

DERIVADOS DE PIRIDO [2,3-D] PIRIMIDINA COMO INHIBIDORES DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a compuestos, composiciones y métodos para el tratamiento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Más particularmente, la invención da a conocer nuevos inhibidores del VIH, composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y métodos para usar dichos compuestos en el tratamiento de la infección por VIH. La invención también se refiere a métodos para preparar los compuestos descritos a continuación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es el resultado de la infección por VIH. El VIH sigue siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial. En 2015, se estima que 36,7 millones de personas vivían con el VIH (incluidos 1,8 millones de niños), lo cual equivale a una prevalencia mundial del VIH del 0,8%. La gran mayoría de ellas vive en países de ingresos bajos y medianos. En el mismo año, 1,1 millones de personas murieron de enfermedades relacionadas con el SIDA.

La terapia actual para individuos infectados con VIH consiste en una combinación de agentes antirretrovirales aprobados. Cerca de cuatro docenas de medicamentos están aprobados actualmente para la infección por VIH, ya sea como agentes únicos, combinaciones de dosis fijas o regímenes de tabletas individuales; los dos últimos contienen 2-4 agentes aprobados. Estos agentes pertenecen a varias clases diferentes, dirigidos a una enzima viral o a la función de una proteína viral durante el ciclo de replicación del virus. Por lo tanto, los agentes se clasifican como inhibidores de la transcriptasa inversa nucleotídicos (INTI), inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleotídicos (NNRTI), inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores de la transferencia de la cadena de la integrasa (INSTI) o inhibidores de entrada (uno, maraviroc, se dirige contra la proteína CCR5 del hospedero, mientras que la otra, enfuvirtida, es un péptido que se dirige contra la región gp41 de la proteína viral gp160). Además, se puede usar un potenciador farmacocinético (cobicistat o ritonavir) en combinación con los agentes antirretrovirales (ARV) que requieren refuerzo.

A pesar del arsenal de agentes y combinaciones de medicamentos, sigue siendo necesario en la medicina contar con nuevos agentes antirretrovirales. La alta heterogeneidad viral, la toxicidad asociada al fármaco, los problemas de tolerabilidad y la mala adherencia pueden conducir al fracaso del tratamiento y pueden dar lugar a la selección de virus con mutaciones que confieren resistencia a uno o más agentes

antirretrovirales o incluso a múltiples fármacos de una clase completa (Beyrer, C., Pozniak A. HIV drug resistance – an emerging threat to epidemic control. *N. Engl. J. Med.* 2017, 377, 1605-1607; Gupta, R. K., Gregson J., et al. HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2017, 18, 346-355; Zazzi, M., Hu, H., Prosperi, M. The global burden of HIV-1 drug resistance in the past 20 years. *PeerJ.* 2018, DOI 10.7717/peerj.4848). Como resultado, se necesitan nuevos medicamentos que sean más fáciles de administrar, que tengan altas barreras genéticas para el desarrollo de resistencia y que tengan una mayor seguridad que los agentes actuales. Ante esta variedad de opciones, los nuevos mecanismos de acción (MOA) que se pueden usar como parte de la terapia antirretroviral (ART) preferida aún pueden desempeñar un papel importante, en la medida que sean eficaces contra los virus resistentes a los agentes actuales. Las mejoras que harían que los medicamentos fueran más fáciles de tomar durante largos períodos de tiempo o incluso durante toda la vida podrían incluir todos o algunos de los siguientes: efectos secundarios reducidos, interacciones medicamentosas reducidas, mayor duración entre la dosificación o vías alternativas de administración que coincidan con las preferencias individuales del paciente. Los objetivos de una seguridad mejorada definitivamente incluirían índices terapéuticos altos hacia [sic] cualquier toxicidad que causaría la interrupción de la dosificación, y también podrían incluir efectos secundarios reducidos o interacciones farmacológicas reducidas. El potencial de usar menos medicamentos en general en un régimen de combinación también probablemente conduciría a un mejor cumplimiento y seguridad. El aumento de la potencia contra el objetivo antiviral, especialmente si se mantiene en presencia de plasma humano y albúmina sérica, también conduciría a una dosis reducida y podría afectar directa y positivamente la duración de la dosificación y el índice terapéutico respecto a los efectos secundarios y las toxicidades. En resumen, se obtendrían los máximos beneficios para los pacientes infectados por el VIH si se descubrieran medicamentos contra el VIH con nuevos mecanismos de acción que también tengan los otros beneficios descritos anteriormente que faciliten el cumplimiento y la seguridad a largo plazo.

A la fecha se han encontrado ciertos compuestos potencialmente terapéuticos que han sido descritos en la técnica y se divulgan en Blair, Wade S. et.al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2009), 53(12), 5080-5087, Blair, Wade S. et al. *PLoS Pathogens* (2010), 6(12), e1001220, Thenin-Houssier, Suzie; Valente, Susana T. *Current HIV Research*, 2016, 14, 270-282, y las solicitudes de patente PCT con los siguientes números: WO 2012065062, WO 2013006738, WO 2013006792, WO 2014110296, WO 2014110297, WO 2014110298, WO 2014134566, WO 2015130964, WO2015130966, WO 2016033243, WO2018035359, y WO2018203235.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

CN1C=NC2=C1C(=C(C=C2)Cl)N(C)C(=O)N3C(=O)c4cc5nc6c(ncn6C7C8C9C7C(C8)C9)cc5c4OCC(F)(F)F

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de la invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un método para tratar la infección por VIH en un humano que comprende administrar un compuesto o sal de la invención.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un compuesto o sal de la invención para su utilización en una terapia.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un compuesto o sal de la invención para su utilización en tratar la infección por VIH en un humano.

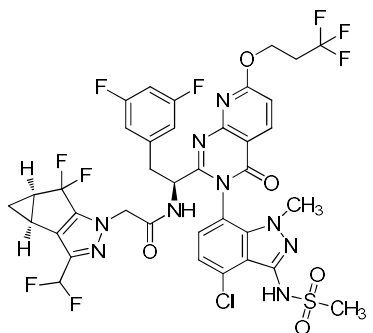
En otro aspecto, la presente invención da a conocer el uso de un compuesto o sal de la invención en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de la infección por VIH en un humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

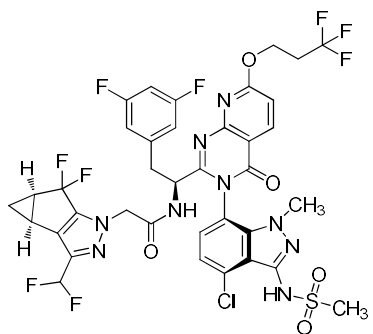
La Figura 1 es un resumen de los perfiles de concentración media en plasma vs tiempo en ratas en el estudio que se describe a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Preferiblemente, los compuestos y sales de la invención poseen la estereoquímica que se ilustra a continuación



En otro aspecto, los compuestos y sales de la invención poseen la estereoquímica que se ilustra a continuación



Las sales de la invención son aptas para uso farmacéutico. Dichas sales pueden ser sales de adición ácida o sales de adición básica. Una revisión de las sales aptas para uso farmacéuticos puede encontrarse en, por ejemplo, Berge *et al*, J. Pharm, Sci., 66, 1-19, 1977.

Las sales de adición ácida aptas para uso farmacéutico representativas incluyen, sin limitarse a las mismas, 4-acetamidobenzoato, acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencensulfonato (besilato), benzoato, bisulfato, bitartrato, butirato, edetato de calcio, camforato, camforsulfonato (camsilato), caprato (decanoato), caproato (hexanoato), caprilato (octanoato), cinamato, citrato, ciclamato, digluconato, 2,5-dihidroxibenzoato, disuccinato, dodecilsulfato (estolato), edetato (etilenediaminatetraacetato), estolato (lauril sulfato), etan-1,2-disulfonato (edisilato), etansulfonato (esilato), formato, fumarato, galactarato (mucato), gentisato (2,5-dihidroxibenzoato), glucoheptonato (gluceptato), gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicerofosforato, glicolato, hexilresorcinato, hipurato, hidrabamina (*N,N'*-

di(dehidroabietil)-etilendiamina), bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, hidroxinaftoato, isobutirato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, malonato, mandelato, metansulfonato (mesilato), metilsulfato, mucato, naftalen-1,5-disulfonato (napadisilato), naftalen-2-sulfonato (napsilato), nicotinato, nitrato, oleato, palmitato, *p*-aminobencensulfonato, *p*-aminosalicilato, pamoato (embonato), pantotenato, pectinato, persulfato, fenilato, feniletilbarbiturato, fosfato, poligalacturonato, propionato, *p*-toluensulfonato (tosilato), piroglutamato, piruvato, salicilato, sebacato, stearato, subato, succinato, sulfamato, sulfato, tanato, tartrato, teocato (8-cloroteofilinato), tiocianato, trietyoduro, undecanoato, undecilenato, y valerato.

Las sales de adición básica aptas para uso farmacéutico representativas incluyen, sin limitarse a las mismas, aluminio, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol (TRIS, trometamina), arginina, benetamina (*N*-bencilfenetilamina), benzatina (*N,N'*-dibenciletilenediamina), *bis*-(2-hidroxietil)amina, bismuto, calcio, cloroprocaina, colina, clemizol (1-*p* clorobencil-2-pirrolidil-1'-ilmetilbenzimidazol), ciclohexilamina, dibenciletilenediamina, dietilamina, dietiltriaina, dimetilamina, dimetiletanolamina, dopamina, etanolamina, etilenediamina, L-histidina, hierro, isoquinolina, lepidina, litio, lisina, magnesio, meglumina (*N*-metilglucamina), piperazina, piperidina, potasio, procaina, quinina, quinolina, sodio, strontio, *t*-butilamina, y cinc.

En una forma de realización, las sales de adición ácida se seleccionan a partir de clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, hidrógeno fosfato, acetato, benzoato, succinato, sacarato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartrato, gluconato, camsilato, metansulfonato, etansulfonato, bencensulfonato, *p*-toluensulfonato y pamoato. En una forma de realización, las sales de adición básica incluyen las sales metálicas (tales como sodio, potasio, aluminio, calcio, magnesio y cinc) y las sales de amonio (tales como sales de isopropilamina, dietilamina, dietanolamina). Pueden utilizarse otras sales (tales como trifluoroatos y oxalatos) para la manufactura de los compuestos y sales de la invención, y las mismas quedan incluidas dentro del alcance de la invención.

Todas las formas estequiométricas y no estequiométricas de las sales del compuesto de la invención quedan abarcadas por el alcance de la invención. Las sales de adición ácida y básica pueden ser preparadas por un químico experto, mediante el tratamiento de un compuesto de la invención con el ácido o la base adecuada en un solvente adecuado, seguido de cristallización y filtración.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también comprenden un vehículo, excipiente, y/o diluyente apto para uso farmacéutico. En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención también comprenden un excipiente apto para uso farmacéutico.

En el método de la presente invención, las rutas de administración preferidas son la oral y mediante inyección para suministrar subcutánea o intramuscularmente. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas preferidas incluyen las composiciones adecuadas para la administración oral (por ejemplo, comprimidos) y las composiciones adecuadas para la inyección, por ejemplo, inyección subcutánea o intramuscular.

En otro aspecto la presente invención da a conocer métodos para prevenir la infección por el VIH en un humano o disminuir el riesgo de infección, siendo que los mismos comprenden administrar un compuesto o sal de la invención. La pre-exposición (profilaxis o PrEP) es cuando las personas que se encuentran en riesgo de infección por VIH se administran diariamente medicamentos para reducir la posibilidad de contraer la infección por VIH. Se ha demostrado que PrEP es efectiva para reducir el riesgo de infección. Tal como se utiliza en la presente memoria, “VIH” o “Virus de Inmunodeficiencia Humana” se refiere a VIH-1 y/o a VIH-2.

Se cree que los compuestos y sales de la invención poseen como diana biológica la cápside de VIH y de ese modo su mecanismo de acción es modificar en una o más formas la función de la cápside del VIH. Por ejemplo, los compuestos y sales de la invención pueden actuar como inhibidores de la cápside.

Los compuestos y sales de la invención pueden emplearse en forma aislada o en combinación con otros agentes terapéuticos. Las terapias de combinación conforme a la presente invención de ese modo comprenden la administración de al menos un compuesto o sal de la invención, y la administración de al menos un agente adicional que puede ser útil en el tratamiento de la infección por VIH. Los compuestos y sales de la invención y cualesquiera otros agentes farmacéuticamente activos pueden administrarse en forma conjunta o separadamente y, cuando se administran en forma separada, la administración puede realizarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden. Por ejemplo, un compuesto o sal de la invención, y el agente adicional pueden formularse y administrarse en forma conjunta en una única composición farmacéutica o pueden formularse y administrarse en forma separada.

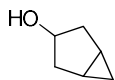
Las cantidades del compuesto y las sales de la presente invención y los agentes farmacéuticamente activos adicionales y los tiempos relativos de administración se seleccionarán de modo tal de obtener el efecto terapéutico combinado deseado. La administración en combinación del compuesto, sales, solvatos, u otros derivados farmacéuticamente aceptables de la presente invención con otros agentes de tratamiento adicionales puede ser en combinación mediante la administración concomitantemente en: (1) una única composición farmacéutica que incluye múltiples compuestos; o (2) composiciones farmacéuticas separadas cada una de las cuales

incluye uno de los compuestos. En forma alternativa, la combinación puede administrarse separadamente en forma secuencial siendo que un agente de tratamiento se administra primero y el otro en segundo lugar o vice versa, y los diferentes agentes podrían administrarse según diferentes regímenes de ser adecuado. Dicha administración secuencial puede ser cercana o remota en el tiempo. Las cantidades del compuesto de la invención, o sales de los mismos y los otros agentes farmacéuticamente aceptables y los tiempos relativos de administración se seleccionarán de modo tal de obtener el efecto terapéutico combinado deseado.

Como tales, los compuestos y sales de la presente invención pueden utilizarse en combinación con uno o más agentes útiles en la prevención o el tratamiento de VIH. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, inhibidores nucleosídicos de la VIH transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de la VIH transcriptasa inversa, inhibidores de la VIH proteasa, inhibidores de la fusión de VIH, inhibidores de unión de VIH, inhibidores de CCR5, inhibidores de CXCR4, inhibidores del brote o la maduración de VIH e inhibidores de la VIH integrasa. Los agentes adicionales adecuados incluyen, por ejemplo, abacavir, atazanavir, bictegravir, cabotegravir, darunavir, delavirdina, didanosina, dideoxiinosina, dolutegravir, doravirina, efavirenz, elvitegravir, emtricitabina, etavirina, fosamprenavir, fostemsavir, GSK3640254, indinavir, islatravir, lamivudina, lopinavir, maraviroc, nelfinavir, nevirapina, raltegravir, rilpiverina, ritonavir, saquinavir, islatravir, stavudina, tipranavir, tenofovir, tenofovir alafenamida, tenofovir disoproxil fumarate, zalcitabina, zidovudina, el anticuerpo N6LS, GSK3739937/VH3739937, y S-648414. Otros agentes adicionales adecuados incluyen Dolutegravir, lamivudina, Fostemsavir, Cabotegravir, maraviroc, rilpiverina, Reyataz, Tenofovir, Afeamide [sic], Efavirenz, Doravirina, y Prezista. Incluso otros agentes adicionales adecuados incluyen Dolutegravir, lamivudina, Fostemsavir, y Cabotegravir. Los agentes preferidos incluyen, por ejemplo, bictegravir, cabotegravir, dolutegravir, fostemsavir, islatravir, y lamivudina. Los agentes particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, bictegravir, cabotegravir, dolutegravir, fostemsavir, y lamivudina.

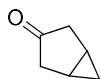
EJEMPLOS

Preparación de biciclo[3.1.0]hexan-3-ol



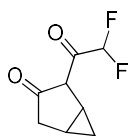
A una solución agitada de ciclopent-3-enol (130 g, 1545 mmol) en DCM (1200 mL) bajo atmósfera de N₂ a 0-5 °C se agregó mediante goteo una solución de dietil cinc en hexano (1,0 M, 3091 mL, 3091 mmol) en el lapso de 3 h. A la solución a 0 °C se agregó mediante goteo una solución de diyodometano (249 mL, 3091 mmol) en DCM (300 mL) en el lapso de 1h. La mezcla de reacción se dejó entibiar hasta 27 °C luego de lo cual se observó la formación de un precipitado blanco. La mezcla se agitó durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 20% EtOAc/pet, R_f = 0,3, no activo al UV, activo a PMA). La mezcla de reacción se detuvo agregando cuidadosamente solución acuosa saturada de NH₄Cl (1,5 L). La mezcla se filtró a través de un lecho de Celite. La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 1L). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y luego se concentraron bajo presión reducida para dar el producto crudo biciclo[3.1.0]hexan-3-ol en la forma de un líquido rojo, 180 g. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,41 - 4,35 (m, 1H), 2,18 - 2,05 (m, 2H), 1,73 (d, J = 13,9 Hz, 2H), 1,35 - 1,25 (m, 2H), 1,21 - 1,14 (m, 1H), 0,57 - 0,43 (m, 2H). GCMS: m/z = 98,1).

Preparación de biciclo[3.1.0]hexan-3-ona



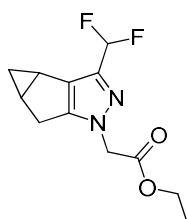
A una solución agitada de biciclo[3.1.0]hexan-3-ol (210 g, 2054 mmol) en DCM (5000 mL) bajo atmósfera de N₂ a 0 °C se agregó en porciones peryodinano de Dess-Martin (954 g, 225 mmol). La mezcla se dejó entibiar hasta 27 °C y luego se agitó durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 20% Acetona/Hex, R_f = 0,3, UV in-active, activo a PMA). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite y el filtrado se lavó con solución acuosa de NaOH (1N, 8x 1 L). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con DCM (5 X 1 L). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y luego se concentraron bajo presión reducida (temperatura del baño: 20 °C) para dar el producto crudo biciclo[3.1.0]hexan-3-ona en la forma de un líquido marrón. El líquido luego se purificó mediante destilación descendente a 70 °C para dar biciclo[3.1.0]hexan-3-ona en la forma de un líquido viscoso amarillo pálido, 125 g (62%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,61 - 2,54 (m, 2H), 2,17 - 2,12 (m, 2H), 1,54 - 1,46 (m, 2H), 0,92 - 0,86 (m, 1H), -0,01 - -0,08 (m, 1H); GCMS: M/Z = 96,1.

Preparación de 2-(2,2-difluoroacetil)biciclo[3.1.0]hexan-3-ona



A una solución agitada de biciclo[3.1.0]hexan-3-ona (125 g, 1274 mmol) en THF (1500 mL) bajo atmósfera de N₂ a -78 °C se agregó LDA (2,0 M en THF, 0,701 L, 1402 mmol). La solución se agitó durante 1 h a -78 °C. A la solución se agregó lentamente en el lapso de 30 minutos una solución de difluoroacetato de etilo (174 g, 1402 mmol) en THF (300 mL) manteniendo una temperatura de -78 °C. La mezcla de reacción se dejó entibiar hasta 27 °C y luego se agitó durante 1 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 20% Acetona/Hexano, R_f = 0,3, activo al UV). La mezcla de reacción se detuvo mediante el agregado de solución acuosa de HCl (1N, 2000 mL). La mezcla se agitó durante 30 min. y luego se extrajo con EtOAc (3 x 1000 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1000 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar 2-(2,2-difluoroacetil)biciclo[3.1.0]hexan-3-ona en la forma de un líquido viscoso amarillo pálido, 180 g (71%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,18 (t, *J* = 54,8 Hz, 1H), 2,70 - 2,62 (m, 1H), 2,35 (d, *J* = 19,4 Hz, 1H), 2,14 (br s, 1H), 1,26 - 1,21 (m, 1H), 1,04-1,03 (m, 1H), 0,22-0,21 (m, 1H), LCMS: M/Z = 173,17).

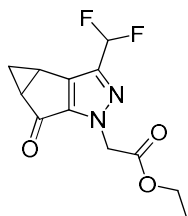
Preparación de 2-(3-(difluorometil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)ato de etilo.



A una solución agitada de 2-(2,2-difluoroacetil)biciclo[3.1.0]hexan-3-ona (180 g, 910 mmol) en etanol (2 L) bajo atmósfera de N₂ a 27 °C se agregó clorhidrato de 2-hidrazinilacetato de etilo (422 g, 2729 mmol) seguido de ácido sulfúrico (20 mL, 375 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min. y luego se calentó hasta 100 °C y se agitó durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 20% Acetona/Hexano, R_f = 0,3, activo al UV). La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc (2000 mL) y se lavó con agua (2 x 1 L), salmuera (1,0 L), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna de silica gel (pet.:acetona 100:0→98:2) para dar 2-(3-(difluorometil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetato de etilo en la forma de un sólido blancuzco, 110 g (46%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 6,86 (t, *J* = 54,8 Hz, 1H), 4,93

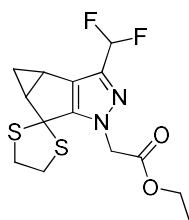
(s, 2H), 4,14 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,88 - 2,79 (m, 1H), 2,76 - 2,68 (m, 1H), 2,14 - 2,04 (m, 2H), 1,19 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,10 - 1,03 (m, 1H), 0,14 (q, $J = 4,3$ Hz, 1H).

Preparación de 2-(3-(difluorometil)-5-oxo-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)ato de etilo.



A una solución agitada de 2-(3-(difluorometil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetato de etilo (110 g, 422 mmol) y Celite (395 g) en ciclohexano (3,5 L) a 0 °C se agregó en porciones dicromato de piridinio (794 g, 2110 mmol). a la mezcla bajo atmósfera de nitrógeno se agregó mediante goteo ter-butilo hidroperóxido de (355 mL, 2130 mmol) en el lapso de 10 min. La mezcla de reacción se entibió hasta 27 °C y luego se agitó a dicha temperatura durante 48 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO_2 , 30% Acetona/pet, $R_f = 0,4$, activo al UV). La mezcla de reacción se filtró, y la torta de filtración se extrajo con EtOAc (1000 mL). El filtrado se lavó con solución acuosa saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2x500 mL); solución acuosa saturada de FeSO_4 (300 mL); y luego salmuera (500 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para obtener el compuesto del título crudo (150 g).

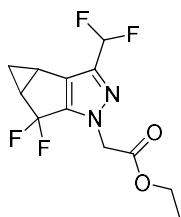
Preparación de 2-(3-(difluorometil)-4,4a-dihidrospiro[ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-5,2'-[1,3]ditiolano]-1(3bH)-il)acetato de etilo.



A una solución agitada de 2-(3-(difluorometil)-5-oxo-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetato de etilo (75 g, 269 mmol) en DCM (1500 mL) a 27 °C bajo atmósfera de nitrógeno se agregó etan-1,2-ditio (43,0 mL, 511 mmol) seguido del agregado de trifluoruro de boro ácido acético [sic] (72,6 mL, 511 mmol). La solución se agitó durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO_2 , 20% Acetona/Pet, $R_f = 0,35$, activo al UV). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y detuvo por dilución mediante el agregado de solución acuosa saturada de NaHCO_3 (500 mL). La mezcla se extrajo con DCM (2 X 1000 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1000 mL),

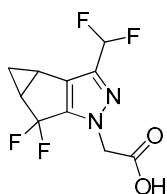
se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para obtener un líquido marrón. Dicho material se sometió a cromatografía en columna de silica gel (Pet.:EtOAc 95:5→90:10) para dar 2-(3-(difluorometil)-4,4a-dihidrospiro[ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-5,2'-[1,3]ditiolano]-1(3bH)-il)acetato de etilo en la forma de un sólido blancuzco, 80 g (74%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,61 (t, *J* = 55,2 Hz, 1H), 5,00 - 4,85 (m, 2H), 4,29 - 4,19 (m, 2H), 3,55 - 3,46 (m, 4H), 2,63 - 2,53 (m, 1H), 2,49 - 2,38 (m, 1H), 1,30 - 1,24 (m, 4H), 0,65 - 0,60 (m, 1H). LCMS M+H = 346,9.

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



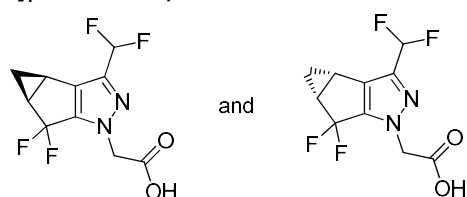
A una solución agitada de 1,3-dibromo-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona (26,3 g, 92 mmol) en DCM (20 mL) a -70 °C bajo atmósfera de N₂ se agregó HF-piridina (2,460 g, 24,83 mmol). La solución se [sic] durante 30 min. A la solución se agregó una solución de 2-(3-(difluorometil)-4,4a-dihidrospiro[ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-5,2'-1,3]ditiolano]-1(3bH)-il)ato de etilo (10 g, 25 mmol) en DCM (20 mL). La mezcla de reacción se dejó entibiar hasta -40 °C y luego se agitó a dicha temperatura durante 1 h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 30% EtOAc/Pet, R_f = 0,3, no activo al UV). La mezcla de reacción se detuvo mediante el agregado de solución acuosa sat. de NaHCO₃ (200 mL). La mezcla se entibió hasta la temperatura ambiente y luego se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 mL); se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro; se filtraron; y se concentraron bajo presión reducida para dar un sólido marrón. Dicho material se sometió a cromatografía en columna de silica gel (Pet.:EtOAc 100:0→75:25) para dar 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)ato de etilo en la forma de un sólido amarillo pálido, 8,5 g (91%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,62 (t, *J* = 55,2 Hz, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,30 - 4,18 (m, 2H), 2,51 - 2,37 (m, 2H), 1,42 - 1,35 (m, 1H), 1,31 - 1,23 (m, 3H), 1,14 - 1,08 (m, 1H). LCMS M+H = 293,07.

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



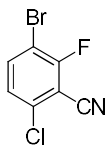
A una solución agitada de 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)ato de etilo (15 g, 50 mmol) en THF (17 mL) y MeOH (66 mL) a 0 °C bajo atmósfera de N₂ se agregó una solución de LiOH (1,788 g, 74,7 mmol) en agua (66 mL). La mezcla de reacción se dejó entibiar hasta 27 °C y luego se agitó durante 3 h a dicha temperatura. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 5% MeOH/DCM, R_f = 0,2, activo al UV). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida; se diluyó con agua (50 mL); y se lavó con EtOAc (2 x 250 mL) para eliminar las impurezas. La capa acuosa se llevó a pH 2-3 utilizando solución acuosa de HCl (1M), luego se extrajo con EtOAc (3 x 1000 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro; se filtraron; y se concentraron bajo presión reducida para dar ácido 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético en la forma de un sólido blancuzco, 14 g (98%). LCMS M+H = 265,15.

Separación para obtener ácido 2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético y ácido 2-((3bR,4aS)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético



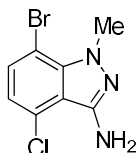
Se disolvió ácido 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético (5,5 g) en isopropanol (20 mL). La solución se sometió en porciones a separación quiral SFC de la siguiente manera: instrumento = Thar 80; columna = Chiralpak IC 30x250mm, 5 micron; solvente A = CO₂ supercrítico; solvente B = isopropanol con 0,5% isopropilamina (v/v); composición del eluyente = 70%A:30%B; velocidad de flujo = 65 g/min; contrapresión = 100 bar; temperatura = 30 °C; volumen de inyección = 2,5 mL; detección = 220 nm. El ácido 2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético se recolectó en la forma de un pico que eluyó entre 7,5 min. y 14 min; el ácido 2-((3bR,4aS)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético se recolectó en la forma de un pico que eluyó entre 2,7 min. y 5,8 min. Para cada enantiómero, la solución resultante se concentró bajo presión reducida y los sólidos resultantes se disolvieron en EtOAc, luego se lavaron dos veces con ácido cítrico acuoso (1M) seguido de agua seguido de salmuera. La solución orgánica se secó sobre Na₂SO₄; se filtró; luego se concentró al vacío para dar el enantiómero separado con 80-90% de recuperación.

Preparación de 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzonitrilo



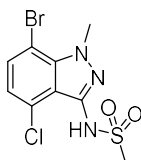
A una solución agitada de 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzaldehído (210,0 g, 0,89 mol, 1,0 equiv.) en agua (2,1 L) a temperatura ambiente se agregó ácido hidroxilamina-O-sulfónico (175,15 g, 1,55 mol, 1,75 equiv.). La mezcla de reacción se calentó hasta 50 °C y se agitó durante 18 h). La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1–1,5 h. Los sólidos se aislaron mediante filtración y luego se lavaron con agua. El sólido húmedo se secó bajo vacío a 50 °C durante 12–15 h para dar 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzaldehído, 190,0 g (91%).

Preparación de 7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-amina



A una solución de 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzonitrilo (360,0 g, 1,55 mol, 1,0 equiv.) en etanol (1,08 L) se agregó sulfato de metilhidrazina (1,11 kg, 7,73 mol, 5,0 equiv.) seguido del agregado de trietilamina (1,3 L, 9,3 mol, 6,0 equiv.) a 25–35 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta 110 °C y se mantuvo [sic] durante 15 h (la reacción se monitoreó mediante TLC). Una vez completada la reacción la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se agregó agua (3,0 L) y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Los sólidos se aislaron mediante filtración y se lavaron con agua. El sólido húmedo se secó bajo vacío a 50 °C durante 12–15 horas. El sólido crudo se purificó mediante cromatografía en columna (10% EA/hexanos hasta 40% EA/hexanos) para dar el producto en la forma de un un sólido amarillo pálido. Rendimiento: 185,0 g (46,0 %).

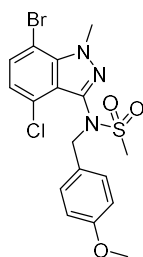
Preparación de N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida



A una solución de 7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-amina (1,40 g, 5,37 mmol) en DCM (30 mL) se agregó base de Hunig's (3,75 mL, 21,5 mmol) y luego la reacción se enfrió en un baño de hielo y se agregó cloruro de metansulfonilo (1,26 mL, 16,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a dicha temperatura durante 1h (se formó un

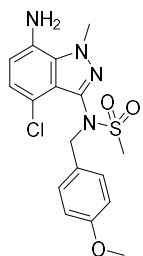
precipitado). La mezcla luego se diluyó con diclorometano (100 mL) y se lavó con agua, 1 M HCl y salmuera, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se resuspendió en EtOH (30 ml) y 10 ml de 20% solución acuosa de NaOH. La mezcla resultante se calentó con una pistola calefactora hasta que se tornó en una solución homogénea y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se diluyó con agua (80 mL) y se acidificó con 1 N HCl (60 mL). El precipitado se filtró, se lavó con agua, y se secó al vacío para dar el producto del título (1,5 g) en la forma de un sólido blancuzco. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,48 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 7,24 (br s, 1H), 6,95 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 4,38 (s, 3H), 3,42 (s, 3H). LC/MS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ = 337,80.

Preparación de N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibencil)metansulfonamida



A una mezcla de N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida (1,3 g, 3,84 mmol) y 1-(clorometil)-4-metoxibenceno (0,625 mL, 4,61 mmol) en DMF (30 mL) se agregó carbonato de cesio (1,626 g, 4,99 mmol) y la mezcla se calentó a 80 °C durante 2 h. La mezcla se vertió en agua (100 mL) y se extrajo con EtOAc (50 ml, 2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante Bioatag (0~35% EtOAc-hexanos) para dar el producto del título (1,5 g) en la forma de una espuma blanca. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,44 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), 6,99 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 6,84 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), 4,99 (br s, 1H), 4,76 (br s, 1H), 4,40 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,01 (s, 3H).

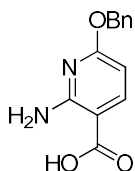
Preparación de N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibencil)metansulfonamida



Conforme a la referencia: Andersen, Jacob *et al*, *Synlett* 2005 (14), 2209-2213. A una mezcla de N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibencil)metansulfonamida (600,0 mg, 1,308 mmol), yoduro de cobre(I) (49,8 mg, 0,262 mmol),

ascorbato de sodio (518 mg, 2,62 mmol) y (1R,2R)-N1,N2-dimetilciclohexano-1,2-diamina (46,5 mg, 0,327 mmol) en NMP (10 mL) se agregó una solución de azida de sodio (255 mg, 3,92 mmol) en agua (2,0 mL). La mezcla luego se cerró herméticamente y se calentó en un sistema de microondas a 120 °C durante 2,5 h. La mezcla luego se filtró a través de un lecho de Celite y el lecho se lavó con EtOAc. El filtrado se vertió en agua (100 mL) y se extrajo con EtOAc (50 ml, 2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó mediante Bioatge (5-100% EtOAc/hexanos) para dar el producto del título (400 mg) en la forma de un sólido blancuzco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 - 7,29 (m, 2H), 6,89 (d, J=7,8 Hz, 1H), 6,85 - 6,79 (m, 2H), 6,48 (d, J=7,8 Hz, 1H), 5,11 (br.s, 1H), 4,81 (br.s, 1H), 4,30 (s, 3H), 3,80 (br s, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,99 (s, 3H). LC/MS (M+H)⁺ = 395,00.

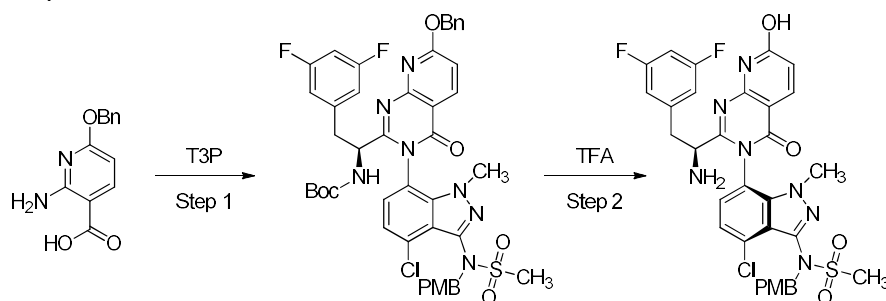
Preparación de ácido 2-amino-6-(benciloxi)nicotínico



Una solución de ácido 2-amino-6-cloronicotínico (5 g, 29 mmol) y ter-butóxido de potasio (9,75 g, 87 mmol) en alcohol bencílico (97 mL) se calentó hasta 120 °C durante 3 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción muy oscura se agregó a agua y se lavó con éter (x3). La capa acuosa luego se acidificó con ácido cítrico 0,5 M. El precipitado oscuro se filtró para dar el producto (4,4 g, 62%), el cual se utilizó en la siguiente reacción sin posterior purificación. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12,40 (br s, 1H), 7,94 (d, J=8,55 Hz, 1H), 7,06-7,52 (m, 5H), 6,04 (d, J=8,24 Hz, 1H), 5,33 (s, 2H). LC/MS: m/z = 245,15 [M+1]⁺.

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

Esquema:



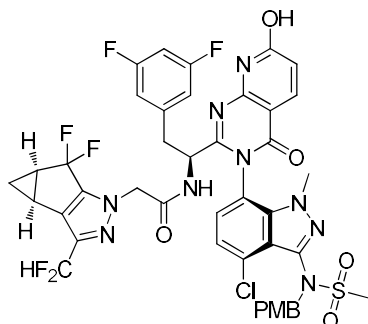
Paso 1:

A una suspensión de ácido (S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-(3,5-difluorofenil)propanoico (5,49 g, 18,23 mmol) y ácido 2-amino-6-(benciloxi)nicotínico (4,45 g, 18,23 mmol) en acetonitrilo (92 mL) (solución amarilla) a -25 °C se agregó piridina (9,83 mL, 122 mmol) seguido de 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrisfosfinano ("T3P", 45,2 mL, 76 mmol). La mezcla de reacción (se tornó en una solución clara después del agregado de T3P) se agitó a -25 °C to 10 °C en el lapso de 4,5 h, luego se agregó N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibencil)metansulfonamida (6 g, 15,19 mmol) y la mezcla se agitó durante 18 h mientras se calentaba hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con 1N NaOH, luego agua, luego ácido cítrico 0,5 M, luego agua, luego se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. El residuo obtenido se purificó sobre sílice (330 g RediSep Gold column) utilizando acetato de etilo en hexanos 0-60 % en el lapso de 15 CV, luego manteniendo 60% EtOAc durante 10 CV. Las fracciones deseadas se combinaron y se concentraron para dar un sólido amarillo pálido (8,1 g, 9,14 mmol, 60,1 % de rendimiento), una mezcla de N-[(1S)-1-[(3P,3P)-7-(benciloxi)-3-(4-cloro-3-{N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamido}-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il]-2-(3,5-difluorofenil)etil]carbamato de ter-butilo (principal) y N-[(1S)-1-[(3M,3M)-7-(benciloxi)-3-(4-cloro-3-{N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamido}-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il]-2-(3,5-difluorofenil)etil]carbamato de ter-butilo (secundario). LC/MS: m/z = 886,25 [M+1]⁺.

Paso 2:

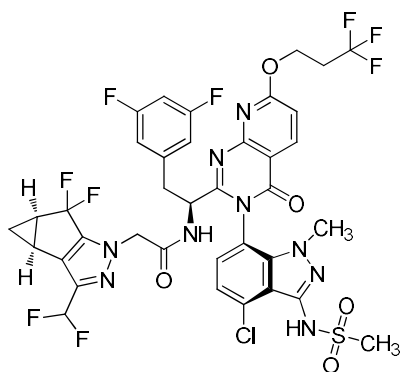
Se agregó TFA (21,1 mL, 274 mmol) a una solución de (S)-(1-(7-(benciloxi)-3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibencil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil]carbamato de ter-butilo (Producto del paso 1, 8,1 g, 9,14 mmol) en diclorometano (45,7 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de coloración amarillo pálido se concentró. El residuo se resuspendió en acetato de etilo, luego se lavó tres veces con 1 N NaOH, luego se secó sobre Na₂SO₄ y luego se concentró al vacío para dar un residuo aceitoso. El residuo se purificó sobre sílica gel (330 g RediSep Gold column) mediante un método de gradiente de Solvente A:Solvente B 65:35→0:100 (2 CV), luego 0:100 (9 CV); Solvente A = hexanos; Solvente B = 9:9:2 hexanos:acetato de etilo:MeOH. El isómero que eluyó primero (principal) se recolectó y se concentró al vacío para dar N-[(6P)-7-{2-[(1S)-1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil]-7-hidroxi-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-3-il}-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il]-N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamida (4,1 g, 5,89 mmol, 64,5 % de rendimiento). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,86 - 7,98 (m, 1 H) 7,15 - 7,37 (m, 4 H) 6,97 - 7,06 (m, 1 H) 6,70 - 6,89 (m, 4 H) 6,40 - 6,48 (m, 1 H) 4,70 - 4,88 (m, 2 H) 3,41 - 3,81 (m, 7 H) 3,20 - 3,28 (m, 1 H) 3,08 - 3,12 (m, 3 H) 2,71 - 2,79 (m, 1 H) 1,69 - 2,00 (m, 2 H). LC/MS: m/z = 696,20 [M+1]⁺.

Preparación de N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibencil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-7-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida



A una solución agitada de N-[(6P)-7-{2-[(1S)-1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil]-7-hidroxi-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-3-il}-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il]-N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamida (0,926 g, 1,330 mmol) en DMF (13 ml) se agregó ácido 2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético (0,351 g, 1,330 mmol), hexafluorofosfato (V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio ("HATU", 0,531 g, 1,397 mmol), y DIPEA (0,581 ml, 3,33 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h después de lo cual la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Las extracciones de EtOAc extracciones se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, y se concentraron al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en silica gel utilizando acetato de etilo en hexanos 10-100% para dar N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibencil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-7-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida (1,1 g, 88%) en la forma de un sólido espumoso de color blancuzco. LC/MS: m/z = 942,25 [M+1]⁺.

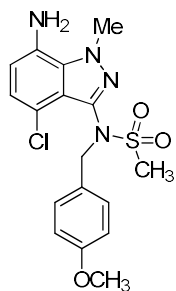
Preparación de Ejemplo 1: N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida



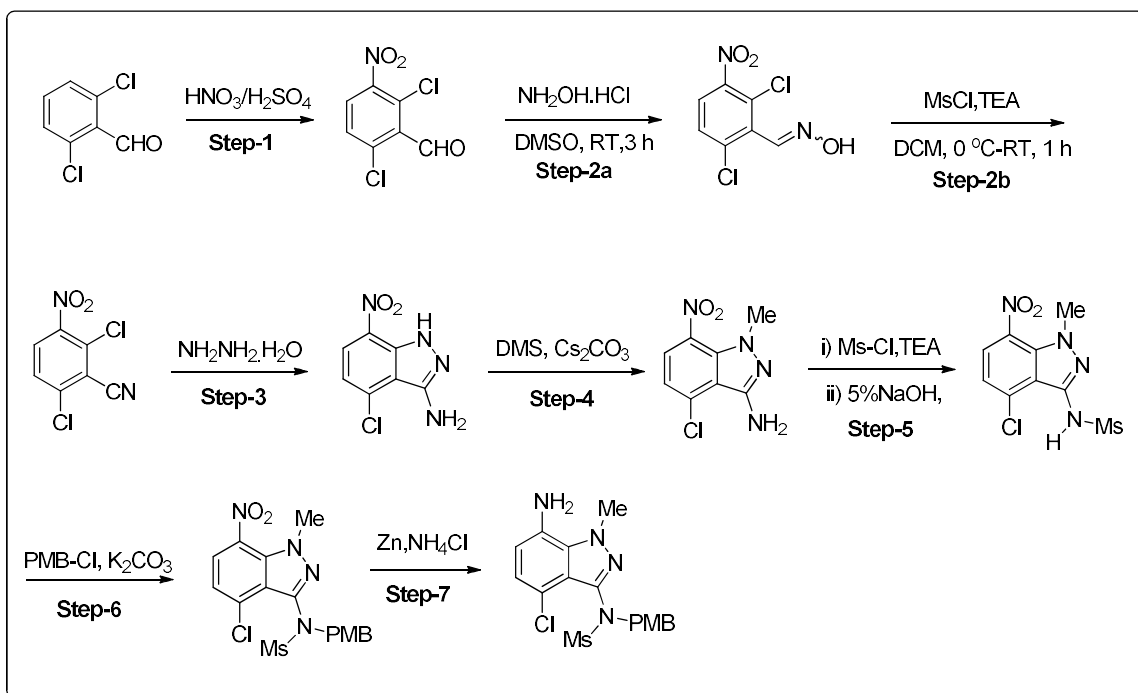
Una solución de (E)-diazene-1,2-dicarboxilato de diisopropilo ("DIAD", 0,125 ml, 0,637 mmol) en THF (0,2 mL) se agregó mediante goteo a una mezcla de N-(1-((3P)-3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibencil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-7-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida (0,2 g, 0,212 mmol)), 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (0,073 g, 0,637 mmol) y trifenilfosfina (0,178 g, 0,679 mmol) en tetrahidrofurano (2,1 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente y luego se concentró al vacío. El residuo se purificó sobre silica gel (24 g RediSep Gold column) utilizando a gradiente de acetato de etilo en hexanos 0-60 % en el lapso de 15 CV, y luego manteniendo acetato de etilo en hexanos 60 % durante 5 CV. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y luego se concentraron para dar un sólido amarillo. Dicho sólido se resuspendió en DCM (1 mL):TFA (0,5 mL); la solución se enfrió hasta 0 °C; y a la solución se agregó ácido triflúrico (0,057 mL, 0,637 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h y luego se concentró al vacío. El residuo se resuspendió en acetato de etilo; se lavó con 1 N NaOH; se lavó con ácido cítrico 0,5M; se secó sobre Na₂SO₄; se filtró; y luego se concentró al vacío. El residuo se sometió a cromatografía en silica gel (24 g RediSep Gold column) utilizando acetato de etilo en hexanos 0-60 % en el lapso de 20 CV, luego a 60 % acetato de etilo durante 10 CV. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y luego se concentraron al vacío para dar N-(1-((6P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida (0,078 g, 0,081 mmol, 38,0 % de rendimiento) en la forma de un sólido marrón. ¹H NMR (500 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 8,46 - 8,53 (m, 1 H) 7,28 - 7,34 (m, 1 H) 7,19 - 7,24 (m, 1 H) 7,03 - 7,09 (m, 1 H) 6,53 - 6,81 (m, 4 H) 4,80 (dd, J=5,96, 2,98 Hz, 3 H) 4,49 - 4,62 (m, 2 H) 3,58 - 3,62 (m, 3 H) 3,40 - 3,49 (m, 1 H) 3,22 - 3,24 (m, 3 H) 3,06 - 3,14 (m, 1 H) 2,80 - 2,89 (m, 2 H) 2,37 - 2,44 (m, 2 H) 1,32 - 1,37 (m, 1 H) 0,96 - 1,01 (m, 1 H). Método del análisis LCMS: columna = Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, partículas de 1,7 µm; volumen de inyección = 5,00 µL; velocidad de flujo = 0,80 mL/min; solvente A = 95:5 agua:MeCN con 0,1% v/v ácido fórmico; Solvente B = 5:95 Agua:MeCN con 0,1% v/v ácido fórmico; perfil de elución =

comienzo %B: 0, fin %B: 100, tiempo del gradiente: 3,5 min. luego mantener a 100% B durante 1 min.; longitud de onda de detección 1 = 220 nm, longitud de onda 2 = 254 nm. LCMS tiempo de retención = 3,097 min; m/z = 918,05 [M+1]⁺.

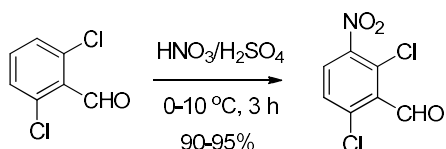
Alternate preparación de N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibencil)metansulfonamida



Esquema de síntesis:



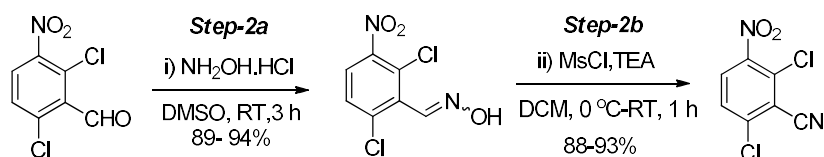
Paso 1: Preparación de 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldeído



A una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (5,63 L, 4,5 V) en un matraz de fondo redondo a 0-5 °C se agregó 2,6-diclorobenzaldeído (1,25 kg, 7,10 mol, 1,0 equiv.) en porciones a una temperatura inferior a 15 °C. La masa de reacción se agitó a 0-5 °C durante 30 min.

Una solución de mezcla de nitración recién preparada [Preparada a partir de H₂SO₄ concentrado (0,425 L, 0,34 V) y 70% HNO₃ (0,85 kg, 13,49 mol, 1,30 equiv.) a 0 °C] se agregó a la mezcla de reacción anterior a una temperatura inferior a 10 °C [Nota: la reacción es levemente exotérmica (3-6 °C); de modo tal que el agregado se prefiere a una temperatura inferior]. La mezcla de reacción se agitó a 5-10 °C durante 2-3 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), se detuvo con agua enfriada con hielo (18,75 L, 15 V) a una temperatura inferior a 25 °C. Luego la masa de reacción se dejó entibiar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. Los sólidos se aislaron mediante filtración y luego se lavaron con agua (2,5 L, 2,0 V). El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 60-90 min. El sólido crudo húmedo primero se secó bajo atmósfera de aire; luego en un horno de aire caliente a 50-55 °C durante 10-12 h (hasta que el contenido de humedad no fue mayor que 5,0 %) para dar el producto del título secado, 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldehído (1,44 kg, 92% de rendimiento) en la forma de un sólido amarillo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.44 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H).

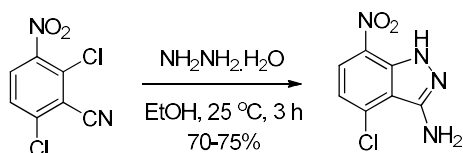
Paso 2: Preparación de 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitrilo



(Paso-2a) A una solución de DMSO (5,9 L, 5,0 V) en un matraz de fondo redondo se agregó 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldehído (1,17 kg, 5,31 mol, 1,0 equiv.) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 30 min a temperatura ambiente, se agregó clorhidrato de hidroxilamina (0,63 kg, 9,04 mol, 1,70 equiv.) y la masa de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la masa de [reacción] se detuvo mediante el agregado de agua enfriada con hielo (18,0 L, 15,0 V) agregada a una tasa suficiente para mantener la temperatura por debajo de 30 °C (Observación: se forman sólidos después del agregado). La masa de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 60-90 min. Los sólidos se aislaron mediante filtración; se lavaron con agua (2,5 L, 2,0 V); seguido de lavado con una mezcla de acetona y hexanos (6,0 L, 1:1 ratio). El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 60-90 min. El sólido húmedo primero se secó al aire y luego se secó en un horno de aire caliente a 50-55 °C durante 10-12 h (hasta que el contenido de humedad no fuera superior a 1,0 %) para dar el producto deseado secado, oxima de 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldehído (1,22 kg, 92% de rendimiento) en la forma de un sólido blancuzco. El producto crudo (el cual contenía 10-20% de 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitrilo) se utilizó directamente en el siguiente paso sin posterior purificación.

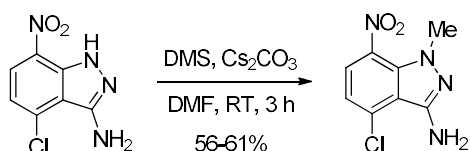
(Paso-2b) A una solución agitada de la oxima cruda (preparación antes descrita, 1,13 kg, 4,80 mol, 1,0 equiv.) en DCM (9,04 L, 8,0 V) a 0-5 °C se agregó trietilamina ("TEA", 1,02 kg, 10,09 mol, 2,1 equiv.). Después de agitar durante 5 min, se agregó cloruro de metansulfonilo (0,60 kg, 5,29 mol, 1,1 equiv.) (Observación: se observa una exoterma durante el agregado) lentamente a 15 °C. Luego la masa de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30-45 min. Una vez completada la reacción (el progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC; Fase móvil: 20% acetato de etilo en hexanos), la masa de reacción se diluyó con agua (6,78 L, 6,0 V); la capa orgánica se separó; y la capa acuosa se extrajo con DCM (3,4 L, 3,0 V). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5,65 L, 5,0 V); se secaron sobre Na₂SO₄; y se concentraron bajo vacío. Los sólidos crudos resultantes se trituraron con hexanos (4,50 L, 4,0 V) a temperatura ambiente. El material húmedo se secó en un horno de aire caliente a 50-55 °C durante 5- 6 h para obtener el producto seco, 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitrilo (0,95 kg, 91% de rendimiento) en la forma de un sólido amarillo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,07 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H).

Paso 3: Preparación de 4-cloro-7-nitro-1*H*-indazol-3-amina



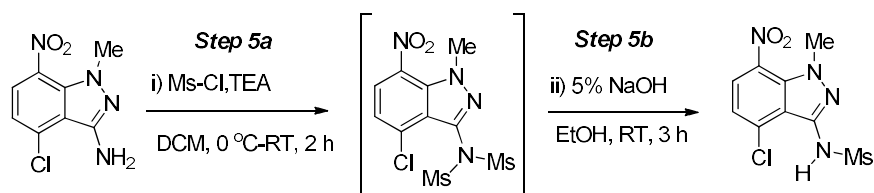
A una solución agitada de 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitrilo (750,0 g, 3,45 mol, 1,0 equiv.) en etanol (7,5 L, 10,0 V) a 15-20 °C. se agregó lentamente hidrato de hidrazina (519,0 g, 10,36 mol, 3,0 equiv.) manteniendo la masa de reacción por debajo de 25 °C (Observación: el agregado [sic] es levemente exotérmico y después del agregado comenzará a formarse un sólido). La temperatura de la mezcla de reacción se elevó lentamente hasta temperatura ambiente y luego la mezcla se agitó durante 3 h (Observación: la cantidad de sólidos aumentará durante este lapso). Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla se diluyó con agua (7,5 L, 10,0 V) y se continuó agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Los sólidos se aislaron mediante filtración y luego se lavaron con agua (2,25 L, 3,0 V). El sólido húmedo se lavó con una mezcla de acetona (1,875 L, 2,5 V) y hexanos (1,875 L, 2,5 V) en relación 1:1. El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 60-90 min. El sólido húmedo finalmente se secó en un horno de aire caliente durante 7- 8 h a 50 °C (hasta que el contenido de humedad alcanzó un valor por debajo de 1,5%) para obtener el producto seco, 4-cloro-7-nitro-1*H*-indazol-3-amina (549,0 g, 75% de rendimiento) en la forma de un sólido de coloración rojo ladrillo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10,36 (bs, 1H), 8,20 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,07 (d, *J* = 8,40 Hz, 1H), 4,73 (bs, 2H).

Paso 4: Preparación de 4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-amina



A una solución agitada de 4-cloro-7-nitro-1*H*-indazol-3-amina (500 g, 0,42 mol, 1,0 equiv.) en DMF (5,0 L, 10,0 V) a 5-10 °C se agregó lentamente carbonato de cesio (Cs₂CO₃) (1,91 kg, 5,88 mol, 2,5 equiv.) manteniendo la masa de reacción por debajo de 10 °C. Después de agitar durante 5-10 min, se agregó sulfato de dimetilo (326,3 g, 2,59 mol, 1,1 equiv.) manteniendo la masa de reacción por debajo de 10 °C (Nota: El agregado lento se prefiere para obtener una regioselectividad favorable). Luego, la temperatura de reacción se elevó lentamente hasta temperatura ambiente y se continuó agitando durante otras 2 h a la misma temperatura. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la masa de reacción se detuvo mediante el agregado de agua enfriada con hielo (15,0 L, 30,0 V) y la mezcla resultante luego se agitó durante 6-8 h a temperatura ambiente. Los sólidos se aislaron mediante filtración y luego se lavaron con agua (1,5 L, 3,0 V). El sólido húmedo se lavó con IPA (1,5 L, 3,0 V) seguido de hexanos (1,0 L, 2,0 V). El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 60-90 min. El sólido húmedo se secó en un horno de aire caliente durante 7-8 h a 50 °C (hasta que el contenido de humedad estuvo por debajo de 1,0%). El material aislado, 4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-amina (319,0 g, 60% de rendimiento), se utilizó en el siguiente paso sin posterior purificación. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,97 (d, *J* = 8,32 Hz, 1H), 6,97 (d, *J* = 8,24 Hz, 1H), 4,63 (bs, 2H), 3,96 (s, 3H).

Paso 5: Preparación de *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)metansulfonamida

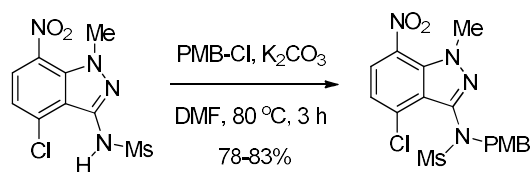


(Paso 5a) A una solución de 4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-amina (625,0 g, 2,76 mol, 1,0 equiv.) en DCM (6,25 L, 10,0 V) a 0-5 °C. se agregó trietilamina (TEA) (837,0 g, 8,27 mol, 3,0 equiv.); seguido del agregado de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (20,60 g, 0,165 mol, 0,06 equiv.). La masa de reacción se agitó durante 5-10 min., luego se agregó cloruro de metansulfonilo (MsCl) (790,0 g, 6,89 mol, 2,5 equiv.) lentamente manteniendo la masa de reacción por debajo de 10 °C. La mezcla de reacción se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y luego se agitó durante 1,5-2,0 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla se diluyó con agua (6,25 L, 10,0 V) y luego se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. La capa orgánica se separó, y la capa acuosa se extrajo con DCM (6,25 L, 10,0 V). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,25 L, 2,0 V), se secaron sobre Na₂SO₄ y se

concentraron para dar los sólidos crudos. Los sólidos se trituraron con hexanos (1,25 L, 2,0 V) a temperatura ambiente para obtener el compuesto intermedio, *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(metilsulfonyl)metansulfonamida, el cual se utilizó directamente en el siguiente paso.

(ii) A una solución agitada de *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(metilsulfonyl)metansulfonamida (preparada más arriba) en etanol (10,5 L, 20,0 V) a temperatura ambiente se agregó lentamente una solución acuosa de NaOH al 5% (4,38 L, 7,0 V) [Nota: El agregado lento se prefiere mediante embudo formador de gotas]. La masa de reacción se agitó a la misma temperatura durante 3 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC) [preparación de la muestra para el análisis de TLC: ~1,0 ml de muestra se acidificaron con solución acuosa de HCl 2,0 N hasta alcanzar un pH de 2-3, se extrajeron con acetato de etilo y la capa orgánica se analizó mediante TLC], la masa de reacción se enfrió hasta 0-5 °C y el pH se llevó a 2-3 mediante el agregado de solución acuosa de HCl 2,0 N (3,13 L, 5,0 V) manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 10 °C [Nota: después del agregado de HCl tuvo lugar la precipitación, la cual aumentó con la agitación]. La mezcla de reacción se entibió hasta la temperatura ambiente y luego se agitó durante 1,5-2,0 h. Los sólidos obtenidos se aislaron mediante filtración y luego se lavaron con agua (1,25 L, 2,0 V); seguido de lavado con hexanos (1,25 L, 2,0 V). El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 60-90 min. El material húmedo se secó en un horno de aire caliente a 50 °C durante 6-7 h (hasta que el contenido de humedad se situó por debajo de 1,0%) para obtener el producto seco, *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)metansulfonamida (640,0 g, 76%) en la forma de un sólido amarillo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,05 (d, *J* = 8,32 Hz, 1H), 7,32 (bs, 1H), 7,17 (d, *J* = 8,28 Hz, 1H), 4,15 (s, 3H), 3,45 (s, 3H).

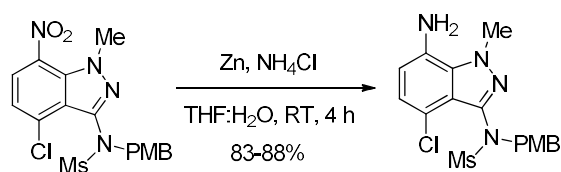
Paso 6: Preparación de *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibencil)metansulfonamida



A una mezcla de *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)metansulfonamida (635,0 g, 2,08 mol, 1,0 equiv.) y 1-(clorometil)-4-metoxibenceno (359,0 g, 2,30 mol, 1,1 equiv.) en DMF (6,35 L, 10,0 V) a temperatura ambiente se agregó carbonato de potasio (374,7 g, 2,70 mol, 1,3 equiv.). La mezcla de reacción se calentó hasta 80-90 °C y se mantuvo a dicha temperatura durante 3 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante TLC), la mezcla se vertió en agua enfriada con hielo (19,05 L, 30,0 V) [Nota: detener la reacción lentamente con agitación vigorosa se prefiere a fin de evitar que el producto forme grumos en la medida en que precipita]. Los sólidos resultantes se aislaron

mediante filtración y se lavaron con agua (1,90 L, 3,0 V); luego los sólidos se lavaron con hexanos (1,27 L, 2,0 V). El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 60-90 min. El sólido aislado se disolvió en acetato de etilo (12,7 L, 20,0 V) y se agregó carbón vegetal (63,5 g). La mezcla se calentó hasta 60-70 °C y luego se agitó durante 30-45 min. a dicha temperatura. La mezcla se filtró mientras que aún estaba caliente (40-50 °C) a través de un lecho de Celite y el lecho de Celite luego se extrajo con acetato de etilo (3,17 L, 5,0 V). Los filtrados combinados se concentraron hasta sequedad bajo presión reducida hasta que la temperatura se situó por debajo de 50 °C. se agregó acetato de etilo (0,635 L, 1,0 V) a los sólidos a temperatura ambiente. La suspensión de sólidos resultante se agitó durante 30 min. Los sólidos se aislaron mediante filtración y luego se lavaron con hexanos (1,27 L, 2,0 V). El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 45-60 min. para dar el producto *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibencil)metansulfonamida (705,0 g, 80% de rendimiento) en la forma de un sólido amarillo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,99 (d, *J* = 8,24 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 8,68 Hz, 2H), 7,19 (d, *J* = 8,24 Hz, 1H), 6,80 (d, *J* = 8,44 Hz, 2H), 4,95-4,76 (m, 2H), 4,17 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,01 (s, 3H).

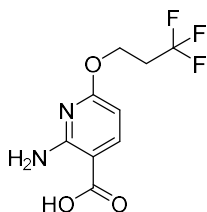
Paso 7: Preparación de *N*-(7-Amino-4-cloro-1-metil-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibencil)metansulfonamida



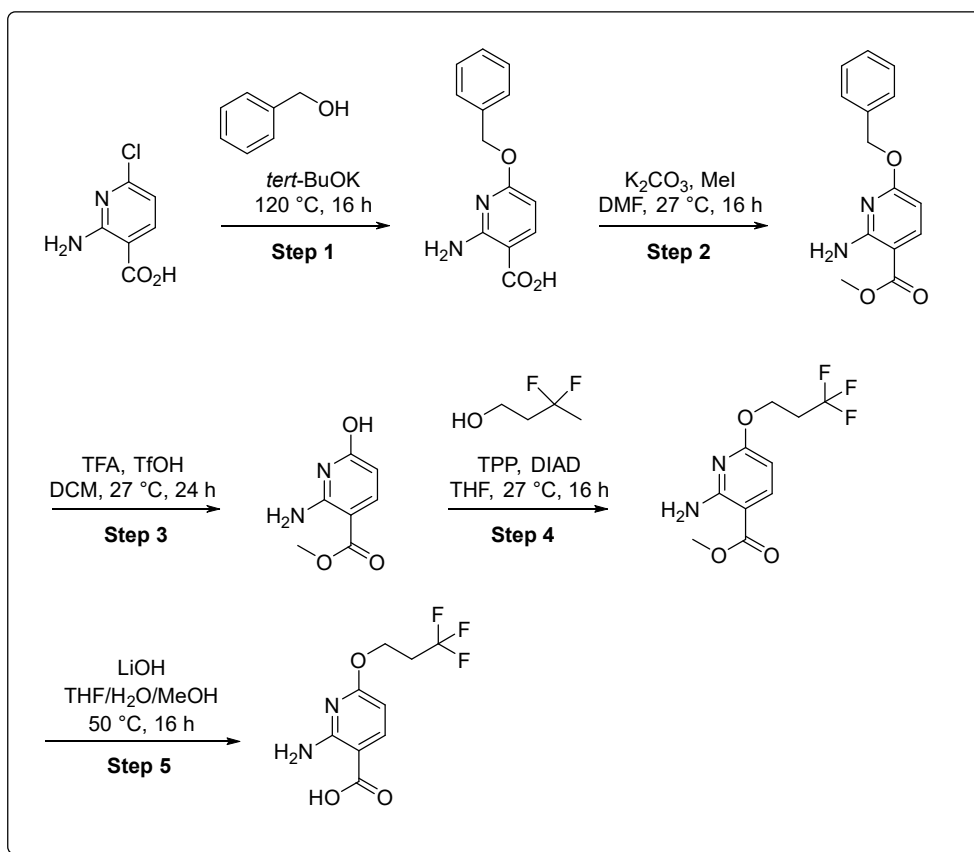
A una suspensión agitada de polvo de cinc (540,0 g, 8,23 mol, 10,0 equiv.) en una mezcla de THF (3,50 L, 10,0 V) y agua (7,0 L, 20,0 V) a temperatura ambiente se agregó cloruro de amonio (NH₄Cl) (449,0 g, 8,23 mol, 10,0 equiv.). a la mezcla se agregó *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibencil)metansulfonamida (350 g, 0,823 mol, 1,0 equiv.) en THF (7,0 L, 20,0 V). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3-4 h. Una vez completada la reacción (monitoreada mediante in-process TLC/HPLC), la mezcla se diluyó con acetato de etilo (3,5 L, 10,0 V) y agua (1,12 L, 2,5 V). La mezcla se agitó durante 15 min. La masa de reacción se filtró a través de un lecho de Celite lavando con acetato de etilo (1,75 L, 5,0 V). Se recolectó el filtrado bifásico, y se separaron las fases. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3,50 L, 10,0 V). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3,50 L, 10 V), se secaron sobre Na₂SO₄, y luego se concentraron al vacío para dar un producto crudo sólido. Al producto crudo se agregó MTBE (3,25 L, 10 V) y la suspensión se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Los sólidos se aislaron mediante filtración. El agua residual se eliminó a partir de los sólidos manteniendo la filtración a vacío durante 30-45 min. El producto húmedo se secó en un horno de aire caliente (50 °C) durante 2 h para dar el

producto del título, *N*-(7-amino-4-cloro-1-metil-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibencil)metansulfonamida (276,0 g, 85% de rendimiento) en la forma de un sólido blancuzco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,29-7,26 (m, 2H), 6,86-6,79 (m, 2H), 6,42 (d, *J* = 7,80 Hz, 1H), 4,99-4,70 (m, 2H), 4,25 (s, 3H), 3,77 (s, 5H), 2,98 (s, 3H).

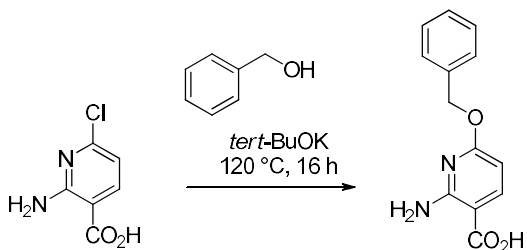
Preparación de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotínico ácido



Esquema de síntesis

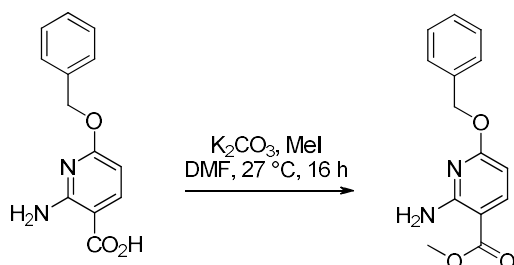


Paso 1: Preparación de ácido 2-amino-6-(benciloxi) nicotínico



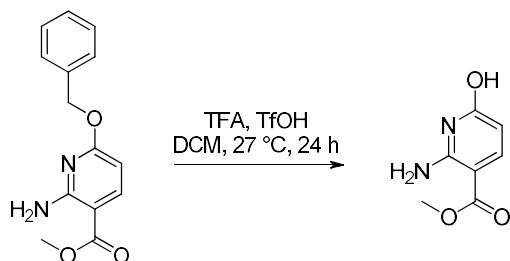
A una solución agitada de ácido 2-amino-6-cloronicotínico (200 g, 1159 mmol) en alcohol bencílico (1400 mL, 13464 mmol) a 26 °C bajo atmósfera de N₂ se agregó ter-butóxido de potasio (390 g, 3477 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 120 °C y se agitó durante 16 hr a dicha temperatura. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 10% MeOH en DCM, R_f = 0,5). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con agua (3 L) y se extrajo con éter dietílico (2 x 1000 mL). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se acidificó hasta pH 4 utilizando solución acuosa de ácido cítrico (0,5 M). El sólido precipitado se recolectó mediante filtración y luego se secó bajo presión reducida para dar ácido 2-amino-6-(benciloxi) nicotínico en la forma de un sólido blancuzco (220 g, rendimiento = 72%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,56 - 12,32 (m, 1H), 7,97 - 7,91 (m, 1H), 7,52 - 7,41 (m, 2H), 7,38 - 7,11 (m, 5H), 6,03 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 5,39 - 5,31 (m, 2H). Pureza de LCMS = 93%; *m/z* = 245,29 (M+H).

Paso 2: Preparación de 2-amino-6-(benciloxi)nicotinato de metilo



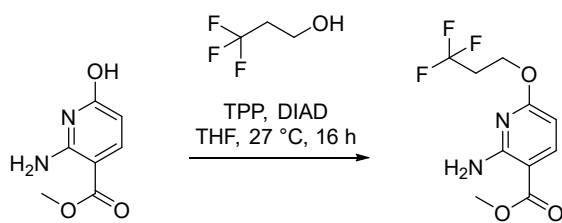
A una solución agitada de ácido 2-amino-6-(benciloxi)nicotínico (220 g, 901 mmol) en DMF (2,5 L) a 26 °C bajo atmósfera de N₂ se agregaron lentamente carbonato de potasio (373 g, 2702 mmol) y yodometano (0,282 L, 4504 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 27 °C durante 16 hr. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 40% EtOAc/Pet., R_f = 0,6). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con agua (5 L). El sólido precipitado se aisló mediante filtración y luego se secó bajo vacío para dar 2-amino-6-(benciloxi)nicotinato de metilo en la forma de un sólido blancuzco (220 g, rendimiento= 92 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,42–7,40 (m, 2H), 7,39–7,35 (m, 2H), 7,34–7,31 (m, 1H), 6,01 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,33 (s, 2H), 3,84 (s, 3H). Pureza de LCMS = 97%, *m/z* = 259,30 (M+H).

Paso 3: Preparación de 2-amino-6-hidroxinicotinato de metilo



A una solución agitada de 2-amino-6-(benciloxi)nicotinato de metilo (50 g, 190 mmol) en DCM (500 mL) a 26 °C bajo atmósfera de N₂ se agregaron lentamente TFA (800 mL) y ácido triflico (25 mL, 282 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 26 °C durante 16 hr. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, EtOAc, R_f = 0,2). Una vez completada la reacción, los volátiles se eliminaron bajo vacío para dar el producto crudo. Dicho material se trituró con éter dietílico (3 x 1000 mL) y el sólido precipitado luego se aisló mediante filtración. Al sólido se agregó agua (2 L) y la mezcla luego se [sic] 5 h. El sólido se recolectó mediante filtración y se lavó con agua. El sólido se secó bajo vacío para dar 2-amino-6-hidroxinicotinato de metilo en la forma de un sólido blancuzco (25 g, rendimiento = 78%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 10,92–10,76 (m, 1H), 7,65 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 7,43–6,87 (m, 2H), 5,51 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,69 (s, 3H). Pureza de LCMS = 99,32%; *m/z* = 169,32 (M+H). La ausencia de TFA y ácido triflico en el producto se confirmó mediante ¹⁹F-NMR. El producto se utilizó directamente en el siguiente paso sin posterior purificación.

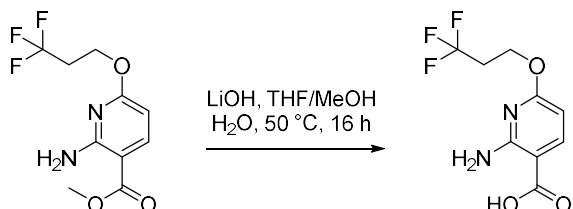
Paso 4: Preparación de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo



A una solución agitada de 2-amino-6-hidroxinicotinato de metilo (50 g, 297 mmol) en THF (1000 mL) a 27 °C bajo atmósfera de nitrógeno se agregó trifetilfosfina (156 g, 595 mmol). La masa de reacción se enfrió hasta 0 °C y a la masa de reacción se agregó mediante goteo azodicarboxilato de diisopropilo (“DIAD” 116 mL, 595 mmol). La solución se agitó durante 30 min. A la solución a 0 °C se agregó una solución de 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (52,4 mL, 595 mmol) en THF (200 mL). La masa de reacción luego se dejó lentamente entibiar hasta 27 °C y luego se agitó a dicha temperatura durante 16 hrs. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 10% EtOAc/Pet. R_f = 0,5). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con agua (500 mL) y se extrajo con EtOAc (2 x 500 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (500 mL) y luego solución de salmuera (500 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y luego se concentró bajo presión reducida para dar el producto crudo en la forma de un semisólido amarillo (100 g). Dicho material se purificó mediante cromatografía en silica gel eluyendo con 5-10% EtOAc en pet. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para dar 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo en la forma de un líquido amarillo (50 g, 60% de rendimiento). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,01 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,21–6,85 (brs, 1H), 6,04 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,50 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,63–2,55 (m, 2H). Método del análisis LCMS: Columna = Acquity BEH C18 (50 mm x 2,1

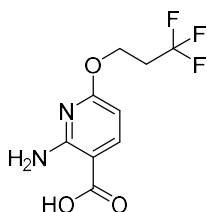
mm, 1,7 μ m); Fase móvil A = Ácido fórmico en agua al 0,05%; Fase móvil B = 0,05% Ácido fórmico en CAN; Gradiente = Tiempo (min.) / %B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temperatura de la columna = 35 °C; Velocidad de flujo = 0,6 mL/min. Resultado de LCMS: Tiempo de retención = 2,03 mins.; Ion observado = 265,15 (M+H); Pureza de LCMS = 93%.

Paso 5: Preparación de ácido 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotínico

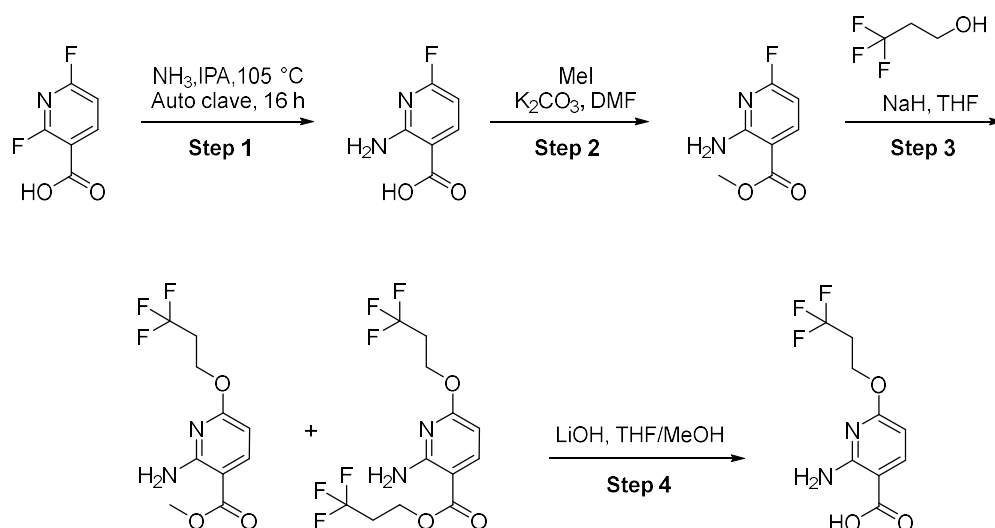


A una solución agitada de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo (50 g, 189 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (500 mL), metanol (150 mL) y agua (80 mL) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno se agregó hidróxido de litio monohidrato (22,66 g, 946 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 16 hr. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 50% EtOAc/Pet. R_f = 0,3). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para dar un residuo acuoso. El residuo luego se acidificó hasta pH 4 mediante el agregado de 1N HCl. El precipitado obtenido se recolectó mediante filtración y se lavó con agua (500 mL), luego n-hexano (400 mL), y luego se secó para dar ácido 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotínico en la forma de un sólido blancuzco (45 g, 90% de rendimiento). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 12,47 (brs, 1H), 7,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,35 (brs, 2H), 5,98 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 4,44 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,84–2,73 (m, 2H). El producto se utilizó directamente en el siguiente paso sin posterior purificación.

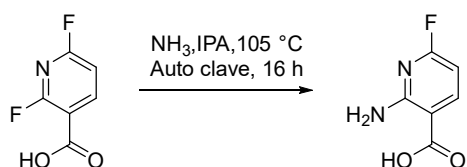
Alternativa para la preparación de ácido 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotínico



Esquema de síntesis



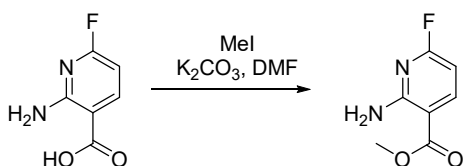
Paso 1: Preparación de ácido 2-amino-6-fluoronicotínico



Una mezcla de NH_3 en agua ("25% NH_3 en H_2O ", 1 L, 4V) e isopropanol (6,5 L, 26V) a 0 °C se burbujeó gas amoníaco durante 1 hr. A la mezcla en un autoclave (25 L) se agregó ácido 2,6-difluoronicotínico (250 g, 1571 mmol). luego la mezcla de reacción se agitó a 105 °C durante 20 hr. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO_2 , 80% EtOAc/Pet. $R_f = 0,3$). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta 20 °C y luego se concentró bajo presión reducida a una temperatura inferior a 20 °C hasta alcanzar un volumen de 4-6V (1,5 L). El residuo se disolvió en agua (5 L) y se acidificó hasta pH 2-3 mediante el agregado de 2N HCl (700 mL) y luego se agitó durante 2 hrs. El precipitado obtenido se recolectó mediante filtración y se lavó con agua (4000 mL), luego n-hexano (5000 mL), y luego se secó en un horno de vacío a 50 °C para dar ácido 2-amino-6-fluoronicotínico en la forma de un sólido blancuzco (250 g, 92% de rendimiento). Dicho producto se mezcló con el producto de otros batches preparados mediante el mismo método para dar 2000 g de producto combinado. El solvente residual se eliminó a partir de los sólidos suspendiendo los sólidos en tolueno (10 L) y luego eliminando el tolueno mediante destilación. los sólidos resultantes se secaron en un horno de vacío a 60 °C durante 7 días para dar ácido 2-amino-6-fluoronicotínico en la forma de un sólido blancuzco (1,6 kg, 77% de rendimiento). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12,94 (brs, 1H), 8,17 (t, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,56 (brs, 2H), 6,25 (dd, $J = 8,2, 2,8$ Hz, 1H). Metodología LCMS: Columna = Acquity BEH C18 (50 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 μm); Fase móvil A = Ácido fórmico en agua al 0,05%; Fase móvil B = Ácido fórmico en acetonitrilo al 0,05%; Gradiente = Tiempo (min) /%B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temperatura de la columna = 35 °C; Velocidad de flujo= 0,6 mL/min. Resultado de LCMS:

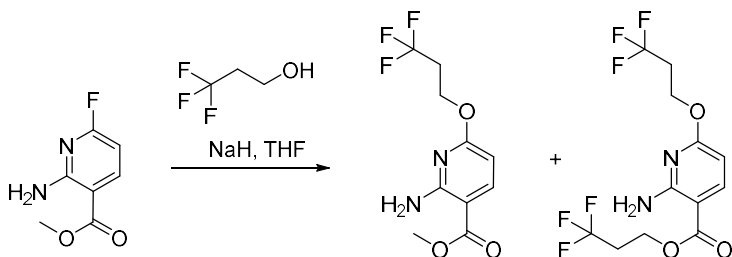
Tiempo de retención = 1,24 mins.; Ion observado = 157,04 (M+H); Pureza de LCMS = 96%.

Paso 2: Preparación de 2-amino-6-fluoronicotinato de metilo



A una solución agitada de ácido 2-amino-6-fluoronicotínico (150 g, 961 mmol) y carbonato de potasio (398 g, 2882 mmol) en DMF (1500 mL) se agregó yodometano (300 mL, 4804 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 27 °C durante 16 hr bajo atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 30% EtOAc/Pet. R_f = 0,7). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se detuvo mediante el agregado de agua enfriada con hielo (5000 mL). El precipitado obtenido se recolectó mediante filtración y se lavó con agua (2000 mL), luego n-hexano (1000 mL), y luego se secó para dar 2-amino-6-fluoronicotinato de metilo en la forma de un sólido marrón (120 g, 70% de rendimiento). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 8,20 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 7,54 (brs, 2H), 6,29 (dd, J = 8,4, 2,8 Hz, 1H), 3,82 (m, 3H). Metodología LCMS: Columna = Acquity BEH C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm); Fase móvil A = Ácido fórmico en agua al 0,05%; Fase móvil B = Ácido fórmico en acetonitrilo al 0,05%; Gradiente = Tiempo (min) /%B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temperatura de la columna = 35 °C; Velocidad de flujo = 0,6 mL/min. Resultado de LCMS: Tiempo de retención = 1,55 mins.; Ion observado = 171,07 (M+H); Pureza de LCMS = 96%. El producto se utilizó directamente en el siguiente paso sin posterior purificación.

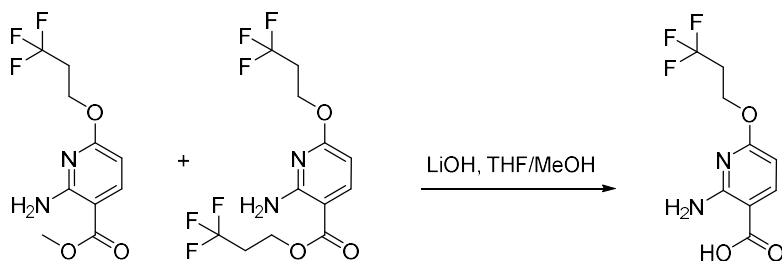
Paso 3: Preparación de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo y 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de 3,3,3-trifluoropropilo



A una solución agitada de 2-amino-6-fluoronicotinato de metilo (25 g, 147 mmol) y 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (15,54 mL, 176 mmol) en THF (500 mL) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno se agregó en porciones hidruro de sodio (60% disp. en oil, 8,82 g, 220 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y luego se dejó lentamente entibiar hasta 27 °C y se agitó a dicha temperatura durante 16 hrs. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 10% EtOAc/Pet. R_f = 0,5). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y detuvo por dilución con solución

acuosa saturada de NH_4Cl (300 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (2×500 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera (200 mL), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron, y luego se concentraron bajo presión reducida para dar 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo en la forma de un líquido amarillo (40 g). También se observó la formación del producto secundario proveniente de la transestrificación 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de 3,3,3-trifluoropropilo durante la reacción. Metodología LCMS: Columna = Acquity BEH C18 (50 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 μm); Fase móvil A = Ácido fórmico en agua al 0,05%; Fase móvil B = Ácido fórmico en acetonitrilo al 0,05%; Gradiente = Tiempo (min)/%B: 0/97, 0,4/97, 2,5/2, 3,4/2, 3,5/97, 4,0/97; Temperatura de la columna = 35 °C; Velocidad de flujo = 0,6 mL/min. Resultado de LCMS: Tiempo de retención = 2,04 & 2,22 mins.; Ion observado = 265,18 & 347,29 (M+H); Pureza de LCMS = 57% de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo y 15% de 3,3,3-trifluoropropil 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de. This crude product mixture se mezcló con otros dos batches de productos crudos preparados mediante el mismo método (40 g y 50 g). el material combinado (130 g) se purificó mediante cromatografía en silica gel eluyendo con 10-20% EtOAc en pet. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para dar una mezcla en la relación 6:1 de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo y 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de 3,3,3-trifluoropropilo en la forma de un líquido amarillo pálido (100 g, 90% de rendimiento). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,02–7,97 (m, 1H), 7,04–6,48 (m, 1H), 6,08–6,03 (m, 1H), 4,52–4,47 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 2,64–2,54 (m, 2H). Metodología LCMS: Columna = Acquity BEH C18 (50 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 μm); Fase móvil A = Ácido fórmico en agua al 0,05%; Fase móvil B = Ácido fórmico en acetonitrilo al 0,05%; Gradiente = Tiempo (min)/%B: 0/97, 0,4/97, 2,5/2, 3,4/2, 3,5/97, 4,0/97; Temperatura de la columna = 35 °C; Velocidad de flujo = 0,6 mL/min. Resultado de LCMS: Tiempo de retención = 2,02 & 2,21 mins.; Ion observado = 264,97 & 346,97 (M+H); Pureza de LCMS = 66% de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo y 11% de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de 3,3,3-trifluoropropilo.

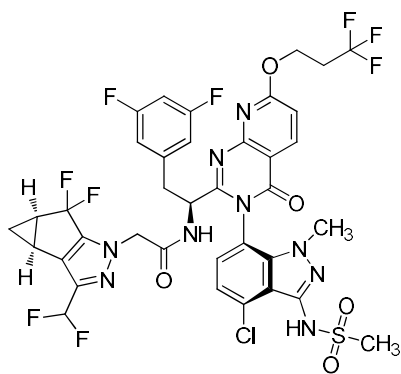
Paso 4: Preparación de ácido 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotínico



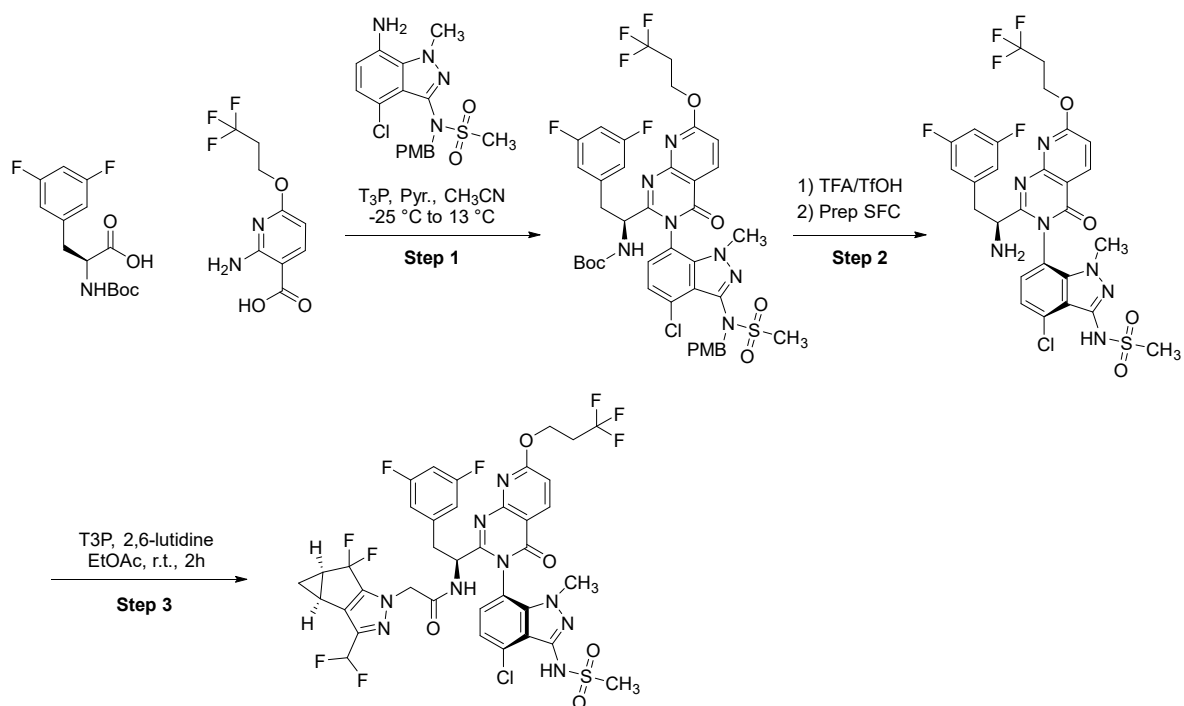
A una solución agitada de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de metilo y 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinato de 3,3,3-trifluoropropilo (6:1, 100 g, 310 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (800 mL), metanol (300 mL) y agua (200 mL) a 27 °C

bajo atmósfera de nitrógeno se agregó hidróxido de litio monohidrato (37,2 g, 1552 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 8 hr. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 50% EtOAc/Pet. R_f = 0,3). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo acuoso resultante luego se acidificó hasta pH 4 mediante el agregado de 1N HCl. El precipitado obtenido se recolectó mediante filtración y se lavó con agua (2000 mL), luego n-hexano (1000 mL), y luego se secó para dar ácido 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotínico en la forma de un sólido blancuzco (80 g, 97% de rendimiento). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,47 (brs, 1H), 7,93 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,33 (brs, 2H), 5,99 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,45 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,83–2,74 (m, 2H). Metodología LCMS: Columna = Acquity BEH C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm); Fase móvil A = Ácido fórmico en agua al 0,05%; Fase móvil B = Ácido fórmico en acetonitrilo al 0,05%; Gradiente = Tiempo (min.)/%B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temperatura de la columna= 35 °C; Velocidad de flujo = 0,6 mL/min. Resultado de LCMS: Tiempo de retención = 1,73 mins.; Ion observado = 251,17 (M+H); Pureza de LCMS = 94%. El producto se utilizó directamente en el siguiente paso sin posterior purificación.

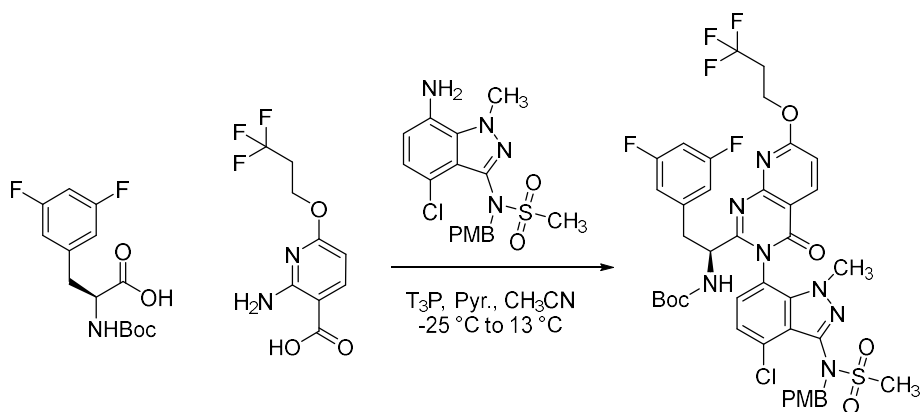
Alternativa para la Preparación del Ejemplo 1: N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida



Esquema de síntesis



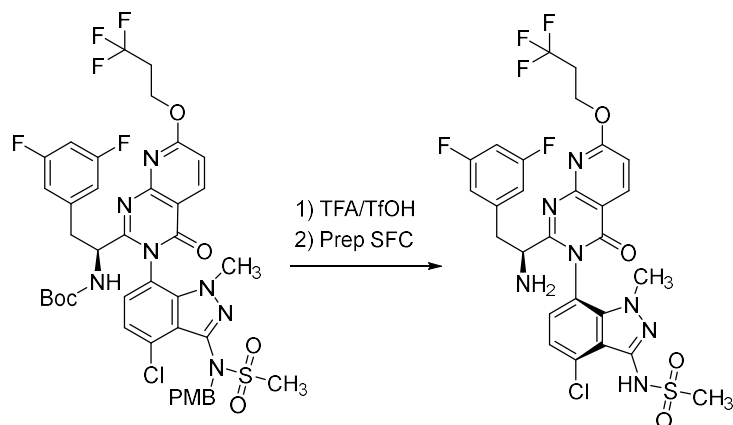
Paso 1: Preparación de (S)-1-(3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibencil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)carbamato de *ter*-butilo



A una solución agitada de ácido (S)-2-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-3-(3,5-difluorofenil)propanoico (62,3 g, 207 mmol) y ácido 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotínico (55 g, 207 mmol) en acetonitrilo (600 mL) bajo atmósfera de nitrógeno a -25 °C se agregó piridina (41,8 mL, 517 mmol). A la mezcla resultante se agregó mediante goteo en el lapso de 15 min. 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrfosfinano ("T3P", 50% en peso en EtOAc, 609 mL, 1033 mmol). La solución se agitó a -25 °C durante 1 hr, luego se dejó lentamente entibiar hasta 13 °C y se agitó durante 5 hrs. A la solución a 13 °C se agregó N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibencil)metansulfonamida (82 g, 207 mmol). La masa de reacción luego se dejó lentamente entibiar hasta 27 °C y luego se agitó a dicha temperatura durante 16 hrs. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC

(SiO₂, 40% EtOAc/Pet. R_f = 0,4). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc (500 mL) y luego se lavó con ácido cítrico acuoso (0,5M, 2 × 500 mL) seguido de solución acuosa de NaOH (1N, 3 × 500 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y luego se concentró bajo presión reducida para dar el producto crudo (180 g), el cual se purificó mediante cromatografía en silica gel eluyendo con 40-50% EtOAc en pet. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para dar (S)-(1-(3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibencil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)carbamato de ter-butilo en la forma de un sólido blancuzco (85 g, 39% de rendimiento). El producto es una mezcla de atropisómeros homoquirales (diastereómeros). Metodología LCMS: Columna = Acquity BEH C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm); Fase móvil A = Ácido fórmico en agua al 0,05%; Fase móvil B = Ácido fórmico en acetonitrilo al 0,05%; Gradiente = Tiempo (min)/%B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temperatura de la columna = 35 °C; Velocidad de flujo = 0,6 mL/min. Resultado de LCMS: Tiempo de retención = 2,46 mins.; Ion observado = 892,53 (M+H); Pureza de LCMS = 85%.

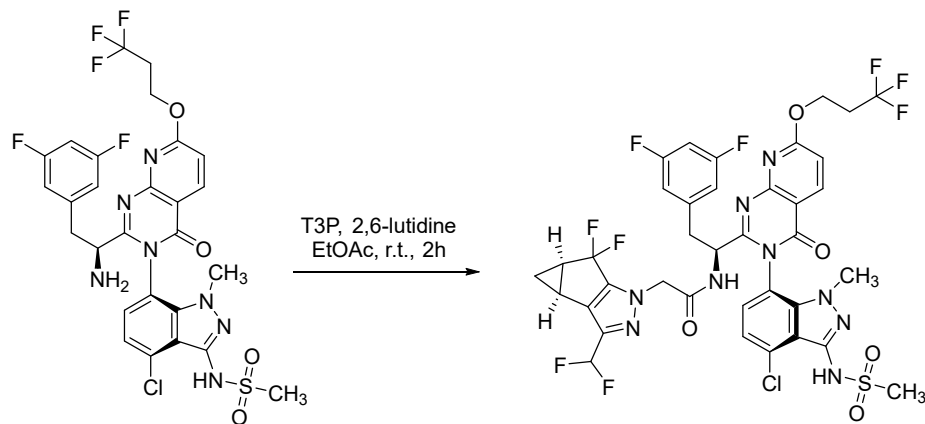
Paso 2: Preparación de (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida



A una solución agitada de (S)-(1-(3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibencil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)carbamato de ter-butilo (85 g, 95 mmol) en DCM (300 mL) a 0 °C se agregó ácido trifluoroacético (TFA, 294 mL, 3810 mmol) seguido de ácido triflico (25,4 mL, 286 mmol). La solución se dejó entibiar hasta 27 °C y se agitó durante 1 hr bajo atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (SiO₂, 80% EtOAc/Pet. R_f = 0,3). Una vez completada la reacción, los volátiles se eliminaron bajo una corriente leve de nitrógeno gaseoso. El residuo se disolvió en EtOAc (1000 mL) y se lavó con 2N NaOH (2 × 500 mL) y luego salmuera (500 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y luego se concentró bajo presión

reducida para dar el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en silica gel eluyendo con 50-99% EtOAc en Pet. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para dar (S)-N-(7-(2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida en la forma de un sólido amarillo pálido (63 g). El material es una mezcla de atropisómeros homoquirales (diastereómeros) en una relación 64:26 según la determinación por LCMS. Dicho producto se mezcló con otros tres batches de productos preparados conforme a la misma técnica. El producto combinado (195 g) se disolvió en metanol:acetonitrilo (80:20, 1300 mL) y dicha solución se purificó mediante prep-SFC utilizando la siguiente metodología: Columna = (R,R) Whelk-01 (250 × 30 × 5 μm); eluyente = CO₂:MeOH (65:35); Velocidad de flujo = 90 g/min; Contrapresión = 120 bar; Detección = 214 nm (UV); Tiempo de stack = 14 min; Carga por inyección = 430 mg. El pico puro principal se recolectó y se concentró bajo presión reducida para sólo el estereoisómero (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida en la forma de un sólido blancuzco (113 g, 63% de rendimiento). ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 8,42 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,06 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,03–6,97 (m, 1H), 6,75–6,70 (m, 2H), 4,73–4,69 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,58–3,52 (m, 1H), 3,28–3,24 (m, 1H), 3,22 (s, 3H), 2,97–2,83 (m, 3H). Metodología LCMS: Columna = XBridge C18 (75 mm × 4,6 mm, 3,5 μm); Fase móvil A = bicarbonato de amonio en agua 5 mM; Fase móvil B = acetonitrilo; Gradiente = Tiempo (min)/%B: 0/5, 0,5/5, 1,0/15, 4,0/98, 7,0/98, 7,5/5, 8,0/5; Temperatura de la columna = 35 °C; Velocidad de flujo = 1,3 mL/min. Resultado de LCMS: Tiempo de retención = 4,03 mins.; Ion observado = 672,07 (M+H); Pureza de LCMS = 98%; Pureza de HPLC = 98%; Pureza de HPLC quiral = 98%.

Paso 3: Preparación de N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida



A una solución agitada de (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida (55 g, 82 mmol) y ácido 2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acético (22,70 g, 86 mmol) en acetato de etilo (818 ml) se agregó 2,6-lutidina (23,83 ml, 205 mmol). A la mezcla se agregó mediante goteo 2,4,6-trióxido de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatрифосфинано ("T3P", 50% en peso en acetato de etilo) (97 mL, 164 mmol) luego de lo cual la temperatura interna aumentó desde 17 °C hasta 24 °C. La mezcla se agitó durante 2 hrs a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante el agregado de agua (500 mL). Se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua (500 mL), luego se secó sobre Na₂SO₄. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta 1/4 del volumen original para dar el producto crudo en la forma de una solución en acetato de etilo.

Se preparó un segundo batch de producto siguiendo la misma técnica excepto por la siguiente modificación: la reacción se llevó a cabo utilizando (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida (53,4 g, 79 mmol) y las cantidades de todos los demás reactivos se ajustaron en forma acorde. Tras la resuspensión se llevó a cabo un lavado con salmuera (300 mL) antes del secado sobre MgSO₄.

Los productos crudos se combinaron y luego se adsorbieron sobre Celite. El polvo resultante se sometió a cromatografía en silica gel (3 kg RediSep Gold column) eluyendo con acetato de etilo en hexanos 30-85%. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para dar una espuma amarilla. El material se colocó bajo alto vacío durante 18h. El material se convirtió en un polvo fino utilizando un mortero y una mano y los sólidos se colocaron en un horno de vacío a 50 °C durante 48 h para dar N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida en la forma de un polvo amarillo (134,1 g, 90% de rendimiento). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,84 - 9,91 (1 H, m) 9,49 (1 H, d, *J*=8,34 Hz) 8,47 (1 H, d, *J*=8,35 Hz) 7,79 (1 H, d, *J*=7,75 Hz) 7,49 (1 H, d, *J*=8,05 Hz) 7,11 (1 H, d, *J*=8,64 Hz) 6,80 - 7,09 (2 H, m) 6,66 (2 H, dd, *J*=8,20, 2,24 Hz) 4,69 - 4,75 (3 H, m) 4,57 (1 H, d, *J*=16,39 Hz) 4,48 (1 H, ddd, *J*=11,03, 8,35, 2,68 Hz) 3,51 (3 H, s) 3,42 (1 H, dd, *J*=14,01, 2,38 Hz) 3,20 (3 H, s) 3,05 (1 H, dd, *J*=14,01, 11,03 Hz) 2,89 - 2,99 (2 H, m) 2,42 - 2,48 (2 H, m) 1,32 - 1,40 (1 H, m) 0,81 - 0,86 (1 H, m). Metodología LCMS: Columna = Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, partículas de 1,7 μm); Solvente A = Agua:MeCN (95:5) con 0,1% v/v Ácido fórmico; Solvente B = MeCN:Agua (95:5) con 0,1% v/v Ácido fórmico; Gradiente = Tiempo (min)/%B: 0/0, 3,5/100, 4,5/100; Velocidad de flujo = 0,8 mL/min. Resultado de

LCMS: Tiempo de retención = 3,173 min; Masa observada = 917,95 (M+H). Pureza determinada mediante UPLC = 99,8%.

Nomenclatura del Ejemplo 1:

El compuesto del Ejemplo 1 como se preparó anteriormente es un material homoquiral que contiene quiralidad axial. La quiralidad axial se puede describir utilizando la nomenclatura P/M como se detalla en el IUPAC Gold Book (doi: 10.1351/goldbook.A00547). Sin embargo, en este momento solo hay disponible un número limitado de herramientas de software que son capaces de generar nombres químicos que contienen nomenclatura P/M, e incluso hay menos opciones disponibles para convertir nombres químicos usando esta nomenclatura en representaciones estructurales de las moléculas. Por lo tanto, para mayor claridad y conveniencia, a continuación se proporcionan varios nombres para el Ejemplo 1:

El nombre del Ejemplo 1 generado por ChemDraw Ultra 12 (nomenclatura P/M ausente) es:

N-((S)-1-(3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida

El nombre químico del Ejemplo 1 generado por JChem para Excel (incluye nomenclatura P/M) es:

N-[(1S)-1-[(3P,3P)-3-(4-cloro-3-metansulfonamido-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il]-2-(3,5-difluorofenil)etil]-2-[(2S,4R)-9-(difluorometil)-5,5-difluoro-7,8-diazatriciclo[4.3.0.0^{2,4}]nona-1(6),8-dien-7-il]acetamida

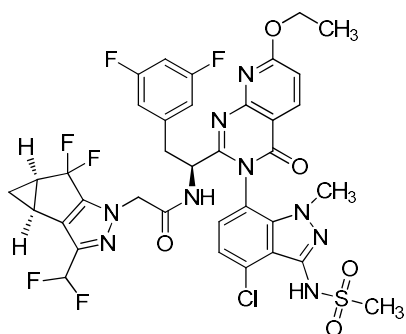
El nombre químico generado por ChemDraw Ultra 12 con nomenclatura P/M ingresada manualmente es:

N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida

Ensayos comparativos:

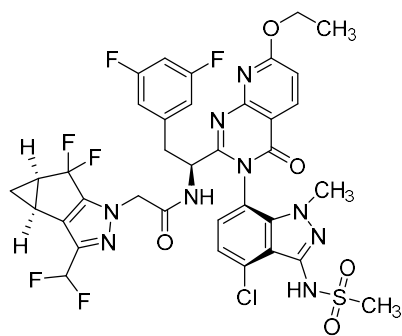
El compuesto del Ejemplo 1 se comparó con el compuesto del Ejemplo 60.2 descrito en el documento WO2018203235 (Esquema 1) en varios ensayos. Para los propósitos de estas comparaciones, elegimos usar material homóquiral de cada compuesto, ya que este nivel de pureza es más representativo de lo que se usaría en ensayos clínicos en humanos. Específicamente, la rotación restringida alrededor del enlace C-N indicado del indazol da lugar a atropisómeros (diastereómeros) tanto en el Ejemplo 1 como en el Ejemplo 60.2 que pueden separarse por cromatografía y no se interconvierten a temperatura ambiente. De esa forma, usando cromatografía, aislamos en forma pura los estereoisómeros representados en el Esquema 2.

Scheme 1

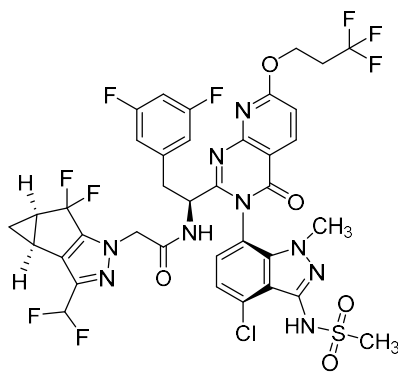


Example 60.2 as depicted
in WO2018203235

Scheme 2



Example 60.2 depicting the
stereochemistry of the homochiral
material used in the described
comparative tests.



Example 1 of the present patent
depicting the stereochemistry of the
homochiral material used in the
described comparative tests.

Procedimiento general para cuantificar el compuesto mediante LC-MS/MS:

Todas las muestras in vitro se inyectaron en un sistema Exion LC 4500 Triple Quad™ LC-MS/MS. La columna analítica utilizada fue una Phenomenex C18 (C18, 4,6 mm x 50 mm, 5 μm) mantenida a temperatura ambiente. La fase móvil A consistió en ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua MilliQ. La fase móvil B consistió en metanol al 100%. El caudal fue de 1 ml/min. El gradiente fue el siguiente: la fase móvil B se incrementó

linealmente de 5% a 90% en el lapso de 0,7 min, se mantuvo al 90% durante 1,4 min y se mantuvo al 5% durante 0,7 min.

Todas las muestras in vivo fueron inyectadas en un sistema Triple QuadTM 6500 LC-MS/MS con columnas mantenidas a 60°C. La fase móvil A consistió en H₂O, NH₄OAc 1 mM, ácido fórmico al 0,025%. La fase móvil B consistió en MeOH, NH₄OAc 5 mM. El caudal fue de 0,6 ml/min. La columna y el gradiente de elución se seleccionaron de uno de los métodos de análisis generales que se describen a continuación.

Método general de análisis A:

Columna = Waters X-Bridge BEH C18 (2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm); Gradiente: Tiempo(min.)/%B = 0,0/10, 0,2/10, 0,8/90, 1,3/90, 1,31/10, 2,0/10.

Método general de análisis B:

Columna = Waters BEH C18 (2,1 x 50mm, partículas de 2,5 µm); Gradiente: Tiempo(min.)/%B = 0,0/10, 0,2/10, 0,8/90, 1,3/90, 1,31/10, 2,0/10.

Método general de análisis C:

Columna = Waters BEH C18 (2,1 x 50mm, partículas de 1,7 µm); Gradiente: Tiempo(min.)/%B = 0,0/2, 0,40/2, 0,7/65, 1,3/90, 1,9/90, 1,91/2, 2,5/2.

Procedimiento para medir la potencia y la citotoxicidad:

Las células MT-2, las células 293T y el clon de ADN proviral del virus NL4-3 se obtuvieron del Programa NIH AIDS Research and Reference Reagent. Las células MT-2 se propagaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10%, penicilina G 100 mg/ml y estreptomicina hasta 100 unidades/ml. Las células 293T se propagaron en medio DMEM suplementado con FBS inactivado por calor al 10%, penicilina G 100 mg/ml y estreptomicina 100 mg/ml. Para obtener el virus de referencia utilizado en estos estudios, se usó un clon proviral NL4-3 recombinante, en el que se reemplazó una sección del gen nef con el gen de luciferasa Renilla. El virus recombinante se preparó mediante transfección del clon proviral NL4-3 recombinante en células 293T usando el reactivo de transfección Transit-293 de Mirus Bio LLC (Madison, WI). El sobrenadante se recogió después de 2-3 días y la cantidad de virus presente se tituló en células MT-2 usando la actividad de la enzima luciferasa como marcador midiendo la actividad de la enzima luciferasa. La luciferasa se cuantificó usando el sustrato de células vivas EnduRen de Promega (Madison, WI). Las actividades antivirales de los compuestos contra el virus recombinante se cuantificaron midiendo la

actividad de luciferasa en células MT-2 infectadas durante 4-5 días con el virus recombinante en presencia de diluciones en serie del compuesto.

La concentración efectiva del 50% (CE_{50}) se calculó utilizando la forma exponencial de la ecuación del efecto medio donde $(Fa) = 1/[1 + (ED_{50}/\text{conc. de fármaco})^m]$ (Johnson VA, Byington RT. Infectivity Assay. In Techniques in HIV Research. ed. Aldovini A, Walker BD. 71-76. New York: Stockton Press.1990). La concentración inhibitoria del 50% (CE_{50}) se calculó utilizando la forma exponencial de la ecuación del efecto medio donde el porcentaje de inhibición = $1/[1 + (CE_{50}/\text{concentración del fármaco})^m]$, donde m es un parámetro que refleja la pendiente de la curva de respuesta vs concentración.

La citotoxicidad del compuesto y los correspondientes valores de CC_{50} se determinaron usando el mismo protocolo que se describe en el ensayo antiviral, excepto que se usaron células no infectadas. La citotoxicidad se evaluó el día 4 en células MT2 no infectadas utilizando un ensayo colorimétrico basado en una sal interior de XTT (2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida) (Sigma -Aldrich, St Louis, Mo).

Resultados:

Las potencias del Ejemplo 1 y del Ejemplo 60.2 están dentro del error del ensayo inicial de virología anti-VIH (Ejemplo 1 de $EC_{50} = 25 \pm 8$ pM, Ejemplo 60.2 de $CE_{50} 60.2 = 18 \pm 13$ pM). Debe tenerse en cuenta que la CE_{50} del Ejemplo 1 era 0,034 nM cuando se ensayó inicialmente, pero una prueba adicional dio lugar a un promedio revisado de 25 ± 8 pM. La citotoxicidad CC_{50} medida es $>0,5 \mu\text{M}$ y $>10 \mu\text{M}$ para el Ejemplo 1 y el Ejemplo 60.2, respectivamente.

Procedimiento para medir el metabolismo en microsomas hepáticos:

Los microsomas hepáticos de humanos, ratas y monos se descongelaron y se diluyeron hasta una concentración final de 1 mg/ml en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,4). Los compuestos de prueba y los controles se prepararon a una concentración final 100x de 1 μM en acetonitrilo:agua 1:1 (v/v) y se dividieron en alícuotas en una mezcla microsómica. La mezcla se preincubó a 37°C en un baño de agua con agitación durante 10 minutos. Las incubaciones se realizaron por duplicado. Se incluyeron tres controles en las incubaciones; warfarina, fenacetina y verapamilo. Después de la preincubación, la reacción se inició con NADPH a una concentración final de 1 mM. A los 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos, se retiraron 25 μL de muestra que se inactivó con 300 μL de acetonitrilo que contenía la referencia interna (Telmisartan). Las muestras se sometieron a vórtice durante 5 minutos a 1200 rpm y luego se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. Una parte alícuota de 100 μL de sobrenadante se diluyó tres veces con agua y se inyectó en un sistema Exion LC 4500 Triple Quad LC-MS/MS. Los resultados se informaron como un

porcentaje remanente del progenitor que se calculó a partir de las relaciones de áreas de pico del compuesto de prueba remanente después de cada punto del tiempo y en comparación con la incubación de tiempo cero.

Resultados:

El Ejemplo 1 es seis veces más estable en los microsomas de hígado de perro que el Ejemplo 60.2, y el Ejemplo 1 es al menos dos veces más estable en los microsomas de hígado de mono que el Ejemplo 60.2. Estos datos sugieren que el Ejemplo 1 debería ser significativamente más estable que el Ejemplo 60.2 al metabolismo in vivo en perros y monos.

Tabla 1.

<i>Estabilidad en microsoma de hígado</i>	Ejemplo 1	Ejemplo 60.2
T _{1/2} en microsoma de hígado humano	> 120 min.	> 120 min.
T _{1/2} en microsoma de hígado de rata	> 120 min.	> 120 min.
T _{1/2} en microsoma de hígado de perro	105 min.	17 min.
T _{1/2} en microsoma de hígado de mono	> 120 min.	55 min.

Procedimiento para medir el metabolismo en hepatocitos humanos:

Los hepatocitos de humanos, monos, perros, ratas y ratones en suspensión criopreservados se descongelaron y se diluyeron en el medio E de William precalentado (pH 7,4). Se agregaron alícuotas de la suspensión de hepatocitos a las soluciones de trabajo del compuesto de prueba preparadas en el medio E de William precalentado (pH 7,4) para obtener concentraciones finales de 0,5 μ M en $0,5 \times 10^6$ células por mililitro y DMSO $\leq 0,25\%$. Estas muestras se incubaron a 37°C con dióxido de carbono al 5% y se agitaron a 200 rpm. Las incubaciones se realizaron en singulete. En los puntos de tiempo 0, 10, 30, 60, 120 y 240 minutos, se extrajo una alícuota de 50 μ L de las mezclas de incubación que se agregó a una solución de 100 μ L de acetonitrilo que contenía la referencia interna y la mezcla se agitó en vórtex y luego se centrifugó a 4°C y 3500 rpm durante 15 minutos. Después de completar el experimento, las muestras se analizaron por LC-MS/MS. Los resultados de estabilidad metabólica se informaron como un porcentaje remanente del compuesto de prueba original. Este porcentaje se calcula dividiendo la relación de áreas de pico del compuesto de prueba después de la

incubación (tx) por la relación de áreas de pico del compuesto de prueba en el tiempo cero (t0) justo antes de la incubación.

La constante de la velocidad de eliminación (k, min⁻¹) se calcula utilizando un ajuste de regresión no lineal con la siguiente ecuación:

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

donde:

C0 es la concentración inicial representada como la relación de las áreas de pico (área del pico del compuesto de prueba/área del pico de la referencia interna);

Ct es la concentración en t representada como la relación de las áreas (área del pico del compuesto de prueba/área del pico de la referencia interna);

e es la base del logaritmo natural

t es el tiempo (min);

k es la constante de la velocidad de eliminación (min⁻¹).

La vida media (t1/2, min) se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

donde:

k es la constante de la velocidad de eliminación (min⁻¹).

La tasa de eliminación intrínseca in vitro (CL_{int}, ml/min/millón de células) se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$CL_{int} = 0,693 / t_{1/2} / n$$

donde:

t1/2 es la vida media;

n es el número de células por ml.

Resultados:

La vida media del Ejemplo 1 en hepatocitos humanos calculada fue >480 minutos, mientras que la vida media del Ejemplo 60.2 en hepatocitos humanos fue de 350 minutos. La tasa de eliminación intrínseca del Ejemplo 60.2 en hepatocitos humanos es 0,465 ml/min/g de hígado, siendo 1,5 veces más rápida que la tasa de eliminación de 0,312 ml/min/g de hígado encontrada con el Ejemplo 1.

Procedimiento para medir los parámetros farmacocinéticos (PK) in vivo:

Se investigó la PK en ratones macho CD1, ratas Wistar Han, monos Cynomolgus y perros Beagle. Dos grupos de animales (N = 3 por grupo) recibieron el compuesto de prueba ya sea como una dosis intravenosa (IV) (1 mg/kg) o por sonda oral (solución y suspensión de 5 mg/kg). El fármaco se formuló en PEG 400 al 90% y etanol al 10% para administración IV y en PEG400 al 90% y etanol al 5% para administración PO. Se recogieron muestras de sangre a las 0,167, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72 y 96 h después de la dosis para IV y a las 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72 y 96 h después de la dosis para administración oral. Se recogieron muestras de sangre en tubos K3EDTA que se centrifugaron a 1500 a 2000 x g para obtener plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta el análisis por LC-MS/MS.

Todas las muestras in vivo se inyectaron en un sistema Exion LC 4500 Triple Quad™ LC-MS/MS donde la columna se mantuvo a 60 °C y el caudal fue de 0,6 ml/min. Todos los parámetros de análisis LC-MS/MS se capturan electrónicamente en archivos de datos sin procesar. Las PK de las muestras de rata IV, perro IV, mono IV y mono PO fueron analizadas por el método de análisis general A. Las PK de las muestras de ratón IV, ratón PO y perro PO fueron analizadas por el método de análisis general B. Las muestras de rata PO fueron analizadas por el método de análisis general C.

Los parámetros PK se obtuvieron mediante análisis no compartimental de la concentración plasmática contra los datos de tiempo (Phoenix WinNonlin v8.1). La concentración máxima (C_{max}) y el tiempo para C_{max} (T_{max}) se registraron directamente a partir de observaciones experimentales. El área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo [AUC_{0-T}] y el área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el infinito [AUC_{INF}] se calcularon utilizando la regla trapezoidal lineal/logarítmica. La tasa de eliminación plasmática total (CL_{TP}), el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}), la vida media de eliminación aparente (T_{1/2}) y el tiempo medio de residencia (MRT) se estimaron después de la administración IV. Las estimaciones de AUC y T_{1/2} se realizaron utilizando un mínimo de tres puntos en el tiempo con concentraciones cuantificables. La biodisponibilidad oral absoluta (F) se estimó como la relación de los valores de AUC normalizados respecto a la dosis después de las dosis orales y IV.

Resultados:

Los parámetros farmacocinéticos (PK) IV del Ejemplo 1 y el Ejemplo 60.2 se midieron en cuatro especies preclínicas: ratón, rata, perro y mono. El Ejemplo 1 exhibió una tasa de eliminación mejorada en las cuatro especies con respecto al Ejemplo 60.2. De acuerdo con los resultados del análisis de microsomas hepáticos mencionado anteriormente, las diferencias en la tasa de eliminación fueron más significativas para perros y monos, donde la eliminación mejoró 4,9 veces y 2,6 veces, respectivamente. Asimismo, la vida

media en circulación del Ejemplo 1 en perros y monos fue 3,4 veces y dos veces mayor que en el Ejemplo 60.2, respectivamente.

Tabla 2.

<i>Ejemplo 1</i> <i>Parámetros PK</i>	Unidad	Ratón	Rata	Mono	Perro
CL	mL/min/kg	0,50	2,64	8,50	1,68
Vss	L/kg	0,24	3,34	1,18	0,83
T _{1/2}	h	7,6	17,4	3,0	8,6

Tabla 3.

<i>Ejemplo 60.2</i> <i>Parámetros PK</i>	Unidad	Ratón	Rata	Mono	Perro
CL	mL/min/kg	5,20	5,89	22,2	8,21
Vss	L/kg	2,14	2,86	1,34	0,96
T _{1/2}	h	5,2	11,0	1,4	2,5

Resultados:

Los parámetros PK de las especies preclínicas se usan comúnmente para predecir los parámetros PK en humanos antes de los ensayos clínicos en humanos. Los métodos utilizados para esta predicción se denominan "escala alométrica" y generalmente se analizan y utilizan en la literatura. Usando la escala alométrica, la dosis oral diaria pronosticada requerida para mantener una concentración eficaz del fármaco en plasma humano es 7 veces menor para el Ejemplo 1 que para el Ejemplo 60.2. Específicamente, la dosis de QD PO pronosticada en humanos del Ejemplo 1 es inferior a 10 mg, mientras que la dosis pronosticada de QD PO humana del Ejemplo 60.2 es mayor que 30 mg.

Si bien las reacciones idiosincrásicas (es decir, las reacciones de hipersensibilidad) a los medicamentos son impredecibles y de naturaleza grave, y por lo tanto representan un problema clínico significativo, se ha afirmado que los medicamentos administrados a una dosis diaria de 10 mg o menos rara vez se ven asociados a una alta incidencia de reacciones farmacológicas idiosincrásicas (Uetrecht, J. P. New Concepts in Immunology Relevant to Idiosyncratic Drug Reactions: The "Danger Hypothesis" and Innate Immune System. Chem. Res. Toxicol. 1999, 12(5), 387-395, DOI:10.1021/tx980249i).

Procedimiento para medir los parámetros farmacocinéticos en un experimento subcutáneo in vivo:

El fármaco se formuló en Kolliphor P188 al 1%/PEG3350 al 1%/manitol al 3,5%/agua al 94,5% y luego se administró a ratas Wistar Han como inyección subcutánea a una dosis de 20 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre a las 0,167, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5, 7,

24, 48, 72, 96 h, y luego cada 3 días hasta los 122 días. Se recogieron muestras de sangre en tubos K3EDTA y se centrifugaron a 1500 a 2000 x g para obtener plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta el análisis por LC-MS/MS.

Resultados:

La idoneidad de cada compuesto para la administración subcutánea (SC) se evaluó en un experimento de los PK para SC en rata. Según lo determinado por este experimento, la vida media aparente del compuesto en plasma fue de 13 días para el Ejemplo 1 y de 11,5 días para el Ejemplo 60.2. El AUC₀-infinito para el Ejemplo 1 fue de 4,941 días * ng/mL (2,89% del AUC extrapolado). El AUC₀-infinito para el Ejemplo 60.2 fue 609 días * ng/mL (12,8% del AUC extrapolado). La biodisponibilidad fue del 93% para el Ejemplo 1 y del 25% para el Ejemplo 60.2. Las concentraciones de fármaco se mantuvieron por encima de 7 ng/mL para todos los animales durante 73 días con el Ejemplo 1 y 24 días con el Ejemplo 60.2 (Figura 1). Las dosis mensuales por vía subcutánea (Q1M SC) pronosticadas para humanos se calcularon utilizando las vidas medias aparentes y las biodisponibilidades derivadas de los PK para SC en rata junto con los valores de eliminación corporal en humanos derivados de la escala alométrica. La dosis de Q1M SC pronosticada requerida para mantener una concentración eficaz del fármaco en plasma humano es 15 veces menor para el Ejemplo 1 que para el Ejemplo 60.2.

Procedimiento para medir la inducción del citocromo P450 en hepatocitos humanos criopreservados:

Siguiendo las pautas de la FDA ("In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry"), se probó el potencial del Ejemplo 1 y el Ejemplo 60.2 para inducir la expresión de CYP2B6 usando hepatocitos de los mismos tres donantes individuales (en lugar de donantes agrupados), y se evaluaron los cambios en los niveles de ARNm de enzima utilizando el "método del factor de multiplicación". En este ensayo, un aumento en los niveles de ARNm inferior al doble se considera un hallazgo negativo, mientras que un aumento ≥ 2 veces se considera un hallazgo positivo. Los compuestos se probaron en un ensayo de inducción de CYP usando hepatocitos primarios humanos criopreservados inducibles de tres donantes para determinar el potencial de causar inducción (medida por un aumento en la transcripción de ARNm) de CYP2B6. Los compuestos de prueba (concentración final de 0,12 a 30 μ M) se incubaron durante 48 horas con hepatocitos humanos primarios que expresaban naturalmente todos los receptores nucleares implicados en la regulación de los niveles de expresión de varias enzimas CYP. Las soluciones frescas de los compuestos de prueba y los controles se diluyeron en medios de ensayo y se agregó DMSO cada 24 horas durante dos días consecutivos hasta una concentración final de 0,1%. Al final de la incubación, se evaluó la integridad de las monocapas celulares, la densidad celular y la viabilidad

para evaluar los efectos de citotoxicidad. Las células se solubilizaron luego en tampón de lisis celular y se purificó el ARN total de cada muestra de ensayo. Las muestras se usaron luego en reacciones en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) para cuantificar la cantidad de especies de ARNm específicas que codifican el gen CYP2B6 humano.

El potencial de inducción de los compuestos de prueba y los controles se comparó con el fenobarbital inductor conocido de CYP2B6 (1000 μ M). Los resultados de este ensayo se expresan como inducción en número de veces. La inducción en número de veces se calculó como una proporción del nivel de ARNm en las células tratadas con el compuesto de prueba respecto al de las células tratadas con solo DMSO (control de solvente), el nivel basal de ARNm, y por lo tanto representa el potencial de inducción del compuesto de prueba. Los valores de inducción en número de veces se usaron para calcular valores porcentuales de la actividad de control, que luego se ajustaron a un modelo de regresión logística de 4 parámetros para determinar los valores de CE_{50} y E_{max} (si se observa inducción). La citotoxicidad también se evaluó en paralelo para evitar resultados de inducción de CYP falsos positivos debido a la citotoxicidad. Se debe evitar la evaluación e interpretación del potencial de inducción de CYP a concentraciones citotóxicas.

Resultados:

No se observó citotoxicidad con ninguno de los compuestos a ninguna de las concentraciones probadas (hasta 30 μ M). Para el Ejemplo 1, se encontró un hallazgo negativo (sin inducción) con los tres donantes. Para el Ejemplo 60.2, se encontró un hallazgo positivo (inducción) con 2 de 3 donantes (valores de CE_{50} de 1,5 μ M y 1,8 μ M). La inducción de la expresión de la enzima CYP se reconoce como una causa radical de las interacciones farmacológicas, lo que lleva a una mayor tasa de eliminación del fármaco víctima cuyo metabolismo se rige por la isoforma inducida de CYP. Entre las isoformas de CYP, CYP2B6 es de particular importancia en el contexto del tratamiento del VIH porque el efavirenz (EFV), un medicamento ampliamente utilizado para tratar el VIH (incluido en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud de 2019), principalmente es metabolizado por CYP2B6 (Ward, B. A., Gorski, J. C., Jones, D. R., Hall, S. D., Flockhard, D. A., Desta, Z. The Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) Is the Main Catalyst of Efavirenz Primary and Secondary Metabolism: Implication for HIV/AIDS Therapy and Utility of Efavirenz as a Substrate Marker of CYP2B6 Catalytic Activity, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2003, 306, 287-300, DOI: 10.1124/jpet.103.049601).