

Brevetto europeo No. 3089979

Domanda di brevetto europeo No. 15747721.7

Data di deposito: 29 luglio 2015

Classificazione Internazionale: C07D471/18, A61K31/4162, A61P7/02

5 Priorità: Statunitense No. 201462058316P del 01 ottobre 2014

Titolo: PIRIMIDINONI COME INIBITORI DEL FATTORE XIA

Richiedente: Bristol-Myers Squibb Company
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543

10 U.S.A.

Inventori: DILGER, Andrew K.
CORTE, James R.
DE LUCCA, Indawati
FANG, Tianan
15 YANG, Wu
WANG, Yufeng
PABBISSETTY, Kumar Balashanmuga
EWING, William R.
ZHU, Yeheng
20 WEXLER, Ruth R.
PINTO, Donald J.P.
ORWAT, Michael J.
SMITH II, Leon M.

25 Descrizione

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda in generale nuovi composti macrociclici e loro analoghi che sono inibitori del fattore XIa e/o della callicreina plasmatica, composizioni contenenti i medesimi, e detti composti per l'uso, ad esempio, nel trattamento o nella profilassi di disturbi tromboembolici o nel trattamento della permeabilità vascolare retinica associata alla retinopatia diabetica e all'edema maculare diabetico.

SFONDO DELL'INVENZIONE

Le malattie tromboemboliche rimangono la principale causa di morte nei paesi sviluppati nonostante la disponibilità di anticoagulanti, come warfarina (COUMADIN®), eparina, eparine di basso peso molecolare (LMWH), pentasaccaridi sintetici e agenti antiplastrinici, come aspirina e clopidogrel (PLAVIX®). L'anticoagulante orale warfarina inibisce la maturazione post-traduzionale dei fattori di coagulazione VII, IX, X e della protrombina, e si è dimostrato efficace sia nella trombosi venosa che in quella arteriosa. Tuttavia, il suo utilizzo è limitato a causa del suo ristretto indice terapeutico, della lenta insorgenza dell'effetto terapeutico, delle numerose interazioni con la dieta e con i farmaci, e della necessità di eseguire opere di monitoraggio e di regolazione della dose. Pertanto, è diventato sempre più importante scoprire e sviluppare anticoagulanti orali sicuri ed efficaci per la prevenzione e il trattamento di un'ampia gamma di disturbi tromboembolici.

Un approccio prevede di inibire la generazione della trombina prendendo a bersaglio l'inibizione del fattore di coagulazione XIa (FXIa). Il fattore XIa è una serin proteasi plasmatica coinvolta nella regolazione della coagulazione del sangue, la quale viene iniziata in vivo dal legame del fattore tissutale (TF) al fattore VII (FVII) per generare il fattore VIIa (FVIIa). Il complesso TF:FVIIa risultante attiva il fattore IX (FIX) e il fattore X (FX), portando alla produzione del fattore Xa (FXa). L'FXa generato catalizza la trasformazione della protrombina in piccole quantità di trombina prima che questa via venga spenta dall'inibitore della via del fattore tissutale (TFPI). Il processo di coagulazione viene poi ulteriormente propagato attraverso l'attivazione retroattiva dei fattori V, VIII e XI per opera di quantità catalitiche di trombina (Gailani, D. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27:2507-2513 (2007)). L'esplosione di trombina risultante converte il fibrinogeno in fibrina, la quale polimerizza per formare l'impalcatura strutturale di un coagulo di sangue e attiva le piastrine, che sono un componente cellulare chiave della coagulazione

(Hoffman M., Blood Reviews, 17:S1-S5 (2003)). Il fattore XIa svolge dunque un ruolo fondamentale nella propagazione di questo ciclo di amplificazione e, di conseguenza, rappresenta un bersaglio interessante per la terapia anti-trombotica.

5 La precallicreina plasmatica è uno zimogeno di una serin proteasi simil-tripsina, ed è presente nel plasma a 35 - 50 µg/mL. La struttura del gene è simile a quella del fattore XI. In generale, la sequenza di amminoacidi della callicreina plasmatica mostra un'omologia del 58% con il fattore XI. Si ritiene che la callicreina plasmatica svolga un ruolo in una pluralità di disturbi infiammatori. Il principale inibitore della callicreina plasmatica è l'inibitore della serpina C1 esterasi. I pazienti che si presentano con un deficit genetico di inibitore della C1 esterasi soffrono di angioedema ereditario (HAE) che è responsabile di gonfiore intermittente di viso, mani, gola, tratto gastrointestinale e genitali. Le vesciche che si formano durante gli episodi acuti contengono alti livelli di callicreina plasmatica, la quale taglia il chininogeno di alto peso molecolare e, liberando la bradichinina, causa un aumento della permeabilità vascolare. È stato mostrato che il trattamento con un inibitore a grande proteina della callicreina plasmatica è in grado di trattare efficacemente l'HAE impedendo il rilascio della bradichinina responsabile della permeabilità vascolare aumentata (Lehmann A., "Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery", Expert Opin. Biol. Ther., 8:187-199 (2008)).

15 Il sistema callicreina plasmatica-chinina è anormalmente abbondante nei pazienti con edema maculare diabetico avanzato. È stato recentemente pubblicato che la callicreina plasmatica contribuisce a disfunzioni vascolari della retina nei ratti diabetici (Clermont A. et al., "Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats", Diabetes, 60:1590-1598 (2011)). Inoltre, nei ratti diabetici, la somministrazione dell'inibitore della callicreina plasmatica ASP-440 migliorava sia la permeabilità vascolare della retina che le anomalie a livello di flusso sanguigno retinico. Pertanto, un inibitore della callicreina plasmatica dovrebbe essere utile come trattamento per ridurre la permeabilità vascolare retinica associata alla retinopatia diabetica e all'edema maculare diabetico. Possono essere considerate bersagli di un inibitore della callicreina plasmatica anche altre complicanze del diabete, come emorragia cerebrale, nefropatia, cardiomiopatia e neuropatia, tutte che mostrano associazioni con la callicreina plasmatica.



Ad oggi, nessun inibitore sintetico a piccola molecola della callicreina plasmatica è stato approvato per un uso medico. Gli inibitori a grande proteina della callicreina plasmatica presentano rischi di reazioni anafilattiche, come riportato per Ecallantide. Rimane dunque la necessità di composti che inibiscano la callicreina plasmatica, che non inducano anafilassi, e che siano disponibili per via orale. Inoltre, le molecole della tecnica nota sono caratterizzata dalla presenza di una funzionalità di guanidina o ammidina altamente polare e ionizzabile. È risaputo che tali funzionalità possono rappresentare un limite per la permeabilità intestinale e, di conseguenza, per la disponibilità orale.

WO2014/022767 divulga derivati diidropiridonici che sono utili come inibitori del fattore XIa.

RIEPILOGO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce nuovi composti macrociclici, loro analoghi, inclusi loro stereoisomeri, tautomeri, sali farmaceuticamente accettabili o solvati, che sono utili come inibitori selettivi degli enzimi serin proteasi, specialmente del fattore XIa e/o della callicreina plasmatica.

La presente divulgazione fornisce anche processi e intermedi per produrre i composti della presente invenzione.

La presente invenzione fornisce anche composizioni farmaceutiche che comprendono un trasportatore farmaceuticamente accettabile e almeno uno dei composti della presente invenzione o loro stereoisomeri, tautomeri, sali farmaceuticamente accettabili o solvati.

I composti dell'invenzione possono essere usati nel trattamento e/o nella profilassi dei disturbi tromboembolici.

I composti dell'invenzione possono essere usati nel trattamento della permeabilità vascolare retinica associata alla retinopatia diabetica e all'edema maculare diabetico.

I composti della presente invenzione possono essere usati in terapia.

I composti della presente invenzione possono essere usati nella produzione di un medicamento per il trattamento e/o la profilassi di un disturbo tromboembolico.

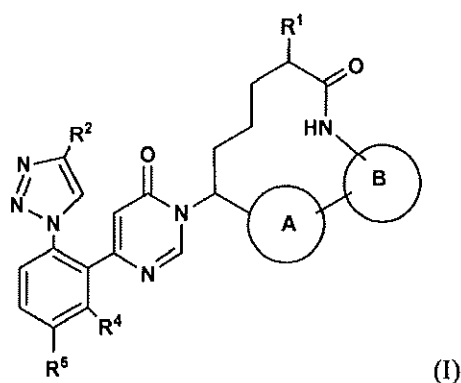
I composti dell'invenzione possono essere usati da soli, in combinazione con altri composti della presente invenzione, o in combinazione con uno o più, preferibilmente con uno o due, altri agenti.

Queste e altre caratteristiche dell'invenzione verranno delineate in forma estesa nel prosieguo della divulgazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

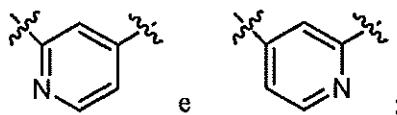
I. COMPOSTI DELL'INVENZIONE

5 In un aspetto, la presente invenzione fornisce, tra le altre cose, composti di Formula (I):

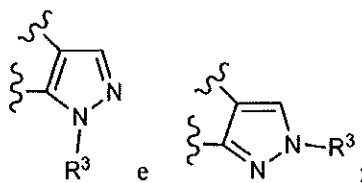


o loro stereoisomeri, tautomeri, sali farmaceuticamente accettabili o solvati, in cui:

l'anello A è indipendentemente selezionato da



10 l'anello B è indipendentemente selezionato da



R¹ è indipendentemente selezionato da H e alchile C₁₋₄;

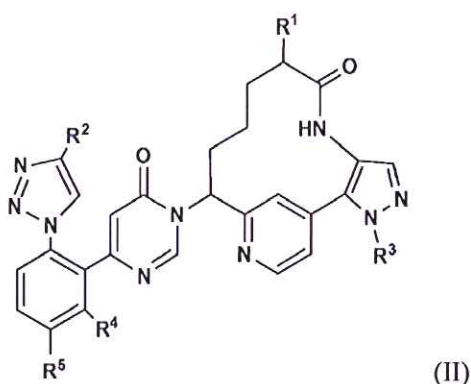
R² è indipendentemente selezionato da F, Cl, CF₃, CHF₂ e COOH;

R³ è indipendentemente selezionato da H, CHF₂, CD₃ e CH₃;

R⁴ è indipendentemente selezionato da H ed F; e

R⁵ è indipendentemente selezionato da H, F, Cl, CH₃ e OCH₃.

5 In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce composti di Formula (II):



o loro stereoisomeri, tautomeri, sali farmaceuticamente accettabili o solvati, in cui:

R¹ è alchile C₁₋₄;

R² è indipendentemente selezionato da F, Cl, CF₃ e CHF₂;

10 R³ è indipendentemente selezionato da CHF₂, CD₃ e CH₃;

R⁴ è H; e

R⁵ è indipendentemente selezionato da F e Cl.

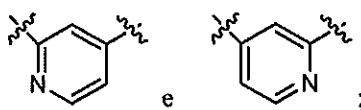
In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce composti di Formula (III):

R² è indipendentemente selezionato da F, Cl, CF₃ e CHF₂; e

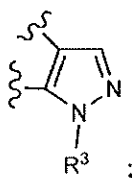
R³ è indipendentemente selezionato da CHF₂, CD₃ e CH₃.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce composti di Formula (I), o loro stereoisomeri, tautomeri, sali farmaceuticamente accettabili o solvati, in cui:

5 l'anello A è indipendentemente selezionato da



l'anello B è



R¹ è indipendentemente selezionato da H e alchile C₁₋₄;

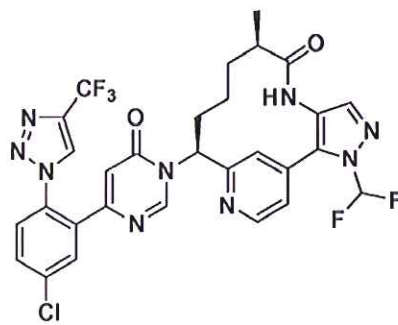
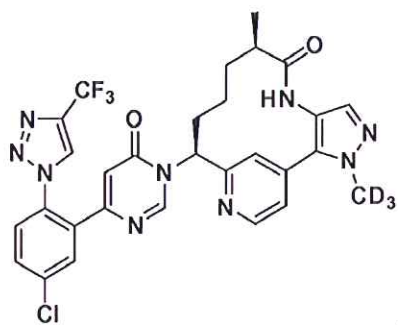
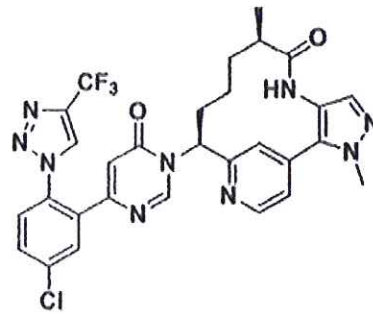
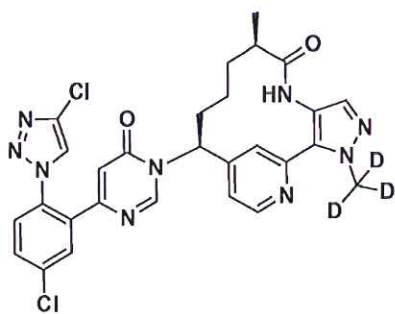
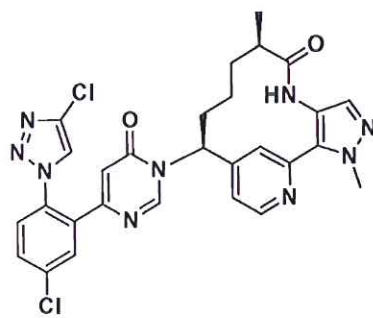
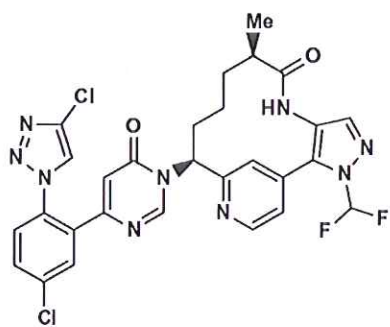
10 R² è COOH;

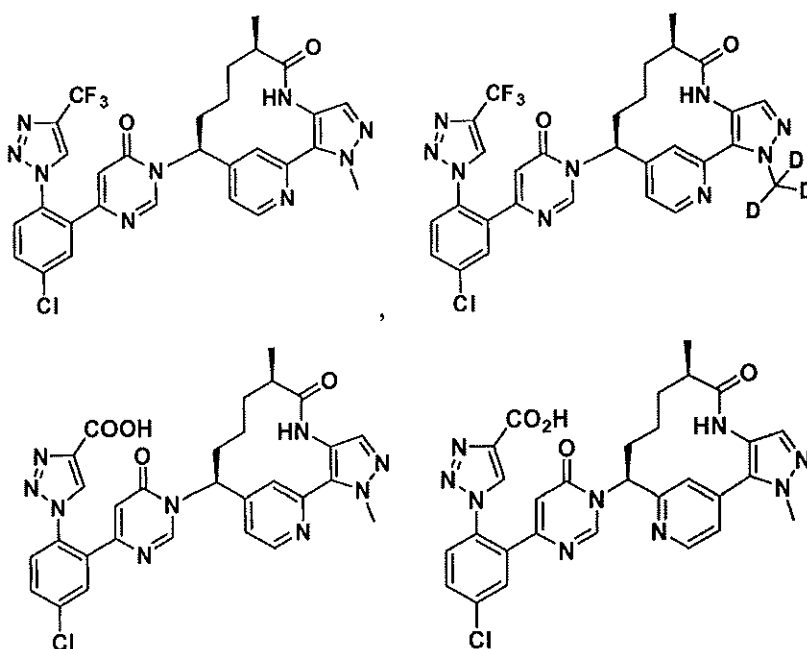
R³ è indipendentemente selezionato da H, CHF₂, CD₃ e CH₃;

R⁴ è indipendentemente selezionato da H ed F; e

R⁵ è indipendentemente selezionato da H, F, Cl, CH₃ e OCH₃.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce composti selezionati da





o loro stereoisomeri, tautomeri, sali farmaceuticamente accettabili o solvati.

In un'altra forma esecutiva, R¹ è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da H e alchile C₁₋₄.

5 In un'altra forma esecutiva, R¹ è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da H e metile, etile e isopropile.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce un composto selezionato da un elenco che rappresenta un qualsiasi sottoinsieme dei composti esemplificati nella presente domanda di brevetto.

10 In un'altra forma esecutiva, i composti della presente invenzione hanno valori di K_i per il fattore XIa o per la callicreina plasmatica ≤ 10 μM.

In un'altra forma esecutiva, i composti della presente invenzione hanno valori di K_i per il fattore XIa o per la callicreina plasmatica ≤ 1 μM.

In un'altra forma esecutiva, i composti della presente invenzione hanno valori di K_i per il fattore XIa o per la callicreina plasmatica $\leq 0,5 \mu\text{M}$.

In un'altra forma esecutiva, i composti della presente invenzione hanno valori di K_i per il fattore XIa o per la callicreina plasmatica $\leq 0,1 \mu\text{M}$.

5 II. ALTRE FORME ESECUTIVE DELL'INVENZIONE

In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione che comprende almeno uno dei composti della presente invenzione o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato.

10 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica che comprende un trasportatore farmaceuticamente accettabile e almeno uno dei composti della presente invenzione o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato.

In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica che comprende: un trasportatore farmaceuticamente accettabile e una quantità terapeuticamente efficace di almeno uno dei composti della presente invenzione o di un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato.

15 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un processo per produrre un composto della presente invenzione.

In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un intermedio per produrre un composto della presente invenzione.

20 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente inoltre uno o più agenti terapeutici aggiuntivi. In una forma esecutiva preferita, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica in cui lo/gli agenti terapeutici aggiuntivi sono un agente antiplastrinico o una combinazione di agenti antiplastrinici. Preferibilmente, gli uno o più agenti antiplastrinici sono clopidogrel e/o aspirina, o una loro combinazione.

In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce un metodo per il trattamento e/o la profilassi di un disturbo tromboembolico, che prevede di somministrare, ad un paziente bisognoso di tale trattamento e/o profilassi,

una quantità terapeuticamente efficace di almeno uno di composti della presente invenzione o di un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato.

In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un composto della presente invenzione o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato.

5 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un composto della presente invenzione, o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato, per l'uso in terapia nel trattamento e/o nella profilassi di un disturbo tromboembolico.

10 In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce anche l'uso di un composto della presente invenzione, o di un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato, nella produzione di un medicamento per il trattamento e/o la profilassi di un disturbo tromboembolico.

15 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un primo e un secondo agente terapeutico per l'uso nel trattamento e/o nella profilassi di un disturbo tromboembolico, in cui il primo agente terapeutico è un composto della presente invenzione, o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato, mentre il secondo agente terapeutico è almeno un agente selezionato da un inibitore del fattore Xa, come apixaban, rivaroxaban, betrixaban, edoxaban, un agente anticoagulante, un agente antiplastrinico, un agente di inibizione della trombina, come dabigatran, un agente trombolitico, e un agente fibrinolitico. Preferibilmente, il secondo agente terapeutico è almeno un agente selezionato da warfarina, eparina non frazionata, eparina di basso peso molecolare, pentasaccaride sintetico, irudina, argatroban, aspirina, ibuprofene, naproxene, sulindac, indometacina, mefenamato, droxicam, diclofenac, sulfpirazone, piroxicam, ticlopidina, clopidogrel, tirofiban, eptifibatide, abciximab, melagatran, disolfatoirudina, 20 attivatore tissutale del plasminogeno, attivatore tissutale del plasminogeno modificato, anistreplasi, urochinasi e streptochinasi. Preferibilmente, il secondo agente terapeutico è almeno un agente antiplastrinico. Preferibilmente, gli uno o più agenti antiplastrinici sono clopidogrel e/o aspirina, o una loro combinazione.

25 Il disturbo tromboembolico comprende disturbi tromboembolici cardiovascolari arteriosi, disturbi tromboembolici cardiovascolari venosi, disturbi tromboembolici cerebrovascolari arteriosi, e disturbi tromboembolici cerebrovascolari venosi. Esempi del disturbo tromboembolico comprendono, ma senza limitazioni, angina instabile, una

sindrome coronarica acuta, fibrillazione atriale, primo infarto del miocardio, infarto del miocardio ricorrente, morte ischemica improvvisa, attacco ischemico transitorio, ictus, aterosclerosi, arteriopatia occlusiva periferica, trombosi venosa, trombosi venosa profonda, tromboflebite, embolia arteriosa, trombosi arteriosa coronarica, trombosi arteriosa cerebrale, embolia cerebrale, embolia renale, embolia polmonare, e trombosi dovuta ad impianti, dispositivi o procedure
5 medicali in cui il sangue è esposto ad una superficie artificiale che promuove la trombosi.

In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce almeno uno dei composti della presente invenzione, o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato per il trattamento e/o la profilassi di un disturbo infiammatorio. Esempi del disturbo infiammatorio comprendono, ma senza limitazioni, sepsi, sindrome da distress respiratorio acuto e sindrome da risposta infiammatoria sistemica.

10 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce almeno uno dei composti della presente invenzione, o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato, per l'uso nella profilassi di una malattia o condizione in cui è coinvolta la callicreina plasmatica.

15 La malattia o condizione che vede il coinvolgimento dell'attività della callicreina plasmatica comprende, ma senza limitazioni, compromissione dell'acutezza visiva, retinopatia diabetica, edema maculare diabetico, angioedema ereditario, diabete, pancreatite, nefropatia, cardiomiopatia, neuropatia, malattia infiammatoria delle viscere, artrite, infiammazione, shock settico, ipotensione, cancro, sindrome da distress respiratorio nell'adulto, coagulazione intravascolare disseminata e chirurgia di bypass cardiopolmonare.

In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una preparazione combinata tra un composto della presente invenzione e uno o più agenti terapeutici aggiuntivi per l'uso simultaneo, separato o sequenziale in terapia.

20 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una preparazione combinata tra un composto della presente invenzione e uno o più agenti terapeutici aggiuntivi per l'uso simultaneo, separato o sequenziale nel trattamento e/o nella profilassi di un disturbo tromboembolico.

25 La presente invenzione può essere implementata in altre forme specifiche senza allontanarsi dai suoi attributi essenziali. Questa invenzione abbraccia tutte le combinazioni degli aspetti preferiti qui descritti dell'invenzione. Resta inteso che qualsiasi forma esecutiva e tutte le forme esecutive della presente invenzione possono essere prese in

combinazione con una o più altre forme esecutive qualsiasi per descrivere ulteriori forme esecutive. Resterà inoltre inteso che ogni singolo elemento delle forme esecutive costituisce di per sé una forma esecutiva indipendente. Inoltre, resta inteso che qualsiasi elemento di una forma esecutiva può essere combinato con qualsiasi altro elemento e con tutti gli altri elementi di qualsiasi forma esecutiva per descrivere un'ulteriore forma esecutiva.

5 III. CHIMICA

In tutta la descrizione dettagliata e nelle rivendicazioni allegate, una data formula chimica o un dato nome chimico comprenderà tutti i suoi stereoisomeri, isomeri ottici e racemi, sempre che tali isomeri esistano. Salvo diversa indicazione, tutte le forme chirali (enantiomeriche e diastereomeriche) e le forme racemiche ricadono nell'ambito dell'invenzione. I composti possono anche contenere molti isomeri geometrici di doppi legami C=C, doppi legami C=N, sistemi anulari e simili, e tutti questi isomeri stabili sono contemplati nella presente invenzione. Vengono descritti isomeri geometrici cis e trans (o E e Z) dei composti della presente invenzione, i quali possono essere isolati come una miscela di isomeri o come forme isomeriche separate. I presenti composti possono essere isolati in forme otticamente attive o racemiche. Le forme otticamente attive possono essere preparate mediante risoluzione delle forme racemiche o tramite sintesi da materiali di partenza otticamente attivi. Tutti i processi usati per preparare i composti della presente invenzione e gli intermedi generati in tali processi sono considerati parte della presente invenzione. Se i prodotti preparati sono prodotti enantiomerici o diastereomerici, essi possono essere separati attraverso metodi convenzionali, ad esempio mediante cromatografia o cristallizzazione frazionata. A seconda delle condizioni di lavorazione, i prodotti finali della presente invenzione vengono ottenuti in forma libera (neutra) o in forma di sale. Sia la forma libera che i sali di questi prodotti finali rientrano nell'ambito dell'invenzione. Se desiderato, è possibile convertire una forma di un composto in un'altra forma. È possibile convertire una base libera o un acido libero in un sale; è possibile convertire un sale nel composto libero o in un altro sale; è possibile separare una miscela di composti isomerici della presente invenzione nei singoli isomeri. I composti della presente invenzione, le loro forme libere e i loro sali possono presentarsi in molteplici forme tautomeriche in cui gli atomi di idrogeno sono trasposti su altre parti delle molecole e i legami chimici tra gli atomi delle molecole sono riorganizzati di conseguenza. Resterà inteso che l'invenzione comprende tutte le forme tautomeriche, sempre che esse possano esistere.

10

15

20

25



Il termine "stereoisomero" identifica isomeri di costituzione identica che si distinguono per l'arrangiamento dei loro atomi nello spazio. Gli enantiomeri e i diastereomeri sono esempi di stereoisomeri. Il termine "enantiomero" identifica una di una coppia di specie molecolari che sono immagini speculari l'una dell'altra e non sovrapponibili. Il termine "diastereoisomero" identifica stereoisomeri che non sono immagini speculari. I termini "racemo" o "miscela
5 racemica" identificano una composizione costituita da quantità equimolari di due specie enantiomeriche, la composizione essendo priva di attività ottica.

I simboli "R" ed "S" rappresentano la configurazione dei sostituenti intorno ad uno o più atomi di carbonio chirali. I descrittori isomerici "R" ed "S" vengono impiegati come qui descritto per indicare una o più configurazioni di atomi rispetto ad una molecola centrale, e intendono essere usati secondo la loro definizione in letteratura (IUPAC
10 Recommendations 1996, Pure and Applied Chemistry, 68:2193-2222 (1996)).

Il termine "chirale" identifica la caratteristica strutturale di una molecola che le impedisce di sovrapporsi alla sua immagine speculare. Il termine "omochirale" identifica uno stato di purezza enantiomerica. Il termine "attività ottica" identifica il grado con cui una molecola omochirale o una miscela non racemica di molecole chirali ruota un piano di luce polarizzata.

Nel presente contesto, il termine "alchile", o "alchilene", intende comprendere gruppi idrocarbureici alifatici saturi, sia a catena ramificata che a catena lineare, che hanno il numero specificato di atomi di carbonio. Ad esempio, un alchile (o alchilene) da C₁ a C₁₀, o alchile (o alchilene) C₁₋₁₀, intende comprendere i gruppi alchile C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ e C₁₀. Inoltre, ad esempio, un "alchile da C₁ a C₆", o "alchile C₁-C₆", indica un alchile avente da 1 a 6 atomi di carbonio. Il gruppo alchile può essere non sostituito o sostituito, nel qual caso almeno un idrogeno è sostituito con un
20 altro gruppo chimico. I gruppi alchile esemplificativi comprendono, ma senza limitazioni, metile (Me), etile (Et), propile (ad esempio n-propile e isopropile), butile (ad esempio n-butile, isobutile, t-butile), e pentile (ad esempio n-pentile, isopentile, neopentile). L'uso dei termini "alchile C₆" o "alchilene C₆" intende indicare un legame diretto.

Il termine "alchinile", o "alchinilene", intende comprendere catene idrocarbureiche provviste di una configurazione lineare o ramificata avente uno o più, preferibilmente uno - tre tripli legami carbonio-carbonio che
25 possono presentarsi in qualsiasi punto stabile lungo la catena. Ad esempio, un "alchinile (o alchinilene) da C₂ a C₆", o

"alchinile (o alchinilene) C₂₋₆", intende comprendere i gruppi alchinile C₂, C₃, C₄, C₅ e C₆; come etinile, propinile, butinile, pentinile e esinile.

Il termine "alcossi", o "alchilossi", identifica un gruppo -O-alchile. Un "alcossi (o alchilossi) da C₁ a C₆", o "alcossi (alchilossi) C₁₋₆", intende comprendere i gruppi alcossi C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ e C₆. I gruppi alcossi esemplificativi comprendono, ma senza limitazioni, metossi, etossi, propossi (ad esempio n-propossi e isopropossi) e t-butossi. In modo simile, il termine "alchiltio", o "tioalcossi", rappresenta un gruppo alchile come definito sopra con il numero indicato di atomi di carbonio attaccati attraverso un ponte di zolfo; ad esempio metile-S- ed etile-S-.

Il termine "alo", o "alogeno", indica fluoro, cloro, bromo e iodio. Il termine "aloalchile" intende comprendere gruppi idrocarburici alifatici saturi, sia a catena ramificata che a catena lineare, che hanno il numero specificato di atomi di carbonio e che sono sostituiti con 1 o più alogeni. Esempi di aloalchile comprendono, ma senza limitazioni, fluorometile, difluorometile, trifluorometile, triclorometile, pentafluoroetile, pentacloroetile, 2,2,2-trifluoroetile, eptafluoropropile ed eptacloropropile. Esempi di aloalchile comprendono inoltre "fluoroalchile", che intende comprendere gruppi idrocarburici alifatici saturi, sia a catena ramificata che a catena lineare, che hanno il numero specificato di atomi di carbonio e che sono sostituiti con 1 o più atomi di fluoro.

Il termine "aloalcossi", o "aloalchilossi", rappresenta un gruppo aloalchile come definito sopra con il numero indicato di atomi di carbonio attaccati attraverso un ponte di ossigeno. Ad esempio, un "aloalcossi da C₁ a C₆" o "aloalcossi C₁₋₆" intende comprendere i gruppi aloalcossi C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ e C₆. Esempi di aloalcossi comprendono, ma senza limitazioni, trifluorometossi, 2,2,2-trifluoroetossi e pentafluoroetossi. In modo simile, il termine "aloalchiltio", o "tioaloalcossi", rappresenta un gruppo aloalchile come definito sopra con il numero indicato di atomi di carbonio attaccati attraverso un ponte di zolfo; ad esempio trifluorometile-S- e pentafluoroetile-S-.

Nel presente contesto, il termine "ammino" identifica -NH₂.

Nel presente contesto, il termine "ammino sostituito" identifica i termini definiti sotto che hanno il suffisso "ammino", come "arilammino", "alchilammino", "arilammino", ecc.

Nel presente contesto, il termine "alcossicarbonile" identifica un gruppo alcossi attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un gruppo carbonile.

Nel presente contesto, il termine "alcossicarbonilammino" identifica un -NHR in cui R è un gruppo alcossicarbonile.

Nel presente contesto, il termine "alchilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo alchile.

5 Nel presente contesto, il termine "alchilcarbonile" identifica un gruppo alchile attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un gruppo carbonile.

Nel presente contesto, il termine "alchilcarbonilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo alchilcarbonile.

Nel presente contesto, il termine "amminosolfonile" identifica -SO₂NH₂.

10 Nel presente contesto, il termine "arilalchile" identifica un gruppo alchile sostituito con uno, due o tre gruppi arile.

Nel presente contesto, il termine "arilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo arile.

Nel presente contesto, il termine "arilcarbonile" identifica un gruppo arile attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un gruppo carbonile.

Nel presente contesto, il termine "arilcarbonilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo arilcarbonile.

15 Nel presente contesto, il termine "carbonile" identifica -C(O)-.

Nel presente contesto, il termine "ciano" identifica -CN.

Nel presente contesto, il termine "cicloalchilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo cicloalchile.

Nel presente contesto, il termine "cicloalchilcarbonile" identifica un gruppo cicloalchile attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un gruppo carbonile.

20 Nel presente contesto, il termine "cicloalchilcarbonilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo cicloalchilcarbonile.

Nel presente contesto, il termine "cicloalchilossi" identifica un gruppo cicloalchile attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un atomo di ossigeno.

25 Nel presente contesto, il termine "dialchilammino" identifica NR₂, in cui ogni R è un gruppo alchile. I due gruppi alchile sono uguali o differenti.

Nel presente contesto, il termine "aloalcoosi" identifica un gruppo aloalchile attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un atomo di ossigeno.

Nel presente contesto, il termine "aloalchile" identifica un gruppo alchile sostituito con uno, due, tre o quattro atomi di alogeno.

5 Nel presente contesto, il termine "aloalchilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo aloalchile.

Il termine "carbonile" identifica C(=O).

Il termine "carbossi" identifica C(=O)OH.

Nel presente contesto, il termine "aloalchilcarbonile" identifica un gruppo aloalchile attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un gruppo carbonile.

10 Nel presente contesto, il termine "aloalchilcarbonilammino" identifica -NHR, in cui R è un gruppo aloalchilcarbonile.

Il termine "alchilcarbonile" identifica un alchile, o un alchile sostituito, legato ad un carbonile.

Nel presente contesto, il termine "alcossicarbonile" identifica un gruppo alcoosi attaccato alla porzione molecolare genitrice attraverso un gruppo carbonile.

15 Il termine "idrossi" o "idrossile" identifica OH.

Il termine "cicloalchile" identifica gruppi alchile ciclizzati, tra cui sistemi anulari mono-, bi- o poli-ciclici. Il termine "cicloalchile da C₃ a C₇", o "cicloalchile C₃₋₇", intende comprendere i gruppi cicloalchile C₃, C₄, C₅, C₆ e C₇. I gruppi cicloalchile esemplificativi comprendono, ma senza limitazioni, ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile e norbornile. La definizione di "cicloalchile" comprende i gruppi cicloalchile ramificati, come 1-metilciclopropile e 2-

20 metilciclopropile.

Nel presente contesto, un "carbociclo" o "residuo carbociclico" intende significare qualsiasi anello idrocarburico stabile monociclico o biciclico di 3, 4, 5, 6, 7 od 8 componenti, o biciclico o triciclico di 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 componenti, che può essere in ogni caso saturo, parzialmente insaturo, insaturo o aromatico. Esempi di tali carbocicli comprendono, ma senza limitazioni, ciclopropile, ciclobutile, ciclobutenile, ciclopentile, ciclopentenile, cicloesile, cicloeptenile, cicloeptile, cicloeptenile, adamantile, cicloottile, cicloottenile, cicloottadienile,

25

[3.3.0]bicycloottano, [4.3.0]bicyclononano, [4.4.0]bicyclodecano (decalina), [2.2.2]bicycloottano, fluorenilo, fenile, naftile, indanile, adamantile, antracenile e tetraidronaftile (tetralina). Come mostrato sopra, anche gli anelli legati a ponte ricadono nella definizione di carbociclo (come nel caso del [2.2.2]bicycloottano). Salvo diversa indicazione, i carbocicli preferiti sono ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile, fenile e indanile. Quando usato, il termine "carbociclo" intende comprendere "arile". Un anello è legato a ponte quando uno o più atomi di carbonio collegano due atomi di carbonio non adiacenti. I ponti preferiti sono costituiti da uno o due atomi di carbonio. Si noti che un ponte converte sempre un anello monociclico in un anello tricyclico. Quando un anello è legato a ponte, i sostituenti recitati per l'anello possono essere anche presenti sul ponte.

Nel presente contesto, il termine "carbociclo biciclico", o "gruppo carbociclico biciclico", intende significare un sistema anulare carbociclico stabile di 9 o 10 componenti che contiene due anelli condensati e che è costituito da atomi di carbonio. Dei due anelli condensati, un anello è un anello benzo condensato ad un secondo anello; e il secondo anello è un anello carbonioso di 5 o 6 componenti che è saturo, parzialmente insaturo o insaturo. Il gruppo carbociclico biciclico può essere attaccato al suo gruppo pendente su qualsiasi atomo di carbonio che dà luogo ad una struttura stabile. Se il composto risultante è stabile, il gruppo carbociclico biciclico qui descritto può essere sostituito su qualsiasi carbonio. Esempi di un gruppo carbociclico biciclico sono, ma senza limitazioni, naftile, 1,2-diidronaftile, 1,2,3,4-tetraidronaftile e indanile.

I gruppi "arile" identificano idrocarburi aromatici monociclici o policiclici tra cui, ad esempio, fenile, naftile e fenantranile. Le porzioni ariliche sono ben note e descritte, ad esempio, in Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 13ª Edizione, redattore Lewis, R. J., John Wiley & Sons, Inc., New York (1997). Il termine "arile C₆ o C₁₀", o "arile C₆₋₁₀", identifica fenile e naftile. Se non specificato in altro modo, un "arile", "arile C₆ o C₁₀", "arile C₆₋₁₀" o "residuo aromatico" può essere non sostituito o sostituito con 1 - 5 gruppi, preferibilmente con 1 - 3 gruppi, OH, OCH₃, Cl, F, Br, I, CN, NO₂, NH₂, N(CH₃)H, N(CH₃)₂, CF₃, OCF₃, C(=O)CH₃, SCH₃, S(=O)CH₃, S(=O)₂CH₃, CH₃, CH₂CH₃, CO₂H e CO₂CH₃.

Nel presente contesto, il termine "benzile" identifica un gruppo metile in cui uno degli atomi di idrogeno è sostituito con un gruppo fenile, in cui detto gruppo fenile può essere opzionalmente sostituito con 1 - 5 gruppi,

preferibilmente con 1 - 3 gruppi OH, OCH₃, Cl, F, Br, I, CN, NO₂, NH₂, N(CH₃)H, N(CH₃)₂, CF₃, OCF₃, C(=O)CH₃, SCH₃, S(=O)CH₃, S(=O)₂CH₃, CH₃, CH₂CH₃, CO₂H e CO₂CH₃.

Nel presente contesto, il termine "eterociclo" o "anello eterociclico" intende significare un anello stabile monociclico o policiclico di 3, 4, 5, 6 o 7 componenti, o eterociclico policiclico di 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 componenti, che è saturo, parzialmente insaturo o totalmente insaturo e che contiene atomi di carbonio e 1, 2, 3 o 4 eteroatomi indipendentemente selezionati dal gruppo costituito da N, O ed S; incluso qualsiasi gruppo policiclico in cui uno qualsiasi degli anelli eterociclici definiti sopra è condensato ad un anello benzenico. Gli eteroatomi di azoto e di zolfo possono essere opzionalmente ossidati (ovvero N→O ed S(O)_p, in cui p è 0, 1 o 2). L'atomo di azoto può essere sostituito o non sostituito (ovvero essere N o NR, in cui R è H o un altro sostituente, se definito). L'anello eterociclico può essere attaccato al suo gruppo pendente su qualsiasi eteroatomo o atomo di carbonio che dà luogo ad una struttura stabile. Se il composto risultante è stabile, gli anelli eterociclici qui descritti possono essere sostituiti su un atomo di carbonio o su un atomo di azoto. Un azoto nell'eterociclo può essere opzionalmente quaternizzato. Preferibilmente, quando il numero totale di atomi di S e O nell'eterociclo è maggiore di 1, questi eteroatomi non sono adiacenti l'uno all'altro. È preferito che il numero totale di atomi di S e O nell'eterociclo non sia maggiore di 1. Quando usato, il termine "eterociclo" intende comprendere eteroarile.

Esempi di eterocicli comprendono, ma senza limitazioni, acridinile, azetidile, azocinile, benzimidazolile, benzofuranile, benzotiofuranile, benzotiofenile, benzossazolile, benzossazolinile, benziazolile, benztriazolile, benztetrazolile, benzisossazolile, benzisotiazolile, benzimidazolinile, carbazolile, 4aH-carbazolile, carbolinile, cromanile, cromenile, cinnolinile, decaidrochinolinile, 2H,6H-1,5,2-ditiazinile, diidrofuro[2,3-b]tetraidrofurano, furanile, furazanile, imidazolidinile, imidazolinile, imidazolile, 1H-indazolile, imidazolopiridinile, indolenile, indolinile, indolizinile, indolile, 3H-indolile, isatinoile, isobenzofuranile, isocromanile, isoindazolile, isoindolinile, isoindolile, isochinolinile, isotiazolile, isotiazolopiridinile, isossazolile, isossazolopiridinile, metilendiossifenile, morfolinile, naftiridinile, ottaidroisochinolinile, ossadiazolile, 1,2,3-ossadiazolile, 1,2,4-ossadiazolile, 1,2,5-ossadiazolile, 1,3,4-ossadiazolile, ossazolidinile, ossazolile, ossazolopiridinile, ossazolidinilpirimidinile, ossindolile, pirimidinile, fenantridinile, fenantrolinile, fenazinile, fenotiazinile, fenossatinile, fenossazinile, ftalazinile, piperazinile, piperidinile,

piperidonile, 4-piperidonile, piperonile, pteridinile, purinile, piranile, pirazinile, pirazolidinile, pirazolinile, pirazolopiridinile, pirazolile, piridazinile, piridoossazolile, piridoimidazolile, piridotiazolile, piridinile, pirimidinile, pirrolidinile, pirrolinile, 2-pirrolidonile, 2H-pirrolile, pirrolile, chinazofinile, chinolinile, 4H-chinolizile, chinossalinile, chinuclidinile, tetrazolile, tetraidrofurane, tetraidroisochinolinile, tetraidrochinolinile, 6H-1,2,5-tiadiazinile, 1,2,3-tiadiazolile, 1,2,4-tiadiazolile, 1,2,5-tiadiazolile, 1,3,4-tiadiazolile, tiantrenile, tiazolile, tienile, tiazolopiridinile, tienotiazolile, tienoossazolile, tienoimidazolile, tiofenile, triazinile, 1,2,3-triazolile, 1,2,4-triazolile, 1,2,5-triazolile, 1,3,4-triazolile e xantenile. Sono anche inclusi i composti anulari e spiro condensati che, ad esempio, contengono gli eterocicli di sopra.

Esempi di eterocicli di 5 - 10 componenti comprendono, ma senza limitazioni, piridinile, furanile, tienile, pirrolile, pirazolile, pirazinile, piperazinile, piperidinile, imidazolile, imidazolidinile, indolile, tetrazolile, isossazolile, morfolinile, ossazolile, ossadiazolile, ossazolidinile, tetraidrofurane, tiadiazinile, tiadiazolile, tiazolile, triazinile, triazolile, benzimidazolile, 1H-indazolile, benzofuranile, benzotiofuranile, benzotetrazolile, benzotriazolile, benzisossazolile, benzossazolile, ossindolile, benzossazolinile, benzotiazolile, benzisotiazolile, isatinoile, isochinolinile, ottaidroisochinolinile, tetraidroisochinolinile, tetraidrochinolinile, isossazolopiridinile, chinazolinile, chinolinile, isotiazolopiridinile, tiazolopiridinile, ossazolopiridinile, imidazolopiridinile e pirazolopiridinile.

Esempi di eterocicli di 5 - 6 componenti comprendono, ma senza limitazioni, piridinile, furanile, tienile, pirrolile, pirazolile, pirazinile, piperazinile, piperidinile, imidazolile, imidazolidinile, indolile, tetrazolile, isossazolile, morfolinile, ossazolile, ossadiazolile, ossazolidinile, tetraidrofurane, tiadiazinile, tiadiazolile, tiazolile, triazinile, e triazolile. Sono anche inclusi i composti anulari e spiro condensati che, ad esempio, contengono gli eterocicli di sopra.

Nel presente contesto, il termine "eterociclo biciclico", o "gruppo eterociclico biciclico", intende significare un sistema anulare eterociclico stabile di 9 o 10 componenti che contiene due anelli condensati e che è costituito da atomi di carbonio e da 1, 2, 3 o 4 eteroatomi indipendentemente selezionati dal gruppo costituito da N, O ed S. Dei due anelli condensati, un anello è un anello aromatico monociclico di 5 o 6 componenti, tra cui un anello eteroarilico di 5 componenti, un anello eteroarilico di 6 componenti o un anello benzo, ciascuno condensato ad un secondo anello. Il secondo anello è un anello monociclico di 5 o 6 componenti che è saturo, parzialmente insaturo o insaturo e che

comprende un eterociclo di 5 componenti, un eterociclo di 6 componenti o un carbociclo (posto che, quando il secondo anello è un carbociclo, il primo anello non è benzo).

Il gruppo eterociclico biciclico può essere attaccato al suo gruppo pendente su qualsiasi eteroatomo o atomo di carbonio che dà luogo ad una struttura stabile. Se il composto risultante è stabile, il gruppo eterociclico biciclico qui descritto può essere sostituito su un atomo di carbonio o di azoto. Preferibilmente, quando il numero totale di atomi di S e O nell'eterociclo è maggiore di 1, questi eteroatomi non sono adiacenti l'uno all'altro. È preferito che il numero totale di atomi di S e O nell'eterociclo non sia maggiore di 1.

Esempi di un gruppo eterociclico biciclico sono, ma senza limitazioni, chinolinile, isochinolinile, ftalazinile, chinazolinile, indolile, isoindolile, indolinile, 1H-indazolile, benzimidazolile, 1,2,3,4-tetraidrochinolinile, 1,2,3,4-tetraidroisochinolinile, 5,6,7,8-tetraidro-chinolinile, 2,3-diidro-benzofuranile, cromanile, 1,2,3,4-tetraidro-chinossalinile, e 1,2,3,4-tetraidro-chinazolinile.

Nel presente contesto, il termine "gruppo eterociclico aromatico", o "eteroarile", intende significare idrocarburi aromatici stabili, monociclici e policiclici, che comprendono almeno un componente d'anello che è un eteroatomo, come zolfo, ossigeno o azoto. I gruppi eteroarile comprendono, senza limitazioni, piridile, pirimidinile, pirazinile, piridazinile, triazinile, furile, chinolile, isochinolile, tienile, imidazolile, tiazolile, indolile, pirrolile, ossazolile, benzofurile, benzotienile, benzotiazolile, isossazolile, pirazolile, triazolile, tetrazolile, indazolile, 1,2,4-tiadiazolile, isotiazolile, purinile, carbazolile, benzimidazolile, indolinile, benzodiossolanile e benzodiossano. I gruppi eteroarile sono sostituiti o non sostituiti. L'atomo di azoto è sostituito o non sostituito (ovvero è N o NR, in cui R è H o un altro sostituente, se definito). Gli eteroatomi di azoto e di zolfo possono essere opzionalmente ossidati (ovvero N→O ed S(O)_p, in cui p è 0, 1 o 2).

Nella definizione di eterociclo ricadono anche gli anelli legati a ponte. Un anello è legato a ponte quando uno o più atomi (ovvero C, O, N od S) collegano due atomi non adiacenti di carbonio o di azoto. Esempi di anelli legati a ponte comprendono, ma senza limitazioni, un atomo di carbonio, due atomi di carbonio, un atomo di azoto, due atomi di azoto, e un gruppo carbonio-azoto. Si noti che un ponte converte sempre un anello monociclico in un anello triciclico. Quando un anello è legato a ponte, i sostituenti recitati per l'anello possono essere anche presenti sul ponte.

Il termine "controione" viene usato per rappresentare una specie caricata negativamente, come cloruro, bromuro, idrossido, acetato e solfato.

In caso di utilizzo di un anello tratteggiato all'interno di una struttura anulare, questo anello tratteggiato indica che la struttura anulare può essere satura, parzialmente satura o insatura.

5 Nel presente contesto, il termine "sostituito" significa che almeno un atomo di idrogeno è sostituito con un gruppo diverso dall'idrogeno, a patto di mantenere normali le valenze e a condizione che la sostituzione dia luogo ad un composto stabile. Quando un sostituito è cheto (ovvero =O), allora gli idrogeni sostituiti sull'atomo sono 2. I
10 sostituenti cheto non sono presenti sulle porzioni aromatiche. Quando si afferma che un sistema anulare (ad esempio carbociclico o eterociclico) è sostituito con un gruppo carbonile o con un doppio legame, si intende che il gruppo carbonile o il doppio legame costituisce parte (ovvero si trova all'interno) dell'anello. Nel presente contesto, i doppi legami anulari sono doppi legami che sono formati tra due atomi d'anello adiacenti (ad esempio C=C, C=N o N=N).

15 Quando i composti della presente invenzione contengono atomi di azoto (come nel caso delle ammine), questi possono essere convertiti in N-ossidi mediante trattamento con un agente ossidante (ad esempio MCPBA e/o perossidi di idrogeno) per dare luogo ad altri composti di questa invenzione. Resta dunque inteso che gli atomi di azoto mostrati e rivendicati comprendono sia l'azoto mostrato che il suo derivato di N-ossido (N→O).

20 Quando una qualunque variabile appare più di una volta in qualsiasi costituente o in qualsiasi formula per un composto, la sua definizione in ogni singolo caso è indipendente dalla sua definizione in qualsiasi altro caso. Pertanto, ad esempio, se viene mostrato che un gruppo è sostituito con 0-3 gruppi R, allora detto gruppo può essere opzionalmente sostituito con un massimo di tre gruppi R ed R, in ogni caso, è indipendentemente selezionato dalla definizione di R. Inoltre, le combinazioni di sostituenti e/o di variabili sono lecite solo se tali combinazioni danno luogo a composti stabili.

Quando un legame ad un sostituito appare attraversare un legame che collega due atomi in un anello, allora tale sostituito può essere legato a qualsiasi atomo sull'anello. Quando un sostituito viene elencato senza indicare l'atomo attraverso cui tale sostituito è legato al resto del composto di una data formula, allora tale sostituito può

essere legato attraverso qualsiasi atomo in tale sostituente. Le combinazioni di sostituenti e/o di variabili sono lecite solo se tali combinazioni danno luogo a composti stabili.

L'espressione "farmaceuticamente accettabile" viene qui usata per identificare quei composti, quei materiali, quelle composizioni e/o quelle forme di dosaggio che, nell'ambito di una valutazione medica attendibile, sono adatti per l'uso a contatto con i tessuti degli esseri umani e degli animali senza causare un livello eccessivo di tossicità, irritazione, risposta allergica o altro problema o complicanza in commisurazione ad un rapporto beneficio/rischio ragionevole.

Nel presente contesto, i "sali farmaceuticamente accettabili" identificano derivati dei composti divulgati in cui il composto genitore è modificato attraverso la generazione di suoi sali di acido o di base. Esempi di sali farmaceuticamente accettabili comprendono, ma senza limitazioni, sali di acidi minerali od organici di gruppi basici, come ammine; e sali alcalini od organici di gruppi acidi, come acidi carbossilici. I sali farmaceuticamente accettabili comprendono i sali atossici convenzionali o i sali di ammonio quaternario del composto genitore, ad esempio formati da acidi inorganici od organici atossici. Tali sali atossici convenzionali comprendono, ad esempio, quelli derivati da acidi inorganici, come acido cloridrico, bromidrico, solforico, solfamminico, fosforico e nitrico; e i sali preparati da acidi organici, come acido acetico, propionico, succinico, glicolico, stearico, lattico, malico, tartarico, citrico, ascorbico, pamoico, maleico, idrossimaleico, fenilacetico, glutammico, benzoico, salicilico, solfanilico, 2-acetossibenzoico, fumarico, toluensolfonico, metansolfonico, etandisolfonico, ossalico e isetionico.

I sali farmaceuticamente accettabili della presente invenzione possono essere sintetizzati dal composto genitore, che contiene una porzione basica o acida, attraverso metodi convenzionali. Generalmente, tali sali possono essere preparati facendo reagire le forme di acido libero o di base libera di questi composti con una quantità stechiometrica dell'opportuna base o dell'opportuno acido in acqua, in un solvente organico o in una miscela dei due; i mezzi preferiti sono generalmente mezzi non acquosi, come etere, etil acetato, etanolo, isopropanolo o acetonitrile. Elenchi di sali adatti si trovano in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edizione, Mack Publishing Company, Easton, PA (1990), la cui divulgazione è qui inclusa per riferimento.

I composti di formula I possono anche avere forme di profarmaco. Un profarmaco è qualsiasi composto che, in vivo, verrà convertito per fornire l'agente bioattivo (ovvero il composto di formula I). Nel ramo sono ben note varie forme di profarmaci. Per esempi di tali derivati profarmaci, vedere:

- 5 a) Design of Prodrugs, redattore Bundgaard H., Elsevier (1985), e Methods in Enzymology, redattori Widder K. et al., 112:309-396, Academic Press (1985);
- b) Bundgaard H., Capitolo 5, "Design and Application of Prodrugs", A Textbook of Drug Design and Development, pagg. 113-191, redattori Krosgaard-Larsen P. et al., Harwood Academic Publishers (1991);
- c) Bundgaard H., Adv. Drug Deliv. Rev., 8:1-38 (1992);
- d) Bundgaard H. et al., J. Pharm. Sci., 77:285 (1988); e
- 10 e) Kakeya N. et al., Chem. Pharm. Bull., 32:692 (1984).

I composti contenenti un gruppo carbossi possono formare esteri fisiologicamente idrolizzabili che agiscono da profarmaci e che verranno idrolizzati nel corpo per rendere composti di formula I in quanto tali. Tali profarmaci vengono preferibilmente somministrati per via orale perché, in molti casi, l'idrolisi avviene principalmente sotto l'influsso degli enzimi digestivi. Quando l'estere è di per sé attivo, o quando l'idrolisi avviene nel sangue, è possibile adoperare la somministrazione parenterale. Esempi di esteri fisiologicamente idrolizzabili di composti di formula (I) comprendono alchile C₁₋₆, (alchile C₁₋₆)benzile, 4-metossibenzile, indanile, ftalile, metossimetile, alcanoilossi C₁₋₆-alchile C₁₋₆ (ad esempio acetossimetile, pivaloilossimetile o propionilossimetile), (alcossi C₁₋₆)carbonilossi-alchile C₁₋₆ (ad esempio metossicarbonilossimetile o etossicarbonilossimetile, glicilossimetile, fenilglicilossimetile, (5-metil-2-osso-1,3-diossolen-4-il)-metile), e altri esteri fisiologicamente idrolizzabili ben noti che, ad esempio, vengono usati nei rami delle penicilline e delle cefalosporine. Tali esteri possono essere preparati attraverso tecniche convenzionali che sono note nel ramo.

La preparazione dei profarmaci è ben nota nel ramo e descritta, ad esempio, in Medicinal Chemistry: Principles and Practice, The Royal Society of Chemistry, redattore King F. D., Cambridge, UK (1994); Testa B. et al., Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. Chemistry, Biochemistry and Enzymology, VCHA and Wiley-VCH, Zurigo,

Svizzera (2003); The Practice of Medicinal Chemistry, redattore Wermuth C. G., Academic Press, San Diego, CA (1999).

La presente invenzione intende comprendere tutti gli isotopi degli atomi esistenti nei presenti composti. Gli isotopi comprendono quegli atomi aventi lo stesso numero atomico ma numeri di massa differenti. A titolo d'esempio generico e senza limitazioni, gli isotopi dell'idrogeno comprendono il deuterio e il trizio. Il deuterio ha un protone e un neutrone nel suo nucleo, e ha una massa che è due volte quella dell'idrogeno ordinario. Il deuterio può essere rappresentato da simboli come ^2H o "D". Qui, il termine "deuterato", sia da solo che quando usato per modificare un composto o un gruppo, intende la sostituzione di uno o più atomi di idrogeno attaccati ad uno o più atomi di carbonio con un atomo di deuterio. Gli isotopi del carbonio comprendono ^{13}C e ^{14}C .

La preparazione dei composti isotopicamente marcati dell'invenzione può essere generalmente ottenuta attraverso tecniche convenzionali che sono note agli esperti del ramo o tramite processi analoghi a quelli qui descritti, utilizzando un opportuno reagente isotopicamente marcato al posto del reagente non marcato che verrebbe altrimenti impiegato. Tali composti trovano una varietà di usi potenziali, ad esempio come standard e reagenti per determinare la capacità di legame a proteine o recettori bersaglio di un potenziale composto farmaceutico, o per acquisire immagini dei composti di questa invenzione quando legati a recettori biologici in vivo o in vitro.

I termini "composto stabile" e "struttura stabile" intendono indicare un composto che è sufficientemente robusto da sopravvivere, con un grado di purezza utile, al suo isolamento da una miscela di reazione e alla sua formulazione in un agente terapeutico efficace. È preferito che i composti della presente invenzione non contengano un gruppo N-alo, $\text{S}(\text{O})_2\text{H}$ o $\text{S}(\text{O})\text{H}$.

Il termine "solvato" intende un'associazione fisica di un composto di questa invenzione con una o più molecole di solvente, siano esse organiche o inorganiche. Questa associazione fisica comprende legami idrogeno. In certe circostanze, il solvato potrà essere isolato, ad esempio quando una o più molecole di solvente vengono incorporate nel reticolo di cristallo del solido cristallino. Le molecole di solvente nel solvato possono essere presenti in un arrangiamento regolare e/o in un arrangiamento non ordinato. Il solvato può comprendere una quantità stechiometrica o non stechiometrica di molecole del solvente. Il termine "solvato" comprende sia i solvati in fase di soluzione che i

solvati isolabili. I solvati esemplificativi comprendono, ma senza limitazioni, gli idrati, gli etanolati, i metanolati e gli isopropanolati. I metodi di solvatazione sono generalmente noti nel ramo.

Le abbreviazioni qui usate sono definite nel seguente modo: "1x" sta per una volta, "2 x" per due volte, "3 x" per tre volte, "°C" per gradi Celsius, "eq." per equivalente o equivalenti, "g" per grammo o grammi, "mg" per milligrammo o milligrammi, "L" per litro o litri, "mL" per millilitro o millilitri, "µL" per microlitro or microlitri, "N" per normale, "M" per molare, "mmol" per millimole o millimoli, "min." per minuto o minuti, "h" per ora od ore, "t.a." per temperatura ambiente, "RT" per tempo di ritenzione, "RBF" per beuta con fondo arrotondato, "atm" per atmosfera, "psi" per libbre per pollice quadrato, "conc." per concentrato, "RCM" per metatesi a chiusura d'anello, "sat" o "sat." per saturo, "SFC" per cromatografia a fluido supercritico, "MW" per peso molecolare, "p.f." per punto di fusione, "ee" per eccesso enantiomerico, "MS" o "spett. massa" per spettrometria di massa, "ESI" per spettroscopia di massa con ionizzazione per elettrospray, "HR" per alta risoluzione, "HRMS" per spettrometria di massa ad alta risoluzione, "LCMS" per cromatografia liquida-spettrometria di massa, "HPLC" per cromatografia liquida ad alta pressione, "RP HPLC" per HPLC in fase inversa, "TLC" o "tlc" per cromatografia su strato sottile, "RMN" per spettroscopia in risonanza magnetica nucleare, "nOe" per spettroscopia nucleare ad effetto Overhauser, "¹H" per protone, "δ" per delta, "s" per singoletto, "d" per doppietto, "t" per tripletto, "q" per quartetto, "m" per multipletto, "br" per largo, "Hz" per hertz, e "α", "β", "R", "S", "E" e "Z" sono designazioni stereochimiche che sono familiari all'esperto del ramo.

Me	metile
Et	etile
Pr	propile
i-Pr	isopropile
Bu	butile
i-Bu	isobutile
t-Bu	terz.-butile
Ph	fenile

Bn	benzile
Boc o BOC	terz.-butilossicarbonile
Boc ₂ O	di-terz.-butil dicarbonato
AcOH o HOAc	acido acetico
AlCl ₃	cloruro di alluminio
AIBN	azobisisobutirronitrile
BBr ₃	tribromuro di boro
BCl ₃	tricloruro di boro
BEMP	2-terz.-butilimmino-2-dietilammino-1,3-dimetilperidro-1,3,2-diazafosforina
reagente BOP	benzotriazol-1-ilossi-tris(dimetilammino)fosfonio esafluorofosfato
reagente di Burgess	1-metossi-N-trietilammoniosolfonil-metanimmidato
Cbz	carbобензилосси
DCM o CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CH ₃ CN o ACN	acetonitrile
CDCl ₃	deutero-cloroformio
CHCl ₃	cloroformio
mCPBA o m-CPBA	acido meta-cloroperbenzoico
Cs ₂ CO ₃	carbonato di cesio
Cu(OAc) ₂	acetato di rame(II)
CuI	ioduro di rame(I)
CuSO ₄	solfato di rame(II)
Cy ₂ NMe	N-cicloesil-N-metilcicloesanimmina
DBU	1,8-diazabicciclo[5.4.0]undec-7-ene

DCE	1,2-dicloroetano
DEA	dietilammina
Dess-Martin	1,1,1-tris(acetilossi)-1,1-diidro-1,2-benzodiossol-3-(1H)-one
DIC o DIPCDI	diisopropilcarbodiimmide
DIEA, DIPEA o base di Hünig	diisopropilettilammina
DMAP	4-dimetilamminopiridina
DME	1,2-dimetossietano
DMF	dimetil formammide
DMSO	dimetil solfossido
cDNA	DNA complementare
Dppp	(R)-(+)-1,2-bis(difenilfosfino)propano
DuPhos	(+)-1,2-bis((2S,5S)-2,5-dietilfosfolano)benzene
EDC	N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide
EDCI	N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato
EDTA	acido etilendiammintetraacetico
(S,S)-EtDuPhosRh(I)	(+)-1,2-bis((2S,5S)-2,5-dietilfosfolano)benzene(1,5-cicloottadiene)rodio(I) trifluorometansolfonato
Et ₃ N o TEA	trietilammina
EtOAc	etil acetato
Et ₂ O	dietil etere
EtOH	etanolo
GMF	filtro in microfibra di vetro
Grubbs II	(1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidiniliden)dicloro(fenilmetilen)(tricicloesilfosfina)rutenio

HCl	acido cloridrico
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato
HEPES	acido 4-(2-idrossietil)piperazin-1-etansolfonico
Hex	esano
HOBt o HOBT	1-idrossibenzotriazolo
H ₂ O ₂	perossido di idrogeno
H ₂ SO ₄	acido solforico
IBX	acido 2-idrossibenzoico
InCl ₃	cloruro di indio(III)
reagente di Jones	CrO ₃ in H ₂ SO ₄ acquoso, 2M
K ₂ CO ₃	carbonato di potassio
K ₂ HPO ₄	fosfato di potassio dibasico
K ₃ PO ₄	fosfato di potassio tribasico
KOAc	acetato di potassio
K ₃ PO ₄	fosfato di potassio
LAH	idruro di litio-alluminio
LG	gruppo uscente
LiOH	idrossido di litio
MeOH	metanolo
MgSO ₄	solfoato di magnesio
MsOH o MSA	acido metilsolfonico
NaCl	cloruro di sodio
NaH	idruro di sodio
NaHCO ₃	bicarbonato di sodio

Na ₂ CO ₃	carbonato di sodio
NaOH	idrossido di sodio
Na ₂ SO ₃	solfito di sodio
Na ₂ SO ₄	solfato di sodio
NBS	N-bromosuccinimide
NCS	N-clorosuccinimide
NH ₃	ammoniaca
NH ₄ Cl	cloruro di ammonio
NH ₄ OH	idrossido di ammonio
NH ₄ COOH	formiato di ammonio
NMM	N-metilmorfolina
OTf	triflato o trifluorometansolfonato
Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibenzilidenacetone)dipalladio(0)
Pd(OAc) ₂	acetato di palladio(II)
Pd/C	palladio su carbone
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-bis(difenilfosfino)-ferrocene]dicloropalladio(II)
Ph ₃ PCL ₂	trifenilfosfina dicloruro
PG	gruppo protettivo
POCl ₃	ossicloruro di fosforo
i-PrOH o IPA	isopropanolo
PS	polistirene
t.a.	temperatura ambiente
SEM-Cl	2-(trimetilsilil)etossimetil cloruro
SiO ₂	ossido di silice

SnCl ₂	cloruro di stagno(II)
TBAI	tetra-n-butilammonio ioduro
TFA	acido trifluoroacetico
THF	tetraidrofurano
TMSCHN ₂	trimetilsilildiazometano
T3P [®]	anidride di acido propanfosfonico
TRIS	tris(idrossimetil)amminometano
pTsOH	acido p-toluensolfonico

I composti della presente invenzione possono essere preparati in una pluralità di modi che sono noti all'esperto nel ramo della sintesi organica e che sono descritti in maggiore dettaglio nella Sezione VI.

IV. BIOLOGIA

5 Benché la coagulazione del sangue sia essenziale per la regolazione dell'emostasi di un organismo, essa è anche coinvolta in numerose condizioni patologiche. Nella trombosi, è possibile che si formi un coagulo di sangue o trombo che ostruisce la circolazione a livello locale, causando ischemia e arrecando un danno agli organi. In alternativa, in un processo noto come embolia, il coagulo può staccarsi e rimanere successivamente intrappolato in un vaso distale, dove causa nuovamente ischemia e danno agli organi. Le malattie dovute alla formazione patologica di trombi vengono collettivamente identificate come disturbi tromboembolici, e comprendono sindrome coronarica acuta, angina instabile, 10 infarto del miocardio, trombosi nelle cavità del cuore, ictus ischemico, trombosi delle vene profonde, arteriopatia obliterante periferica, attacco ischemico transitorio ed embolia polmonare. Inoltre, la trombosi avviene su superfici artificiali a contatto con il sangue, tra cui cateteri, stent, valvole cardiache artificiali e membrane di emodialisi.

15 Alcune condizioni contribuiscono al rischio di sviluppare la trombosi. Ad esempio alterazioni della parete vascolare, cambiamenti nel flusso sanguigno e alterazioni nella composizione del compartimento vascolare. Questi fattori di rischio sono collettivamente noti come triade di Virchow (Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, redattori Colman R. W. et al., Quinta Edizione, pag. 853, Lippincott Williams & Wilkins (2006)).

5 Gli agenti antitrombotici vengono spesso dati ai pazienti a rischio di sviluppare una malattia tromboembolica a causa della presenza di uno o più fattori di rischio predisponenti della triade di Virchow in modo da prevenire la formazione di un trombo occlusivo (prevenzione primaria). Ad esempio, nel contesto di un intervento chirurgico ortopedico (ad esempio una sostituzione di anca e ginocchio), spesso si prevede di somministrare un agente antitrombotico prima della procedura chirurgica. L'agente antitrombotico controbilancia lo stimolo protrombotico esercitato dalle alterazioni nel flusso vascolare (stasi), dal potenziale danno chirurgico arrecato alle pareti dei vasi, e dai cambiamenti di composizione del sangue dovuti alla risposta di fase acuta correlata all'intervento chirurgico. Un altro esempio dell'uso di un agente antitrombotico per scopi di prevenzione primaria è il suo dosaggio con aspirina, un inibitore dell'attivazione piastrinica, nei pazienti a rischio di sviluppare una malattia cardiovascolare trombotica. I fattori di rischio ben noti in questo ambito comprendono età, sesso maschile, ipertensione, diabete mellito, alterazioni lipidiche e obesità.

15 Gli agenti antitrombotici sono anche indicati per scopi di prevenzione secondaria dopo un episodio trombotico iniziale. Ad esempio, i pazienti con mutazioni nel fattore V (anche noto come fattore V di Leiden) e con fattori di rischio aggiuntivi (ad esempio gravidanza) vengono dosati con anticoagulanti per impedire una recidiva della trombosi venosa. Un altro esempio riguarda la prevenzione secondaria di eventi cardiovascolari nei pazienti con storia di infarto acuto del miocardio o di sindrome coronarica acuta. In un ambiente clinico, è possibile adoperare una combinazione di aspirina e clopidogrel (o altre tienopiridine) per impedire un secondo evento trombotico.

20 Gli agenti antitrombotici vengono anche dati per trattare lo stato patologico (ovvero per arrestarne lo sviluppo) dopo il suo esordio. Ad esempio, i pazienti che presentano una trombosi ad una vena profonda vengono trattati con anticoagulanti (ad esempio eparina, warfarina o LMWH) per impedire un'ulteriore crescita dell'occlusione venosa. Con il trascorrere del tempo, questi agenti inducono anche una regressione dello stato patologico perché cambiano l'equilibrio tra i fattori protrombotici e le vie anticoagulanti/profibrinolitiche a favore di queste ultime. Esempi che interessano il letto vascolare arterioso comprendono il trattamento di pazienti affetti da infarto acuto del miocardio o da sindrome coronarica acuta con aspirina e clopidogrel per prevenire l'ulteriore crescita delle occlusioni vascolari e infine causare una regressione delle occlusioni trombotiche.

Pertanto, gli agenti antitrombotici vengono ampiamente usati sia per la prevenzione primaria e secondaria (ovvero la profilassi o la riduzione del rischio) di disturbi tromboembolici, e sia per il trattamento di un processo trombotico già esistente. I farmaci che inibiscono la coagulazione del sangue, o anticoagulanti, sono "agenti fondamentali per la prevenzione e il trattamento dei disturbi tromboembolici" (Hirsh J. et al., Blood, 105:453-463 (2005)).

In alternativa, la coagulazione può essere innescata quando il sangue viene esposto a superfici artificiali (ad esempio durante emodialisi, interventi di chirurgia cardiovascolare "su pompa", innesti vascolari, sepsi batterica), superfici cellulari, recettori cellulari, detriti cellulari, DNA RNA e matrici extracellulari. Questo processo prende anche il nome di attivazione per contatto. L'assorbimento del fattore XII sulla superficie induce una modifica conformazionale nella molecola del fattore XII che facilita la sua attivazione in molecole proteolitiche attive del fattore XII (fattore XIIa e fattore XIIb). Il fattore XIIa (o XIIb) ha una pluralità di proteine bersaglio, tra cui la precalicreina plasmatica e il fattore XI. La callicreina plasmatica attiva inoltre il fattore XII, causando un'amplificazione dell'attivazione per contatto. In alternativa, la serin proteasi proilcarbossilpeptidasi può attivare la callicreina plasmatica complessata con il chininogeno di alto peso molecolare in un complesso multiproteico formato sulla superficie delle cellule e delle matrici (Shariat-Madar et al., Blood, 108:192-199 (2006)). L'attivazione per contatto è un processo superficie-mediato che è in parte responsabile della regolazione della trombosi e dell'infiammazione e che è mediato, almeno in parte, dalla via fibrinolitica, da quella del complemento, da quella della chininogeno/chinina e da altre vie umorali e cellulari (per riferimento, vedere Coleman R., "Contact Activation Pathway", Hemostasis and Thrombosis, pagg. 103-122, Lippincott Williams & Wilkins (2001); Schmaier A. H., "Contact Activation", Thrombosis and Hemorrhage, pagg. 105-128 (1998)). La rilevanza biologica del sistema di attivazione per contatto nelle malattie tromboemboliche è supportata dal fenotipo dei topi carenti di fattore XII. Più nello specifico, i topi carenti di fattore XII erano protetti dall'occlusione vascolare trombotica sia in diversi modelli di trombosi che in diversi modelli di ictus, con il fenotipo dei topi carenti di XII che era identico a quello dei topi carenti di XI (Renne et al., J. Exp. Med., 202:271-281 (2005); Kleinschmitz et al., J. Exp. Med., 203:513-518 (2006)). Il fatto che il fattore XI si trova a valle del fattore XIIa, combinato con il fenotipo



identico dei topi carenti di XII e di XI, suggerisce che il sistema di attivazione per contatto potrebbe svolgere un ruolo importante nell'attivazione del fattore XI in vivo.

5 Il fattore XI è uno zimogeno di una serin proteasi simil-tripsina, ed è presente nel plasma ad una concentrazione relativamente bassa. L'attivazione proteolitica su un legame R369-I370 interno produce una catena pesante (369 amminoacidi) e una catena leggera (238 amminoacidi). Quest'ultima contiene una tipica triade catalitica simil-tripsina (H413, D464 ed S557). Si ritiene che l'attivazione del fattore XI per opera della trombina avvenga su superfici caricate negativamente, molto probabilmente sulla superficie delle piastrine attivate. Le piastrine contengono siti specifici (130-500/piastrina) e di alta affinità (0,8 nM) per il fattore XI attivato. Dopo l'attivazione, il fattore XIa rimane legato alla superficie e riconosce il fattore IX come suo normale substrato macromolecolare (Galiani D., Trends Cardiovasc. Med., 10:198-204 (2000)).

10 Oltre ai meccanismi di attivazione retroattiva descritti sopra, la trombina attiva l'inibitore della fibrinolisi attivato dalla trombina (TAFI), una carbossipeptidasi plasmatica che taglia i residui C-terminali di lisina e di arginina sulla fibrina e riduce la capacità della fibrina di potenziare l'attivazione del plasminogeno dipendente dall'attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (tPA). In presenza di anticorpi diretti contro FXIa, la lisi del coagulo può verificarsi più rapidamente e a prescindere dalla concentrazione di TAFI nel plasma (Bouma B. N. et al., Thromb. Res., 101:329-354 (2001)). Pertanto, ci si aspetta che gli inibitori del fattore XIa siano anticoagulanti e profibrinolitici.

15 Un'ulteriore evidenza a supporto degli effetti anti-tromboembolici associati al fatto di prendere a bersaglio il fattore XI viene ricavata da topi carenti di fattore XI. È stato dimostrato che una carenza totale di fXI proteggeva i topi dalla trombosi dell'arteria carotide indotta da cloruro ferrico (FeCl₃) (Rosen et al., Thromb. Haemost., 87:774-777 (2002); Wang et al., J. Thromb. Haemost., 3:695-702 (2005)). Inoltre, la carenza di fattore XI ristabilisce il fenotipo letale perinatale dalla carenza completa di proteina C (Chan et al., Amer. J. Pathology, 158:469-479 (2001)). Inoltre, l'uso di anticorpi funzione-bloccanti cross-reattivi di babbuino che sono diretti contro il fattore XI umano protegge il babbuino dalla trombosi da shunt arterovenoso (Gruber et al., Blood, 102:953-955 (2003)). Un'evidenza a sostegno di un effetto antitrombotico degli inibitori a piccola molecola del fattore XIa è anche divulgata nella pubblicazione di

brevetto US 2004/0180855 A1. Nel loro insieme, questi studi suggeriscono che, prendendo a bersaglio il fattore XI, sarà possibile ridurre la predisposizione alle malattie trombotiche e tromboemboliche.

L'evidenza genetica indica che il fattore XI non è necessario per la normale omeostasi, implicando un profilo di sicurezza superiore del meccanismo associato al fattore XI rispetto a meccanismi antitrombotici competitivi. In
5 contrasto con l'emofilia A (carenza di fattore VIII) o con l'emofilia B (carenza di fattore IX), le mutazioni nel gene del fattore XI che causano una carenza di fattore XI (emofilia C) danno solamente luogo ad una diatesi emorragica di grado lieve-moderato che è principalmente caratterizzata da emorragia post-operatoria o post-traumatica, ma raramente spontanea. Il sanguinamento postoperatorio avviene per lo più in tessuti con alte concentrazioni di attività fibrinolitica endogena (ad esempio la cavità orale e il sistema urogenitale). La maggior parte dei casi viene identificata fortuitamente
10 in base ad un prolungamento pre-operatorio di aPTT (sistema intrinseco) in assenza di una storia pregressa di sanguinamento.

La maggiore sicurezza dell'inibizione di XIa come terapia anticoagulante viene inoltre supportata dal fatto che i topi knock-out per il fattore XI, che non hanno alcuna proteina di fattore XI rilevabile, si sviluppano normalmente e hanno un'aspettativa di vita nella norma. Non è stata notata alcuna evidenza di sanguinamento spontaneo. L'aPTT
15 (sistema intrinseco) si prolunga in modo dipendente dalla dose del gene. È interessante notare che, anche dopo una stimolazione severa del sistema di coagulazione (dissezione della coda), il tempo di sanguinamento non si prolunga in maniera significativa rispetto ai compagni di cucciolata di tipo selvatico ed eterozigoti (Gailani D., *Frontiers in Bioscience*, 6:201-207 (2001); Gailani D. et al., *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 8:134-144 (1997)). Nel loro insieme, queste osservazioni suggeriscono che dovrebbe essere possibile tollerare bene alti livelli di inibizione del
20 fattore XIa. Ciò è in contrasto con gli esperimenti di localizzazione genica con altri fattori di coagulazione, escluso il fattore XII.

L'attivazione in vivo del fattore XI può essere determinata dalla formazione di complessi con l'inibitore di C1 o l'alfa 1-antitripsina. In uno studio su 50 pazienti con infarto acuto del miocardio (AMI), circa il 25% dei pazienti aveva valori di complessi al di sopra dell'intervallo superiore normale in ELISA. Questo studio può essere considerato come
25 un'evidenza del fatto che, almeno in una sottopopolazione di pazienti con AMI, l'attivazione del fattore XI contribuisce

5 alla formazione della trombina (Minnema M. C. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20:2489-2493 (2000)). Un secondo studio stabilisce una correlazione positiva tra il grado di arteriosclerosi coronarica e il fattore XIa complessato con l'alfa 1-antitripsina (Murakami T. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15:1107-1113 (1995)). In un altro studio, i livelli di fattore XI al sopra del 90° percentile nei pazienti erano associati ad un aumento di 2,2 volte del rischio di trombosi venosa (Meijers J. C. M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 342:696-701 (2000)).

10 Inoltre, è preferibile individuare nuovi composti aventi un'attività migliorata nei saggi di coagulazione in vitro, come il saggio del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) o quello del tempo di protrombina (PT), rispetto ai noti inibitori di serin-proteasi (per una descrizione dei saggi aPTT e PT, vedere Goodnight S. H. et al., "Screening Tests of Hemostasis", *Disorders of Thrombosis and Hemostasis: A Clinical Guide*, Seconda Edizione, pagg. 41-51, McGraw-Hill, New York (2001)).

15 È anche desiderabile e preferibile individuare composti con caratteristiche vantaggiose e migliorate rispetto agli inibitori di serin proteasi noti in una o più delle seguenti categorie che vengono date a titolo d'esempio e senza alcun intento limitativo: (a) proprietà farmacocinetiche, tra cui biodisponibilità orale, emivita e clearance; (b) proprietà farmacologiche; (c) requisiti di dosaggio; (d) fattori che riducono le caratteristiche di concentrazione da picco a valle nel sangue; (e) fattori che aumentano la concentrazione del farmaco attivo a livello di recettore; (f) fattori che riducono la propensione ad interazioni cliniche farmaco-farmaco; (g) fattori che diminuiscono il rischio di effetti collaterali avversi, inclusa la selettività contro altri bersagli biologici; e (h) fattori che migliorano i costi di produzione o la fattibilità.

20 Gli studi pre-clinici hanno dimostrato significativi effetti antitrombotici degli inibitori a piccola molecola del fattore XIa in modelli di trombosi arteriosa nel coniglio e nel ratto a dosi che preservavano l'emostasi (Wong P. C. et al., *American Heart Association Scientific Sessions*, Abstract n° 6118, 12-15 novembre 2006; Schumacher W. et al., *J. Thromb. Haemost.*, 3(Suppl. 1):P1228 (2005); Schumacher W. A. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 167-174 (2007)). Inoltre, è stato osservato che il prolungamento in vitro di aPTT da parte di inibitori specifici di XIa è un buon predittore dell'efficacia nei nostri modelli di trombosi. Pertanto, il test di aPTT in vitro può essere usato come surrogato
25 dell'efficacia in vivo.

Nel presente contesto, il termine "paziente" comprende tutte le specie di mammiferi.

Nel presente contesto, i termini "trattare" o "trattamento" circoscrivono il trattamento di uno stato patologico in un mammifero, in particolare in un essere umano, e comprendono: (a) inibire lo stato patologico, ovvero arrestarne lo sviluppo; e/o (b) alleviare lo stato patologico, ovvero provocare la regressione dello stato patologico.

5 Nel presente contesto, la "profilassi" è il trattamento protettivo di uno stato patologico per ridurre e/o minimizzare il rischio di uno stato patologico e/o ridurre il rischio di recidiva di uno stato patologico attraverso la somministrazione ad un paziente di una quantità terapeuticamente efficace di almeno uno dei composti della presente invenzione o di uno suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile o solvato. I pazienti possono essere selezionati per la terapia profilattica in base a fattori che aumentano notoriamente il rischio di contrarre uno stato
10 patologico clinico rispetto alla popolazione generale. Per il trattamento di profilassi, non è necessario che le condizioni dello stato patologico clinico si siano già manifestate. Il trattamento di "profilassi" può essere suddiviso in (a) profilassi primaria e (b) profilassi secondaria. La profilassi primaria è definita come un trattamento per ridurre il rischio di uno stato patologico in un paziente che non ha ancora manifestato uno stato patologico clinico, mentre la profilassi secondaria è definita come la minimizzazione o la riduzione del rischio di recidiva o di seconda manifestazione dello
15 stesso stato patologico clinico o di uno simile.

Nel presente contesto, il termine "riduzione del rischio" circoscrive le terapie che riducono l'incidenza di sviluppo di uno stato patologico clinico. Pertanto, le terapie di prevenzione primaria e secondaria sono esempi di riduzione del rischio.

20 Una "quantità terapeutamente efficace" intende comprendere una quantità di un composto della presente invenzione che, quando somministrata da sola o in combinazione, è efficace per inibire il fattore XIa e/o la callicreina plasmatica e/o per prevenire o trattare i disturbi qui elencati. Quando applicato ad una combinazione, il termine identifica le quantità combinate degli ingredienti attivi che producono l'effetto profilattico o terapeutico, a prescindere dal fatto che la loro somministrazione avvenga in combinazione, in sequenza o simultaneamente.

25 Nel presente contesto, il termine "trombosi" identifica la formazione o la presenza di un trombo (pl. trombi); un coagulo all'interno di un vaso sanguigno che può causare ischemia o infarto nei tessuti che vengono alimentati dal



vaso. Nel presente contesto, il termine "embolia" identifica l'improvviso blocco di un'arteria con un coagulo o un materiale estraneo che è stato trasportato fino al suo sito di deposito dalla corrente sanguigna. Nel presente contesto, il termine "tromboembolia" identifica l'ostruzione di un vaso sanguigno con un materiale trombotico che è stato trasportato dal sito di origine attraverso il flusso sanguigno e che ostruisce un altro vaso. Il termine "disturbi tromboembolici" comporta sia i disturbi "trombotici" che i disturbi "embolici" (definiti sopra).

Nel presente contesto, il termine "disturbi tromboembolici" comprende disturbi tromboembolici cardiovascolari arteriosi, disturbi tromboembolici cardiovascolari venosi o cerebrovascolari, e disturbi tromboembolici nelle camere del cuore o nella circolazione periferica. Nel presente contesto, il termine "disturbi tromboembolici" comprende anche specifici disturbi selezionati da, ma senza limitazioni, angina instabile e altre sindromi coronariche acute, fibrillazione atriale, primo infarto del miocardio o infarto del miocardio ricorrente, morte ischemica improvvisa, attacco ischemico transitorio, ictus, aterosclerosi, arteriopatia occlusiva periferica, trombosi venosa, trombosi venosa profonda, tromboflebite, embolia arteriosa, trombosi arteriosa coronarica, trombosi arteriosa cerebrale, embolia cerebrale, embolia renale, embolia polmonare, e trombosi dovuta ad impianti, dispositivi o procedure medicali in cui il sangue è esposto ad una superficie artificiale che promuove la trombosi. Gli impianti o i dispositivi medicali comprendono, ma senza limitazioni: valvole protesiche, valvole artificiali, cateteri permanenti, stent, ossigenatori del sangue, shunt, luci di accesso vascolare, dispositivi di assistenza ventricolare, cuori o camere cardiache artificiali, e innesti di vasi. Le procedure comprendono, ma senza limitazioni: bypass cardiopolmonare, intervento coronarico percutaneo ed emodialisi. In un'altra forma esecutiva, il termine "disturbi tromboembolici" comprende sindrome coronarica acuta, ictus, trombosi venosa profonda ed embolia polmonare.

In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce un metodo per il trattamento di un disturbo tromboembolico, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da angina instabile, sindrome coronarica acuta, fibrillazione atriale, infarto del miocardio, attacco ischemico transitorio, ictus, aterosclerosi, arteriopatia occlusiva periferica, trombosi venosa, trombosi delle vene profonde, tromboflebite, embolia arteriosa, trombosi arteriosa coronarica, trombosi arteriosa cerebrale, embolia cerebrale, embolia renale, embolia polmonare, e trombosi dovuta ad impianti, dispositivi o procedure medicali in cui il sangue si trova esposto ad una superficie artificiale che promuove la

trombosi. In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce un metodo per il trattamento di un disturbo tromboembolico, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da sindrome coronarica acuta, ictus, trombosi venosa, fibrillazione atriale, e trombosi dovuta ad impianti e dispositivi medicali.

5 In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce un metodo per la profilassi primaria di un disturbo tromboembolico, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da angina instabile, sindrome coronarica acuta, fibrillazione atriale, infarto del miocardio, morte ischemica improvvisa, attacco ischemico transitorio, ictus, aterosclerosi, arteriopatia occlusiva periferica, trombosi venosa, trombosi delle vene profonde, tromboflebite, embolia arteriosa, trombosi arteriosa coronarica, trombosi arteriosa cerebrale, embolia cerebrale, embolia renale, embolia polmonare, e trombosi dovuta ad impianti, dispositivi o procedure medicali in cui il sangue si trova esposto ad una
10 superficie artificiale che promuove la trombosi. In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce un metodo per la profilassi primaria di un disturbo tromboembolico, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da sindrome coronarica acuta, ictus, trombosi venosa, e trombosi dovuta ad impianti e dispositivi medicali.

15 In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce un metodo per la profilassi secondaria di un disturbo tromboembolico, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da angina instabile, sindrome coronarica acuta, fibrillazione atriale, infarto del miocardio ricorrente, attacco ischemico transitorio, ictus, aterosclerosi, arteriopatia occlusiva periferica, trombosi venosa, trombosi delle vene profonde, tromboflebite, embolia arteriosa, trombosi arteriosa coronarica, trombosi arteriosa cerebrale, embolia cerebrale, embolia renale, embolia polmonare, e trombosi dovuta ad impianti, dispositivi o procedure medicali in cui il sangue si trova esposto ad una superficie artificiale che promuove la trombosi. In un'altra forma esecutiva, la presente divulgazione fornisce un metodo per la
20 profilassi secondaria di un disturbo tromboembolico, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da sindrome coronarica acuta, ictus, fibrillazione atriale e trombosi venosa.

Nel presente contesto, il termine "ictus" identifica un ictus embolico o un ictus aterotrombotico dovuto ad una trombosi occlusiva nella carotide comune, nella carotide interna o nelle arterie intracerebrali.

25 Si noti che la trombosi comprende l'occlusione (ad esempio dopo un bypass) e la riuclusione di un vaso (ad esempio durante o dopo un'angioplastica coronarica transluminale percutanea). I disturbi tromboembolici possono

discendere da condizioni tra cui, ma senza limitazioni, aterosclerosi, interventi chirurgici o complicanze chirurgiche, immobilizzazione prolungata, fibrillazione arteriosa, trombofilia congenita, cancro, diabete, effetti di medicazioni od ormoni, e complicanze in gravidanza.

5 I disturbi tromboembolici sono frequentemente associati ai pazienti affetti da aterosclerosi. I fattori di rischio per l'aterosclerosi comprendono, ma senza limitazioni, sesso maschile, età, ipertensione, dislipidemie e diabete mellito. I fattori di rischio per l'aterosclerosi sono allo stesso tempo fattori di rischio per le complicanze dell'aterosclerosi, ovvero per i disturbi tromboembolici.

10 In maniera simile, la fibrillazione arteriosa è frequentemente associata ai disturbi tromboembolici. I fattori di rischio per la fibrillazione arteriosa e i conseguenti disturbi tromboembolici comprendono malattie cardiovascolari, cardiopatia reumatica, malattia non reumatica della valvola mitralica, malattie cardiovascolari ipertensive, pneumopatia cronica e una varietà di anomalie cardiache eterogenee, e anche tireotossicosi.

15 Il diabete mellito è frequentemente associato all'aterosclerosi e alle malattie tromboemboliche. I fattori di rischio per il più comune tipo 2 comprendono, ma senza limitazioni, storia familiare, obesità, inattività fisica, razza/etnia, test pregresso di alterata glicemia a digiuno o di alterata tolleranza al glucosio, storia di diabete mellito gestazionale o parto di un "bambino macrosomico", ipertensione, colesterolo HDL basso, e sindrome dell'ovaio policistico.

I fattori di rischio per la trombofilia congenita comprendono mutazioni con guadagno di funzione nei fattori di coagulazione o mutazioni con perdita di funzione nella via anticoagulante o in quella fibrinolitica.

20 La trombosi è stata associata ad una varietà di tipi di tumore, ad esempio cancro del pancreas, cancro della mammella, cancro del cervello, cancro del polmone, cancro dell'ovaio, cancro della prostata, tumori maligni gastrointestinali, e linfoma di Hodgkin o non Hodgkin. Studi recenti suggeriscono che la frequenza del cancro nei pazienti con trombosi riflette la frequenza di un particolare tipo di cancro nella popolazione generale (Levitan N. et al., *Medicine* (Baltimore), 78(5):285-291 (1999); Levine M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 334(11):677-681 (1996); Blom J. W. et al., *JAMA*, 293(6):715-722 (2005)). Pertanto, i cancri più comuni che sono associati alla trombosi negli uomini sono i
25 cancri della prostata, del colon-retto, del cervello e del polmone, e nelle donne sono i cancri della mammella, dell'ovaio

e del polmone. Il tasso di tromboembolia venosa (VTE) osservato nei pazienti oncologici è significativo. I tassi di VTE variano a seconda del tipo di tumore, riflettendo con tutta probabilità la selezione della popolazione di pazienti. I pazienti oncologici a rischio di trombosi possono possedere uno qualsiasi o tutti i seguenti fattori di rischio: (i) stadio del cancro (ovvero la presenza di metastasi), (ii) presenza di cateteri venosi centrali, (iii) terapie chirurgiche e anti-
5 cancro, chemioterapia inclusa, e (iv) ormoni e farmaci antiangiogenici. Pertanto, in presenza di tumori avanzati, è pratica clinica comune dosare i pazienti con eparina o con eparina di basso peso molecolare per prevenire i disturbi tromboembolici. Esistono numerose preparazioni di eparina di basso peso molecolare che sono state approvate dalla FDA per queste indicazioni.

Sono tre le situazioni cliniche principali da prendere in considerazione per la prevenzione di VTE in un
10 paziente oncologico: (i) il paziente è costretto a letto per lunghi periodi di tempo; (ii) il paziente è un paziente ambulatoriale che sta ricevendo chemioterapia o radiazioni; e (iii) il paziente ha cateteri venosi centrali permanenti. L'eparina non frazionata (UFH) e l'eparina di basso peso molecolare (EBPM) sono agenti antitrombotici efficaci nei pazienti oncologici che si sottopongono ad un intervento chirurgico (Mismetti P. et al., Br. J. Surg., 88:913-930 (2001)).

A. Saggi in vitro

15 L'efficacia dei composti della presente invenzione come inibitori dei fattori di coagulazione XIa, VIIa, IXa, Xa, XIIa, callicreina plasmatica o trombina può essere determinata usando una rispettiva serin proteasi purificata rilevante e un opportuno substrato sintetico. La velocità di idrolisi del substrato cromogenico o fluorogenico da parte della serin proteasi rilevante è stata misurata sia in assenza che in presenza dei composti della presente invenzione. L'idrolisi del substrato dava luogo al rilascio di pNA (para-nitroanilina), il quale veniva monitorato per via spettrofotometrica
20 misurando l'aumento di assorbanza a 405 nm, o al rilascio di AMC (amminometilcumarina), il quale veniva monitorato per via spettrofotometrica misurando l'aumento di emissione a 460 nm con eccitazione a 380 nm. Una riduzione della velocità di cambiamento dell'assorbanza o della fluorescenza in presenza dell'inibitore è indicativa dell'inibizione dell'enzima. Tali metodi sono noti ad un esperto del ramo. I risultati di questo saggio vengono espressi in termini di costante di inibizione, K_i .

Le determinazioni per il fattore XIa sono state condotte in tampone HEPES 50 mM, pH 7,4, contenente NaCl 145 mM, KCl 5 mM e PEG 8000 0,1% (polietilenglicole; JT Baker o Fisher Scientific). Le determinazioni sono state condotte usando un fattore XIa umano purificato ad una concentrazione finale di 25-200 pM (Haematologic Technologies) e il substrato sintetico S-2366 (piroGlu-Pro-Arg-pNA; CHROMOGENIX® o AnaSpec) ad una
5 concentrazione di 0,0002-0,001 M.

Le determinazioni del fattore VIIa sono state condotte in cloruro di calcio 0.005 M, cloruro di sodio 0,15 M, tampone HEPES 0,05 M contenente PEG 8000 0,1% a pH 7,5. Le determinazioni sono state condotte usando un fattore VIIa umano purificato (Haematologic Technologies) o un fattore VIIa umano ricombinante (Novo Nordisk) ad una
10 concentrazione di saggio finale di 0,5-10 nM, un fattore tissutale solubile ricombinante ad una concentrazione di 10-40 nM, e il substrato sintetico H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288; CHROMOGENIX® o BMPM-2; AnaSpec) ad una concentrazione di 0,001-0,0075 M.

Le determinazioni del fattore IXa sono state condotte in cloruro di calcio 0.005 M, cloruro di sodio 0,1 M, Refludan 0,0000001 M (Berlex), base TRIS 0,05 M e PEG 8000 0,5% a pH 7,4. È stato aggiunto Refludan per inibire le
15 piccole quantità di trombina presenti nelle preparazioni commerciali del fattore IXa umano. Le determinazioni sono state condotte usando un fattore IXa umano purificato (Haematologic Technologies) ad una concentrazione di saggio finale di 20-100 nM e il substrato sintetico PCIXA2100-B (CenterChem) o Pefalfluor IXa 3688 (H-D-Leu-Ph'Gly-Arg-AMC; CenterChem) ad una concentrazione di 0,0004-0,0005 M.

Le determinazioni del fattore Xa sono state condotte in tampone fosfato di sodio 0,1 M a pH 7,5 che conteneva
20 cloruro di sodio 0,2 M e PEG 8000 0,5%. Le determinazioni sono state condotte usando un fattore Xa umano purificato (Haematologic Technologies) ad una concentrazione di saggio finale di 150-1000 pM e il substrato sintetico S-2222 (Bz-Ile-Glu (gamma-OMe, 50%)-Gly-Arg-pNA; CHROMOGENIX®) ad una concentrazione di 0,0002-0,00035 M.

Le determinazioni del fattore XIIa sono state condotte in tampone HEPES 0,05 mM, pH 7,4, contenente NaCl 0,145 M, KCl 0,05 M e PEG 8000 0,1%. Le determinazioni sono state condotte usando un fattore XIIa umano purificato ad una concentrazione di 4 nM (American Diagnostica) e il substrato sintetico SPECTROZYME® #312 (H-
25 D-CHT-Gly-L-Arg-pNA.2AcOH; American Diagnostica) ad una concentrazione di 0,00015 M.



5 Le determinazioni della callicreina plasmatica sono state condotte in tampone fosfato di sodio 0,1 M a pH 7,5 che conteneva cloruro di sodio 0,1-0,2 M e PEG 8000 0,5%. Le determinazioni sono state condotte usando una callicreina plasmatica umana purificata (Enzyme Research Laboratories) ad una concentrazione di saggio finale di 200 pM e il substrato sintetico S-2302 (H-(D)-Pro-Phe-Arg-pNA; CHROMOGENIX®) ad una concentrazione di 0,00008-0,0004 M.

10 Le determinazioni della trombina sono state condotte in tampone fosfato di sodio 0,1 M a pH 7,5 che conteneva cloruro di sodio 0,2 M e PEG 8000 0,5%. Le determinazioni sono state condotte usando un'alfa-trombina umana purificata (Haematologic Technologies o Enzyme Research Laboratories) ad una concentrazione di saggio finale di 200-250 pM e il substrato sintetico S-2366 (piroGlu-Pro-Arg-pNA; CHROMOGENIX® o AnaSpec) ad una concentrazione di 0,0002-0,0004 M.

15 La costante di Michaelis, K_m , per l'idrolisi del substrato da parte di ciascuna proteasi è stata determinata a 25°C o 37°C in assenza dell'inibitore. I valori di K_i sono stati determinati lasciando reagire la proteasi con il substrato in presenza dell'inibitore. Le reazioni sono state lasciate procedere per periodi di 20-180 minuti (a seconda della proteasi) misurandone le velocità (velocità di cambiamento dell'assorbanza o della fluorescenza in funzione del tempo). Per calcolare i valori di K_i , sono state usate le seguenti relazioni:

$$(V_{max} * S) / (K_m + S)$$

$$(v_o - v_s) / v_s = I / (K_i (1 + S / K_m))$$

per un inibitore competitivo con un unico sito legante; o

$$v_s / v_o = A + (B - A) / (1 + (I / IC_{50})^n);$$

20 e

$$K_i = IC_{50} / (1 + S / K_m)$$

per un inibitore competitivo, dove:

v_o è la velocità del controllo in assenza dell'inibitore;

v_s è la velocità in presenza dell'inibitore;

25 V_{max} è la velocità di reazione massima;

I è la concentrazione dell'inibitore;

A è l'attività minima residua (normalmente bloccata a zero);

B è l'attività massima residua (normalmente bloccata a 1,0);

n è il coefficiente di Hill, una misura del numero e della cooperatività dei potenziali siti leganti dell'inibitore;

5 IC₅₀ è la concentrazione dell'inibitore che produce un'inibizione del 50% alle condizioni di saggio;

K_i è la costante di dissociazione per il complesso enzima: inibitore;

S è la concentrazione del substrato; e

K_m è la costante di Michaelis per il substrato.

10 La selettività di un composto può essere valutata prendendo il rapporto tra il valore di K_i per una data proteasi e il valore di K_i per la proteasi d'interesse (ovvero la selettività per FXIa contro la proteasi P = K_i per la proteasi P/K_i per FXIa). I composti con rapporti di selettività >20 sono considerati selettivi.

15 L'efficacia dei composti della presente invenzione come inibitori della coagulazione è stata determinata usando un saggio di coagulazione standard o modificato. Un aumento del tempo di coagulazione del plasma in presenza dell'inibitore è indicativo dell'anticoagulazione. Il tempo di coagulazione relativo è il tempo di coagulazione in presenza di un inibitore diviso per il tempo di coagulazione in assenza dell'inibitore. I risultati di questo saggio possono essere espressi come IC_{1,5x} o IC_{2x}, la concentrazione di inibitore necessaria per aumentare il tempo di coagulazione rispettivamente del 50 o del 100 percento. IC_{1,5x} o IC_{2x} viene determinata tramite interpolazione lineare dei grafici del tempo di coagulazione relativo in funzione della concentrazione di inibitore adoperando la concentrazione di inibitore che interseca IC_{1,5x} o IC_{2x}.

20 I tempi di coagulazione vengono determinati adoperando plasma umano normale citrato e plasma ottenuto da una pluralità di specie di animali di laboratorio (ad esempio un ratto o un coniglio). Un composto viene diluito nel plasma a partire da una soluzione madre 10 mM in DMSO. La concentrazione finale di DMSO è minore di 2%. I saggi di coagulazione del plasma vengono condotti in un analizzatore automatizzato della coagulazione (SYSMEX®, Dade-Behring, Illinois). In modo simile, i tempi di coagulazione possono essere determinati da specie di animali da
25 laboratorio o da esseri umani che vengono dosati con i composti dell'invenzione.

Il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) viene determinato impiegando ACTIN[®] FSL (Dade-Behring, Illinois) e seguendo le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo. Il plasma (0,05 mL) viene scaldato a 37°C per 1 minuto. Il plasma viene addizionato con ACTIN[®] FSL (0,05 mL) e incubato per altri 2 - 5 minuti. Alla reazione viene aggiunto cloruro di calcio (25 mM, 0,05 mL) per iniziare la coagulazione. Il tempo di coagulazione è il tempo in secondi dal momento in cui il cloruro di calcio viene aggiunto fino al momento in cui viene rilevato un coagulo.

Il tempo di protrombina (PT) viene determinato adoperando una tromboplastina (Thromboplastin C Plus o INNOVIN[®], Dade-Behring, Illinois) e seguendo le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo. Il plasma (0,05 mL) viene scaldato a 37°C per 1 minuto. La tromboplastina (0,1 mL) viene aggiunta al plasma per iniziare la coagulazione. Il tempo di coagulazione è il tempo in secondi dal momento in cui viene aggiunta la tromboplastina fino al momento in cui viene rilevato un coagulo.

Le solubilità all'equilibrio sono state determinate in vari solventi acquosi tamponati ad uno specifico pH. Per l'equilibratura, è stato usato circa 1 mg di composto in 100 - 300 µL di solvente. I campioni venivano agitati a 300 RPM e temperatura ambiente (20 ± 2°C) per 24 ore. Se il solido non mostrava una solubilizzazione completa, veniva aggiunto altro composto per mantenere il solido in eccesso per la durata dello studio. Dopo 24 ore, veniva usato un microscopio per determinare la presenza di eventuali cambiamenti di morfologia nel solido in eccesso. I sovrantanti venivano poi agitati attraverso una piastra filtrante di PVDF da 0,22 µm e diluiti con acetonitrile per l'analisi via HPLC. Per l'analisi via HPLC, venivano anche forniti dei campioni di calibrazione.

Il grado con cui i composti della presente invenzione si legano alle sieroproteine umane può essere determinato usando metodi di dialisi e tecniche analitiche che sono ben noti nel ramo e descritti, ad esempio, in Plise E. G. et al., "Semi-automated protein binding methodology using equilibrium dialysis and a novel mixed-matrix cassette approach", J. Pharm. Sci., 99(12):5070-5078 (2010); Waters N. J. et al., "Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding", J. Pharm. Sci., 97(10):4586-4595 (2008); Van Liempd S. et al., "Development and Validation of a Higher-Throughput Equilibrium Dialysis Assay for Plasma Protein Binding", J. Lab. Autom., 16:56-67 (2011); Di L. et al., "Impact of Recovery on Fraction Unbound Using Equilibrium Dialysis", J. Pharm. Sci., 101(3):1327-1335 (2011).

I composti della presente invenzione sono stati saggiati in triplicato combinandoli con siero umano per ottenere una concentrazione finale di 10 µM. La dialisi è stata condotta per 5 ore a 37°C, in un atmosfera contenente 10% di CO₂, contro tampone fosfato di sodio 0,133 M regolato a pH 7,4 e usando le piastre di saggio rapido per dialisi all'equilibrio a due piastre di Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts). I campioni di saggio della camera contenente il tampone e di quella contenente il siero sono stati raccolti al tempo zero ($T_{0[\text{siero}]}$ e $T_{0[\text{tampone}]}$) e 5 ore dopo l'incubazione ($T_{5h[\text{siero}]}$ e $T_{5h[\text{tampone}]}$). Prima dell'analisi, i campioni di siero dializzato sono stati diluiti con tampone fosfato di sodio 0,133 M regolato a pH 7,4 e i campioni di tampone dializzato sono stati diluiti con siero umano in modo da ottenere la stessa concentrazione di siero finale in ogni campione. Successivamente, questi campioni sono stati estratti mediante precipitazione proteica in acetonitrile contenente due standard interni analitici (alprenololo 200 nM e tolbutamide 600 nM). Le proteine precipitate e i sovrantanti sono stati separati mediante centrifugazione a 4000×g per 10 minuti. I sovrantanti dei campioni sono stati analizzati via LC-MS/MS, e i rapporti tra le aree di picco del composto e dello standard interno sono stati determinati per i campioni iniziali al tempo zero ($T_{0[\text{siero}]}$ e $T_{0[\text{tampone}]}$) e per i campioni post-equilibrio ($T_{5h[\text{siero}]}$ e $T_{5h[\text{tampone}]}$). La percentuale libera (frazione libera), la percentuale legata e la percentuale recuperata sono state calcolate nel seguente modo:

$$\text{Percentuale libera} = 100 \times (T_{5h[\text{tampone}]} / T_{5h[\text{siero}]})$$

$$\text{Percentuale legata} = 100 - \text{percentuale libera}$$

$$\text{Percentuale recuperata} = 100 \times ((T_{5h[\text{tampone}]} + T_{5h[\text{siero}]}) / T_{0[\text{siero}]})$$

L'interferenza della matrice è stata saggiata misurando il rapporto in LC-MS/MS tra le aree di picco dell'analita e dello standard interno per il bianco della matrice di saggio (siero:tampone 50:50). Le condizioni analitiche venivano considerate accettabili per la valutazione della percentuale libera quando il rapporto tra le aree dell'analita e dello standard interno per il bianco della matrice di saggio (siero:tampone 50:50) era minore di 20% rispetto al rapporto tra le aree per il campione $T_{5h[\text{tampone}]}$.

Gli Esempi illustrativi divulgati sotto sono stati esaminati nel saggio del fattore XIa descritto sopra, risultando in possesso di un'attività di inibizione del fattore XIa. È stato osservato un intervallo di attività di inibizione del fattore

XIa (valori di $K_i \leq 10 \mu\text{M}$ (10000 nM)). La Tabella 1 sottostante elenca i valori di K_i per il fattore XIa che sono stati misurati a 37°C per i seguenti Esempi.

Tabella 1

Esempio N°	K_i per il fattore XIa (nM)
1	0,1
2	0,6
10	0,2
11	0,2
15	0,1
16	0,1
17	0,1
18	0,1
19	0,1
20	0,2
21	0,2

5 Gli Esempi illustrativi divulgati sotto sono stati esaminati nel saggio della callicreina plasmatica descritto sopra, risultando in possesso di un'attività di inibizione della callicreina plasmatica. È stato osservato un intervallo di attività di inibizione della callicreina plasmatica (valori di $K_i \leq 10 \mu\text{M}$ (10000 nM)). La Tabella 2 sottostante elenca i valori di K_i per la callicreina plasmatica che sono stati misurati a 37°C per i seguenti Esempi.

Tabella 2

Esempio N°	K_i per la callicreina plasmatica (nm)
1	28
2	10
10	23

11	22
15	24
16	32
17	33
18	17
19	19
20	35
21	37

L'efficacia dei composti della presente invenzione come agenti antitrombotici viene anche valutata in altri saggi descritti sopra, come aPTT, solubilità e affinità di legame per le proteine umane. Rispetto ai fenil P2' macrocicli divulgati in WO 2013/022814 e WO 2014/022766, i pirazolil P2' macrocicli della presente domanda di brevetto mostravano attività farmacologiche sorprendenti. Come mostrato nella Tabella 3, i composti della presente invenzione possiedono un'attività anticoagulante, una solubilità e una biodisponibilità superiori rispetto ai composti di riferimento.

Tabella 3

Esempio N°	aPTT _{1,5x} (μ M)	Solubilità a pH = 6,5 μ g/mL	Frazione libera legante le proteine umane
Esempio 1 di WO 2014/022766	1,50	<0,001 (crist.)	0,7%
Esempio 100 di WO 2013/022814	1,33	0,005 (anfotero)	5%
1	0,50	6 (crist.)	9%
10	0,37	16 (anfotero)	17%
11	0,34	159 (anfotero)	25%
15	0,32	100 (anfotero)	21%

16	0,36	82 (anfotero)	21%
17	0,52	2 (crist.)	8%
18	0,42	106 (anfotero)	24%
19	0,37	44 (crist.)	26%
20	0,22	>3.000 (anfotero)	25%
21	0,24	>3.400 (anfotero)	11%

B. Saggi in vivo

L'efficacia dei composti della presente invenzione come agenti antitrombotici può essere determinata usando modelli rilevanti di trombosi in vivo, inclusi i modelli di trombosi dell'arteria carotide indotta elettricamente in vivo e i modelli di trombosi da shunt arterovenoso di coniglio in vivo.

5 a. Modello di trombosi dell'arteria carotide indotta elettricamente (ECAT)

In questo studio è possibile adoperare il modello ECAT in coniglio descritto da Wong et al. (*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295:212-218 (2000)). Dei conigli bianchi New Zealand maschi vengono anestetizzati con ketamina (50 mg/kg + 50 mg/kg/h IM) e xilazina (10 mg/kg + 10 mg/kg/h IM). Questi anestetici vengono integrati al bisogno. Una sonda di flusso elettromagnetica viene collocata su un segmento di un'arteria carotide isolata per monitorare il flusso di sangue. Gli agenti di test o il veicolo verranno forniti (e.v., i.p., s.c. o per via orale) prima o dopo l'inizio della trombosi. Il trattamento farmacologico prima dell'inizio della trombosi viene usato come modello della capacità degli agenti di test di prevenire e ridurre il rischio di formazione dei trombi, mentre il dosaggio dopo l'inizio viene usato come modello della capacità di trattare una malattia trombotica esistente. La formazione del trombo viene indotta tramite stimolazione elettrica della carotide per 3 min. a 4 mA con l'uso di un elettrodo bipolare di acciaio inossidabile ad uso esterno. Il flusso di sangue carotideo viene costantemente misurato per un periodo di 90 min. allo scopo di monitorare l'occlusione indotta dal trombo. Usando la regola trapezoidale, viene calcolato il flusso di sangue carotideo totale in 90 min. Il flusso carotideo medio in 90 min. viene poi determinato convertendo il flusso di sangue carotideo totale in 90 min. nella percentuale del flusso di sangue carotideo di controllo totale che si avrebbe se il flusso di sangue di controllo venisse

mantenuto costantemente per 90 min. La ED_{50} dei composti (dose che aumenta il flusso di sangue carotideo medio di 90 min. fino al 50% del controllo) viene stimata attraverso un programma di regressione non lineare dei minimi quadrati che utilizza l'equazione sigmoideale di Hill per E_{max} (DeltaGraph; SPSS Inc., Chicago, IL).

b. Modello in vivo di trombosi da shunt arterovenoso (AV) nel coniglio

5 In questo studio è possibile adoperare il modello di shunt AV in coniglio descritto da Wong et al. (Wong, P. C. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 292:351-357 (2000)). Dei conigli bianchi New Zealand maschi vengono anestetizzati con ketamina (50 mg/kg + 50 mg/kg/h IM) e xilazina (10 mg/kg + 10 mg/kg/h IM). Questi anestetici vengono integrati al bisogno. L'arteria femorale, la vena giugulare e la vena femorale vengono isolate e cateterizzate. Tra la cannula nell'arteria femorale e la cannula nella vena femorale viene collegato un dispositivo di shunt AV riempito di soluzione
10 salina. Il dispositivo di shunt AV è costituito da un pezzo di tubo esterno di Tygon (lunghezza = 8 cm, diametro interno = 7,9 mm) e un pezzo di tubo interno (lunghezza = 2,5 cm, diametro interno = 4,8 mm). Lo shunt AV contiene anche un filo di seta 2-0 lungo 8 cm (Ethicon, Somerville, NJ). Il sangue fluisce dall'arteria femorale alla vena femorale passando attraverso lo shunt AV. L'esposizione del flusso di sangue ad un filo di seta induce la formazione di un trombo di grandezza significativa. Dopo quaranta minuti, lo shunt viene scollegato, e il filo di seta coperto con il trombo viene
15 pesato. Gli agenti di test o il veicolo verranno forniti (e.v., i.p., s.c. o per via orale) prima dell'apertura dello shunt AV. Per ogni gruppo di trattamento viene determinata la percentuale di inibizione della formazione del trombo. I valori di ID_{50} (dose che causa un'inibizione del 50% della formazione del trombo) vengono stimati attraverso un programma di regressione non lineare dei minimi quadrati che utilizza l'equazione sigmoideale di Hill per E_{max} (DeltaGraph; SPSS Inc., Chicago, IL).

20 L'effetto antinfiammatorio di questi composti può essere dimostrato in un saggio di extravasazione con blu di Evans come colorante che adopera topi carenti dell'inibitore della C1-esterasi. In questo modello, i topi vengono dosati con un composto della presente invenzione, il colorante blu di Evans viene iniettato attraverso la vena della coda, e l'extravasazione del colorante blu di Evans viene determinata attraverso mezzi spettrofotometrici in estratti di tessuto.

25 La capacità dei composti della presente invenzione di ridurre o prevenire, ad esempio, la sindrome da risposta infiammatoria sistemica come osservata durante le procedure cardiovascolari su pompa, può essere esaminata in sistemi

di perfusione in vitro o attraverso procedure chirurgiche su pompa in mammiferi di maggiore taglia, tra cui cani e babbuini. Le misure per valutare il beneficio dei composti della presente invenzione comprendono, ad esempio, una riduzione della perdita di piastrine, una riduzione dei complessi piastrine/globuli bianchi, una riduzione dei livelli di elastasi neutrofila nel plasma, una riduzione dell'attivazione dei fattori del complemento, e una riduzione dell'attivazione e/o del consumo delle proteine di attivazione per contatto (callicreina plasmatica, fattore XII, fattore XI, chininogeno di alto peso molecolare, inibitori della CI-esterasi).

I composti della presente invenzione possono anche essere utili come inibitori di ulteriori serin proteasi, segnatamente la trombina umana, la callicreina plasmatica umana e la plasmina umana. In virtù della loro azione di inibizione, questi composti sono indicati per l'uso nella prevenzione o nel trattamento di reazioni fisiologiche, tra cui coagulazione del sangue, fibrinolisi, regolazione della pressione sanguigna, infiammazione e guarigione delle ferite, che vengono catalizzate dalla suddetta classe di enzimi. Nello specifico, i composti possiedono un'utilità come farmaci per il trattamento delle malattie dovute all'elevata attività trombinica delle succinate serin proteasi, ad esempio per il trattamento dell'infarto del miocardio, e come reagenti da usare come anticoagulanti nella trasformazione del sangue in plasma a scopo diagnostico e per altri scopi commerciali.

V. COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE, FORMULAZIONI E COMBINAZIONI

I composti di questa invenzione possono essere somministrati in forme di dosaggio orale come compresse, capsule (ciascuna forma comprendendo formulazioni a rilascio prolungato o temporizzato), pillole, polveri, granuli, bevande, tinture, sospensioni, sciroppi ed emulsioni. I composti possono anche essere somministrati in forma endovenosa (bolo o infusione), intraperitoneale, sottocutanea o intramuscolare, in tutti i casi usando forme di dosaggio che sono ben note a coloro di competenza ordinaria nelle arti farmaceutiche. I composti possono essere somministrati da soli ma, generalmente, verranno somministrati insieme ad un trasportatore farmaceutico che verrà selezionato in base alla via di somministrazione scelta e alla pratica farmaceutica standard.

Il termine "composizione farmaceutica" identifica una composizione comprendente un composto dell'invenzione in combinazione con almeno un trasportatore farmaceuticamente accettabile aggiuntivo. Un "trasportatore farmaceuticamente accettabile" identifica mezzi generalmente accettati nel ramo per la distribuzione di

agenti biologicamente attivi ad animali, in particolare a mammiferi, tra cui ad esempio un adiuvante, un eccipiente o un veicolo, come diluenti, agenti conservanti, cariche, agenti di regolazione del flusso, agenti disintegranti, agenti umettanti, agenti emulsionanti, agenti sospendenti, agenti dolcificanti, agenti aromatizzanti, agenti profumanti, agenti antibatterici, agenti antimicotici, agenti lubrificanti e agenti disperdenti, a seconda della natura della modalità di somministrazione e delle forme di dosaggio. I trasportatori farmaceuticamente accettabili vengono formulati in base ad una pluralità di fattori che sono ampiamente alla portata delle persone di competenza ordinaria nel ramo. Questi comprendono, senza limitazioni: il tipo e la natura dell'agente attivo formulato; il soggetto a cui va somministrata la composizione contenente l'agente; la via attraverso cui si intende somministrare la composizione; e l'indicazione terapeutica presa a bersaglio. I trasportatori farmaceuticamente accettabili comprendono mezzi liquidi sia acquosi che non acquosi, insieme ad una varietà di forme di dosaggio solide e semi-solide. Tali trasportatori possono comprendere, oltre all'agente attivo, una pluralità di ingredienti e additivi differenti, tali ingredienti aggiuntivi essendo inclusi nella formulazione per una varietà di ragioni, ad esempio per stabilizzare l'agente attivo, come leganti, ecc., come sarà ben noto alle persone di competenza ordinaria nel ramo. Sono diverse le fonti facilmente accessibili che contengono descrizioni di adatti trasportatori farmaceuticamente accettabili e dei fattori coinvolti nella loro selezione come, ad esempio, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edizione (1990).

Naturalmente, il regime di dosaggio per i composti della presente invenzione varierà a seconda di fattori noti, come le caratteristiche farmacodinamiche del particolare agente e la sua modalità e via di somministrazione; la specie, l'età, il sesso, la salute, la condizione medica e il peso del ricevente; la natura e l'estensione dei sintomi; il tipo di trattamento concorrente; la frequenza di trattamento; la via di somministrazione, la funzione renale ed epatica del paziente, e l'effetto desiderato. Un medico o un veterinario è in grado di determinare e prescrivere la quantità efficace di farmaco che è necessaria per prevenire, contrastare o arrestare la progressione del disturbo tromboembolico.

Come guida generale, il dosaggio orale giornaliero di ciascun ingrediente attivo, quando usato per gli effetti indicati, varierà tra circa 0,001 e circa 1.000 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente tra circa 0,01 e circa 100 mg/kg di peso corporeo al giorno, e con preferenza assoluta tra circa 0,1 e circa 20 mg/kg/giorno. Le dosi più preferite per la somministrazione endovenosa varieranno tra circa 0.001 e circa 10 mg/kg/minuto durante un'infusione a velocità

costante. I composti di questa invenzione possono essere somministrati in una singola dose giornaliera, o il dosaggio giornaliero totale può essere somministrato in dosi suddivise due, tre o quattro volte al giorno.

I composti di questa invenzione possono anche essere somministrati per via parenterale (ad esempio per via endovenosa, intrarteriosa, intramuscolare o sottocutanea). Quando somministrata per via endovenosa o intrarteriosa, la dose può essere fornita in modo continuo o intermittente. Inoltre, è possibile sviluppare una formulazione da distribuire per via intramuscolare e sottocutanea che garantisce un rilascio graduale dell'ingrediente farmaceutico attivo. In una forma esecutiva, la composizione farmaceutica è una formulazione solida, ad esempio una composizione essiccata a spruzzo, che può essere usata come è o che può essere addizionata con solventi e/o diluenti dal medico o dal paziente prima dell'uso.

I composti di questa invenzione possono essere somministrati in forma intranasale, attraverso l'uso topico di veicoli intranasali adatti, o attraverso vie transdermiche con l'uso di cerotti cutanei transdermici. Quando la somministrazione avviene attraverso un sistema di distribuzione transdermica, la somministrazione del dosaggio sarà naturalmente continua, anziché intermittente, per tutto il regime di dosaggio.

I composti vengono tipicamente somministrati in miscela con adatti diluenti, eccipienti o trasportatori farmaceutici (qui identificati collettivamente come trasportatori farmaceutici) che verranno opportunamente selezionati in base alla forma di somministrazione voluta, ad esempio compresse orali, capsule, bevande e sciroppi, e in conformità alle pratiche farmaceutiche convenzionali.

Ad esempio, quando somministrato per via orale in forma di compressa o capsula, il componente farmaceutico attivo può essere combinato con un trasportatore orale, atossico, farmaceuticamente accettabile e inerte come lattosio, amido, saccarosio, glucosio, metilcellulosa, stearato di magnesio, fosfato dicalcico, solfato di calcio, mannitolo, sorbitolo e simili; quando somministrati per via orale in forma liquida, i componenti farmaceutici orali possono essere combinati con qualsiasi trasportatore orale, atossico, farmaceuticamente accettabile e inerte come etanolo, glicerolo, acqua e simili. Inoltre, quando desiderato o necessario, è anche possibile aggiungere alla miscela adatti leganti, lubrificanti, agenti disintegranti e agenti coloranti. I leganti adatti comprendono amido, gelatina, zuccheri naturali, come glucosio o beta-lattosio, dolcificanti a base di mais, gomme naturali e sintetiche, come acacia, gomma adragante o

alginato di sodio, carbossimetilcellulosa e polietilenglicole, cere e simili. I lubrificanti usati in queste forme di dosaggio comprendono oleato di sodio, stearato di sodio, stearato di magnesio, benzoato di sodio, acetato di sodio, cloruro di sodio e simili. I disintegranti comprendono, senza limitazioni, amido, metilcellulosa, agar, bentonite, gomma xantano e simili.

5 I composti della presente invenzione possono anche essere somministrati sotto forma di sistemi di distribuzione liposomiali, ad esempio piccole vescicole monolamellari, grandi vescicole monolamellari e vescicole multilamellari. I liposomi possono essere formati da una varietà di fosfolipidi, come colesterolo, stearilamina o fosfatidilcoline.

10 I composti della presente invenzione possono anche essere accoppiati a polimeri solubili che agiscono da trasportatori farmaceutici localizzabili. Tali polimeri possono comprendere polivinilpirrolidone, copolimeri di pirano, poliidrossipropilmetacrilammidefenolo, poliidrossietilaspirtammidefenolo, o polietilenoossido-polilisina sostituito con residui di palmitoile. I composti della presente invenzione possono anche essere accoppiati ad una classe di polimeri biodegradabili che sono utili per ottenere un rilascio controllato di un farmaco, ad esempio acido polilattico, acido poliglicolico, copolimeri di acido polilattico e poliglicolico, poli(caprolattone epsilon), acido poliidrossi butirrico, 15 poliortoesteri, poliacetali, poliidropirani, policianoacrilati, e copolimeri a blocchi reticolati o anfipatici di idrogel. Le dispersioni solide sono anche denominate dispersioni allo stato solido. In alcune forme esecutive, uno qualunque dei composti qui descritti viene formulato come una dispersione essiccata a spruzzo (SDD). Una SDD è una dispersione molecolare amorfa a singola fase di un farmaco in una matrice polimerica. Trattasi di una soluzione solida preparata dissolvendo il farmaco e un polimero in un solvente (ad esempio acetone, metanolo o simili) ed essiccando a spruzzo la 20 soluzione. Il solvente evapora rapidamente dalle goccioline, causando la rapida solidificazione della miscela di polimero e farmaco e intrappolando il farmaco in forma amorfa sotto forma di una dispersione molecolare amorfa.

25 Le forme di dosaggio (composizioni farmaceutiche) adatte per la somministrazione possono contenere da circa 1 milligrammo a circa 1000 milligrammi di ingrediente attivo per unità di dosaggio. In queste composizioni farmaceutiche, l'ingrediente attivo sarà normalmente presente in una quantità di circa 0,1-95% in peso in base al peso totale della composizione.



5 Le capsule di gelatina possono contenere l'ingrediente attivo e trasportatori in polvere, come lattosio, amido, derivati della cellulosa, stearato di magnesio, acido stearico e simili. La produzione delle compresse pressate può fare uso di diluenti simili. Sia le compresse che le capsule possono essere realizzate sotto forma di prodotti a rilascio prolungato che forniscono un rilascio continuo della medicazione per diverse ore. Le compresse pressate possono essere rivestite con zucchero o rivestite con una pellicola allo scopo di mascherare qualsiasi gusto sgradevole e proteggere la compressa dall'atmosfera, o possono essere rivestite con un rivestimento enterico in modo da permettere la loro disintegrazione selettiva nel tratto gastrointestinale.

Le forme di dosaggio liquide da somministrare per via orale possono contenere coloranti e aromatizzanti allo scopo di aumentare l'accettazione del paziente.

10 In generale, i trasportatori adatti per le soluzioni parenterali sono acqua, un olio adatto, soluzione salina, destrosio (glucosio) acquoso e soluzioni zuccherine correlate, e glicoli, come propilenglicole o polietilenglicoli. Le soluzioni da somministrare per via parenterale contengono preferibilmente un sale idrosolubile dell'ingrediente attivo, opportuni agenti stabilizzanti e, se necessario, sostanze tamponanti. Gli agenti stabilizzanti adatti sono agenti antiossidanti, come bisolfito di sodio, solfito di sodio o acido ascorbico, da soli o in combinazione. È anche previsto
15 l'uso di acido citrico, suoi sali ed EDTA sodico. Le soluzioni parenterali possono inoltre contenere conservanti, come benzalconio cloruro, metil- o propil-parabene, e clorbutanolo.

I trasportatori farmaceutici adatti sono descritti in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un testo di riferimento standard in questo settore.

20 Quando i composti di questa invenzione vengono combinati con altri agenti anticoagulanti, ad esempio, un dosaggio giornaliero può essere da circa 0,1 a circa 100 milligrammi del composto della presente invenzione e da circa 0,1 a circa 100 milligrammi (del secondo agente) per chilogrammo di peso corporeo del paziente. Per una forma di dosaggio in compresse, i composti di questa invenzione possono essere generalmente presenti in una quantità da circa 5 a circa 300 milligrammi per unità di dosaggio, e il secondo anticoagulante in una quantità da circa 1 a circa 500 milligrammi per unità di dosaggio.

Quando i composti della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con un agente antiplastrinico, come guida generale, un dosaggio giornaliero può essere tipicamente da circa 0,01 a circa 300 milligrammi del composto della presente invenzione e da circa 50 a circa 150 milligrammi dell'agente antiplastrinico, preferibilmente da circa 0,1 a circa 4 milligrammi del composto della presente invenzione e da circa 1 a circa 3 milligrammi dell'agente antiplastrinico per chilogrammo di peso corporeo del paziente.

Quando i composti della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con un agente trombolitico, un dosaggio giornaliero può essere tipicamente da circa 0,1 a circa 100 milligrammi del composto della presente invenzione per chilogrammo di peso corporeo del paziente e, nel caso degli agenti trombolitici, il dosaggio abituale dell'agente trombolitico, quando somministrato da solo, può essere ridotto di circa 50-80% quando somministrato insieme ad un composto della presente invenzione.

In particolare, quando forniti in una singola unità di dosaggio, è probabile un'interazione chimica tra gli ingredienti attivi combinati. Per questa ragione, quando il composto della presente invenzione e un secondo agente terapeutico vengono combinati in una singola unità di dosaggio, essi vengono formulati in maniera tale che, benché gli ingredienti attivi siano combinati in una singola unità di dosaggio, il contatto fisico tra gli ingredienti attivi sia minimizzato (ovvero ridotto). Ad esempio, un ingrediente attivo può essere provvisto di un rivestimento enterico. Applicando un rivestimento enterico ad uno degli ingredienti attivi, è possibile non solo minimizzare il contatto tra gli ingredienti attivi combinati ma anche controllare il rilascio di uno di questi componenti nel tratto gastrointestinale, permettendo così che uno di questi componenti non venga rilasciato nello stomaco bensì negli intestini. Uno degli ingredienti attivi può anche essere rivestito con un materiale che esercita un rilascio prolungato attraverso l'intero tratto gastrointestinale e che serve anche a minimizzare il contatto fisico tra gli ingredienti attivi combinati. In aggiunta, il componente a rilascio prolungato può essere anche provvisto di un rivestimento enterico che permetterà di effettuare il rilascio di questo componente solo nell'intestino. Ancora un altro approccio potrà prevedere di formulare un prodotto di combinazione in cui un componente è rivestito con un polimero di rilascio prolungato e/o enterico e in cui anche l'altro componente è rivestito con un polimero, come una idrossipropil metilcellulosa (HPMC) a basso grado di viscosità o

altri materiali adatti noti nel ramo, in modo da separare ulteriormente i componenti attivi. Il rivestimento polimerico serve a formare una barriera aggiuntiva all'interazione con l'altro componente.

5 Questi e altri modi per minimizzare il contatto tra i componenti dei prodotti di combinazione della presente invenzione, a prescindere dal fatto che essi vengano somministrati in una singola forma di dosaggio o in forme separate ma allo stesso tempo e nello stesso modo, risulteranno evidenti agli esperti del ramo sulla scorta della presente divulgazione.

10 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente inoltre uno o più agenti terapeutici aggiuntivi che sono selezionati da attivatori dei canali del potassio, bloccanti dei canali del potassio, bloccanti dei canali del calcio, inibitori dello scambiatore sodio-idrogeno, agenti antiaritmici, agenti antiarterosclerotici, anticoagulanti, agenti antitrombotici, agenti protrombolitici, antagonisti del fibrinogeno, diuretici, agenti antipertensivi, inibitori dell'ATPasi, antagonisti del recettore per i mineralcorticoidi, inibitori della fosfodiesterasi, agenti antidiabetici, agenti antinfiammatori, antiossidanti, modulatori dell'angiogenesi, agenti antiosteoporosi, terapie di sostituzione ormonale, modulatori dei recettori ormonali, contraccettivi orali, agenti antiobesità, antidepressivi, agenti ansiolitici, agenti antipsicotici, agenti antiproliferativi, agenti antitumorali, agenti 15 contro l'ulcera e contro la malattia da reflusso gastroesofageo, agenti a base di ormoni della crescita e/o secretagoghi degli ormoni della crescita, mimetici tiroidei, agenti antinfettivi, agenti antivirali, agenti antibatterici, agenti antimicotici, agenti ipocolesterolemizzanti/ipolipidemizzanti, terapie basate sul profilo lipidico, agenti che mimano il precondizionamento ischemico e/o lo stordimento miocardico, o una loro combinazione.

20 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente inoltre uno o più agenti terapeutici aggiuntivi che sono selezionati da un agente antiaritmico, un agente antipertensivo, un agente anticoagulante, un agente antiplastrinico, un agente inibente la trombina, un agente trombolitico, un agente fibrinolitico, un bloccante dei canali del calcio, un bloccante dei canali del potassio, un agente ipocolesterolemizzante/ipolipidemizzante, o una loro combinazione.

25 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente inoltre uno o più agenti terapeutici aggiuntivi che sono selezionati da warfarina, eparina non frazionata, eparina di basso

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

peso molecolare, pentasaccaride sintetico, irudina, argatroban, aspirina, ibuprofene, naproxene, sulindac, indometacina, mefenamato, dipiridamolo, droxicam, diclofenac, sulfpirazone, piroxicam, ticlopidina, clopidogrel, tirofiban, eptifibatide, abciximab, melagatran, ximelagatran, disolfatoirudina, attivatore tissutale del plasminogeno, attivatore tissutale del plasminogeno modificato, anistreplasi, urochinasi e streptochinasi, o una loro combinazione.

5 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica in cui l'agente terapeutico aggiuntivo è un agente antipertensivo selezionato da inibitori di ACE, antagonisti dei recettori AT-1, antagonisti dei recettori beta-adrenergici, antagonisti dei recettori ETA, antagonisti doppi dei recettori ETA/AT-1, inibitori della renina (aliskiren) e inibitori delle vasopepsidasi, un agente antiaritmico selezionato da inibitori di I_{Kur} , un anticoagulante selezionato da inibitori della trombina, attivatori dell'antitrombina III, attivatori del cofattore eparinico
10 II, altri inibitori del fattore XIa, altri inibitori della callicreina, antagonisti dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), inibitori dell'inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina (TAFI), inibitori del fattore VIIa, inibitori del fattore IXa e inibitori del fattore Xa, o un agente antiplastrinico selezionato da bloccanti di GPIIb/IIIa, bloccanti di GP Ib/IX, antagonisti del recettore attivato da proteasi 1 (PAR-1), antagonisti del recettore attivato da proteasi 4 (PAR-4), antagonisti del recettore EP3 per la prostaglandina E2, antagonisti del recettore per il collagene, inibitori della
15 fosfodiesterasi-III, antagonisti del recettore P2Y₁, antagonisti di P2Y₁₂, antagonisti dei recettori per i trombossani, inibitori della cicloossigenasi-1 e aspirina, o una loro combinazione.

In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica in cui lo/gli agenti terapeutici aggiuntivi sono un agente antiplastrinico o una combinazione di agenti antiplastrinici.

20 In un'altra forma esecutiva, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica in cui l'agente terapeutico aggiuntivo è l'agente antiplastrinico clopidogrel.

I composti della presente invenzione possono essere somministrati da soli o in combinazione con uno o più agenti terapeutici aggiuntivi. Con "somministrato in combinazione" o "terapia di combinazione" si intende che il composto della presente invenzione e uno o più agenti terapeutici aggiuntivi vengono somministrati simultaneamente al mammifero sotto trattamento. Quando la somministrazione avviene in combinazione, ogni componente può essere
25 somministrato allo stesso tempo o in sequenza, secondo qualsiasi ordine e in punti temporali differenti. Ogni

componente può dunque essere somministrato in maniera separata ma sufficientemente ravvicinata nel tempo da fornire l'effetto terapeutico desiderato.

5 I composti che possono essere somministrati in combinazione con i composti della presente invenzione comprendono, ma senza limitazioni, anticoagulanti, agenti anti-trombina, agenti anti-piastrinici, fibrinolitici, agenti ipolipidemizzanti, farmaci antipertensivi e agenti anti-ischemici.

10 Altri agenti anticoagulanti (o agenti inibitori della coagulazione) che possono essere usati in combinazione con i composti di questa invenzione comprendono warfarina, eparina (eparina non frazionata o qualsiasi eparina di basso peso molecolare disponibile in commercio, ad esempio LOVENOX®), pentasaccaride sintetico, inibitori della trombina ad azione diretta, tra cui irudina e argatroban, e altri inibitori del fattore VIIa, inibitori del fattore IXa, inibitori del
10 fattore Xa (ad esempio ARIXTRA®, apixaban, rivaroxaban, LY-517717, DU-176b, DX-9065a, e quelli divulgati in WO 98/57951, WO 03/026652, WO 01/047919 e WO 00/076970), inibitori del fattore XIa, e inibitori delle forme attivate di TAFI e PAI-1 che sono noti nel ramo.

15 Nel presente contesto, il termine agenti anti-piastrinici (o agenti inibitori delle piastrine) indica agenti che inibiscono la funzione delle piastrine, ad esempio inibendo l'aggregazione, l'adesione o la secrezione del contenuto
15 granulare delle piastrine. Tali agenti comprendono, ma senza limitazioni, i vari farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) noti come acetaminofene, aspirina, codeina, diclofenac, droxicam, fentanil, ibuprofene, indometacina, ketorolac, mefenamato, morfina, naproxene, fenacetina, piroxicam, sufentanil, sulfpirazone, sulindac e loro sali o profarmaci farmaceuticamente accettabili. Tra i FANS sono preferiti l'aspirina (acido acetilsalicilico o ASA) e il piroxicam. Altri agenti adatti per inibire le piastrine comprendono antagonisti delle glicoproteine IIb/IIIa (ad esempio
20 tirofiban, eptifibatide, abciximab e integrelin), antagonisti del recettore per il trombossano-A2 (ad esempio ifetroban), inibitori della trombossano-A-sintetasi, inibitori della fosfodiesterasi-III (PDE-III) (ad esempio dipiridamolo, cilostazolo) e inibitori di PDE-V (come sildenafil), antagonisti del recettore attivato da proteasi 1 (PAR-1) (ad esempio E-5555, SCH-530348, SCH-203099, SCH-529153 e SCH-205831), e loro sali o profarmaci farmaceuticamente accettabili.

Altri esempi di agenti antiplastrinici adatti per l'uso in combinazione con i composti della presente invenzione, con o senza aspirina, sono antagonisti dei recettori per ADP (adenosina difosfato), preferibilmente antagonisti dei recettori purinergici P2Y₁ e P2Y₁₂, con P2Y₁₂ che è ancora più preferito. Gli antagonisti del recettore P2Y₁₂ preferiti comprendono clopidogrel, ticlopidina, prasugrel, ticagrelor e cangrelor, e loro sali o profarmaci farmaceuticamente accettabili. La ticlopidina e il clopidogrel sono composti preferiti anche perché, in uso, sono notoriamente più delicati dell'aspirina sul tratto gastrointestinale. Un agente ancora più preferito è il clopidogrel.

Un esempio preferito è una tripla combinazione comprendente un composto della presente invenzione, aspirina e un altro agente antiplastrinico. Preferibilmente, l'agente antiplastrinico è clopidogrel o prasugrel, più preferibilmente clopidogrel.

Nel presente contesto, il termine inibitori della trombina (o agenti anti-trombina) indica inibitori della serin proteasi trombina. L'inibizione della trombina interrompe vari processi mediati dalla trombina, come l'attivazione trombina-mediata delle piastrine (ovvero, ad esempio, l'aggregazione delle piastrine e/o la secrezione dei contenuti granulari, serotonina inclusa) e/o la formazione di fibrina. L'esperto del ramo conosce una pluralità di inibitori della trombina, e questi inibitori sono contemplati per l'uso in combinazione con i presenti composti. Tali inibitori comprendono, ma senza limitazioni, derivati di boroarginina, boropeptidi, eparine, irudina e argatroban, dabigatran, AZD-0837, e quelli divulgati in WO 98/37075 e WO 02/044145, e loro sali e profarmaci farmaceuticamente accettabili. I derivati di boroarginina e i boropeptidi comprendono N-acetil derivati e derivati peptidici dell'acido boronico, come derivati di lisina, ornitina, arginina e omoarginina con residui C-terminali di acido α -amminoboronic, e i loro corrispondenti analoghi di isotiuronio. Nel presente contesto, il termine irudina comprende adatti derivati o analoghi dell'irudina, qui identificati come iruloghi, ad esempio disolfatoirudina.

Nel presente contesto, il termine agenti trombolitici (o fibrinolitici) (o trombolitici o fibrinolitici) indica agenti che lisano i coaguli di sangue (trombi). Tali agenti comprendono attivatore tissutale del plasminogeno (TPA, naturale o ricombinante) e sue forme modificate, anistreplasi, urochinasi, streptochinasi, tenecteplasi (TNK), lanoteplasi (nPA), inibitori del fattore VIIa, inibitori della trombina, inibitori dei fattori IXa, Xa e XIa, inibitori di PAI-I (ovvero inattivatori degli inibitori dell'attivatore tissutale del plasminogeno), inibitori di TAFI, inibitori dell'alfa-2-antiplasmina

e il complesso anisoilato attivatore del plasminogeno-streptochinasi, inclusi loro sali farmaceuticamente accettabili o profarmaci. Nel presente contesto, il termine anistreplasi identifica il complesso anisoilato attivatore del plasminogeno-streptochinasi come descritto, ad esempio, nella domanda di brevetto europeo EP-A-028489, la cui divulgazione è qui inclusa per riferimento. Nel presente contesto, il termine urochinasi intende significare sia l'urochinasi a catena doppia che l'urochinasi a catena singola, la seconda essendo qui anche identificata come prourochinasi.

Esempi di agenti ipocolesterolemizzanti/ipolipidemizzanti e di terapie basate sul profilo lipidico che sono adatti per l'uso in combinazione con i composti della presente invenzione comprendono inibitori della HMG-CoA reduttasi (ad esempio pravastatina, lovastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e altre statine), modulatori dell'attività dei recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDL) (ad esempio HOE-402, inibitori di PCSK9), sequestranti degli acidi biliari (ad esempio colestiramina e colestipolo), acido nicotinico o suoi derivati (ad esempio NIASPAN[®]), modulatori di GPR109B (recettore per l'acido nicotinico), derivati dell'acido fenofibrato (ad esempio gemfibrozil, clofibrato, fenofibrato e benzafibrato) e altri modulatori dei recettori attivati dai proliferatori perossisomiali (PPAR) alfa, modulatori di PPAR-delta (ad esempio GW-501.516), modulatori di PPAR-gamma (ad esempio rosiglitazone), composti che hanno molteplici funzionalità per modulare le attività di varie combinazioni di PPAR-alfa, PPAR-gamma e PPAR-delta, probucolo o suoi derivati (ad esempio AGI-1067), inibitori dell'assorbimento del colesterolo e/o inibitori del trasportatore C1-simile di Niemann-Pick (ad esempio ezetimibe), inibitori della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (ad esempio CP-529414), inibitori della squalene sintasi e/o inibitori della squalene epossidasi o loro miscele, inibitori dell'acil coenzima A:colesteril aciltransferasi (ACAT) 1, inibitori di ACAT2, inibitori doppi di ACAT1/2, inibitori del trasporto degli acidi biliari nell'ileo (o inibitori del trasporto sodio co-dipendente apicale degli acidi biliari), inibitori della proteina di trasferimento dei trigliceridi nel microsoma, modulatori del recettore X del fegato (LXR) alfa, modulatori di LXR-beta, modulatori doppi di LXR alfa/beta, modulatori di FXR, acidi grassi omega 3 (ad esempio 3-PUFA), stanoli vegetali e/o esteri di acidi grassi di stanoli vegetali (ad esempio il fitostanolo estere usato nella margarina BENECOL[®]), inibitori della lipasi endoteliale, e mimetici funzionali di HDL che attivano il trasporto inverso del colesterolo (ad esempio derivati di apoAI o peptidomimetici di apoAI).

I composti della presente invenzione sono anche utili come composti standard o di riferimento, ad esempio come standard di qualità o come controlli, in test o saggi che prevedono di inibire la trombina, i fattori VIIa, IXa, Xa, XIa e/o la callicreina plasmatica. Tali composti possono essere forniti in un kit commerciale, ad esempio per l'uso nella ricerca farmaceutica che riguarda la trombina, i fattori VIIa, IXa, Xa, XIa e/o la callicreina plasmatica. XIa. Ad esempio, un composto della presente invenzione potrà essere usato come riferimento in un saggio per confrontare la sua attività nota con un composto di attività ignota. Ciò servirà a garantire allo sperimentatore che il saggio è stato effettuato in maniera corretta e fornirà una base per il confronto, specie se il composto di test è un derivato del composto di riferimento. I composti secondo la presente invenzione potranno essere usati per valutare l'efficacia di nuovi saggi o protocolli durante il loro sviluppo.

I composti della presente invenzione possono anche essere usati in saggi diagnostici che riguardano la trombina, i fattori VIIa, IXa, Xa, XIa e/o la callicreina plasmatica. Ad esempio, la presenza della trombina, dei fattori VIIa, IXa, Xa, XIa e/o della callicreina plasmatica in un campione ignoto potrà essere determinata aggiungendo il substrato cromogenico rilevante, ad esempio S2366 per il fattore XIa, ad una serie di soluzioni contenenti un campione di test e opzionalmente uno dei composti della presente invenzione. Osservando una produzione di pNA nelle soluzioni contenenti il campione di test ma non in presenza di un composto della presente invenzione, si concluderà che il fattore XIa era presente.

I composti della presente invenzione che sono estremamente potenti e selettivi, ovvero quelli aventi valori di K_i inferiori o uguali a $0,001 \mu\text{M}$ contro la proteasi bersaglio e superiori o uguali a $0,1 \mu\text{M}$ contro le altre proteasi, possono anche essere usati in saggi diagnostici che prevedono di quantificare la trombina, i fattori VIIa, IXa, Xa, XIa e/o la callicreina plasmatica in campioni di siero. Ad esempio, la quantità di fattore XIa nei campioni di siero potrà essere determinata attraverso un'accurata titolazione dell'attività proteasica in presenza del substrato cromogenico rilevante, S2366, con un potente inibitore del fattore XIa della presente invenzione.

La presente invenzione comprende anche un articolo manufatto. Nel presente contesto, un articolo manufatto intende comprendere, ma senza limitazioni, kit e confezioni. L'articolo manufatto della presente invenzione comprende:

(a) un primo contenitore; (b) una composizione farmaceutica collocata all'interno del primo contenitore, in cui la

composizione comprende: un primo agente terapeutico comprendente un composto della presente invenzione o una sua forma di sale farmaceuticamente accettabile; e (c) un inserto informativo che dichiara che la composizione farmaceutica può essere adoperata per il trattamento di un disturbo tromboembolico e/o infiammatorio (come già definito). In un'altra forma esecutiva, l'inserto informativo dichiara che la composizione farmaceutica può essere usata in combinazione (come già definito) con un secondo agente terapeutico per trattare un disturbo tromboembolico e/o infiammatorio. L'articolo manufatto può inoltre comprendere: (d) un secondo contenitore, in cui i componenti (a) e (b) sono posizionati all'interno del secondo contenitore, mentre il componente (c) è posizionato all'interno o all'esterno del secondo contenitore. Con posizionato all'interno del primo e del secondo contenitore si intende che il rispettivo contenitore contiene l'articolo all'interno dei suoi confini.

Il primo contenitore è un ricettacolo usato per contenere una composizione farmaceutica. Questo contenitore può essere destinato alla produzione, allo stoccaggio, alla spedizione e/o alla vendita al dettaglio/all'ingrosso. Il primo contenitore intende comprendere una bottiglia, un barattolo, una fiala, una provetta, una siringa, un tubetto (ad esempio per una preparazione di crema) o qualsiasi altro contenitore usato per produrre, contenere, conservare o distribuire un prodotto farmaceutico.

Il secondo contenitore è un contenitore usato per contenere il primo contenitore e, opzionalmente, l'inserto informativo. Esempi del secondo contenitore comprendono, ma senza limitazioni, scatole (ad esempio di cartone o di plastica), casse, cartoni, buste (ad esempio buste di carta o di plastica), astucci e sacchetti. L'inserto informativo può essere fisicamente attaccato all'esterno del primo contenitore usando nastro, colla, graffette o un altro metodo di fissaggio, o può trovarsi all'interno del secondo contenitore senza mezzi fisici di fissaggio al primo contenitore. In alternativa, l'inserto informativo si trova posizionato all'esterno del secondo contenitore. Quando l'inserto informativo si trova all'esterno del secondo contenitore, è preferibile che esso venga fisicamente attaccato usando nastro, colla, graffette o un altro metodo di fissaggio. In alternativa, l'inserto informativo può trovarsi adiacente o toccare l'esterno del secondo contenitore senza essere fisicamente attaccato.

L'inserto informativo è un'etichetta, un cartellino, una targhetta, ecc. che riporta informazioni riguardanti la composizione farmaceutica collocata all'interno del primo contenitore. Le informazioni riportate saranno abitualmente

determinate dall'agenzia di regolamentazione che governa l'area in cui l'articolo manufatto è destinato alla vendita (ad esempio la United States Food & Drug Administration). Preferibilmente, l'insero informativo riporta specificatamente le indicazioni per cui la composizione farmaceutica è stata approvata. L'insero informativo può essere realizzato in qualsiasi materiale che permetta ad una persona di leggere le informazioni contenute nell'insero o sull'insero.

5 Preferibilmente, l'insero informativo è un materiale stampabile (ad esempio carta, plastica, cartone, foglio metallico, carta o plastica con dorso adesivo, ecc.) su cui le informazioni desiderate sono state formate (ad esempio stampate o applicate).

Altre caratteristiche dell'invenzione risulteranno evidenti nel corso delle seguenti descrizioni di forme esecutive esemplificative che vengono fornite per illustrare l'invenzione senza volerla limitare. I seguenti esempi sono stati preparati, isolati e caratterizzati usando i metodi qui divulgati.

10

VI. SINTESI GENERALE, SCHEMI INCLUSI

I composti della presente invenzione possono essere sintetizzati attraverso numerosi metodi disponibili agli esperti nel ramo della chimica organica (Maffrand J. P. et al., *Heterocycles*, 16(1):35-37 (1981)). A seguire vengono descritti metodi generali di sintesi per preparare i composti della presente invenzione. Questi schemi sono illustrativi, e non intendono limitare le possibili tecniche che un esperto nel ramo può utilizzare per preparare i composti qui divulgati. Agli esperti del ramo risulteranno evidenti metodi differenti per preparare i composti della presente invenzione. Inoltre, per fornire il o i composti desiderati, i vari passaggi di sintesi possono essere condotti in una sequenza alternativa.

15

Esempi di composti della presente invenzione, preparati con i metodi descritti negli schemi generali, sono forniti nella sezione degli intermedi e degli esempi riportata qui sotto. La preparazione degli esempi omochirali può essere eseguita attraverso tecniche note all'esperto del ramo. Ad esempio, i composti omochirali possono essere preparati mediante separazione dei prodotti racemici via HPLC preparativa in fase chirale. In alternativa, i composti esemplificativi possono essere preparati come prodotti enantiomericamente arricchiti attraverso metodi noti. Questi comprendono, ma senza limitazioni, l'incorporazione di funzionalità ausiliarie chirali in intermedi racemici che servono

20

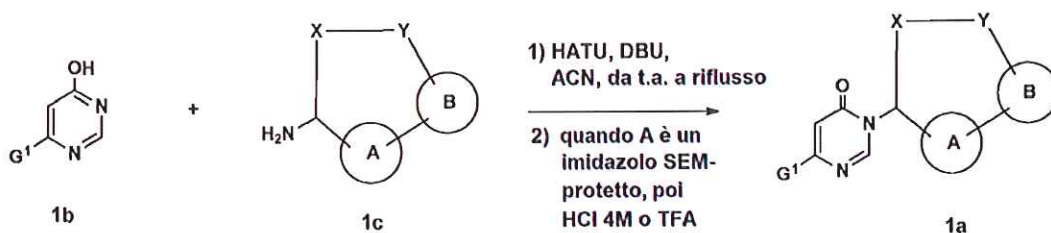
a controllare la diastereoselettività delle trasformazioni, fornendo prodotti enantio-arricchiti dopo il taglio dell'ausiliario chirale.

I composti della presente invenzione possono essere preparati in una pluralità di modi che sono noti all'esperto nel ramo della sintesi organica. Come sapranno gli esperti del ramo, i composti della presente invenzione possono essere sintetizzati usando i metodi descritti sotto in combinazione con metodi di sintesi che sono noti nel ramo della chimica organica sintetica, o con loro varianti. I metodi preferiti comprendono, ma senza limitazioni, quelli descritti sotto. Le reazioni vengono condotte in un solvente o in una miscela di solventi che è adatto/a per i reagenti e i materiali impiegati e che è adatto/a per le trasformazioni da effettuare. Gli esperti nel ramo della sintesi organica sapranno che la funzionalità presente sulla molecola dovrà essere compatibile con le trasformazioni proposte. Talvolta, ciò richiederà di compiere una valutazione per modificare l'ordine dei passaggi di sintesi, o per selezionare un particolare schema procedurale a discapito di un altro, allo scopo di ottenere un composto desiderato dell'invenzione.

Si saprà inoltre che un altro fattore di primaria importanza di cui tenere conto durante la pianificazione di qualunque via di sintesi in questo ramo è la scelta ponderata del gruppo protettivo da usare per proteggere i gruppi funzionali reattivi che sono presenti nei composti descritti in questa invenzione. Un resoconto autorevole che descrive le molte alternative a disposizione del professionista preparato è Greene et al. (Protective Groups in Organic Synthesis, Quarta Edizione, Wiley-Interscience (2006)).

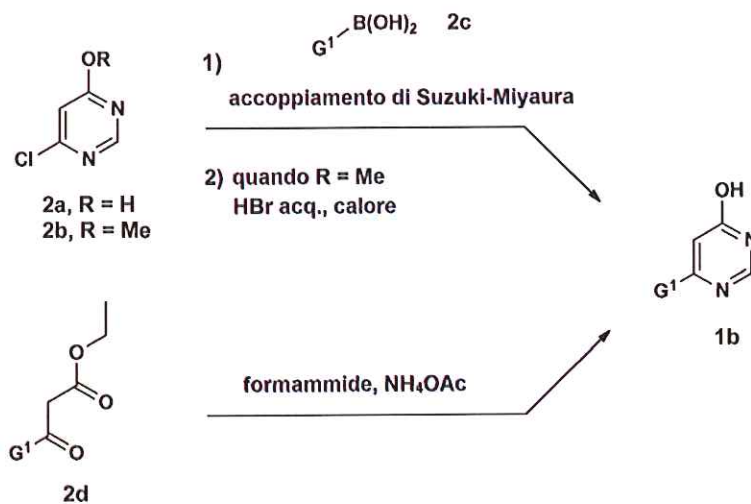
I composti pirimidinonici 1a rappresentativi di questa invenzione possono essere preparati come descritto nello Schema 1. Utilizzando una procedura modificata descritta da Xiao (Org. Lett., 11:1421 (2009)), è possibile accoppiare derivati pirimidin-4-olici opportunamente sostituiti 1b con un'ammina macrociclica opportunamente sostituita 1c in presenza di HATU e DBU in un solvente, come CH₃CN, per fornire i composti pirimidinonici 1a. Quando l'anello A è un anello imidazolico protetto da SEM, è necessario un passaggio di deprotezione aggiuntivo che utilizza HCl 4M in diossano o TFA in DCM per ottenere i composti di questa invenzione.

Schema 1



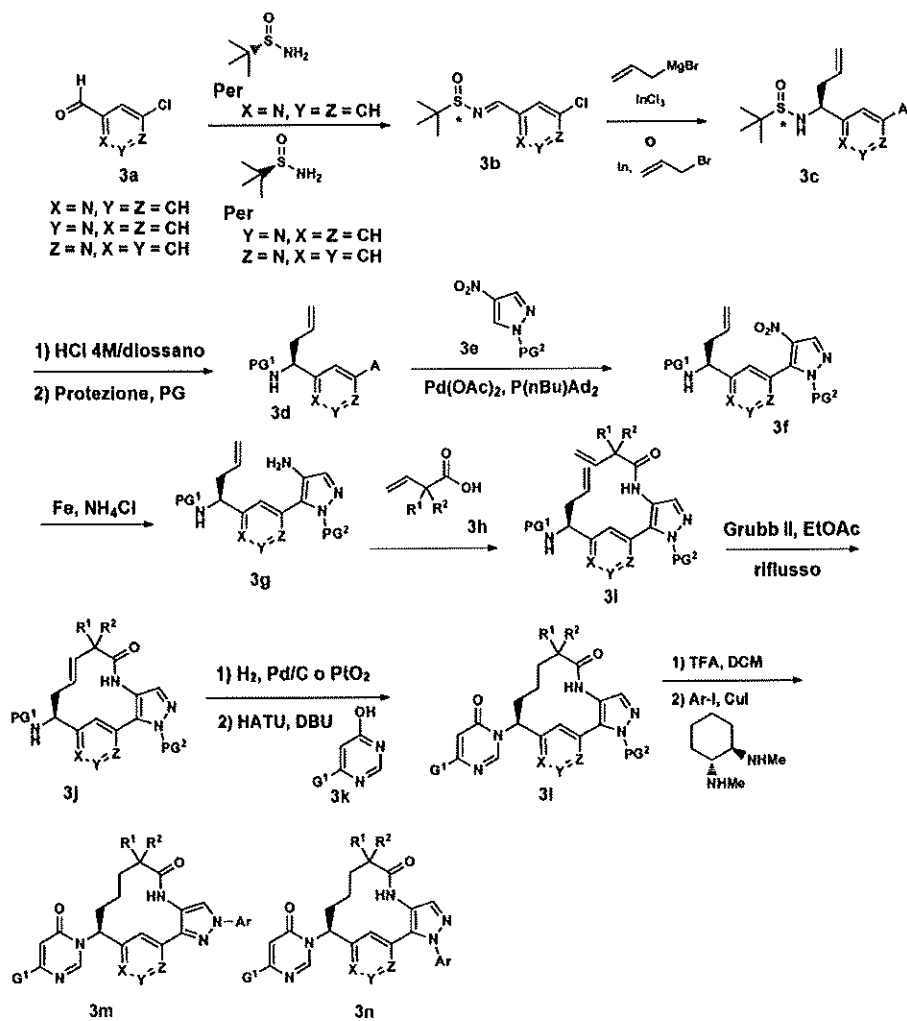
Lo Schema 2 descrive la sintesi di derivati pirimidin-4-olici opportunamente sostituiti 1b. L'accoppiamento di Suzuki-Miyaura tra il 6-cloropirimidin-4-olo (2a) e un acido o estere aril- o eteroaril-boronico 2c opportunamente sostituito in presenza di una base, come base di Hünig o fosfato di potassio tribasico, in una miscela di solventi, come toluene ed etanolo, con l'uso di un precatalizzatore, come Pd(PPh₃)₄ o Xphos di 2^a generazione, fornisce 1b. In alternativa, in caso di utilizzo della 4-cloro-6-metossipirimidina 2b, è necessario un passaggio di deprotezione aggiuntivo che utilizza HBr acquoso ad alte temperature per fornire i derivati pirimidin-4-olici 1b.

Schema 2



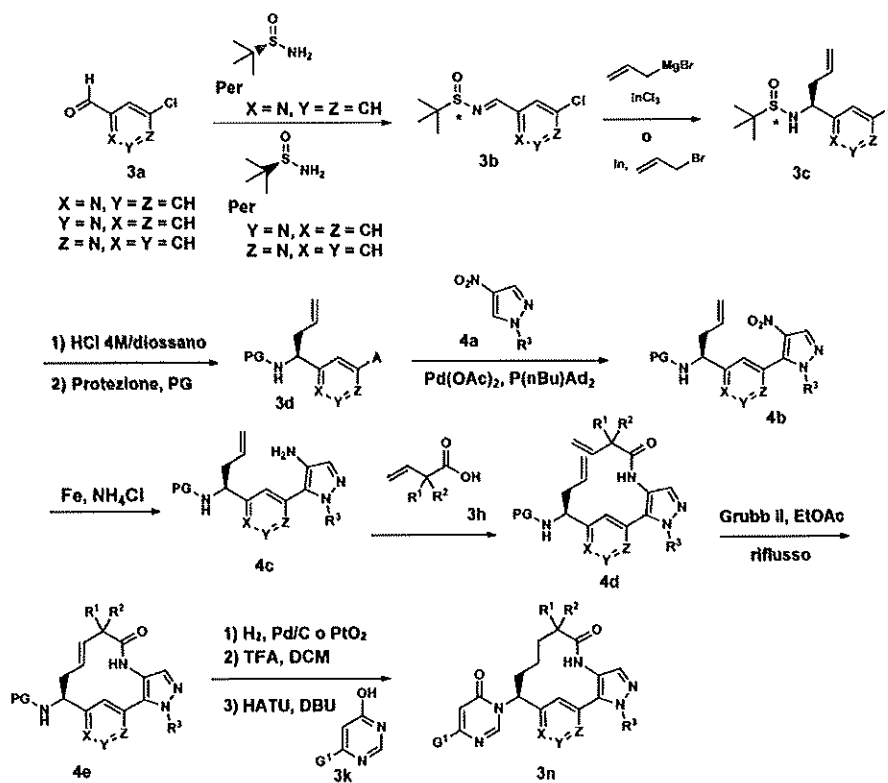
Gli intermedi per la preparazione dei composti della presente invenzione in cui l'anello A è un eterociclo di 6 componenti (ad esempio piridina) possono essere ricavati da aldeidi opportunamente sostituite 3a secondo il metodo generale delineato nello Schema 3. La condensazione dell'aldeide 3a (X = N), preparata secondo una procedura modificata descritta da Negi (Synthesis, 991 (1996)), con (S)-2-metilpropan-2-solfonammide in presenza di solfato di rame o carbonato di cesio anidro in un solvente, come DCM, dà la solfinimmina 3b (Ellman J., J. Org. Chem., 64:1278 (1999)). Utilizzando una procedura modificata descritta da Kuduk (Tetrahedron Letters, 45:6641 (2004)), la solfinimmina 3b può essere addizionata con reagenti di Grignard opportunamente sostituiti, ad esempio allilmagnesio bromuro, fornendo una solfinammide 3c sotto forma di una miscela di diastereoisomeri che possono essere separati in vari stadi della sequenza. La diastereoselettività per l'addizione dell'allilmagnesio bromuro alla solfinimmina 3b può essere migliorata impiegando cloruro di indio(III) secondo una procedura modificata di Xu (Xu M.-H., Org. Lett., 10(6):1259 (2008)). L'interconversione dei gruppi protettivi per dare 3d può essere ottenuta in due passaggi. L'accoppiamento critico tra le subunità viene ottenuto attraverso la metodologia sviluppata da Sames (J. Am. Chem. Soc., 131:3042 (2009)). Il trattamento della cloropiridina 3d con un nitropirazolo N-protetto 3e in presenza di quantità catalitiche di Pd(OAc)₂ e P(nBu)Ad₂ crea il legame arilpirazolico desiderato, formando 3f. La riduzione di questo nitropirazolo rende 3g. Questo amminopirazolo può essere poi accoppiato con un acido carbossilico opportunamente sostituito 3h usando T3P[®] e una base, come piridina, per dare l'ammide 3i. Il diene può essere ciclizzato via metatesi a chiusura d'anello adoperando un catalizzatore, come Grubb (II), in un solvente adatto, come EtOAc ad alta temperatura, fornendo 3j che è un macrociclo contenente piridina. L'alchene può essere ridotto con idrogeno in presenza di palladio su carbone o di ossido di platino. Poi, usando il pirimidinolo 3k, viene eseguita la seconda reazione di accoppiamento come descritta nello Schema 1, rendendo il pirimidinone 3l. La successiva deprotezione del pirazolo con TFA in DCM o HCl 4M fornisce, dopo un accoppiamento di Ullmann con un aril ioduro, 3m come regioisomero maggiore. Se formato, 3n è il componente minore della miscela di prodotti.

Schema 3



5 I composti come 3n possono essere ottenuti come prodotti esclusivi seguendo le procedure di sintesi dello Schema 4. Tutte le operazioni sono analoghe a quelle dello Schema 3 fino alla reazione di accoppiamento pirazolico. I nitropirazoli opportunamente sostituiti 4a rendono i pirazoli regioisomerici 4b mostrati alle stesse condizioni descritte nello Schema 3. Anche la riduzione in 4c, l'ammidazione con 3h per formare 4d e la metatesi a chiusura d'anello per formare il macrociclo 4e avvengono in maniera simile. La riduzione dell'olefina e la deprotezione sono seguite da un accoppiamento pirimidinico come descritto negli Schemi 1 e 3.

Schema 4



Nel ramo sono noti, e sono stati esaustivamente revisionati, metodi per la sintesi di una grande varietà di composti piridinici sostituiti che sono utili come materiali di partenza per la preparazione dei composti della presente invenzione (per esempi di metodi utili nella preparazione dei materiali di partenza a base di piridina, vedere: Kroehnke F., *Synthesis*, 1 (1976); "Pyridine and Its Derivatives", *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, redattore Abramovitch R. A., 14(Suppl. 1-4), John Wiley & Sons, New York (1974); *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, redattori Boulton A. J. et al, 2:165-524, Pergamon Press, New York (1984); *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, redattore McKillop A., 5:1-300, Pergamon Press, New York (1996)).

La purificazione degli intermedi e dei prodotti finali è stata eseguita via cromatografia in fase normale o inversa. Salvo diversa indicazione, la cromatografia in fase normale è stata eseguita adoperando cartucce pre-impaccate di SiO₂ ed eluendo con gradienti di esani ed EtOAc o di DCM e MeOH. La HPLC preparativa in fase inversa è stata eseguita adoperando colonne C18 ed eluendo con gradienti di solvente A (acqua 90%, MeOH 10%, TFA 0,1%) e solvente B (acqua 10%, MeOH 90%, TFA 0,1%, UV 220 nm) o con gradienti di solvente A (acqua 90%, ACN 10%, TFA 0,1%) e solvente B (acqua 10%, ACN 90%, TFA 0,1%, UV 220 nm) o con gradienti di solvente A (acqua 98%, ACN 2%, TFA 0,05%) e solvente B (ACN 98%, acqua 2%, TFA 0,05%, UV 220 nm) (o) adoperando colonne SunFire Prep C18 OBD, 5 μ , 30x100 mm, gradiente di 25 min. di B 0-100%. A = H₂O/ACN/TFA 90:10:0,1. B=ACN/H₂O/TFA 90:10:0,1.

Salvo diversa indicazione, l'analisi dei prodotti finali è stata eseguita via HPLC analitica in fase inversa.

Metodo A: Colonna Waters SunFire (3,5 μ m, C18, 3,0 \times 150 mm). È stata usata un'eluizione a gradiente (0,5 mL/min.) di solvente B 10-100% per 12 min. e poi solvente B 100% per 3 min. Il solvente A è (acqua 95%, acetonitrile 5%, TFA 0,05%), e il solvente B è (acqua 5%, acetonitrile 95%, TFA 0,05%, UV 254 nm).

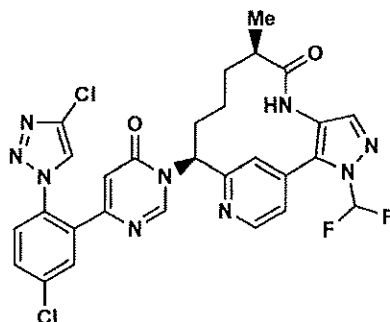
Metodo B: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 \times 50 mm, particelle da 1,7 μ m; fase mobile A: acetonitrile:acqua 5:95 con acetato di ammonio 10 mM; fase mobile B: acetonitrile:acqua 95:5 con acetato di ammonio 10 mM; temperatura: 50°C; gradiente: B 0-100% in 3 minuti, poi mantenimento di 0,75 minuti a B 100%; flusso: 1,11 mL/min.

Metodo C: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm, particelle da 1,7 µm; fase mobile A: acetonitrile:acqua 5:95 con TFA 0,1%; fase mobile B: acetonitrile:acqua 95:5 con TFA 0,1%; temperatura: 50°C; gradiente: B 0-100% per 3 minuti, poi mantenimento di 0,75 minuti a B 100%; flusso: 1,11 mL/min.

5 Metodo X: Colonna ZORBAX® SB C18 (4,6x75 mm). È stata usata un'eluizione a gradiente (2,5 mL/min.) di solvente B 0-100% per 8 min. e poi solvente B 100% per 2 min. Il solvente A è (acqua 90%, MeOH 10%, H₃PO₄ 0,02%), mentre il solvente B è (acqua 10%, MeOH 90%, H₃PO₄ 0,02%, UV 220 nm).

ESEMPLI

10 Esempio 1. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato



1A. Preparazione di 1-(difluorometil)-4-nitro-1H-pirazolo

15 In una soluzione di 4-nitro-1H-pirazolo (5,00 g, 44,2 mmol) e DMF (40 mL) è stato sospeso Cs₂CO₃ (14,41 g, 44,2 mmol). Dopo un riscaldamento di 5 min. a 120°C, è stato aggiunto sodio 2-cloro-2,2-difluoroacetato solido (13,48 g, 88 mmol) in 10 porzioni uguali nel corso di 20 min. La reazione si completava dopo altri 10 min. di riscaldamento. La miscela è stata aggiunta ad un imbuto separatore contenente 100 mL di acqua, ed è stata estratta con Et₂O (2 x 50 mL). Gli strati organici combinati sono stati concentrati. Una purificazione via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc rendeva l'1-(difluorometil)-4-nitro-1H-pirazolo (6,99 g, 42,9 mmol, 97% di resa) sotto

forma di un olio limpido e incolore. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,58 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,39 - 7,05 (t, J = 60 Hz, 1H).

IB. Preparazione di (S)-terz.-butil (1-(4-(1-(difluorometil)-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

5 In una RBF da 500 mL sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ sono stati aggiunti l'(S)-terz.-butil (1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato preparato come descritto nell'Esempio 3 (10 g, 35,4 mmol), 1-(difluorometil)-4-nitro-1H-pirazolo (6,34 g, 38,9 mmol) e diossano (100 mL). La soluzione è stata fatta gorgogliare con N₂ per 5 min. Sono stati poi aggiunti Pd(OAc)₂ (0,40 g, 1,7 mmol), di(adamantan-1-il)(butil)fosfina (1,27 g, 3,5 mmol), K₂CO₃ (14,7 g, 106 mmol) e PvOH (1,08 g, 10,61 mmol). Dopo aver fatto gorgogliare la miscela di reazione con N₂ per
10 5 min., la miscela di reazione è stata riscaldata a 100°C per 3 h. Trascorso questo tempo, la soluzione è stata raffreddata a t.a. e addizionata con acqua (200 mL). La miscela di reazione è stata poi estratta con EtOAc (2 x 200 mL). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con acqua (200 mL) e salamoia (200 mL), e sono stati essiccati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati sotto vuoto. Una purificazione via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc rendeva l'(S)-terz.-butil (1-(4-(1-(difluorometil)-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (12,91 g,
15 31,5 mmol, 89% di resa) sotto forma di un olio leggermente giallo. MS(ESI) m/z: 410,4 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,80 (dd, J = 5,1, 0,7 Hz, 1H), 8,36 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,31 (dd, J = 5,1, 1,5 Hz, 1H), 7,27 - 6,91 (t, J = 58 Hz, 1H), 5,79 - 5,63 (m, 1H), 5,16 - 5,03 (m, 2H), 4,92 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 2,67 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 1,46 (s largo, 9H).

IC. Preparazione di (S)-terz.-butil (1-(4-(4-ammino-1-(difluorometil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

20 In una RBF a 3 colli da 100 mL sono state aggiunte una soluzione di (S)-terz.-butil (1-(4-(1-(difluorometil)-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (0,78 g, 1,90 mmol) in MeOH (12 mL) e una soluzione di NH₄Cl (1,02 g, 19 mmol) in acqua (3 mL). Alla soluzione è stato aggiunto Fe (0,53 g, 9,49 mmol). La miscela di reazione è stata riscaldata a 65°C per 3 h. È stata aggiunta acqua (50 mL). Dopo averla raffreddata a t.a., la miscela è stata filtrata attraverso una compressa di CELITE® e risciacquata con MeOH (200 mL). Il filtrato è stato concentrato
25 sotto vuoto. Il residuo è stato ripartito tra EtOAc (100 mL) e acqua (100 mL). La fase organica è stata separata, lavata

con acqua (100 mL) e salamoia (100 mL), essiccata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata sotto vuoto. Una purificazione via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di DCM/MeOH rendeva l'(S)-terz.-butil (1-(4-(4-ammino-1-(difluorometil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (0,585 g, 1,54 mmol, 81% di resa) sotto forma di un olio. MS(ESI) m/z: 380,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,70 (dd, J = 5,0, 0,7 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,32 (dd, J = 5,1, 1,5 Hz, 1H), 7,28 - 6,97 (t, J = 58 Hz, 1H), 5,80 - 5,66 (m, 1H), 5,65 - 5,53 (m, 1H), 5,13 - 5,03 (m, 2H), 4,87 (s largo, 1H), 3,22 (s largo, 2H), 2,65 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 1,52 - 1,37 (m, 9H).

1D. Preparazione di terz.-butil ((S)-1-(4-(1-(difluorometil)-4-((R)-2-metilbut-3-enamido)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

10 In una RBF a 3 colli da 250 mL sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ è stata aggiunta una soluzione di (S)-terz.-butil (1-(4-(4-ammino-1-(difluorometil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (5 g, 13,18 mmol) ed EtOAc (50 mL). La soluzione è stata raffreddata a -10°C e addizionata con l'acido (R)-2-metilbut-3-enoico preparato nell'Esempio 2 (1,72 g, 17,13 mmol), piridina (4,26 mL, 52,7 mmol) e T3P® (23,54 mL, 39,5 mmol). Il bagno di raffreddamento è stato rimosso, e la soluzione è stata lasciata scaldare a t.a. prima di agitarla per un periodo di 20 h. Sono stati aggiunti acqua (30 mL) ed EtOAc (30 mL), e la miscela è stata agitata per 30 min. La fase organica è stata separata, e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (30 mL). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con salamoia (50 mL), essiccati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati sotto vuoto. Una purificazione via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc dava il terz.-butil ((S)-1-(4-(1-(difluorometil)-4-((R)-2-metilbut-3-enamido)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (5,69 g, 12,33 mmol, 94% di resa). MS(ESI) m/z: 462,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,75 (dd, J = 5,0, 0,6 Hz, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,32 (t, J = 59 Hz, 1H), 7,28 (s largo, 1H), 7,20 (s, 1H), 5,97 - 5,85 (m, 1H), 5,78 - 5,65 (m, 1H), 5,56 - 5,44 (m, 1H), 5,28 - 5,19 (m, 2H), 5,12 (d, J = 2,0 Hz, 2H), 4,91 - 4,82 (m, 1H), 3,20 - 3,11 (m, 1H), 2,72 - 2,62 (m, 2H), 1,48 - 1,43 (s, 9H), 1,33 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

20 1E. Preparazione di terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(difluorometil)-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo [12.3.1.0^{2,6}]tettadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato

In una RBF a 3 colli da 2 L sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ è stata aggiunta una soluzione di

5 terz.-butil ((S)-1-(4-(1-(difluorometil)-4-((R)-2-metilbut-3-enammido)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammati (3 g, 6,50 mmol) in EtOAc (1300 ml). La soluzione è stata cosparsa con argon per 15 min. È stato aggiunto Grubb II (1,38 g, 1,63 mmol) in un'unica porzione. La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso per 24 h.

10 Dopo un raffreddamento a t.a., il solvente è stato rimosso, e il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di DCM/MeOH, rendendo il terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(difluorometil)-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammati (2,13 g, 4,91 mmol, 76% di resa) sotto forma di un solido marroncino. MS(ESI) m/z: 434,4 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,71 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,44 - 7,40 (m, 1H), 7,36 (s largo, 1H), 7,27 (t, J = 58 Hz, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,49 - 6,39 (m, 1H), 5,78 (s, 1H), 4,80 (s largo, 2H), 3,18 - 3,08 (m, 1H), 3,08 - 2,98 (m, 1H), 2,06 - 1,93 (m, 1H), 1,51 (s, 9H), 1,19 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

1F. Preparazione di terz.-butil N-[(9R,13S)-3-(difluorometil)-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammati

15 In una beuta di idrogenazione Parr da 250 mL contenente una soluzione di terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(difluorometil)-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammati (2,46 g, 5,68 mmol) in EtOH (100 mL) è stato aggiunto Pd/C (0,60 g, 0,570 mmol). La beuta è stata spurgata con N₂, pressurizzata a 55 psi di H₂ e lasciata in agitazione per 18 h. La reazione è stata filtrata attraverso CELITE[®] e concentrata, rendendo il terz.-butil N-[(9R,13S)-3-(difluorometil)-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammati (2,17 g, 88% di resa) sotto forma di

20 un solido marroncino. MS(ESI) m/z: 436,3 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,32 (s, 1H), 8,71 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,96 (t, J = 58 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,32 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 4,66 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 2,62 (s largo, 1H), 1,88 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 1,77 - 1,59 (m, 2H), 1,42 - 1,28 (m, 9H), 1,15 (d, J = 18,2 Hz, 2H), 0,83 (d, J = 7,0 Hz, 3H).

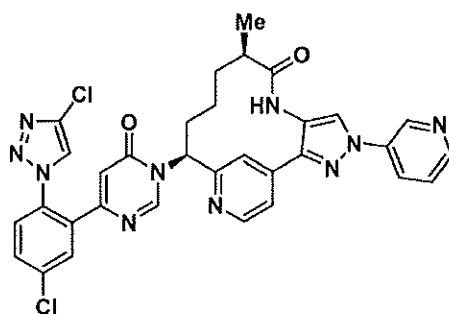
25 1G. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one

Ad una soluzione di *terz.*-butil N-[(9R,13S)-3-(difluorometil)-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato (2,25 g, 5,2 mmol) in MeOH (10 mL) è stato aggiunto HCl 4N in diossano (3,88 mL, 15,5 mmol). La reazione è stata lasciata in agitazione a t.a. per 2 h. La reazione è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio, ed è stata addizionata con NH₃ 7N in MeOH (13,3 mL, 93,0 mmol).
 5 Dopo 5 min., la reazione è stata diluita con CH₂Cl₂ (80 mL), e il solido formato è stato filtrato. Il filtrato è stato concentrato, rendendo il (9R,13S)-13-ammino-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (1,3 g, 3,88 mmol, 75% di resa). MS(ESI) m/z: 336,3 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,33 (s, 1H), 8,71 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,94 (t, J = 58 Hz, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,32 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,01 (dd, J = 10,2, 5,1 Hz, 1H), 2,63 - 2,53 (m, 1H), 1,90 - 1,69 (m, 2H), 1,53 - 1,36 (m, 2H), 1,16 - 1,00 (m,
 10 1H), 0,85 (d, J = 7,0 Hz, 3H).

1H. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidro-pirimidin-1-il}-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one.

In una beuta da 100 mL contenente una sospensione bianca del 6-(5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)pirimidin-4-olo preparato nell'Esempio 4 (0,83 g, 2,7 mmol) in ACN (36 mL) sono stati aggiunti HATU (1,12 g, 3,0 mmol) e DBU (0,53 mL, 3,5 mmol). La soluzione risultante, limpida e gialla, è stata agitata a t.a. Dopo 5 min., è stato aggiunto (9R,13S)-13-ammino-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (0,9 g, 2,68 mmol), e la sospensione risultante è stata agitata a t.a. per 3 h. La reazione è stata poi concentrata e purificata via cromatografia su gel di silice in fase normale eluendo con un gradiente di EtOAc da 0% a 100% in esani, rendendo il (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (0,87 g, 50% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 626,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,91 - 8,83 (m, 1H), 8,78 - 8,71 (m, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,88 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,74 (s, 2H), 7,69 - 7,67 (m, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,63 (t, J = 58 Hz, 1H), 7,52 - 7,50 (m, 1H), 6,36 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 6,06 - 5,95 (m, 1H), 2,76 - 2,65 (m, 1H), 2,36 - 2,21 (m, 1H), 2,08 - 1,93 (m, 2H), 1,63 - 1,53 (m, 1H), 1,53 - 1,42 (m, 1H), 0,99 (d, J = 6,9 Hz, 3H). HPLC
 20 analitica (Metodo A): RT = 8,87 min., purezza = 99,7%.

Esempio 2. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-9-metil-4-(piridin-3-il)-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2,5,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato



5 2A. Preparazione di 4-nitro-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazolo

Ad una soluzione a 0°C di 4-nitro-1H-pirazolo (5,0 g, 44,2 mmol) in THF (100 mL) è stata aggiunta N-cicloesil-N-metilcicloesanammina (0,948 mL, 4,43 mmol), seguita a gocce da SEM-Cl (12,55 mL, 70,7 mmol). La miscela di reazione è stata poi lasciata gradualmente salire a t.a., ed è stata agitata a t.a. per una notte. La miscela di reazione è stata successivamente concentrata e poi purificata via cromatografia in fase normale, rendendo il 4-nitro-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazolo sotto forma di un olio limpido (2,4 g, 21% di resa). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 5,46 (s, 2H), 3,67 - 3,55 (m, 2H), 0,99 - 0,90 (m, 2H), 0,05 - 0,03 (m, 9H).

10 2B. Preparazione di (S)-benzil (1-(4-(4-nitro-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

15 In una fiala a pressione sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ sono stati aggiunti l'(S)-benzil (1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato preparato come descritto nell'Esempio 5 (1,9 g, 6,00 mmol), 4-nitro-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazolo (1,6 g, 6,60 mmol), di(adamant-1-il)(butil)fosfina (0,323 g, 0,90 mmol), PvOH (0,209 mL, 1,80 mmol) e K₂CO₃ (2,48 g, 17,9 mmol). La miscela di sopra è stata poi addizionata con DMA (45 mL), e la fiala è stata spurgata con N₂ per 5 min. A questa miscela è stato poi aggiunto Pd(OAc)₂ (0,135 g, 0,600 mmol). La miscela di reazione è stata nuovamente spurgata brevemente con N₂. La fiala è stata chiusa a tenuta e riscaldata in un

microonde a 120°C per 1 h. La miscela di reazione è stata raffreddata a t.a. e ripartita tra LiCl acquoso al 10% (15 mL) ed EtOAc (30 mL). Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2 x 20 mL), e gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (15 mL) ed essiccati su MgSO₄. Il prodotto grezzo è stato poi purificato via cromatografia in fase normale, rendendo l'(S)-benzil (1-(4-(4-nitro-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (1,92 g, 58% di resa) sotto forma di un olio marrone. MS(ESI) m/z: 524,2 (M+H)⁺.

2C. Preparazione di (S)-benzil (1-(4-(4-ammino-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

Una soluzione dell'(S)-benzil (1-(4-(4-nitro-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato preparato come descritto nell'Esempio 2B (1,92 g, 3,68 mmol) in MeOH (20 mL) e AcOH (2 mL) è stata riscaldata a 40°C in un bagno d'olio. La soluzione limpida di sopra è stata poi lentamente addizionata con Zn (0,481 g, 7,35 mmol, in 3 porzioni (50:25:25%)), ed è stata lasciata in agitazione alla stessa temperatura per 5 min. Alla reazione è stato aggiunto altro Zn. La miscela di reazione veniva monitorata via LCMS e, quando completa, la miscela di reazione è stata raffreddata e poi addizionata con 2,0 g di K₂CO₃ (1 g per 1 mL di AcOH) e 2,0 mL di acqua. La miscela di reazione è stata successivamente agitata per 5 min. La miscela di reazione è stata poi filtrata su una compressa di CELITE® e concentrata sotto vuoto, rendendo il prodotto grezzo. Il prodotto grezzo è stato poi ripartito tra EtOAc (30 mL) e una soluzione satura di NaHCO₃ saturo (15 mL). Gli strati organici sono stati separati, essiccati su MgSO₄, filtrati e concentrati. Il prodotto grezzo è stato poi purificato via cromatografia in fase normale, rendendo l'(S)-benzil (1-(4-(4-ammino-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (1,15 g, 63% di resa) sotto forma di un olio di colore giallo pallido. MS(ESI) m/z: 494,4 (M+H)⁺.

2D. Preparazione di benzil ((S)-1-(4-(4-((R)-2-metilbut-3-enamido)-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

In una RBF a 3 colli da 250 mL sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ è stata aggiunta una soluzione di (S)-benzil (1-(4-(4-ammino-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (1,15 g, 2,33 mmol) ed EtOAc (15 mL). La soluzione è stata raffreddata a -10°C e addizionata con acido (R)-2-metilbut-3-enoico (350 mg, 3,49 mmol), piridina (0,564 mL, 6,99 mmol) e T3P® (2,77 mL, 4,66 mmol). Il bagno di

raffreddamento è stato rimosso, e la soluzione è stata lasciata scaldare a t.a. prima di agitarla per un periodo di 20 h. Sono stati aggiunti acqua (20 mL) ed EtOAc (20 mL), e la miscela è stata agitata per 30 min. La fase organica è stata separata, e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (20 mL). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con salamoia (15 mL), essiccati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati sotto vuoto. Una purificazione via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc dava il benzil ((S)-1-(4-(4-((R)-2-metilbut-3-enamido)-1-((2-(trimetilsilil)etossi)-metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (1,12 g, 79% di resa). MS(ESI) m/z: 576,4 [M+H]⁺.

2E. Preparazione di benzil N-[(9R,10E,13S)-9-metil-8-osso-3-{{2-(trimetilsilil)etossi}metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato

10 In una RBF a 3 colli da 250 mL sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ è stata aggiunta una soluzione di benzil ((S)-1-(4-(4-((R)-2-metilbut-3-enamido)-1-((2-(trimetilsilil)etossi)metil)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (1,12 g, 1,945 mmol) in DCE (18 mL). La soluzione è stata cosparsa con Ar per 15 min. È stato aggiunto Grubb II (662 mg, 0,778 mmol) in un'unica porzione. La miscela di reazione è stata riscaldata in un microonde a 120°C per 30 min. Dopo un raffreddamento a t.a., il solvente è stato rimosso, e il residuo è stato purificato via
15 cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di DCM/MeOH, rendendo il benzil N-[(9R,10E,13S)-9-metil-8-osso-3-{{2-(trimetilsilil)etossi}metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato (477 mg, 42% di resa) sotto forma di un solido marroncino. MS(ESI) m/z: 548,3 [M+H]⁺.

2F. Preparazione di benzil N-[(9R,13S)-9-metil-8-osso-3-{{2-(trimetilsilil)etossi}metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato

20 In una beuta di idrogenazione Parr da 250 mL contenente una soluzione di benzil N-[(9R,10E,13S)-9-metil-8-osso-3-{{2-(trimetilsilil)etossi}metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato (477 mg, 0,871 mmol) in EtOH (20 mL) è stato aggiunto Pd/C (0,93 g, 0,871 mmol). La beuta è stata spurgata con N₂, pressurizzata a 55 psi di H₂ e lasciata in agitazione per 4 h. La reazione è stata filtrata attraverso una compressa di CELITE® e concentrata, rendendo il benzil N-[(9R,13S)-9-metil-8-osso-3-{{2-(trimetilsilil)etossi}metil}-

3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato (245 mg, 64% di resa) sotto forma di un solido marroncino. MS(ESI) m/z: 416,4 [M+H]⁺.

2G. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidro-pirimidin-1-il}-9-metil-3-{[2-(trimetilsilil)etossi]metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one

5 In una beuta da 100 mL contenente una sospensione bianca del 6-(5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil)pirimidin-4-olo preparato come descritto nell'Esempio 4 (0,580 g, 1,88 mmol) in ACN (25,0 ml) sono stati aggiunti HATU (0,785 g, 2,06 mmol) e DBU (0,370 ml, 2,44 mmol). La soluzione risultante, limpida e gialla, è stata agitata a t.a. Dopo 5 min., è stato aggiunto benzil N-[(9R,13S)-9-metil-8-osso-3-{[2-(trimetilsilil)etossi]metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato (0,780 g, 1,88 mmol), e la
10 sospensione risultante è stata agitata a t.a. per 3 h. La reazione è stata concentrata e il materiale grezzo è stato purificato via cromatografia su gel di silice in fase normale, dando il (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-9-metil-3-{[2-(trimetilsilil)etossi]metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (0,65 g, 0,92 mmol, 49,0% di resa) che è stato isolato sotto forma di un solido porpora. MS(ESI) m/z: 706,7 [M+H]⁺.

15 2H. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidro-pirimidin-1-il}-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato

Ad una soluzione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-9-metil-3-{[2-(trimetilsilil)etossi]metil}-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (12 mg, 0,017 mmol) in DCM (0,8 mL) è stato aggiunto TFA (0,2 mL, 2,60 mmol), e
20 la reazione è stata agitata a t.a. per 30 min. La miscela di reazione è stata poi concentrata e il residuo è stato purificato mediante purificazione via HPLC prep., dando il (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato (5,3 mg, 43% di resa) sotto forma di un solido di colore rosa pallido. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ
25 (s, 1H), 6,11 - 5,95 (m, 1H), 2,81 (td, J = 6,8, 3,4 Hz, 1H), 2,44 - 2,17 (m, 2H), 2,15 - 2,01 (m, 1H), 1,80 - 1,65 (m, 1H),

1,62 - 1,46 (m, 1H), 1,11 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,01 (s largo, 1H). MS(ESI) m/z: 576,4 [M+H]⁺. HPLC analitica (Metodo A): RT = 6,98 min., purezza = >95,0%.

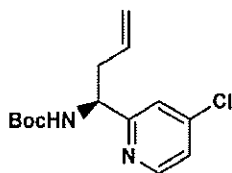
21. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidro-pirimidin-1-il}-9-metil-4-(piridin-3-il)-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2,5,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato

5 In un fiala contenente un setto di Teflon sono stati aggiunti (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one monotrifluoroacetato (0,09 g, 0,16 mmol), (1R,2R)-N1,N2-dimetilcicloesan-1,2-diammina (0,022 g, 0,16 mmol), 3-iodopiridina (0,032 g, 0,16 mmol), CuI (2 mg, 10,5 μmol), Cs₂CO₃ (0,10 g, 0,31 mmol) e DMF (2 mL). La miscela è stata evacuata e riempita con Ar per tre volte prima di riscaldarla a 100°C per 3 h.

10 La reazione è stata raffreddata e diluita con 2 mL di una soluzione di ACN-H₂O 9:1. Dopo una filtrazione attraverso un filtro a siringa, il prodotto è stato purificato via HPLC prep., rendendo il (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-9-metil-4-(piridin-3-il)-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2,5,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato (52 mg, 42%) sotto forma di un solido marroncino. MS(ESI) m/z: 653,6 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 9,31 - 9,24 (m, 1H), 8,80 - 8,73 (m, 1H), 8,71 - 8,64 (m, 2H), 8,60 (s, 2H),

15 8,37 (s, 1H), 8,01 - 7,96 (m, 1H), 7,95 - 7,90 (m, 1H), 7,86 - 7,80 (m, 1H), 7,79 - 7,73 (m, 2H), 7,71 - 7,64 (m, 1H), 6,44 - 6,36 (m, 1H), 6,17 - 6,04 (m, 1H), 2,97 - 2,80 (m, 1H), 2,40 - 2,22 (m, 2H), 2,15 - 2,00 (m, 1H), 1,82 - 1,69 (m, 1H), 1,69 - 1,52 (m, 1H), 1,41 - 1,26 (m, 1H), 1,11 (d, J = 7,0 Hz, 3H). HPLC analitica (Metodo A): RT = 6,69 min., purezza = 97,5%.

Esempio 3. Preparazione di terz.-butil N-[(1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il]carbammato



20

3A. Preparazione di 4-cloro-2-[(E)-2-[(S)-2-metilpropan-2-solfimil]etenil]piridina

Ad una soluzione di S-(-)-t-butil-solfinammide (0,856 g, 7,06 mmol) in DCM (14,13 mL) sono stati aggiunti in sequenza CuSO₄ (2,481 g, 15,54 mmol) e 4-cloropicolinaldeide [1,0 g, 7,06 mmol, preparata secondo una variante descritta da Negi (Synthesis, 991 (1996))]. La sospensione bianca è stata agitata a t.a. Dopo 3 h, la sospensione marrone è stata filtrata attraverso CELITE[®] eluendo con DCM, dando un filtrato marrone limpido. Una concentrazione forniva il prodotto grezzo sotto forma di un olio marrone che pesava 1,85 g. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava il terz.-butil N-[(1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il]carbammato (1,31 g) sotto forma di un olio limpido giallo. MS(ESI) m/z: 245,0 (M+H)⁺.

3B. Preparazione di (R)-N-[(1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il]-2-metilpropan-2-solfinammide

Ad una miscela raffreddata (0-5°C) di InCl₃ (13,56 g, 61,3 mmol) in THF (170 mL) è stato aggiunto a gocce, nel corso di 30 min., allilmagnesio bromuro (1M in Et₂O) (62 mL, 61,3 mmol). La reazione è stata lasciata scaldare a t.a. Dopo 1 h a t.a., la miscela di reazione è stata addizionata con una soluzione di 4-cloro-2-[(E)-2-[(S)-2-metilpropan-2-solfinil]etenil]piridina (10 g, 40,9 mmol) in EtOH (170 mL). Trascorse 2-3 h, la reazione è stata concentrata sotto vuoto a 50-55°C. Il materiale grezzo è stato ripartito tra EtOAc (200 ml) e acqua (1 x 50 ml), e gli strati sono stati separati. Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2 x 50 ml). Gli strati organici sono stati combinati, lavati con salamoia (1 x 100 ml), essiccati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati, dando la (R)-N-[(1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il]-2-metilpropan-2-solfammide (13,5 g, 106%) sotto forma di un olio giallo. MS(ESI) m/z: 287,2 (M+H)⁺. Questo materiale è stato usato nel passaggio successivo senza ulteriori purificazioni.

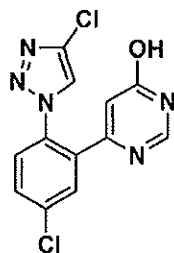
3C. Preparazione di (1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-ammina

La (R)-N-[(1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il]-2-metilpropan-2-solfinammide (75 g, 261 mmol) è stata dissolta in MeOH (1500 mL). È stato aggiunto HCl 6N (750 ml, 4,5 mol). La reazione è stata agitata a t.a. per 2-3 h, ed è stata poi concentrata. Il residuo è stato diluito con acqua (2 L) e lavato con EtOAc (500 ml). Lo strato acquoso è stato basificato con una soluzione satura di Na₂CO₃ prima di estrarlo in EtOAc (3 x 1 L). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua (1 x 1 L) e salamoia (1 x 1 L), essiccati su Na₂SO₄, filtrati e conc. sotto vuoto a 50-55°C, dando la (1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-ammina (43 g, 90%) che è stata usata senza ulteriori purificazioni. MS(ESI) m/z: 183,2 (M+H)⁺.

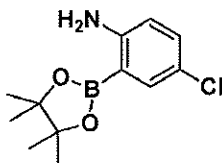
3D. Preparazione di *terz.-butil N-[(1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il]carbammato*

La (1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-ammina (42 g, 230 mmol) è stata dissolta in DCM (420 mL). È stato aggiunto Et₃N (32,1 mL, 230 mmol), seguito a gocce da BOC₂O (53,4 mL, 230 mmol). La reazione è stata agitata a t.a. per 2-3 h. La reazione è stata diluita con DCM in eccesso (1 L), ed è stata lavata con acqua (1 x 500 ml) e salamoia (1 x 500 ml). Lo strato organico è stato essiccato su Na₂SO₄, filtrato e concentrato. Il prodotto grezzo è stato poi purificato via cromatografia su gel di silice, dando il *terz.-butil N-[(1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il]carbammato* (61 g, 86%) sotto forma di un solido di colore giallo pallido. MS(ESI) m/z: 283,2 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,44 (d, 1H), 7,26-7,16 (dd, 2H), 5,69-5,61 (m, 1H), 5,59 (s largo, 1H), 5,07-5,03 (m, 2H), 4,76 (s largo, 1H), 2,62-2,55 (m, 2H), 1,42 (s, 9H).

10 Esempio 4. Preparazione di 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo



4A. Preparazione di 4-cloro-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)anilina



15 In una fiala per microonde da 20 mL sono stati aggiunti 2-bromo-4-cloroanilina (3 g, 14,53 mmol), 4,4,5,5-tetrametil-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1,3,2-diossaborolano (5,53 g, 21,80 mmol), KOAc (3,66 g, 37,3 mmol), un addotto di Pd(dpp)Cl₂-CH₂Cl₂ (0,32 g, 0,44 mmol) e DMSO (9 mL). La sospensione risultante è stata spurgata con N₂, tappata e riscaldata a 80°C per 22 h. La reazione è stata raffreddata a t.a. Dopo aver aggiunto acqua per

dissolvere i sali, la reazione è stata filtrata. Il solido rimanente è stato sospeso in DCM, e il solido insolubile è stato filtrato. Il filtrato è stato concentrato e poi purificato via cromatografia in fase normale, dando la 4-cloro-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)anilina (3,15 g, 86% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 172,3 (M-C₆H₁₀+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,54 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 4,72 (s largo, 2H), 1,34 (s, 12H).

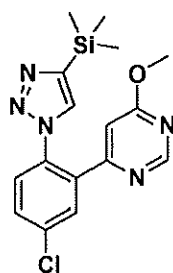
4B. Preparazione di 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina



Una RBF contenente 4-cloro-6-metossipirimidina (3,13 g, 21,62 mmol), 4-cloro-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)anilina (7,31 g, 21,62 mmol), Na₂CO₃ (2,29 g, 21,62 mmol), DME (86 ml), EtOH (10,81 ml) e acqua (10,81 ml) è stata equipaggiata con un condensatore. La miscela è stata spurgata con argon per diversi min. prima di addizionala con un addotto di Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂ (1,77 g, 2,16 mmol). La reazione è stata riscaldata a 90°C per 5 h. La reazione è stata raffreddata a t.a., diluita con acqua ed estratta con EtOAc. Lo strato organico è stato lavato con salamoia, concentrato e purificato via cromatografia in fase normale, dando la 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina (2,86 g, 56,1% di resa) sotto forma di un solido giallo. MS(ESI) m/z: 236,0 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,78 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,15 (dd, J = 8,8, 2,5 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 6,67 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,89 (s largo, 2H), 4,03 (s, 3H).

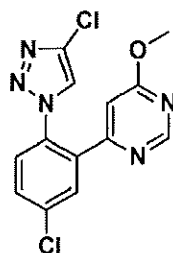
4C. Preparazione di 4-{5-cloro-2-[4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)



Ad una soluzione a 0°C di 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina (1,5 g, 6,36 mmol) in ACN (90 ml) è stato aggiunto 3-metilbutil nitrito (1,28 ml, 9,55 mmol), seguito a gocce da azidotrimetilsilano (1,26 ml, 9,55 mmol). Si osservava un'evoluzione di gas. Dopo 10 min., il bagno di ghiaccio è stato rimosso, e la reazione è stata lasciata scaldare a t.a. (attenzione, gli aril azoturi sono potenzialmente esplosivi). Dopo 1 h, sono stati aggiunti etiniltrimetilsilano (2,72 ml, 19,09 mmol) e Cu₂O (0,09 g, 0,64 mmol), e la reazione è stata agitata per 1 h ulteriore. La reazione è stata ripartita in EtOAc e NH₄Cl sat., e gli strati sono stati separati. Lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su MgSO₄, filtrato e concentrato. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava la 4-{5-cloro-2-[4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina (2,13 g, 5,92 mmol, 93% di resa) sotto forma di un solido giallo. MS(ESI) m/z: 360,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,71 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,82 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,61 - 7,56 (m, 1H), 7,54 - 7,48 (m, 2H), 6,20 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 0,32 - 0,28 (m, 9H).

4D. Preparazione di 4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-metossipirimidina



Ad una soluzione di 4-{5-cloro-2-[4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina (1,56 g, 4,33 mmol) in ACN (28,9 ml) sono stati aggiunti NCS (2,03 g, 15,17 mmol) e gel di silice (6,51 g, 108 mmol). La

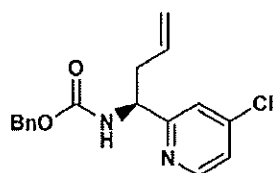
reazione è stata agitata a 80°C per 1 h. La reazione è stata poi filtrata per rimuovere il gel di silice, e il gel di silice raccolto è stato lavato con EtOAc. Il filtrato è stato lavato con acqua (2x) e salamoia, ed è stato concentrato. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava la 4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-metossipirimidina (0,90 g, 64,5% di resa) sotto forma di una schiuma gialla. MS(ESI) m/z: 322,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,70 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,66 - 7,55 (m, 2H), 7,50 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H).

4E. Preparazione di 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo



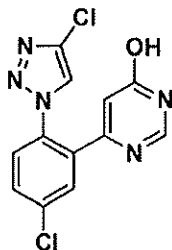
Ad una soluzione di 4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-metossipirimidina (900 mg, 2,79 mmol) in AcOH (6 ml) è stato aggiunto HBr al 48% in acqua (3 ml, 26,5 mmol). La miscela è stata agitata a 85°C per 1 h. La reazione è stata concentrata a secco e poi ripartita tra EtOAc e NaHCO₃ acquoso sat. La miscela è stata separata, e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2x). Gli strati organici sono stati combinati e concentrati, dopo di che il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale, dando un solido bianco. Il solido è stato sospeso in Et₂O, filtrato e lavato con Et₂O, fornendo il 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo (610 mg, 70,9% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 308,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,96 (s, 1H), 7,74 - 7,67 (m, 2H), 7,62 (dd, J = 8,5, 2,3 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,44 (d, J = 0,9 Hz, 1H).

Esempio 5. Preparazione di (S)-benzil (1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

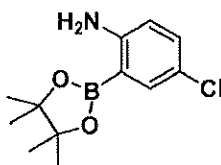


Ad una soluzione di (1S)-1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-ammina (15,37 g, 60,1 mmol) in THF (150 mL) è stato aggiunto NaHCO₃ (15,16 g, 180 mmol) in H₂O (150 mL) a 0°C, seguito da CBz-Cl (12,88 mL, 90 mmol). La reazione è stata poi agitata a 0°C per 2 h. La miscela di reazione è stata diluita con EtOAc (150 mL). La fase organica è stata separata, lavata con salamoia (50 mL), essiccata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata sotto pressione ridotta. Il materiale grezzo è stato purificato via cromatografia su gel di silice in fase normale eluendo con un gradiente di EtOAc 0-20%/etere di petrolio, ottenendo l'(S)-benzil (1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (16 g, 84% di resa) sotto forma di un liquido di colore giallo pallido. MS(ESI) m/z: 317,5 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,44 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,41 - 7,12 (m, 7H), 5,77 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 5,72 - 5,57 (m, 1H), 5,16 - 5,00 (m, 4H), 4,86 (q, J = 6,7 Hz, 1H), 2,60 (t, J = 6,2 Hz, 2H).

Esempio 6. Preparazione di 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo



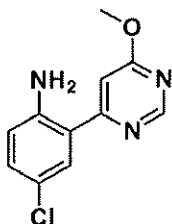
6A. Preparazione di 4-cloro-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)anilina



In una fiala per microonde da 20 mL sono stati aggiunti 2-bromo-4-cloroanilina (3 g, 14,53 mmol), 4,4,5,5-tetrametil-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1,3,2-diossaborolano (5,53 g, 21,80 mmol), KOAc (3,66 g, 37,3 mmol), un addotto di Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂ (0,32 g, 0,44 mmol) e DMSO (9 mL). La sospensione risultante è stata spurgata con N₂, tappata e riscaldata a 80°C per 22 h. La reazione è stata raffreddata a t.a. Dopo aver aggiunto acqua per

5 dissolvere i sali, la reazione è stata filtrata. Il solido rimanente è stato sospeso in DCM, e il solido insolubile è stato filtrato. Il filtrato è stato concentrato e poi purificato via cromatografia in fase normale, dando la 4-cloro-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)anilina (3,15 g, 86% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 172,3 (M-C₆H₁₀+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,54 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 4,72 (s largo, 2H), 1,34 (s, 12H).

10 6B. Preparazione di 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina

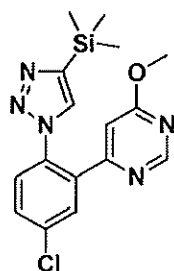


Una RBF contenente 4-cloro-6-metossipirimidina (3,13 g, 21,62 mmol), 4-cloro-2-(tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)anilina (7,31 g, 21,62 mmol), Na₂CO₃ (2,29 g, 21,62 mmol), DME (86 ml), EtOH (10,81 ml) e acqua (10,81 ml) è stata equipaggiata con un condensatore. La miscela è stata spurgata con argon per diversi minuti prima di

15 addizionarla con un addotto di Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂ (1,77 g, 2,16 mmol). La reazione è stata riscaldata a 90°C per 5 h. La reazione è stata raffreddata a t.a., diluita con acqua ed estratta con EtOAc. Lo strato organico è stato lavato con salamoia, concentrato e purificato via cromatografia in fase normale, dando la 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina (2,86 g, 56,1% di resa) sotto forma di un solido giallo. MS(ESI) m/z: 236,0 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,78 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,15 (dd, J = 8,8, 2,5 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 6,67

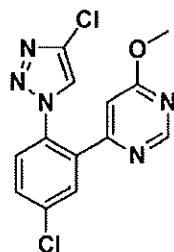
20 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,89 (s largo, 2H), 4,03 (s, 3H).

6C. Preparazione di 4-{5-cloro-2-[4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina



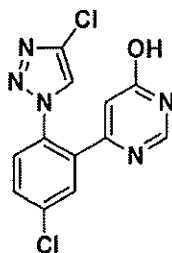
Ad una soluzione a 0°C di 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina (1,5 g, 6,36 mmol) in ACN (90 ml) è stato aggiunto 3-metilbutil nitrito (1,28 ml, 9,55 mmol), seguito a gocce da azidotrimetilsilano (1,26 ml, 9,55 mmol). Si osservava un'evoluzione di gas. Trascorsi 10 min., il bagno di ghiaccio è stato rimosso, e la reazione è stata lasciata scaldare a t.a. (attenzione, gli aril azoturi sono potenzialmente esplosivi). Dopo 1 h, sono stati aggiunti etiniltrimetilsilano (2,72 ml, 19,09 mmol) e Cu₂O (0,09 g, 0,64 mmol), e la reazione è stata agitata per 1 h ulteriore. La reazione è stata ripartita in EtOAc ed NH₄Cl acquoso saturo, e gli strati sono stati separati. Lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su MgSO₄, filtrato e concentrato. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava la 4-{5-cloro-2-[4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina (2,13 g, 5,92 mmol, 93% di resa) sotto forma di un solido giallo. MS(ESI) m/z: 360,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,71 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,82 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,61 - 7,56 (m, 1H), 7,54 - 7,48 (m, 2H), 6,20 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 0,32 - 0,28 (m, 9H).

6D. Preparazione di 4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-metossipirimidina



Ad una soluzione di 4-{5-cloro-2-[4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina (1,56 g, 4,33 mmol) in ACN (28,9 ml) sono stati aggiunti NCS (2,03 g, 15,17 mmol) e gel di silice (6,51 g, 108 mmol). La reazione è stata agitata a 80°C per 1 h. La reazione è stata poi filtrata per rimuovere il gel di silice, e il gel di silice raccolto è stato lavato con EtOAc. Il filtrato è stato lavato con acqua (2x) e salamoia, ed è stato concentrato. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava la 4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-metossipirimidina (0,90 g, 64,5% di resa) sotto forma di una schiuma gialla. MS(ESI) m/z: 322,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,70 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,66 - 7,55 (m, 2H), 7,50 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H).

6E. Preparazione di 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo

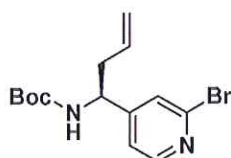


10

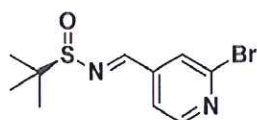
Ad una soluzione di 4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-metossipirimidina (900 mg, 2,79 mmol) in AcOH (6 ml) è stato aggiunto HBr al 48% in acqua (3 ml, 26,5 mmol). La miscela è stata agitata a 85°C per 1 h. La reazione è stata concentrata a secco e poi ripartita tra EtOAc e NaHCO₃ acquoso saturo. La miscela è stata separata, e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2x). Gli strati organici sono stati combinati e concentrati, dopo di che il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale, dando un solido bianco. Il solido è stato sospeso in Et₂O, filtrato e lavato con Et₂O, fornendo il 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo (610 mg, 70,9% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 308,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,96 (s, 1H), 7,74 - 7,67 (m, 2H), 7,62 (dd, J = 8,5, 2,3 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,44 (d, J = 0,9 Hz, 1H).

15

Esempio 7. Preparazione di terz.-butil N-[(1S)-1-(2-bromopiridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato

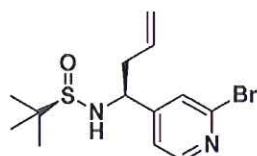


7A. Preparazione di (R)-N-[(1E)-(2-bromopiridin-4-il)metiliden]-2-metilpropan-2-solfinammide



5 Ad una sospensione agitata di (R)-2-metilpropan-2-solfinammide (13,03 g, 108 mmol) e Cs_2CO_3 (52,5 g, 161 mmol) in DCM (400 ml) è stata aggiunta 2-bromopiridin-4-carbaldeide (20 g, 108 mmol) nel corso di 10 min. La miscela di reazione è stata poi agitata a t.a. per 18,5 h. La miscela di reazione è stata concentrata, e il residuo è stato diluito con EtOAc (50 ml) e lavato con salamoia (3 x 20 ml). Lo strato organico è stato essiccato su MgSO_4 e filtrato, dopo di che il filtrato è stato concentrato. Il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale usando esani ed EtOAc come eluenti, rendendo (27,2 g, 87%) di (R)-N-[(1E)-(2-bromopiridin-4-il)metiliden]-2-metilpropan-2-solfinammide sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 289-291,0 (M+H)⁺.

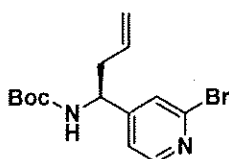
7B. Preparazione di (R)-N-[(1S)-1-(2-bromopiridin-4-il)but-3-en-1-il]-2-metilpropan-2-solfonammide



15 Ad una soluzione di (R)-N-[(1E)-(2-bromopiridin-4-il)metiliden]-2-metilpropan-2-solfinammide (0,73 g, 2,52 mmol) e indio (0,435 g, 3,79 mmol) in THF (6 ml) è stato lentamente aggiunto 3-bromoprop-1-ene (0,458 g, 3,79 mmol), e la soluzione risultante è stata riscaldata a 60°C per 18 h. La miscela di reazione è stata raffreddata e filtrata attraverso CELITE[®], e il filtrato è stato concentrato. Il residuo è stato addizionato con EtOAc (100 ml) e NaHCO_3 al 5% (acq.) (1000 ml), causando la formazione immediata di un'emulsione. La sospensione è stata filtrata attraverso carta.

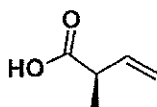
Lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su Na₂SO₄, filtrato e concentrato. Il residuo risultante è stato purificato via cromatografia in fase normale usando esani ed EtOAc come eluenti, rendendo (0,62 g, 74%) di (R)-N-[(1S)-1-(2-bromopiridin-4-il)but-3-en-1-il]-2-metilpropan-2-solfonammide sotto forma di un liquido giallo. MS(ESI) m/z: 331-333,0 (M+H)⁺.

5 7C. Preparazione di terz.-butil N-[(1S)-1-(2-bromopiridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato



Ad una soluzione di (R)-N-[(1S)-1-(2-bromopiridin-4-il)but-3-en-1-il]-2-metilpropan-2-solfonammide (1,38 g, 4,17 mmol) in MeOH (10 ml) è stato aggiunto HCl 4N in diossano (5,21 mL, 20,83 mmol). La miscela di reazione è stata agitata per 1,5 h a t.a., ed è stata poi concentrata. Al residuo risultante sono stati aggiunti ACN (10 ml), TEA (5,81 ml, 41,7 mmol) e Boc₂O (1,818 g, 8,33 mmol). Dopo 18 h, la miscela di reazione è stata concentrata, e il residuo è stato ripreso in EtOAc, lavato con acqua e salamoia, essiccato su MgSO₄, filtrato e concentrato. Il residuo risultante è stato purificato via cromatografia in fase normale usando esani ed EtOAc come eluenti, rendendo (0,80 g, 58,7%) di terz.-butil N-[(1S)-1-(2-bromopiridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato sotto forma di un olio di colore giallo pallido. MS(ESI) m/z: 324-326,1 (M+H)⁺.

15 Esempio 8. Preparazione di acido (R)-2-metilbut-3-enoico



8A. Preparazione di (R)-4-benzil-3-((R)-2-metilbut-3-enoil)ossazolidin-2-one

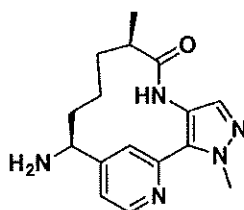
Ad una soluzione a 0°C di acido 2-metilbut-3-enoico (5,59 g, 55,9 mmol) ed NMM (6,14 mL, 55,9 mmol) in THF (62 mL) è stato aggiunto a gocce pivaloil cloruro (6,87 mL, 55,9 mmol). La miscela di reazione è stata raffreddata a -78°C e agitata per ~2 h. In una beuta separata: Ad una soluzione a -78°C di (R)-4-benzilossazolidin-2-one (8,25 g,

46,6 mmol) in THF (126 mL) è stato aggiunto a gocce N-butilitio (2,5 M in esano) (20,49 mL, 51,2 mmol). Trascorsi 35 min., questa reazione è stata trasferita nella prima reazione attraverso una cannula. Dopo aver agitato la miscela di reazione a -78°C per 2 h, il bagno di raffreddamento è stato rimosso, e la reazione è stata spenta con NH₄Cl saturo. La reazione è stata diluita con acqua ed estratta con EtOAc (3x). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia, essiccati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati, dando un olio giallo (15 g). Una purificazione via cromatografia su gel di silice rendeva l'(R)-4-benzil-3-((R)-2-metilbut-3-enil)ossazolidin-2-one (6,59 g, 55%) sotto forma di un olio incolore. MS(ESI) m/z: 282,1 (M+Na)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,36 - 7,19 (m, 5H), 6,03 - 5,93 (m, 1H), 5,23 - 5,10 (m, 2H), 4,69 - 4,63 (m, 1H), 4,51 - 4,43 (m, 1H), 4,23 - 4,15 (m, 2H), 3,29 (dd, J = 13,5, 3,3 Hz, 1H), 2,79 (dd, J = 13,5, 9,6 Hz, 1H), 1,35 (d, J = 6,9 Hz, 3H) ppm. È stato anche ottenuto l'altro diastereomero, (R)-4-benzil-3-((S)-2-metilbut-3-enil)ossazolidin-2-one, sotto forma di un solido bianco (4,6 g, 38%). MS(ESI) m/z: 260,1 (M+H)⁺.

8B. Preparazione di acido (R)-2-metilbut-3-enoico

Ad una soluzione incolore limpida a 0°C di (R)-4-benzil-3-((R)-2-metilbut-3-enil)ossazolidin-2-one (6,05 g, 23,33 mmol) in THF (146 mL) è stato aggiunto a gocce H₂O₂ acquoso al 30% (9,53 mL, 93 mmol), seguito da LiOH 2N (23,33 mL, 46,7 mmol). Dopo 30 min., la reazione è stata spenta con 25 mL di Na₂SO₃ saturo e 25 mL di NaHCO₃ saturo. La reazione è stata poi concentrata per rimuovere il THF. Il residuo è stato diluito con acqua ed estratto con CHCl₃ (3x). Dopo averlo acidificato a pH~3 con HCl conc., lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (3x). Gli strati in EtOAc sono stati combinati, lavati con salamoia, essiccati su MgSO₄, filtrati e concentrati, rendendo l'acido (R)-2-metilbut-3-enoico (2,15 g, 92%) sotto forma di un olio incolore. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,84 (s largo, 1H), 5,94 (ddd, J = 17,4, 10,1, 7,4 Hz, 1H), 5,22 - 5,13 (m, 2H), 3,23 - 3,15 (m, 1H), 1,31 (d, J = 7,2 Hz, 3H) ppm.

Esempio 9. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one



9A. Preparazione di *tert*-butil N-[(1S)-1-[2-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato

In una grande fiala per microonde sono stati aggiunti il *tert*-butil N-[(1S)-1-(2-bromopiridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato preparato come descritto nell'Esempio 2 (1,0 g, 3,06 mmol), 1-metil-4-nitro-1H-pirazolo (0,427 g, 3,36 mmol), diossano (10 ml), di(adamantan-1-il)(butil)fosfina (0,164 g, 0,458 mmol), K₂CO₃ (1,267 g, 9,17 mmol) e acido pivalico (0,106 ml, 0,917 mmol). La reazione è stata degassata con Ar. Successivamente, è stato aggiunto Pd(OAc)₂ (0,069 g, 0,306 mmol), e la reazione è stata agitata a 100°C. Dopo 4 h, il riscaldamento è stato interrotto, e la reazione è stata agitata a t.a. per 72 h. La reazione è stata spenta con acqua (20 ml) ed estratta con EtOAc (3 x 50 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (20 ml), essiccati (MgSO₄), filtrati e concentrati. Il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale usando eptani ed EtOAc come eluenti, dando il *tert*-butil N-[(1S)-1-[2-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato (0,62 g, 54%) sotto forma di una schiuma bianca. MS(ESI) m/z: 374,08 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,73 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,28 - 8,15 (m, 1H), 7,66 - 7,54 (m, 1H), 7,43 - 7,34 (m, 1H), 5,76 - 5,63 (m, 1H), 5,26 - 5,16 (m, 2H), 4,99 (s largo, 1H), 4,83 (s largo, 1H), 3,97 - 3,85 (m, 3H), 2,66 - 2,46 (m, 2H), 1,45 (s largo, 9H).

9B. Preparazione di *tert*-butil N-[(1S)-1-[2-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato

Ad una soluzione raffreddata (0°C) di *tert*-butil N-[(1S)-1-[2-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato (0,62 g, 1,660 mmol) in acetone (40 ml)/acqua (12 ml) sono stati aggiunti NH₄Cl (0,444 g, 8,30 mmol) e Zn (1,086 g, 16,60 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso, e la reazione è stata agitata per 18 h. La reazione è stata filtrata attraverso carta, ed è stata ripartita con acqua (20 ml) ed EtOAc (75 ml). Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2 x 50 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (25 ml) ed essiccati (MgSO₄). La miscela è stata filtrata e concentrata, e il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale

usando DCM e MeOH 0-10% come eluenti, dando il terz.-butil N-[(1S)-1-[2-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato (0,46 g, 60%). MS(ESI) m/z: 344,5 (M+H)⁺.

9C. Preparazione di terz.-butil N-[(1S)-1-(2-{1-metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il}piridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato

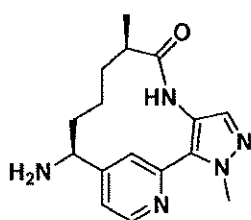
5 Il terz.-butil N-[(1S)-1-[2-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato (0,6 g, 1,747 mmol) è stato addizionato con l'acido (R)-2-metilbut-3-enoico preparato come descritto nell'Esempio 8 (0,189 g, 1,893 mmol) in EtOAc (5,8 ml), è stato raffreddato a 0°C, ed è stato addizionato con piridina (0,424 ml, 5,24 mmol) e con una soluzione in EtOAc di T3P[®] al 50% (2,1 ml, 3,49 mmol). Dopo 24 h, la reazione è stata ripartita tra NaHCO₃ acquoso saturo (10 ml) ed EtOAc (20 ml). Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2 x 20 ml). Gli strati organici
10 combinati sono stati lavati con salamoia (10 ml) ed essiccati (MgSO₄). La miscela è stata filtrata e concentrata, e il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale usando esani ed EtOAc come eluenti, dando il terz.-butil N-[(1S)-1-(2-{1-metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il}piridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato (0,35 g, 47%). MS(ESI) m/z: 426,1 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,23 (s largo, 1H), 8,70 - 8,56 (m, 1H), 8,35 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,56 - 7,44 (m, 1H), 7,25 - 7,14 (m, 1H), 6,03 (ddd, J = 17,2, 10,2, 8,0 Hz, 1H), 5,39 - 5,17 (m, 3H), 5,03 -
15 4,63 (m, 2H), 4,14 - 4,08 (m, 3H), 3,22 (quint., J = 7,2 Hz, 1H), 2,66 - 2,49 (m, 1H), 1,84 - 1,72 (m, 1H), 1,50 - 1,40 (m, 9H), 1,42 - 1,37 (m, 3H), 1,06 - 0,93 (m, 1H).

9D. Preparazione di terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]-ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato

20 Ad una soluzione degassata di terz.-butil N-[(1S)-1-(2-{1-metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il}piridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato (0,160 g, 0,376 mmol) in DCE (20 ml) è stato aggiunto Grubb II (0,096 g, 0,113 mmol), e la miscela di reazione è stata riscaldata in un microonde a 120°C per 30 min. La miscela di reazione è stata concentrata e il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale usando DCM e MeOH come eluenti, rendendo il prodotto desiderato (29 mg, 19%) sotto forma di una pellicola verde. MS(ESI) m/z: 398,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,71 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,23 (d, J = 13,8 Hz, 1H), 7,03 - 6,94 (m, 1H), 6,61 (s,

1H), 5,82 - 5,71 (m, 1H), 5,19 - 5,09 (m, 2H), 4,75 (s largo, 1H), 4,15 - 4,09 (m, 3H), 3,19 - 3,10 (m, 1H), 2,67 (s largo, 1H), 2,28 - 2,15 (m, 2H), 1,54 - 1,39 (m, 9H), 1,34 - 1,28 (m, 3H).

9E. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one

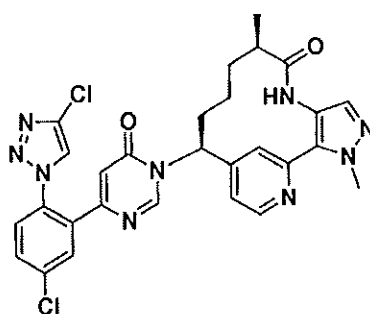


5

Ad una soluzione in EtOH (3 mL) di terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato (29 mg, 0,073 mmol) è stato aggiunto PtO₂ (4 mg). La miscela di reazione è stata spurgata con idrogeno e poi idrogenata a 55 psi. Dopo 3 h, la miscela di reazione è stata filtrata attraverso un filtro da 0,45 µm e concentrata, rendendo un solido scuro (MS(ESI) m/z: 400,3 (M+H)⁺). Il residuo solido scuro è stato dissolto in HCl 4N in diossano (1 ml) e MeOH (1 ml). Dopo 3 h, la miscela è stata concentrata, e il sale HCl risultante è stato dissolto in DCM/MeOH e fatto passare attraverso una cartuccia basica, rendendo il (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one sotto forma di un solido scuro (21 mg, 96%) che è stato usato nel passaggio successivo senza ulteriori purificazioni. MS(ESI) m/z: 300,2 (M+H)⁺.

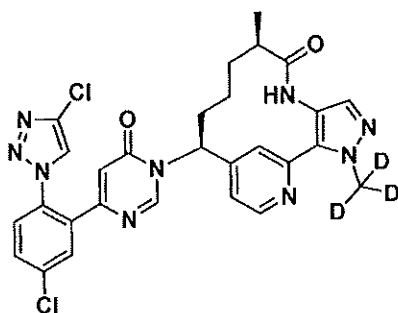
10

15 Esempio 10. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato

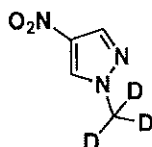


Ad una soluzione in CH₃CN (0,4 ml) del 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo preparato come descritto nell'Esempio 6 (0,019 g, 0,060 mmol) sono stati aggiunti HATU (0,030 g, 0,078 mmol) e DBU (0,014 mL, 0,090 mmol). Dopo 30 min., è stato aggiunto il (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one preparato come descritto nell'Esempio 9 in DMF (0,2 ml). Dopo 18 h, la reazione è stata diluita con DMF, filtrata e concentrata. Il residuo è stato purificato via HPLC in fase inversa usando una PHENOMENEX[®] Luna 5U 30x100 mm (da ACN/H₂O 10:90 ad ACN/H₂O 90:10, TFA 0,1%) (B iniziale 20%, gradiente di 14 min.). Le frazioni desiderate sono state concentrate ed essiccate per congelamento, rendendo il (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (11,9 mg, 27%) sotto forma di un solido di colore bianco avorio. MS(ESI) m/z: 590,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,78 - 8,70 (m, 1H), 8,41 - 8,33 (m, 2H), 7,92 - 7,85 (m, 2H), 7,80 - 7,73 (m, 1H), 7,71 - 7,65 (m, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,21 (dd, J = 5,3, 1,8 Hz, 1H), 6,50 - 6,42 (m, 1H), 5,77 (dd, J = 12,5, 3,1 Hz, 1H), 4,23 - 4,16 (m, 3H), 2,69 - 2,58 (m, 1H), 2,41 (dd, J = 7,5, 4,2 Hz, 1H), 2,22 - 2,09 (m, 1H), 2,07 - 1,96 (m, 1H), 1,74 - 1,60 (m, 1H), 1,38 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 1,15 (d, J = 7,0 Hz, 3H). HPLC analitica (Metodo A), RT = 7,38 min., purezza = 96%.

Esempio 11. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato

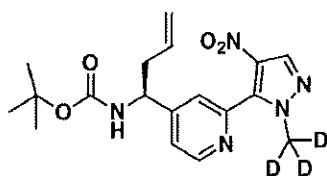


11A. Preparazione di 1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazolo



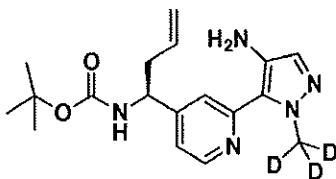
5 Del 4-nitro-1H-pirazolo (10,3 g, 91 mmol) è stato dissolto in THF (200 ml) e raffreddato a 0°C. Questa soluzione è stata addizionata a porzioni con NaH (60%, 4,37 g, 109 mmol), ed è stata agitata a freddo per altre 0,5 h. A questa soluzione lattiginosa fredda è stato poi aggiunto a gocce CD₃I (6,23 ml, 100 mmol), e la miscela di reazione è stata agitata a freddo per 3 h prima di scaldarla a t.a. e agitarla a questa temperatura per una notte. La miscela di reazione è stata spenta con acqua fredda (200 ml), ed è stata estratta con EtOAc (2 x 200 ml) ed essiccata con MgSO₄. La soluzione è stata filtrata e concentrata, rendendo un solido giallo. Una ricristallizzazione del materiale da esano/etil acetato rendeva il composto desiderato sotto forma di un solido giallo (11,5 g, 97%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,85 (s, 1H), 8,82 (s, 1H).

10 11B. Preparazione di terz.-butil N-[(1S)-1-{2-[1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato



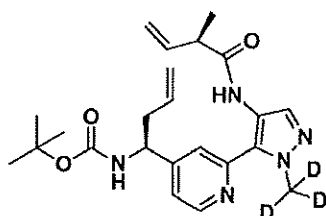
Il *tert*-butil N-[(1S)-1-{2-[1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato (0,80 g, 70%), una schiuma bianca, è stato preparato allo stesso modo del *tert*-butil N-[(1S)-1-[2-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato come descritto nell'Esempio 9A, sostituendo l'1-metil-4-nitro-1H-pirazolo con 1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazolo. MS(ESI) *m/z*: 377,5 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,73 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,28 - 8,15 (m, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,43 - 7,34 (m, 1H), 5,73 - 5,63 (m, 1H), 5,24 - 5,18 (m, 2H), 4,99 (s largo, 1H), 4,83 (s largo, 1H), 2,69 - 2,42 (m, 2H), 1,45 (s largo, 9H).

11C. Preparazione di *tert*-butil N-[(1S)-1-{2-[4-ammino-1-(²H₃)metil-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato



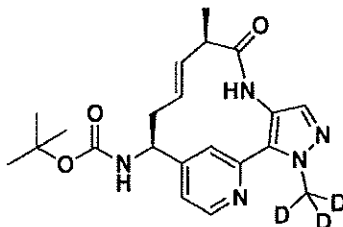
Il *tert*-butil N-[(1S)-1-{2-[4-ammino-1-(²H₃)metil-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato (0,56 g, 76%), un solido marroncino, è stato preparato allo stesso modo del *tert*-butil N-[(1S)-1-[2-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato come descritto nell'Esempio 9B, sostituendo il *tert*-butil N-[(1S)-1-[2-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato, preparato come descritto nell'Esempio 9A, con *tert*-butil N-[(1S)-1-{2-[1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato. MS(ESI) *m/z*: 347,3 (M+H)⁺.

11D. Preparazione di *tert*-butil N-[(1S)-1-{2-[1-(²H₃)metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enamido]-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}[but-3-en-1-il]carbammato



Il tert.-butil N-[(1S)-1-{2-[1-(²H₃)metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato (0,49 g, 72%), un solido giallo, è stato preparato allo stesso modo del tert.-butil N-[(1S)-1-(2-{1-metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato come descritto nell'Esempio 9C, sostituendo il tert.-butil N-[(1S)-1-[2-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il]but-3-en-1-il]carbammato, preparato come descritto nell'Esempio 9B, con tert.-butil N-[(1S)-1-{2-[4-ammino-1-(²H₃)metil-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato. MS(ESI) m/z: 429,08 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,13 (s largo, 1H), 8,56 - 8,50 (m, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,42 - 7,35 (m, 1H), 7,15 - 7,08 (m, 1H), 5,92 (ddd, J = 17,1, 10,1, 8,0 Hz, 1H), 5,68 - 5,56 (m, 1H), 5,26 - 5,19 (m, 3H), 5,16 - 5,11 (m, 2H), 4,88 (s largo, 1H), 4,70 (s largo, 1H), 3,12 (quint., J = 7,2 Hz, 1H), 2,57 - 2,39 (m, 1H), 1,36 (s largo, 9H), 1,30 (d, J = 6,9 Hz, 3H).

11E. Preparazione di tert.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(²H₃)metil-9-metil-8-osso-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato



Il tert.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(²H₃)metil-9-metil-8-osso-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato (64 mg, 33%), un solido verde, è stato preparato allo stesso modo del tert.-butil N-[(9R,10E,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato come descritto nell'Esempio 9D, sostituendo il tert.-butil N-[(1S)-1-(2-{1-metil-4-[(2R)-2-

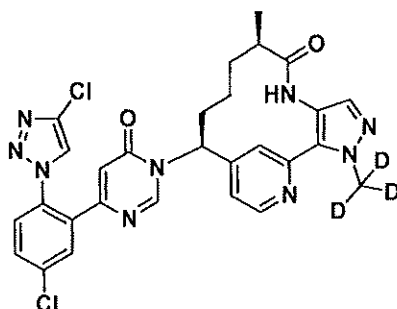
metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il}piridin-4-il)but-3-en-1-il]carbammato, preparato come descritto nell'Esempio 9C, con terz.-butil N[(1S)-1-{2-[1-(²H₃)metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il]piridin-4-il}but-3-en-1-il]carbammato. MS(ESI) m/z: 401,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,67 (s largo, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,20 (s largo, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,75 (s largo, 1H), 5,74 (s largo, 1H), 5,14 (s largo, 2H), 4,76 (s largo, 1H), 3,13 (s largo, 1H), 2,66 (s largo, 1H), 2,20 (s, 1H), 1,47 (s largo, 9H), 1,28 (s largo, 3H).

11F. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one



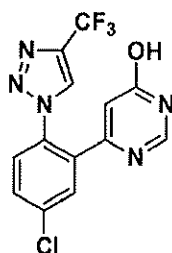
10 Il (9R,13S)-13-ammino-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (48 mg), un solido marrone, è stato preparato allo stesso modo del (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one come descritto nell'Esempio 9E, sostituendo il terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato, preparato come descritto nell'Esempio 9D, con terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(²H₃)metil-9-metil-8-osso-3,4,7,17-tetraazatriciclo-[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato. MS(ESI) m/z: 303,3 (M+H)⁺.

15 11G. Preparazione di (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato

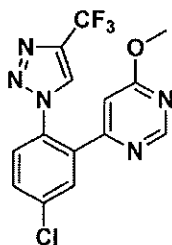


5 Il (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2.6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato (10,8 mg, 18%), un solido bianco, è stato preparato allo stesso modo del (9R,13S)-13-{4-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il}-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2.6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one come descritto nell'Esempio 10, sostituendo il (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2.6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one, preparato come descritto nell'Esempio 9E, con il (9R,13S)-13-ammino-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2.6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one preparato come descritto nell'Esempio 11F. MS(ESI) m/z: 593,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,78 - 8,69 (m, 1H), 8,42 - 8,33 (m, 2H), 7,92 - 7,86 (m, 2H), 7,80 - 7,74 (m, 1H), 7,69 - 7,64 (m, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,21 (dd, J = 5,3, 1,5 Hz, 1H), 6,51 - 6,43 (m, 1H), 5,77 (dd, J = 12,5, 3,3 Hz, 1H), 2,62 (ddd, J = 9,5, 6,7, 3,4 Hz, 1H), 2,48 - 2,38 (m, 1H), 2,22 - 2,11 (m, 1H), 2,06 - 1,97 (m, 1H), 1,69 - 1,59 (m, 1H), 1,42 - 1,33 (m, 2H), 1,15 (d, J = 6,8 Hz, 3H). HPLC analitica (Metodo A), RT = 7,26 min., purezza = 96%.

10 Esempio 12. Preparazione di 6-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}pirimidin-4-olo

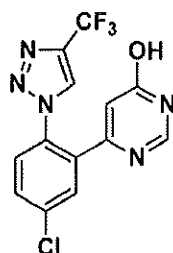


12A. Preparazione di 4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina



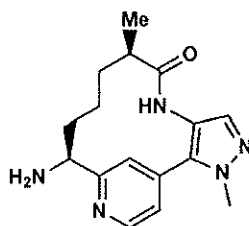
Ad una soluzione a 0°C della 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina preparata come descritto nell'Esempio 6B (1,0 g, 4,24 mmol) in ACN (60,6 ml) è stato aggiunto 3-metilbutil nitrito (0,86 ml, 6,36 mmol), seguito a gocce da azidotrimetilsilano (0,84 ml, 6,36 mmol). Si osservava un'evoluzione di gas. Dopo 10 min., il bagno di ghiaccio è stato rimosso, e la reazione è stata lasciata scaldare a t.a. (attenzione, gli aril azoturi sono potenzialmente esplosivi). Dopo 2 h, è stato aggiunto Cu₂O (61 mg, 0,42 mmol), seguito da un lento gorgogliamento di gas 3,3,3-trifluoroprop-1-ino durante un periodo di 5 min. Dopo altri 10 min., la reazione è stata ripartita tra DCM ed NH₄Cl acquoso saturo, e gli strati sono stati poi separati. Lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su MgSO₄, filtrato e concentrato. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava la 4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossipirimidina (1,46 g, 97% di resa) sotto forma di un solido giallo. MS(ESI) m/z: 356,1 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,62 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 8,00 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,66 - 7,60 (m, 1H), 7,52 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,60 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -61,10 (s).

12B. Preparazione di 6-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}pirimidin-4-olo



Ad una soluzione di 4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-metossi-pirimidina (1,46 g, 4,10 mmol) in AcOH (10 ml) è stato aggiunto HBr al 48% in acqua (5 ml, 44,2 mmol). La miscela è stata agitata a 85°C per 1 h. La reazione è stata concentrata a secco e poi ripartita tra EtOAc e una soluzione acquosa satura di NaHCO₃. Gli strati sono stati separati, e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2x). Gli strati organici sono stati combinati, lavati con NaHCO₃ acquoso saturo e salamoia, essiccati su MgSO₄ e filtrati, e il solvente è stato ridotto sotto vuoto fino a quando non ha iniziato a formarsi un po' di solido. La sospensione risultante è stata tritata con Et₂O. Il solido è stato filtrato e lavato con Et₂O, dando il 6-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}pirimidin-4-olo (1 g, 71,3% di resa) sotto forma di un solido di colore giallo pallido. MS(ESI) m/z: 342,0 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,83 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 7,87 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,79 - 7,72 (m, 1H), 7,70 - 7,62 (m, 1H), 6,45 (d, J = 0,9 Hz, 1H). ¹⁹F RMN (376 MHz, CD₃OD) δ -62,61 (s).

Esempio 13. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one



15 13A. Preparazione di 1-metil-4-nitro-1H-pirazolo

Ad una soluzione di 4-nitro-1H-pirazolo (2,5 g, 22,11 mmol) in THF (50 mL) è stato aggiunto NaH (0,973 g, 24,32 mmol), e la miscela è stata agitata a t.a. per 5 min. A questa sospensione è stato poi aggiunto CH₃I (1,382 mL, 22,11 mmol), e la miscela è stata agitata a t.a. per una notte. La miscela di reazione è stata poi diluita con EtOAc (2 x 25 mL) e lavata con salamoia (25 mL). Lo strato organico è stato concentrato e poi purificato via cromatografia in fase normale, rendendo l'1-metil-4-nitro-1H-pirazolo sotto forma di un solido bianco (1,9 g, 80% di resa). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,12 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 3,97 (s, 3H).

13B. Preparazione di (S)-terz.-butil (1-(4-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

In una fiala a pressione sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ sono stati aggiunti (S)-terz.-butil (1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (3,0 g, 10,61 mmol), 1-metil-4-nitro-1H-pirazolo (1,348 g, 10,61 mmol), di(adamant-1-il)(butil)fosfina (1,141 g, 3,18 mmol), PvOH (0,369 ml, 3,18 mmol) e K₂CO₃ (4,40 g, 31,8 mmol). La miscela di sopra è stata poi addizionata con DMF (21 mL), e la fiala è stata spurgata con N₂ per 5 min. A questa miscela è stato poi aggiunto Pd(OAc)₂(0,476 g, 2,122 mmol). La miscela di reazione è stata nuovamente spurgata brevemente con N₂. La fiala è stata chiusa a tenuta e riscaldata in un bagno d'olio a 120°C per 4 h. La miscela di reazione è stata raffreddata a t.a. e ripartita tra LiCl acquoso al 10% (15 mL) ed EtOAc (30 mL). Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2 x 20 mL), e gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (15 mL), essiccati su MgSO₄, filtrati e concentrati. Il prodotto grezzo è stato poi purificato via cromatografia in fase normale, rendendo l'(S)-terz.-butil (1-(4-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (1,2 g, 29% di resa) sotto forma di un olio marrone. MS(ESI) m/z: 374,4 (M+H)⁺.

13C. Preparazione di (S)-terz.-butil (1-(4-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

Una soluzione di (S)-terz.-butil (1-(4-(1-metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (1,2 g, 3,21 mmol) in MeOH (10 mL) e AcOH (1 mL) è stata riscaldata in un bagno d'olio a 40°C. La soluzione limpida di sopra è stata poi lentamente addizionata con Zn (0,420 g, 6,43 mmol, in 3 porzioni (50:25:25%)), ed è stata lasciata in agitazione alla stessa temperatura per 5 min. La miscela di reazione veniva monitorata via LCMS e, una volta completata la reazione, la miscela di reazione raffreddata è stata poi addizionata con 1 g di K₂CO₃ (1 g per 1 mL di AcOH) e 1 mL di acqua. La miscela di reazione è stata successivamente agitata per 5 min. La miscela di reazione è stata

poi filtrata su una compressa di CELITE® e concentrata sotto vuoto, rendendo il prodotto grezzo. Il prodotto grezzo è stato poi ripartito tra EtOAc (30 mL) e una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (15 mL). Gli strati organici sono stati separati, essiccati su MgSO₄, filtrati e concentrati. Il prodotto grezzo è stato poi purificato via cromatografia in fase normale, rendendo l'(S)-terz.-butil (1-(4-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (0,88 g, 76% di resa) sotto forma di un olio di colore marrone pallido. MS(ESI) m/z: 344,4 (M+H)⁺.

13D. Preparazione di terz.-butil ((S)-1-(4-(1-metil-4-((R)-2-metilbut-3-enammido)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato

In una RBF a 3 colli da 250 mL sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ è stata aggiunta una soluzione di (S)-terz.-butil (1-(4-(4-ammino-1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (620 mg, 1,805 mmol) ed EtOAc (15 mL). La soluzione è stata raffreddata a -10°C e addizionata con l'acido (R)-2-metilbut-3-enoico preparato nell'Esempio 2 (271 mg, 2,71 mmol), piridina (0,437 mL, 5,42 mmol) e T3P® (2,149 mL, 3,61 mmol). Il bagno di raffreddamento è stato rimosso, e la soluzione è stata lasciata scaldare a t.a. prima di agitarla per un periodo di 20 h. Sono stati aggiunti acqua (15 mL) ed EtOAc (15 mL), e la miscela è stata agitata per 30 min. La fase organica è stata separata, e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (15 mL). Gli estratti organici combinati sono stati lavati con salamoia (15 mL), essiccati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati sotto vuoto. Una purificazione via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc dava il terz.-butil ((S)-1-(4-(1-metil-4-((R)-2-metilbut-3-enammido)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (0,26 g, 34% di resa). MS(ESI) m/z: 426,5 [M+H]⁺.

13E. Preparazione di terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}] ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato

In una RBF a 3 colli da 250 mL sottoposta a sostituzione dell'atmosfera con N₂ è stata aggiunta una soluzione di terz.-butil ((S)-1-(4-(1-metil-4-((R)-2-metilbut-3-enammido)-1H-pirazol-5-il)piridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (266 mg, 0,625 mmol) in DCE (18 mL). La soluzione è stata cosparsa con argon per 15 min. È stato aggiunto Grubb II (213 mg, 0,250 mmol) in un'unica porzione. La miscela di reazione è stata riscaldata in un microonde a 120°C per 30 min. Dopo un raffreddamento a t.a., il solvente è stato rimosso, e il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di DCM/MeOH, rendendo il terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-

tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato (60 mg, 23% di resa) sotto forma di un solido marroncino. MS(ESI) m/z: 398,4 [M+H]⁺.

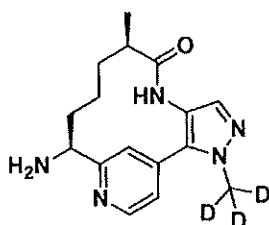
13F. Preparazione di *terz.*-butil N-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato

5 In una beuta di idrogenazione Parr da 100 mL contenente una soluzione di *terz.*-butil N-[(9R,10E,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato (60 mg, 0,151 mmol) in EtOH (6 mL) è stato aggiunto Pd/C (0,016 g, 0,015 mmol). La beuta è stata spurgata con N₂, pressurizzata a 55 psi di H₂ e lasciata in agitazione per 5 h. La reazione è stata filtrata attraverso una compressa di CELITE[®] e concentrata, rendendo il *terz.*-butil N-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-
10 tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato (48 mg, 76% di resa) sotto forma di un solido marroncino. MS(ESI) m/z: 400,5 [M+H]⁺.

13G. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one

15 Ad una soluzione di *terz.*-butil N-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato (48 mg, 0,120 mmol) in DCM (2,5 mL) è stato aggiunto TFA (0,6 mL, 7,79 mmol), e la reazione è stata agitata a t.a. per 1,5 h. La miscela di reazione è stata poi concentrata, fornendo il (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one bis-trifluoroacetato (63 mg, 94% di resa) sotto forma di un solido marrone che è stato poi dissolto in MeOH (1 mL), dando
20 una soluzione marrone limpida. La soluzione è stata aggiunta ad una cartuccia di resina PL-HCO₃ MP AGILENT[®] StratoSpheres pre-risciacquata. Eluendo con MeOH, una filtrazione per gravità dava un filtrato limpido di colore giallino. Una concentrazione forniva il (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (25 mg, 93%) sotto forma di un solido di colore giallo pallido. MS(ESI) m/z: 300,4 [M+H]⁺.

25 Esempio 14. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one



14A. Preparazione di 1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazolo

Ad una soluzione di 4-nitro-1H-pirazolo (2,5 g, 22,11 mmol), CD₃OD (0,898 mL, 22,11 mmol) e Ph₃P (legato a resina) (8,84 g, 26,5 mmol) in THF (40 ml) è stato aggiunto DIAD (5,59 mL, 28,7 mmol), e la miscela è stata agitata per una notte. La reazione è stata spenta con acqua, estratta con EtOAc, lavata con salamoia, essiccata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata. Il prodotto grezzo è stato purificato via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di DCM/MeOH, rendendo il prodotto desiderato (1,92 g, 14,76 mmol, 66,7% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 131,0 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,13 (d, J = 0,4 Hz, 1H), 8,05 (s, 1H).

14B. Preparazione di terz.-butil N-[(1S)-1-{4-[1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il]piridin-2-il}but-3-en-1-il]carbammato

Ad una grande fiala per microonde sono stati aggiunti (S)-terz.-butil (1-(4-cloropiridin-2-il)but-3-en-1-il)carbammato (2,61 g, 9,22 mmol), 1-(²H₃)metil-4-nitro-1H-pirazolo (1,0 g, 7,69 mmol), di(adamantil)-(butil)fosfina (0,413 g, 1,15 mmol), K₂CO₃ (3,19 g, 23,06 mmol), acido pivalico (0,268 ml, 2,306 mmol) e DMF (15,37 ml). La reazione è stata spurgata con argon per 10 min. e addizionata con Pd(OAc)₂ (0,173 g, 0,769 mmol), e la fiala è stata chiusa a tenuta e agitata a 115°C per una notte. La reazione è stata poi ripartita tra EtOAc e H₂O. Lo strato acquoso è stato estratto con altro EtOAc (2x). Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su MgSO₄, filtrato e concentrato. Il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc, dando il prodotto desiderato (1,49 g, 3,96 mmol, 51,5% di resa) sotto forma di una schiuma di colore lavanda. MS(ESI) m/z: 377,0 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,77 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,23 (dd, J = 5,1, 1,5 Hz, 1H), 5,78 - 5,65 (m, 1H), 5,55 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 5,14 - 5,03 (m, 2H), 4,89 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 2,66 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

14C. Preparazione di *terz.-butil N-[(1S)-1-{4-[4-ammino-1-(²H₃)metil-1H-pirazol-5-il]piridin-2-il}but-3-en-1-il]carbammato*

Il *terz.-butil N-[(1S)-1-{4-[1-²H₃]metil-4-nitro-1H-pirazol-5-il]piridin-2-il}but-3-en-1-il]carbammato* (1,45 g, 3,85 mmol) è stato dissolto in acetone (15 ml)/acqua (3 ml), raffreddato a 0°C e addizionato con NH₄Cl (1,030 g, 19,26 mmol) e zinco (2,52 g, 38,5 mmol) prima di rimuovere il bagno di ghiaccio. Dopo 1 h, la reazione è stata filtrata, e il filtrato è stato ripartito con acqua (30 ml) ed EtOAc (50 ml). Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (2 x 50 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (20 ml), essiccati (MgSO₄), filtrati e concentrati. Il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di DCM/MeOH, rendendo il prodotto desiderato (0,62 g, 46,5%). MS(ESI) m/z: 347,2 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,67 (dd, J = 5,1, 0,7 Hz, 1H), 7,26 - 7,23 (m, 2H), 7,21 (dd, J = 5,1, 1,5 Hz, 1H), 5,79 - 5,66 (m, 1H), 5,58 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 5,11 - 5,05 (m, 2H), 4,86 (q, J = 6,6 Hz, 1H), 2,64 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

14D. Preparazione di *terz.-butil N-[(1S)-1-{4-[1-(²H₃)metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il]piridin-2-il}but-3-en-1-il]carbammato*

Una miscela di acido (R)-2-metilbut-3-enoico (233 mg, 2,327 mmol), *terz.-butil N-[(1S)-1-{4-[4-ammino-1-(²H₃)metil-1H-pirazol-5-il]piridin-2-il}but-3-en-1-il]carbammato* (620 mg, 1,79 mmol) e piridina (0,433 ml, 5,37 mmol) in EtOAc (17,900 ml) è stata raffreddata a -10°C sotto Ar e poi addizionata a gocce con T3P® (50% in peso in EtOAc) (2,131 ml, 3,58 mmol) prima di scaldarla gradualmente a t.a. Dopo 3,5 h, la miscela di reazione è stata diluita con EtOAc, lavata con K₂HPO₄ 1,5 M seguito da salamoia, essiccata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata. Il prodotto grezzo è stato poi purificato via cromatografia in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc, rendendo il prodotto desiderato (529 mg, 1,234 mmol, 69,0% di resa) sotto forma di una schiuma gialla. MS(ESI) m/z: 429,2 (M+H)⁺.

14E. Preparazione di *terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(²H₃)metil-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo-[1.2.3.1.0^{2,6}]tettadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato*

Cinque grandi fiale per microonde sono state caricate con quantità uguali del seguente ingrediente: *terz.-butil N-[(1S)-1-{4-[1-(²H₃)metil-4-[(2R)-2-metilbut-3-enammido]-1H-pirazol-5-il]piridin-2-il}but-3-en-1-il]carbammato*

(0,51 g, 1,190 mmol) in DCE degassato (90 ml), e sono state irraggiate a 120°C per 30 min. in presenza di Grubb II (0,404 g, 0,476 mmol). Le reazioni sono state combinate e concentrate, e il residuo è stato purificato via cromatografia su colonna in fase normale eluendo con un gradiente di esani/EtOAc, dando il prodotto desiderato (0,124 g, 26,0%) sotto forma di un solido marrone. MS(ESI) m/z: 401,2 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,66 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,19 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,37 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 5,68 (t, J = 11,2 Hz, 1H), 4,82 - 4,63 (m, 2H), 3,12 - 2,93 (m, 2H), 1,93 (q, J = 11,1 Hz, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,15 (d, J = 5,9 Hz, 3H).

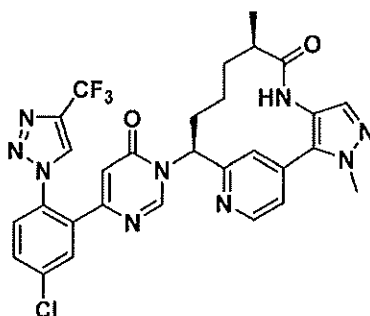
14F. Preparazione di terz.-butil N-[(9R,13S)-3-(²H₃)metil-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo-[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato

10 Ad una soluzione agitata di terz.-butil N-[(9R,10E,13S)-3-(²H₃)metil-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,10,14,16-esaen-13-il]carbammato (0,120 g, 0,300 mmol) in EtOH (10 ml) è stato aggiunto PtO₂ (6,80 mg, 0,030 mmol). La sospensione è stata messa sotto un'atmosfera di idrogeno (55 psi) per 1 h. Il catalizzatore è stato rimosso per filtrazione attraverso una compressa di CELITE[®], e il filtrato è stato concentrato. Il prodotto (0,104 g, 86%) è stato portato avanti alla reazione successiva come era, senza ulteriori purificazioni. MS(ESI) m/z: 403,2 (M+H)⁺.

15 14G. Preparazione di (9R,13S)-13-ammino-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}] ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one

20 Ad una soluzione agitata di terz.-butil N-[(9R,13S)-3-(²H₃)metil-9-metil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]carbammato (0,100 g, 0,248 mmol) in MeOH (3 ml) è stata aggiunta una soluzione di HCl 4,0 M in diossano (1,621 ml), e la miscela è stata agitata per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata a secco e messa sotto un vuoto spinto. Il sale cloruro di idrogeno è stato trasformato nella base libera dissolvendolo in MeOH, facendolo passare attraverso una cartuccia di NaHCO₃ legato a resina (StratoSpheres SPE; 500 mg, carico 0,90 mmol) e concentrando il filtrato. Il materiale è stato portato avanti come era alla reazione successiva. MS(ESI) m/z: 303,4 (M+H)⁺.

Esempio 15. Preparazione di (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il)-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato

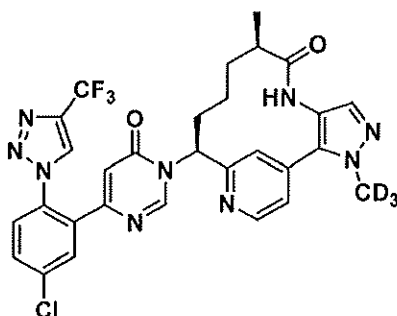


5 In una fiala da scintillazione contenente il 6-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}pirimidin-4-olo preparato come descritto nell'Esempio 12 (22,8 mg, 0,067 mmol) e HATU (33,0 mg, 0,087 mmol) in ACN anidro (0,5 mL) è stato aggiunto DBU (15 mL, 0,100 mmol). Dopo 30 min., è stata aggiunta una soluzione del (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one preparato come descritto nell'Esempio 13 (20 mg, 0,067 mmol) in 0,5 ml di CH₃CN e DMF (0,1 ml). La

10 soluzione risultante è stata agitata a t.a. per 2 h e poi purificata via cromatografia in fase inversa, dando il (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il)-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato (26,98 mg, 53,1% di resa) sotto forma di un solido bianco dopo una concentrazione e una liofilizzazione. MS(ESI) m/z: 624,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) d 8,81 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,70 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,77 - 7,72 (m, 1H), 7,72 - 7,66 (m, 2H), 7,53 (dd, J = 5,1, 1,5 Hz, 1H), 7,49 (s, 1H), 6,43 (s, 1H), 6,02 - 5,93 (m, 1H), 4,04 (s, 3H), 2,70 (td, J = 6,7, 3,3 Hz, 1H), 2,27 (tt, J = 12,7, 4,4 Hz, 1H), 2,12 - 1,94 (m, 2H), 1,66 - 1,52 (m, 1H), 1,45 (ddd, J = 15,0, 9,8, 5,0 Hz, 1H), 1,00 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 0,69 (s largo, 1H). ¹⁹F RMN (376 MHz, CD₃OD) d -62,54 (s), -77,44 (s). HPLC analitica (Metodo A): RT = 11,02 min., purezza = 96,7%.

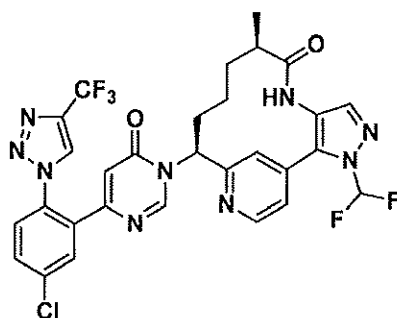
15

Esempio 16. Preparazione di (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il)-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato



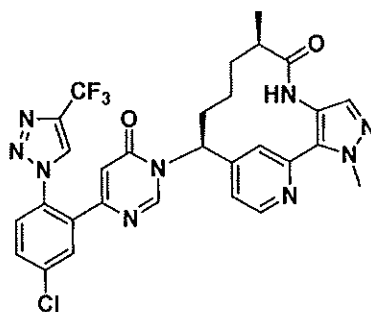
5 Il (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-diidro-pirimidin-1-il)-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato (11 mg, 30% di resa) è stato preparato in maniera simile alla procedura descritta nell'Esempio 15, sostituendo il (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one con il (9R,13S)-13-ammino-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (15 mg,
10 0,050 mmol) preparato come descritto nell'Esempio 14. MS(ESI) m/z: 627,3 (M+H). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,81 (s, 1H), 8,77 - 8,66 (m, 2H), 7,89 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,79 - 7,64 (m, 3H), 7,59 - 7,51 (m, 1H), 7,49 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,97 (dd, J = 12,4, 3,9 Hz, 1H), 2,76 - 2,62 (m, J = 6,5, 3,4, 3,4 Hz, 1H), 2,34 - 2,21 (m, 1H), 2,12 - 1,94 (m, 2H), 1,68 - 1,53 (m, 1H), 1,51 - 1,39 (m, 1H), 1,00 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,78 - 0,63 (m, 1H). HPLC analitica (Metodo A): RT = 8,64 min., purezza = 99,4%.

15 Esempio 17. Preparazione di (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-diidropirimidin-1-il)-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato



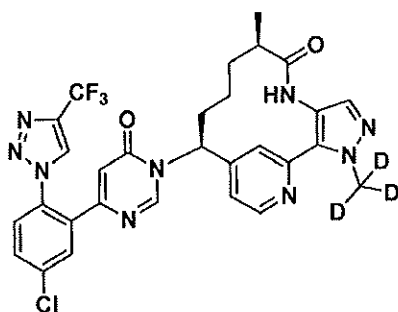
Il (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-diidro-pirimidin-1-il)-
3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato
(20 mg, 50% di resa) è stato preparato in maniera simile alla procedura descritta nell'Esempio 15, sostituendo il
5 (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo-[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one con
(9R,13S)-13-ammino-3-(difluorometil)-9-metil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-
pentaen-8-one (17 mg, 0,051 mmol). MS(ESI) m/z: 660,3 (M+H). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,81 (d, J = 3,7 Hz,
2H), 8,71 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,81 - 7,62 (m, 5H), 7,56 - 7,46 (m, 1H), 6,44 (s, 1H), 6,00 (dd, J
= 12,7, 4,5 Hz, 1H), 2,70 (td, J = 6,5, 3,0 Hz, 1H), 2,32 - 2,20 (m, 1H), 2,10 - 1,91 (m, 2H), 1,65 - 1,51 (m, 1H), 1,51 -
10 1,39 (m, 1H), 0,99 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,70 - 0,51 (m, 1H). HPLC analitica (Metodo A): RT = 9,74 min., purezza =
97,8%.

Esempio 18. Preparazione di (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-
diidropirimidin-1-il)-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one
trifluoroacetato

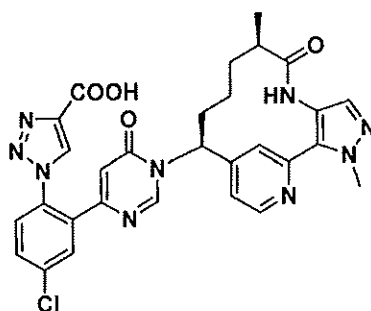


Il sale TFA di (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-
 diidropirimidin-1-il)-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one (9 mg,
 20%), un solido di colore bianco avorio, è stato preparato allo stesso modo dell'Esempio 10 sostituendo il 6-[5-cloro-2-
 5 (4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo, preparato come descritto nell'Esempio 6, con il 6-{5-cloro-2-[4-
 (trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}pirimidin-4-olo preparato come descritto nell'Esempio 12B. MS(ESI) m/z: 624,3
 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,84 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 8,71 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,91 (d, J = 2,4
 Hz, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,80 - 7,75 (m, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,17 (dd, J = 5,3, 1,8 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 0,7 Hz,
 1H), 5,77 (dd, J = 12,4, 3,2 Hz, 1H), 4,18 (s, 3H), 2,64 - 2,56 (m, 1H), 2,38 δ (s largo, 1H), 2,11 (dd, J = 13,1, 3,6 Hz,
 10 1H), 2,02 - 1,95 (m, 1H), 1,64 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 1,39 (dd, J = 16,9, 8,1 Hz, 2H), 1,14 (d, J = 6,8 Hz, 3H). HPLC
 analitica (Metodo A), RT = 8,05 min., purezza = 95%.

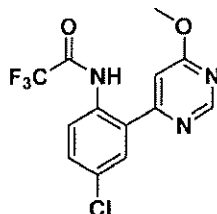
Esempio 19. Preparazione di (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-
 diidropirimidin-1-il)-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-
 one trifluoroacetato



- Il (9R,13S)-13-(4-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]fenil}-6-osso-1,6-diidro-pirimidin-1-il)-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one trifluoroacetato (11,7 mg, 23%), un solido di colore bianco avorio, è stato preparato allo stesso modo dell'Esempio 10 sostituendo il 6-[5-cloro-2-(4-cloro-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenil]pirimidin-4-olo, preparato come descritto nell'Esempio 6, con il 6-{5-cloro-2-[4-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}pirimidin-4-olo preparato come descritto nell'Esempio 12B. Inoltre, il (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one, preparato come descritto nell'Esempio 9, è stato sostituito con il (9R,13S)-13-ammino-3-(²H₃)metil-9-metil-3,4,7,17-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]-ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one preparato come descritto nell'Esempio 6F.
- MS(ESI) m/z: 627,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,86 - 8,82 (m, 1H), 8,75 - 8,69 (m, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,94 - 7,87 (m, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,80 - 7,76 (m, 1H), 7,74 - 7,69 (m, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,20 - 7,09 (m, 1H), 6,56 - 6,51 (m, 1H), 5,77 (dd, J = 12,5, 3,3 Hz, 1H), 2,67 - 2,58 (m, 1H), 2,47 - 2,37 (m, 2H), 2,19 - 2,06 (m, 1H), 2,03 - 1,96 (m, 1H), 1,73 - 1,60 (m, 1H), 1,48 - 1,31 (m, 2H), 1,14 (d, J = 6,8 Hz, 3H). HPLC analitica (Metodo A), RT = 8,02 min., purezza = 96%.
- Esempio 20. Preparazione di acido 1-(4-cloro-2-(1-((5R,9S)-21,5-dimetil-4-osso-21H-3-aza-1(2,4)-piridin-2(5,4)-pirazolaciclononafan-9-il)-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilico trifluoroacetato

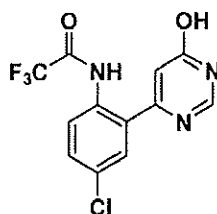


20A. Preparazione di N-(4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)fenil)-2,2,2-trifluoroacetammide



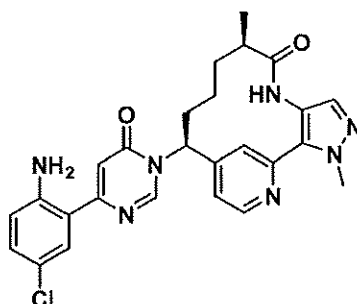
5 Ad una soluzione della 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina preparata come descritto nell'Esempio 6B (0,523 g, 2,219 mmol) e di anidride trifluoroacetica (0,376 ml, 2,66 mmol) in DCM (17,47 ml) è stata aggiunta TEA (0,371 ml, 2,66 mmol). Dopo 1 h, la miscela di reazione è stata concentrata e purificata via cromatografia in fase normale, dando la N-(4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)fenil)-2,2,2-trifluoroacetammide (0,684 g, 93% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 332,1 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃-d) δ 13,95 (s largo, 1H), 8,83 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 8,59 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,76 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,49 (dd, J = 9,0, 2,4 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 4,09 (s, 3H).

10 20B. Preparazione di N-(4-cloro-2-(6-idrossipirimidin-4-il)fenil)-2,2,2-trifluoroacetammide



5

Ad una soluzione agitata a 60°C di N-(4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)fenil)-2,2,2-trifluoroacetammide (0,68 g, 2,05 mmol) in THF (13,67 ml) è stato aggiunto HBr al 48% in H₂O (1,693 ml, 14,97 mmol). Dopo 3 h, la miscela di reazione è stata concentrata, spenta con NaHCO₃ saturo (40 ml) ed estratta con EtOAc (3 x30 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (15 mL) ed essiccati (MgSO₄). Il residuo è stato purificato via cromatografia in fase normale, dando il prodotto desiderato (0,195 g, 30%). MS(ESI) m/z: 318,1 (M+H)⁺. ¹H RMN: (400 MHz, CDCl₃-d) δ 8,50 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,66 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,57 - 7,49 (m, 1H), 6,89 (s, 1H). 20C. Preparazione di (5R,9S)-9-(4-(2-ammino-5-clorofenil)-6-ossopirimidin-1(6H)-il)-21,5-dimetil-21H-3-aza-1(2,4)-piridin-2(5,4)-pirazolacilononafan-4-one



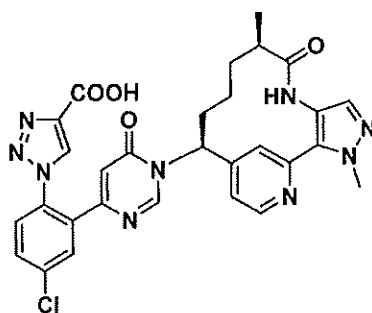
10

15

In una fiala da 1 dram contenente una sospensione bianca di N-(4-cloro-2-(6-idrossipirimidin-4-il)fenil)-2,2,2-trifluoroacetammide (0,035 g, 0,110 mmol) e HATU (0,054 g, 0,143 mmol) in ACN (1,10 ml) è stato aggiunto DBU (0,025 ml, 0,165 mmol). Trascorsi 10 min., è stata aggiunta una soluzione porpora dell'Esempio 9 (0,033 g, 0,110 mmol) in DMF (1,102 ml). Dopo averla agitata per una notte, la reazione è stata diluita con acqua ed estratta con EtOAc (3x), e le materie organiche sono state lavate con salamoia, essiccate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate. Il prodotto

grezzo è stato purificato via cromatografia in fase normale, dando l'intermedio desiderato sotto forma di una pellicola gialla (la ¹H RMN mostrava anche la presenza di 30% di un isomero indesiderato). Il materiale è stato portato avanti alle reazioni successive. Il gruppo trifluoroacetammide è stato rimosso dissolvendo il composto in MeOH (2 ml), trattandolo con HCl (1 ml) e riscaldando a 75°C. Dopo 2 h, le materie organiche sono state rimosse, e lo strato acquoso è stato essiccato per congelamento. Il sale HCl è stato neutralizzato dissolvendo il residuo in MeOH, facendolo passare attraverso due cartucce successive di NaHCO₃ (500 mg) e concentrando il filtrato, dando il prodotto desiderato (0,040 g, 0,079 mmol, 72,0% di resa) sotto forma di una pellicola gialla. MS(ESI) m/z: 504,3 (M+H)⁺.

20D. Preparazione di acido 1-(4-cloro-2-(1-((SR,9S)-21,5-dimetil-4-osso-21H-3-aza-1(2,4)-piridin-2(5,4)-pirazolaciclononafan-9-il)-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilico trifluoroacetato



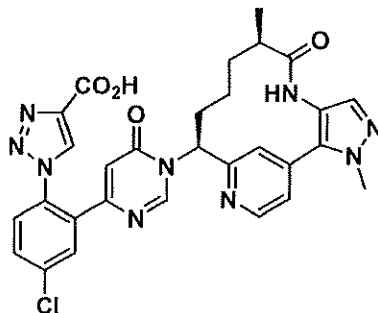
10

Ad una soluzione gialla a 0°C di 20C (0,040 g, 0,079 mmol) in ACN (1,134 ml) è stato aggiunto isoamil nitrito (0,032 ml, 0,238 mmol) in ACN (0,25 ml), seguito a gocce da azidotrimetilsilano (0,031 ml, 0,238 mmol) in ACN (0,25 ml). Trascorsi 10 min., il bagno di raffreddamento è stato rimosso, e la reazione è stata lasciata scaldare a t.a. Dopo 1 h, sono stati aggiunti terz.-butil propiolato (0,050 g, 0,397 mmol), ACN (0,25 ml) e Cu₂O (1,136 mg, 7,94 μmol) a t.a. Trascorse 6 h, la reazione è stata diluita con DCM, lavata con NH₄Cl sat. e salamoia, essiccata su MgSO₄, filtrata e concentrata, dando un olio giallo. Il materiale grezzo è stato purificato via cromatografia in fase normale, dando l'intermedio desiderato sotto forma di una pellicola gialla. Il t-butil estere è stato idrolizzato mediante trattamento con TFA 50%/DCM. Dopo 1 h, la miscela di reazione è stata concentrata, purificata via cromatografia in fase inversa ed essiccata per congelamento, fornendo il prodotto desiderato (15 mg, 25%). Questo materiale è stato sottoposto a

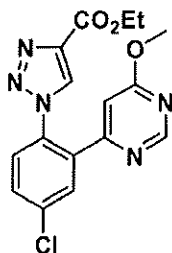
15

purificazione chirale per rimuovere tutto l'isomero indesiderato residuo rimanente. Dopo la separazione via HPLC chirale, il composto del titolo era il primo isomero ad eluire usando una CHIRALPAK® IC, 21 x 250 mm DI, 5 µ, e adoperando MeOH:ACN:FA 40%/CO₂ 60% a 45,0 mL/min., 100 bar e 40°C. MS(ESI) m/z: 600,3 (M+H)⁺. ¹H RMN: (400 MHz, ACN-d₃) δ 8,66 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,83 - 7,77 (m, 2H), 7,73 - 7,66 (m, 2H), 7,65 - 7,61 (m, 1H), 7,37 (s, 1H), 6,99 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 6,39 (s, 1H), 5,66 - 5,61 (m, 1H), 4,12 (s, 3H), 2,52 (s largo, 1H), 2,25 - 2,19 (m, 1H), 2,07 - 2,01 (m, 1H), 1,54 (dd, J = 13,4, 5,5 Hz, 1H), 1,31 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 1,19 - 1,14 (m, 1H), 1,05 (d, J = 6,8 Hz, 3H). HPLC analitica (Metodo A), RT = 5,31 min., purezza > 95%.

5
10
Esempio 21. Preparazione di acido 1-(4-cloro-2-{1-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo-[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il}fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilico trifluoroacetato

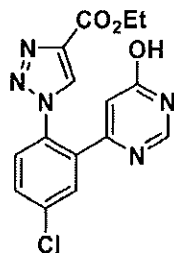


21A. Preparazione di etil 1-[4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)fenil]-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato



Ad una soluzione gialla, limpida e raffreddata (0°C) della 4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)anilina preparata come descritto nell'Esempio 4B (0,400 g, 1,70 mmol) in CH₃CN (24,2 mL) è stato aggiunto isoamil nitrito (0,34 mL, 2,55 mmol), seguito a gocce da azidotrimetilsilano (0,34 mL, 2,55 mmol). Si osservava un'evoluzione di gas. Dopo 10 min., il bagno di raffreddamento è stato rimosso, e la reazione è stata lasciata scaldare a t.a. e agitata a t.a. per 1 h. Si formava una sospensione gialla. Successivamente, sono stati aggiunti etil propiolato (0,500 g, 5,09 mmol) e Cu₂O (0,024 g, 0,17 mmol). Dopo 1 h, la reazione torbida verdastria è stata diluita con DCM, lavata con NH₄Cl acquoso saturo e salamoia, essiccata su MgSO₄, filtrata e concentrata, dando un olio giallo. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava l'etil 1-[4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)fenil]-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato (0,507 g, 83% di resa) sotto forma di un solido giallo. MS(ESI) m/z: 360,0 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,65 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,75 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,62 (dd, J = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,56 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 4,44 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 1,42 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

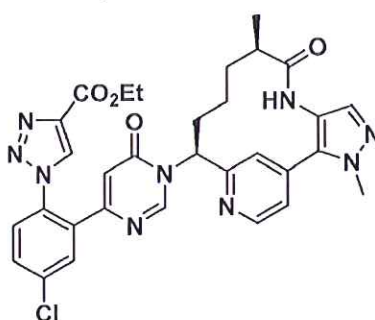
21B. Preparazione di etil 1-[4-cloro-2-(6-idrossipirimidin-4-il)fenil]-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato



Ad una sospensione di etil 1-[4-cloro-2-(6-metossipirimidin-4-il)fenil]-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato (0,200 g, 0,56 mmol) in CH₃CN (3 mL) è stato aggiunto TMS-I (0,38 mL, 2,78 mmol). La soluzione gialla limpida risultante è stata riscaldata a 50°C per una notte. La reazione è stata raffreddata a t.a., dopo di che è stata versata in una miscela di tiosolfato di sodio al 10% e NaHCO₃ acquoso saturo. La reazione è stata estratta con DCM (3x). Gli strati organici sono stati combinati e concentrati. Una purificazione via cromatografia in fase normale dava l'etil 1-[4-cloro-2-(6-idrossipirimidin-4-il)fenil]-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato (0,098 g, 51% di resa) sotto forma di un solido bianco. MS(ESI) m/z: 345,9 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,30 (s, 1H), 7,97 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 2,2 Hz,

1H), 7,62 (dd, J = 8,5, 2,3 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,46 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 4,44 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 1,42 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

21C. Preparazione di etil 1-(4-cloro-2-{1-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il} fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato trifluoroacetato



5

In una fiala da 1 dram contenente una sospensione bianca di etil 1-[4-cloro-2-(6-idrossipirimidin-4-il)fenil]-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato (0,035 g, 0,10 mmol) e HATU (0,050 g, 0,13 mmol) in CH₃CN (1,0 mL) è stato aggiunto DBU (0,023 mL, 0,15 mmol). La soluzione risultante, limpida e gialla, è stata agitata a t.a. per 20 min. È stata poi aggiunta una soluzione limpida porpora del (9R,13S)-13-ammino-3,9-dimetil-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-8-one preparato come descritto nell'Esempio 13 (0,030 g, 0,10 mmol) in DMF (1,0 mL). La reazione è stata agitata a t.a. Dopo 3 h, la reazione è stata arrestata e direttamente purificata via cromatografia in fase inversa, dando l'etil 1-(4-cloro-2-{1-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il} fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato trifluoroacetato (0,0292 g, 39% di resa) sotto forma di un solido di colore bianco avorio dopo una concentrazione e una liofilizzazione. MS(ESI) m/z: 628,4 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,81 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,70 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,74 (dd, J = 8,5, 2,5 Hz, 1H), 7,70 - 7,65 (m, 2H), 7,52 (dd, J = 5,0, 1,7 Hz, 1H), 7,49 (s, 1H), 6,39 (s, 1H), 5,99 - 5,93 (m, 1H), 4,40 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 4,05 (s, 3H), 2,74 - 2,66 (m, 1H), 2,32 - 2,23 (m, 1H), 2,11 - 1,93 (m, 2H), 1,64 - 1,54 (m, 1H), 1,50 - 1,41 (m, 1H), 1,38 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,00 (d, J = 6,9 Hz, 3H), 0,73 - 0,61 (m, 1H). HPLC analitica (Metodo A), RT = 4,90 min., purezza = 98,8%.

10

15

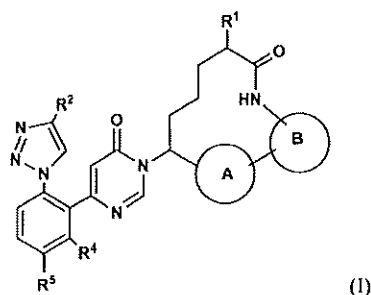
21D. Preparazione di acido 1-(4-cloro-2-{1-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo-[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il} fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilico trifluoroacetato

Una soluzione limpida e incolore di etil 1-(4-cloro-2-{1-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il} fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilato trifluoroacetato (0,020 g, 0,027 mmol) in MeOH (0,54 mL) e NaOH 1,0 M (0,14 mL, 0,14 mmol) è stata agitata a t.a. Dopo 2 h, la reazione è stata arrestata, neutralizzata con HCl 1,0 M e poi concentrata, dando un solido bianco. Una purificazione via cromatografia in fase inversa dava l'acido 1-(4-cloro-2-{1-[(9R,13S)-3,9-dimetil-8-osso-3,4,7,15-tetraazatriciclo[12.3.1.0^{2,6}]ottadeca-1(18),2(6),4,14,16-pentaen-13-il]-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-il} fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbossilico trifluoroacetato (0,0126 g, 64% di resa) sotto forma di un solido bianco dopo una concentrazione e una liofilizzazione. MS(ESI) m/z: 600,3 (M+H)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,78 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,71 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,76 - 7,73 (m, 1H), 7,70 - 7,66 (m, 2H), 7,50 (dd, J = 5,1, 1,5 Hz, 1H), 7,49 (s, 1H), 6,40 (s, 1H), 6,00 - 5,94 (m, 1H), 4,05 (s, 3H), 2,74 - 2,66 (m, 1H), 2,32 - 2,23 (m, 1H), 2,11 - 1,93 (m, 2H), 1,64 - 1,54 (m, 1H), 1,51 - 1,40 (m, 1H), 1,00 (d, J = 6,9 Hz, 3H), 0,73 - 0,61 (m, 1H). HPLC analitica (Metodo A), RT = 3,37 min., purezza = 100%.

15

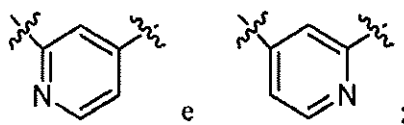
RIVENDICAZIONI

1. Composto di Formula (I):

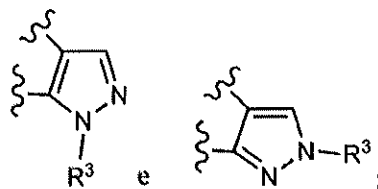


o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

5 l'anello A è indipendentemente selezionato da



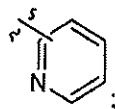
l'anello B è indipendentemente selezionato da



R¹ è indipendentemente selezionato da H e alchile C₁₋₄;

10 R² è indipendentemente selezionato da F, Cl, CF₃, CHF₂ e COOH;

R³ è indipendentemente selezionato da H, CHF₂, CD₃, CH₃, e

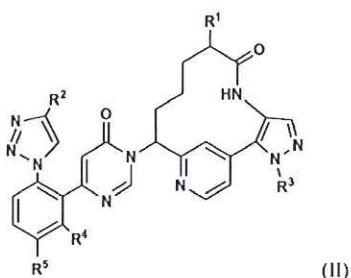


R^4 è indipendentemente selezionato da H ed F; e

R^5 è indipendentemente selezionato da H, F, Cl, CH_3 e OCH_3 .

2. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R^2 è indipendentemente selezionato da F, Cl, CF_3 e CHF_2 .

5 3. Composto di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 2, avente la Formula (II):



o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

R^1 è alchile C_{1-4} ;

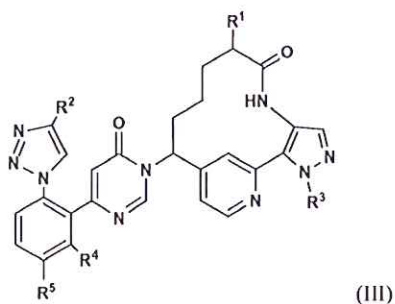
R^2 è indipendentemente selezionato da F, Cl, CF_3 e CHF_2 ;

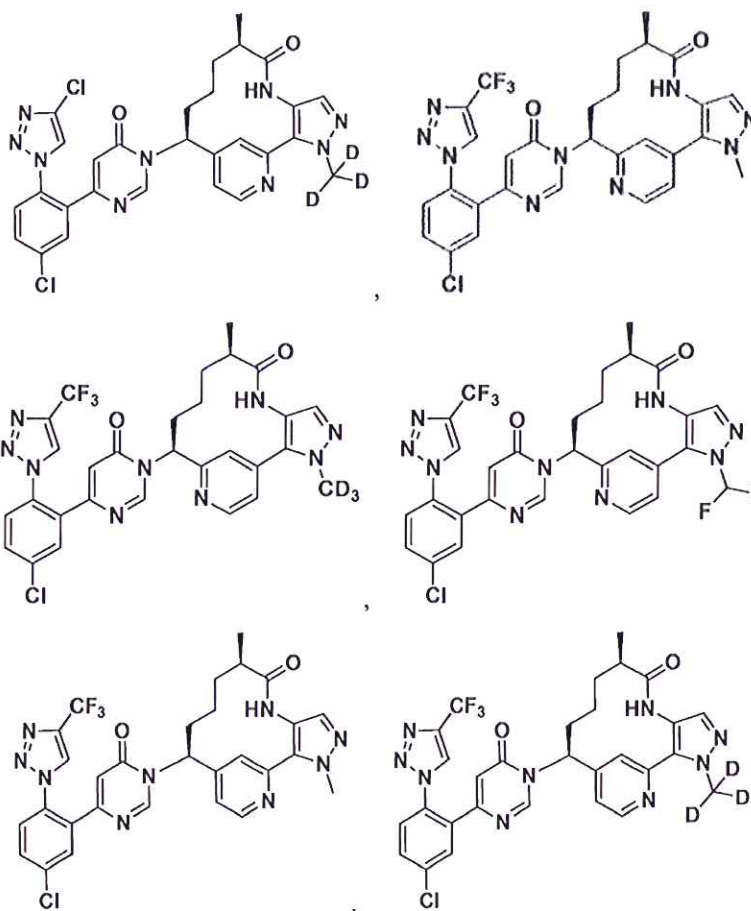
10 R^3 è indipendentemente selezionato da CHF_2 , CD_3 e CH_3 ;

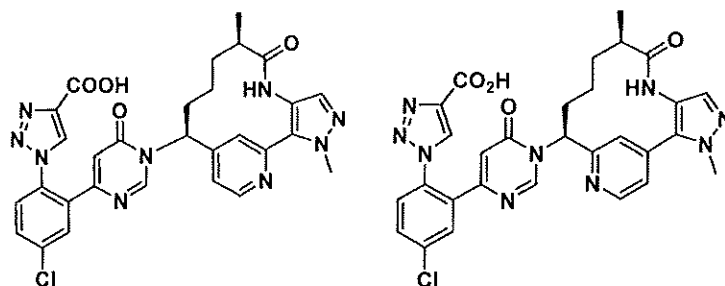
R^4 è H; e

R^5 è indipendentemente selezionato da F e Cl.

4. Composto di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, avente la Formula (III):

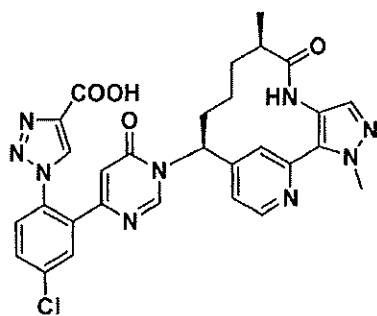






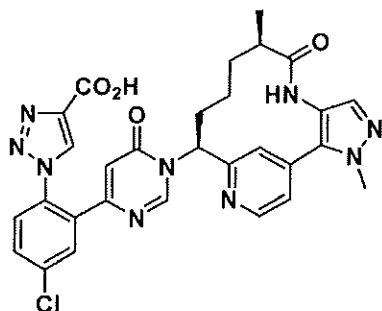
o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile.

7. Composto secondo la rivendicazione 1, avente la struttura:



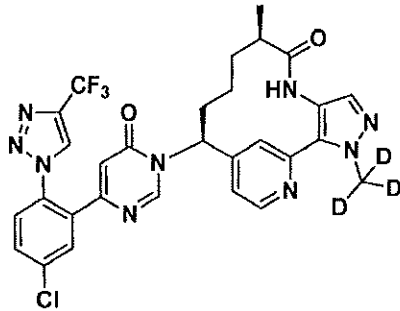
5 o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile.

8. Composto secondo la rivendicazione 1, avente la struttura:



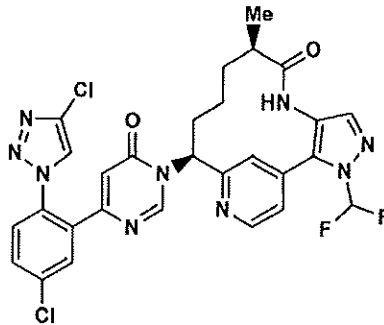
o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile.

9. Composto secondo la rivendicazione 1, avente la struttura:



o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile.

5 10. Composto secondo la rivendicazione 1, avente la struttura:



o un suo stereoisomero, tautomero, sale farmaceuticamente accettabile.

11. Composizione farmaceutica comprendente uno o più composti secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10 e un trasportatore o diluente farmaceuticamente accettabile.

10 12. Composto o composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-11, o un suo stereoisomero, tautomero o sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso come medicamento.

13. Composto o composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-11, o un suo stereoisomero, tautomero o sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel trattamento di un disturbo tromboembolico.

14. Composto, suo stereoisomero, tautomero o sale farmaceuticamente accettabile o composizione per l'uso secondo la rivendicazione 13, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da disturbi tromboembolici cardiovascolari arteriosi, disturbi tromboembolici cardiovascolari venosi, e disturbi tromboembolici nelle camere del cuore o nella circolazione periferica.

15. Composto, suo stereoisomero, tautomero o sale farmaceuticamente accettabile o composizione per l'uso secondo la rivendicazione 14, in cui il disturbo tromboembolico è selezionato da angina instabile, una sindrome coronarica acuta, fibrillazione atriale, infarto del miocardio, attacco ischemico transitorio, ictus, aterosclerosi, arteriopatia occlusiva periferica, trombosi venosa, trombosi venosa profonda, tromboflebite, embolia arteriosa, trombosi arteriosa coronarica, trombosi arteriosa cerebrale, embolia cerebrale, embolia renale, embolia polmonare, e trombosi dovuta ad impianti, dispositivi o procedure medicali in cui il sangue si trova esposto ad una superficie artificiale che promuove la trombosi.

Il sottoscritto dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale.


Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)