

EI58060R/EX7595R

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo n. 3946595

a nome di:

Vertex Pharmaceuticals Incorporated

**“AGENTI MODULATORI DEL REGOLATORE DI CONDUITTANZA TRANSMEMBRANA DELLA
FIBROSI CISTICA”**

DESCRIZIONE

La presente domanda rivendica il beneficio della domanda USA provvisoria n. 62/828.699, depositata il 3 aprile 2019.

La descrizione fornisce modulatori del regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), composizioni farmaceutiche contenenti i modulatori, metodi per il trattamento della fibrosi cistica (CF) e dei disturbi mediati da CFTR che comprendono la somministrazione dei modulatori e procedimenti per realizzare i modulatori.

La CF è una malattia genetica recessiva che colpisce circa 70.000 bambini e adulti in tutto il mondo. Nonostante i progressi nel trattamento della fibrosi cistica, non esiste una cura.

Nei pazienti con CF, le mutazioni nel CFTR espresso endogenamente negli epitelii respiratori portano ad una ridotta secrezione anionica apicale, causando uno squilibrio nel trasporto di ioni e fluidi. La conseguente diminuzione del trasporto di anioni contribuisce ad un maggiore accumulo di muco nei polmoni e alle concomitanti infezioni microbiche che alla fine causano la morte nei pazienti affetti da fibrosi cistica. Oltre alle malattie respiratorie, i pazienti affetti da fibrosi cistica tipicamente soffrono di problemi gastrointestinali e di insufficienza pancreatica che, se non curati, provocano la morte. Inoltre, la maggior parte degli uomini affetti da CF sono sterili e la fertilità è ridotta tra le donne affette da CF.

L'analisi della sequenza del gene CFTR ha rivelato una varietà di mutazioni che causano malattie (Cutting, G.R. et al. (1990) Nature 346:366-369; Dean, M. et al. (1990) Cell 61:863: 870; e Kerem, B.S. et al. (1989) Science 245:1073-1080; Kerem, B.S. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8447-8451). Ad oggi sono state identificate più di 2000 mutazioni nel gene CF. Le mutazioni CF sono elencate nella "Banca dati delle mutazioni della fibrosi cistica", disponibile all'indirizzo <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>. La mutazione patogenetica più diffusa è una delezione della fenilalanina nella posizione 508 della sequenza amminoacidica CFTR ed è comunemente denominata mutazione *F508del*. Questa mutazione si verifica in circa il 90% dei casi di fibrosi cistica ed è associata a malattia grave.

La delezione del residuo 508 nel CFTR impedisce alla proteina nascente di ripiegarsi correttamente. Ciò

comporta l'incapacità della proteina mutante di uscire dal reticolo endoplasmatico (ER) e di raggiungere la membrana plasmatica. Di conseguenza, il numero di canali CFTR per il trasporto degli anioni presenti nella membrana è molto inferiore a quello osservato nelle cellule che esprimono CFTR di tipo selvatico, cioè CFTR che non presenta mutazioni. Oltre al traffico compromesso, la mutazione risulta in un canale difettoso. Insieme, il numero ridotto di canali nella membrana e l'azionamento difettoso portano a una riduzione del trasporto di anioni e fluidi attraverso gli epitelii. (Quinton, P.M. (1990), *FASEB J.* 4: 2709-2727). I canali difettosi a causa della mutazione F508del sono ancora funzionali, sebbene meno funzionali dei canali CFTR tipo selvatico. (Dalemans et al. (1991), *Nature Lond.* 354: 526-528; Pasyk e Foskett (1995), *J. Cell. Biochem.* 270: 12347-50). Oltre a F508del, altre mutazioni patogenetiche nel CFTR che comportano un traffico, sintesi e/o azionamento dei canali difettosi potrebbero essere regolate verso l'alto o verso il basso per alterare la secrezione di anioni e modificare la progressione e/o la gravità della malattia.

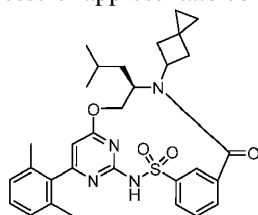
CFTR è un canale anionico mediato da cAMP/ATP che si esprime in una varietà di tipi cellulari, comprese le cellule epiteliali assorbenti e secretorie, dove regola il flusso anionico attraverso la membrana, nonché l'attività di altri canali ionici e proteine. Nelle cellule epiteliali, il normale funzionamento di CFTR è fondamentale per il mantenimento del trasporto degli elettroliti in tutto il corpo, compresi i tessuti respiratori e digestivi. CFTR è composto da circa 1480 amminoacidi che codificano per una proteina costituita da una ripetizione in tandem di domini transmembrana, ciascuno contenente sei eliche transmembrana e un dominio di legame nucleotidico. I due domini transmembrana sono collegati da un ampio dominio regolatore (R) polare con più siti di fosforilazione che regolano l'attività del canale e il traffico cellulare.

Il trasporto del cloruro avviene mediante l'attività coordinata di ENaC e CFTR presenti sulla membrana apicale e della pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$ e dei canali di Cl^- espressi sulla superficie basolaterale della cellula. Il trasporto attivo secondario del cloruro dal lato luminale porta all'accumulo di cloruro intracellulare, che può poi lasciare passivamente la cellula attraverso i canali del Cl^- , determinando un trasporto vettoriale. La disposizione del co-trasportatore $\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/\text{K}^+$, della pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$ e dei canali K^+ della membrana basolaterale sulla superficie basolaterale e CFTR sul lato luminale coordinano la secrezione di cloruro tramite CFTR sul lato

luminale. Poiché l'acqua probabilmente non viene mai trasportata attivamente, il suo flusso attraverso gli epitelii dipende da minuscoli gradienti osmotici transepiteliali generati dal flusso di sodio e cloruro.

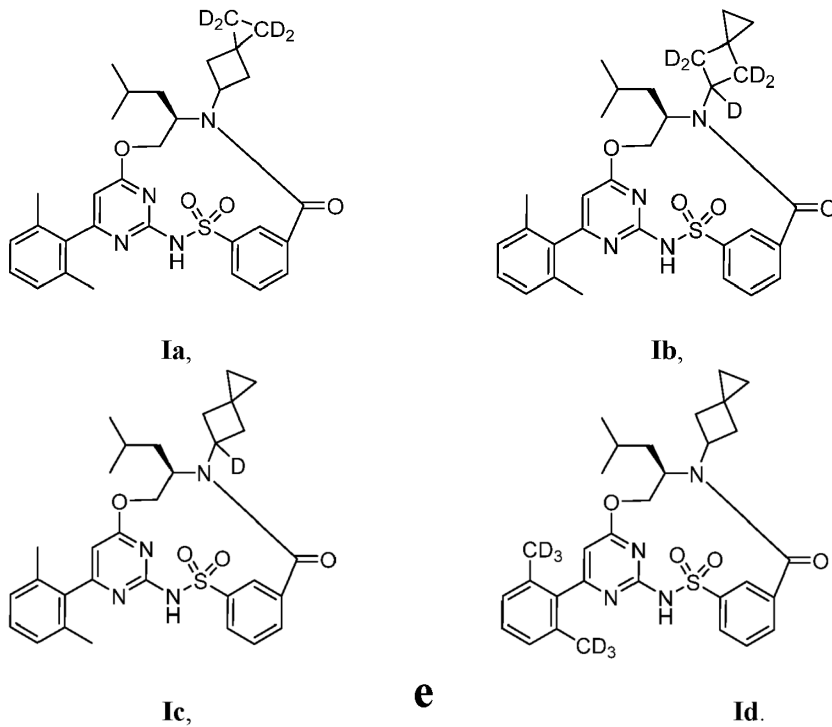
Recentemente sono stati identificati numerosi composti modulanti il CFTR. Tuttavia, sono ancora necessari composti in grado di trattare o ridurre la gravità della fibrosi cistica e di altre malattie mediate da CFTR, e in particolare le forme più gravi di queste malattie. WO 2019/018395 riguarda un composto e/o un suo sale(i) accettabile farmaceuticamente compreso in una composizione farmaceutica e metodi per utilizzare lo stesso per trattare la fibrosi cistica. WO 2018/064632 riguarda composti, loro sali accettabili farmaceuticamente, derivati deuterati di uno qualsiasi dei precedenti, e metaboliti di uno qualsiasi dei precedenti, nonché composizioni farmaceutiche che comprendono gli stessi, metodi per trattare la fibrosi cistica utilizzando gli stessi e metodi per preparare gli stessi. WO 2017/173274 riguarda un composto o un suo sale accettabile farmaceuticamente, per il trattamento di malattie mediate da CFTR, come la fibrosi cistica, nonché composizioni farmaceutiche, metodi di trattamento e relativi kit. WO 2016/057572 riguarda un composto o un suo sale accettabile farmaceuticamente, per il trattamento di malattie mediate da CFTR, come la fibrosi cistica, nonché composizioni farmaceutiche, metodi di trattamento e relativi kit.

Pertanto, un aspetto della descrizione fornisce il composto modulatore di CFTR (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (Composto **I**) e suoi sali e derivati deuterati accettabili farmaceuticamente. Un altro nome per il Composto **I** è (R)-1⁶-(2,6-dimetilfenil)-7-isobutil-6-(spiro[2.3]esan-5-il)-9-ossa-3-tia-2,6-diaza-1(2,4)-pirimidina-4(1,3)-benzenaciclonoanfan-5-one 3,3-diossido. Il composto **I** può essere rappresentato come avente la seguente struttura:



I.

Derivati deuterati illustrativi di Composto **I** includono i seguenti composti:

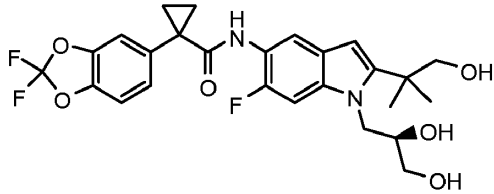


Sali illustrativi di Composto **I** e derivati deuterati di Composto **I** includono sali di potassio, sali di sodio e sali di calcio.

La descrizione fornisce anche composizioni farmaceutiche che comprendono almeno uno tra il Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati. In alcune realizzazioni, le composizioni possono inoltre includere almeno un ingrediente farmaceutico attivo aggiuntivo e/o almeno un veicolo. Sono inoltre descritti metodi per trattare la malattia CF mediata da CFTR, comprendenti la somministrazione di almeno uno tra il Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati. In alcune realizzazioni, il metodo può opzionalmente includere la somministrazione di uno o più ingredienti farmaceutici attivi aggiuntivi. In alcune realizzazioni, l'ingrediente(i) farmaceutico attivo aggiuntivo è un modulatore di CFTR. In alcune realizzazioni, il modulatore di CFTR è scelto tra potenziatori di CFTR e correttori di CFTR.

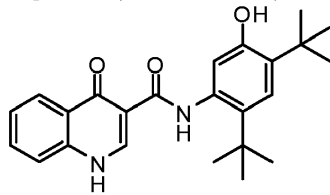
La descrizione fornisce anche metodi per trattare la malattia CF mediata da CFTR, comprendente la somministrazione a un paziente che ne abbia bisogno di almeno uno tra Composto **I**, derivati deuterati di

Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, in combinazione con uno o più composti scelti tra (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)-N-(1-(2,3-diidrossipropil)-6-fluoro-2-(1-idrossi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropancarbossammide (Composto **II**):



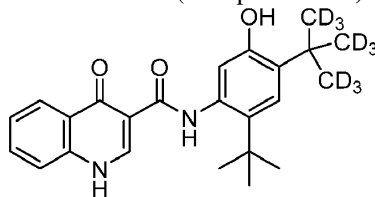
II,

N-[2,4-bis(1,1-dimetiletil)-5-idrossifenil]-1,4-diidro-4-ossochinolina-3-carbossammide (Composto **III**):



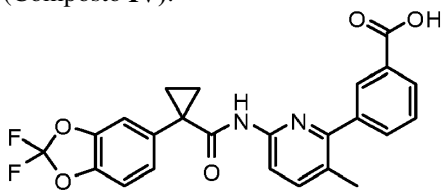
III,

N-(2-(terz-butil)-5-idrossi-4-(2-(metil-d3)propan-2-il)-1,1,1,3,3,3-d6)fenil)-4-osso-1,4-diidrochinolina-3-carbossammide (Composto **III-d**):



III-d,

e acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropancarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Composto **IV**):



IV,

e sali accettabili farmaceuticamente di Composti **II**, **III**, **III-d** e **IV**.

Definizioni

Come usato nella presente, un "derivato deuterato" di Composto **I** si riferisce ad un composto avente la stessa struttura chimica di Composto **I**, ma con uno o più atomi di idrogeno sostituiti da un atomo di deuterio.

Come usato nella presente, "mutazioni" può riferirsi a mutazioni nel gene *CFTR* o nella proteina CFTR. Una "mutazione del gene *CFTR*" si riferisce a una mutazione nel gene *CFTR*, mentre una "mutazione della proteina CFTR" si riferisce a una mutazione nella proteina CFTR. In generale, un difetto genetico o una mutazione, o un cambiamento nei nucleotidi di un gene, provoca una mutazione nella proteina CFTR tradotta da quel gene, o uno o più spostamenti di fase.

Il termine "F508del" si riferisce ad una proteina CFTR mutante a cui manca l'amminoacido fenilalanina in posizione 508.

Come usato nella presente, un paziente che è "omozigote" per una particolare mutazione genetica ha la stessa mutazione su entrambi gli alleli.

Come usato nella presente, un paziente che è "eterozigote" per una particolare mutazione genetica ha questa mutazione su un allele e una mutazione diversa sull'altro allele.

Come usato nella presente, il termine "modulatore" si riferisce ad un composto che aumenta l'attività di un composto biologico come una proteina. Ad esempio, un modulatore di CFTR è un composto che aumenta l'attività del CFTR. L'aumento di attività risultante da un modulatore di CFTR include ma non è limitato a composti che correggono, potenziano, stabilizzano e/o amplificano CFTR.

Come usato nella presente, il termine "correttore di CFTR" si riferisce ad un composto che facilita l'elaborazione e il traffico di CFTR per aumentare la quantità di CFTR sulla superficie cellulare. I composti **I**, **II** e **IV** e i loro sali e derivati deuterati accettabili farmaceuticamente sono correttori di CFTR.

Come usato nella presente, il termine "potenziatore di CFTR" si riferisce ad un composto che aumenta l'attività del canale della proteina CFTR situata sulla superficie cellulare, con conseguente miglioramento del trasporto di ioni. I composti **III** e **III-d** sono potenziatori di CFTR.

Come usato nella presente, il termine "ingrediente farmaceutico attivo" o "API" si riferisce ad un composto

biologicamente attivo.

Come usato nella presente, il termine "sale accettabile farmaceuticamente" si riferisce ad una forma salina di un composto di questa descrizione in cui il sale non è tossico. I sali accettabili farmaceuticamente dei composti di questa descrizione includono quelli derivati da acidi e basi inorganici e organici adatti. Sali accettabili farmaceuticamente sono ben noti nella tecnica. Ad esempio, S.M. Berge, et al. descrivono in dettaglio sali accettabili farmaceuticamente in J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Sali accettabili farmaceuticamente adatti sono, ad esempio, quelli descritti in S.M. Berge, et al. J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19. Ad esempio, Tabella 1 di tale articolo fornisce i seguenti sali accettabili farmaceuticamente:

Tabella 1. Sali accettabili farmaceuticamente

Acetato	Ioduro	Benzatina
Benzenzolfonato	Isetionato	Cloroprocaina
Benzoato	Lattato	Colina
Bicarbonato	Lattobionato	Dietanolamina
Bitartrato	Malato	Etilendiammina
Bromuro	Maleato	Meglumina
Calcio edetato	Mandelato	Procaina
Camsilato	Mesilato	Alluminio
Carbonato	Bromuro di metile	Calcio
Cloruro	Metilnitrato	Litio
Citrato	Metilsolfato	Magnesio
Dicloridrato	Mutare	Potassio
Edetato	Napsilato	Sodio

Edisilato	Nitrato	Zinco
Estolato	Pamoato (Embonato)	
Esilato	Pantotenato	
Fumarato	Fosfato/difosfato	
Gluceptato	Poligalatturonato	
Gluconato	Salicilato	
Glutammato	Stearato	
Glicolilarsanilato	Subacetato	
Esilresorcinato	Succinato	
Idrabamina	Solfato	
Bromidrato	Tannato	
Cloridrato	Tartrato	
Idrossinaftoato	Teoclato	
	Triiodide	

Esempi non limitativi di sali accettabili farmaceuticamente derivati da acidi appropriati includono: sali formati con acidi inorganici, come acido cloridrico, acido bromidrico, acido fosforico, acido solforico o acido perclorico; sali formati con acidi organici, come acido acetico, acido ossalico, acido maleico, acido tartarico, acido citrico, acido succinico o acido malonico; e sali formati usando altri metodi usati nella tecnica, come lo scambio ionico.

Esempi non limitativi di sali accettabili farmaceuticamente includono sali di adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzensolfonato, benzoato, bisolfato, borato, butirrato, canforato, canforasolfonato, citrato, ciclopentanpropionato, digluconato, dodecilsolfato, etansolfonato, formiato, fumarato, glucoeptonato, glicerofosfato, gluconato, emisolfato, eptanoato, esanoato, iodidrato, 2-idrossi-etansolfonato, lattobionato,

lattato, laurato, lauril solfato, malato, maleato, malonato, metansolfonato, 2-naftalensolfonato, nicotinato, nitrato, oleato, ossalato, palmitato, pamoato, pectinato, persolfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, stearato, succinato, solfato, tartrato, tiocianato, p-toluensolfonato, undecanoato e valerato. Esempi non limitativi di sali accettabili farmaceuticamente derivati da basi appropriate includono sali di metalli alcalini, metalli alcalino terrosi, ammonio e $N^+(C_{1-4} \text{alchile})_4$. Questa descrizione prevede anche la quaternizzazione di qualsiasi gruppo basico contenente azoto dei composti qui descritti. Esempi non limitativi adatti di sali di metalli alcalini e alcalino-terrosi includono sodio, litio, potassio, calcio e magnesio. Altri esempi non limitativi di sali accettabili farmaceuticamente includono ammonio, ammonio quaternario e cationi amminici formati usando controioni come alogenuro, idrossido, carbossilato, solfato, fosfato, nitrato, alchil solfonato inferiore, e aril solfonato. Altri esempi adatti e non limitativi di sali accettabili farmaceuticamente includono sali di besilato e glucosammina.

Come usato nella presente, il termine "amorfo" si riferisce ad un materiale solido che non ha un ordine a lungo raggio nella posizione delle sue molecole. I solidi amorfi sono generalmente liquidi sottoraffreddati in cui le molecole sono disposte in modo casuale in modo che non vi sia una disposizione ben definita, ad esempio un impaccamento molecolare, e nessun ordine a lungo raggio. I solidi amorfi sono generalmente isotropi, cioè presentano proprietà simili in tutte le direzioni e non hanno punti di fusione definiti. Ad esempio, un materiale amorfo è un materiale solido che non ha picchi cristallini caratteristici e netti nel suo modello di diffrazione di raggi X da polvere (XRPD) (vale a dire, non è cristallino come determinato da XRPD). Invece, nel suo modello XRPD compaiono uno o più picchi larghi (ad esempio, aloni). I picchi larghi sono caratteristici di un solido amorfo. Vedere US 2004/0006237 per un confronto tra XRPD di un materiale amorfo e di un materiale cristallino.

I termini "paziente" e "soggetto" sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono ad un animale, compresi gli esseri umani.

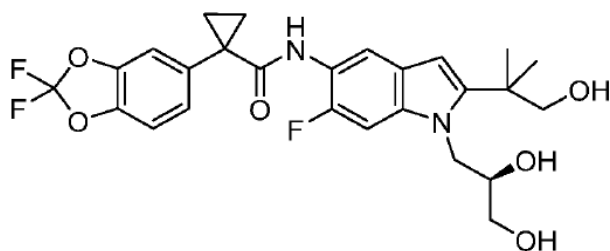
I termini "dose efficace" e "quantità efficace" sono usati in modo intercambiabile nella presente e si riferiscono a quella quantità di un composto che produce l'effetto desiderato per il quale viene somministrato (ad esempio,

miglioramento della CF o un sintomo della CF, o diminuzione la gravità della CF o un sintomo della CF). La quantità esatta di una dose efficace dipenderà dallo scopo del trattamento e sarà accertabile da un esperto nella tecnica usando tecniche note (vedere, ad esempio, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Come usati nella presente, i termini "trattamento", "trattare" e simili indicano generalmente il miglioramento della CF o dei suoi sintomi o la riduzione della gravità della CF o dei suoi sintomi, o un ritardo nell'insorgenza della CF o dei suoi sintomi, in un soggetto. Il "trattamento", come usato nella presente, include, ma non è limitato a, quanto segue: aumento della crescita del soggetto, aumento di peso, riduzione del muco nei polmoni, miglioramento della funzionalità pancreatico e/o epatica, riduzione delle infezioni al torace e/o riduzione della tosse o della mancanza di respiro. I miglioramenti o la diminuzione della gravità di uno qualsiasi di questi sintomi possono essere facilmente valutati secondo metodi e tecniche standard noti nella tecnica.

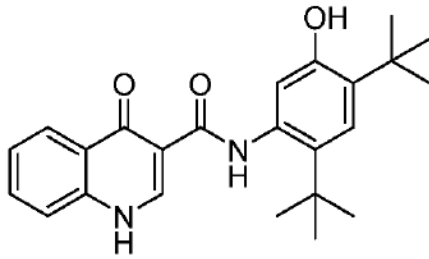
Come usato nella presente, il termine "in combinazione con", quando si fa riferimento a due o più composti, agenti o ingredienti farmaceutici attivi aggiuntivi, indica la somministrazione di due o più composti, agenti o ingredienti farmaceutici attivi al paziente prima, in concomitanza o successivamente l'uno all'altro. In alcune realizzazioni, i metodi della descrizione impiegano la somministrazione ad un paziente che ne ha bisogno di almeno un composto scelto tra Composto I, derivati deuterati di Composto I e sali accettabili farmaceuticamente di Composto I o suoi derivati deuterati, e possono opzionalmente impiegare la somministrazione di almeno un composto scelto tra:

Composto II:

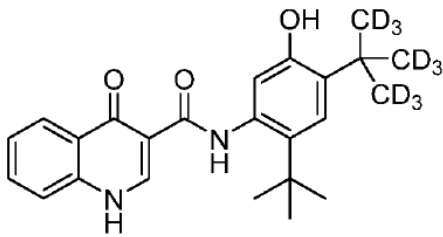


II,

Composto III:

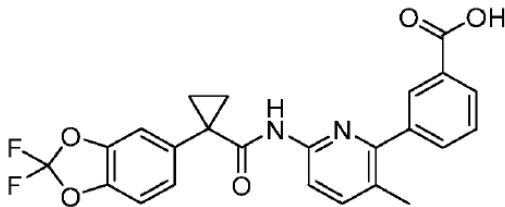
**III,**

Composto III-d

**III-d,**

e

Composto IV:

**IV,**

e sali accettabili farmaceuticamente dei Composti **II**, **III**, **III-d** e **IV**.

Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o i suoi derivati deuterati possono essere somministrati indipendentemente una volta al giorno, due volte al giorno o tre volte al giorno, opzionalmente in combinazione con uno o più dei Composti **II**, **III**, **III-d** e **IV**, e loro sali accettabili farmaceuticamente e loro derivati deuterati. In alcune realizzazioni, almeno un composto scelto tra Composto **I**, dai derivati deuterati di Composto **I** e dai sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati

deuterati, viene somministrato una volta al giorno. In alcune realizzazioni, almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, viene somministrato due volte al giorno, opzionalmente in combinazione con uno o più dei Composti **II**, **III**, **III-d**, **IV**, e loro sali accettabili farmaceuticamente e derivati deuterati.

Un esperto nella tecnica riconoscerebbe che, quando viene descritta una quantità di "un composto o un suo sale accettabile farmaceuticamente", la quantità della forma salina accettabile farmaceuticamente del composto è la quantità equivalente alla concentrazione della base libera del composto. Si noti che le quantità qui descritte dei composti o loro sali accettabili farmaceuticamente si basano sulla loro forma di base libera. Ad esempio, "10 mg di almeno un composto scelto tra Composto **I** e suoi sali accettabili farmaceuticamente" include 10 mg di Composto **I** e una concentrazione di un sale accettabile farmaceuticamente di Composto **I** equivalente a 10 mg di Composto **I**.

In alcune realizzazioni, almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I**, e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, viene somministrato in combinazione con almeno un composto scelto tra Composto **II**, derivati deuterati di Composto **II**, o suoi sali accettabili farmaceuticamente di Composto **II** o derivati deuterati.

In alcune realizzazioni, almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I**, e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, viene somministrato in combinazione con almeno un composto scelto tra Composto **III**, derivati deuterati di Composto **III** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **III** o suoi derivati deuterati. In alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **III** è Composto **III-d**.

In alcune realizzazioni, almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, viene somministrato in combinazione con almeno un composto scelto tra Composto **IV**, derivati deuterati di Composto **IV**, e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **IV** o suoi derivati deuterati.

In alcune realizzazioni, almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali

accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, viene somministrato in combinazione con Composti **II** o un loro sale accettabile farmaceuticamente o un derivato deuterato e almeno un composto scelto tra Composto **III**, derivati deuterati di Composto **III** o suoi sali accettabili farmaceuticamente. In alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **III** è Composto **III-d**.

In alcune realizzazioni, almeno un composto scelto tra Composto **I**, e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, viene somministrato in combinazione con almeno un composto scelto tra Composto **III**, derivati deuterati di Composto **III**, e suoi sali accettabili farmaceuticamente, e almeno un composto scelto tra Composto **IV**, derivati deuterati di Composto **IV**, e suoi sali accettabili farmaceuticamente. In alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **III** è Composto **III-d**.

Qualsiasi dei Composti **I**, derivati deuterati di Composto **I**, e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, insieme ad uno o più Composti **II**, **III**, **III-d** e **IV**, e i loro derivati deuterati e loro sali accettabili farmaceuticamente, possono essere combinati in un'unica composizione farmaceutica o in composizioni farmaceutiche separate. Tali composizioni farmaceutiche possono essere somministrate una volta al giorno o più volte al giorno, ad esempio due volte al giorno. In alcune realizzazioni, la descrizione presenta una composizione farmaceutica comprendente almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, e almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente.

In alcune realizzazioni, la descrizione presenta una composizione farmaceutica che comprende almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, almeno un composto scelto tra Composto **II**, derivati deuterati di Composto **II**, e suoi sali accettabili farmaceuticamente, e almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente.

In alcune realizzazioni, la descrizione presenta una composizione farmaceutica che comprende almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, almeno un composto scelto tra Composto **III**, derivati deuterati di Composto **III**, e suoi sali accettabili farmaceuticamente, e almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente. In

alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **III** è Composto **III-d**.

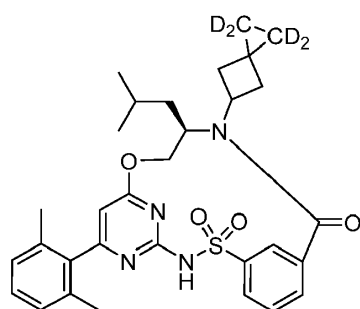
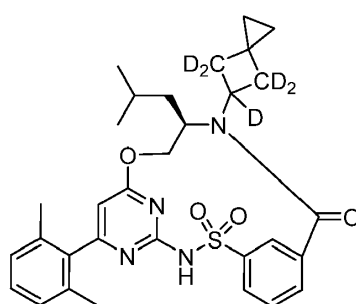
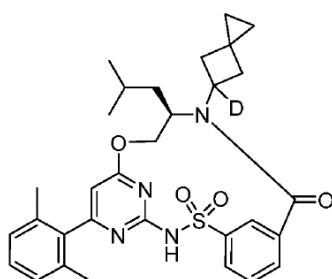
In alcune realizzazioni, la descrizione presenta una composizione farmaceutica che comprende almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, almeno un composto scelto tra Composto **IV**, derivati deuterati di Composto **IV**, e suoi sali accettabili farmaceuticamente, e almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente.

In alcune realizzazioni, la descrizione presenta una composizione farmaceutica che comprende (a) almeno un composto scelto tra Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, (b) almeno un composto scelto tra Composto **II** e suoi sali accettabili farmaceuticamente, (c) almeno un composto scelto tra Composto **III**, Composto **III-d**, e suoi sali accettabili farmaceuticamente, e (d) almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente.

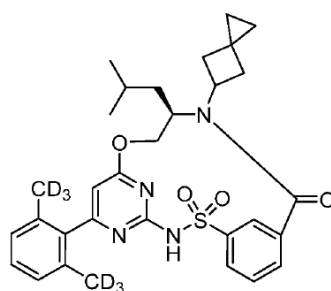
In alcune realizzazioni, la descrizione presenta una composizione farmaceutica che comprende (a) almeno il Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, (b) almeno un composto scelto tra Composto **III**, Composto **III-d**, e suoi sali accettabili farmaceuticamente, (c) almeno un composto scelto tra Composto **IV** e suoi sali accettabili farmaceuticamente, e (d) almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente.

In qualsiasi delle realizzazioni descritte sopra o in tutta questa descrizione, il sale farmaceutico di Composto **I** può essere un sale di potassio. In qualsiasi delle realizzazioni descritte sopra o in tutta questa descrizione, il sale farmaceutico di Composto **I** può essere un sale sodico. In qualsiasi delle realizzazioni descritte sopra o in tutta questa descrizione, il sale farmaceutico di Composto **I** può essere un sale di calcio.

In qualsiasi delle realizzazioni descritte sopra o in tutta la descrizione, il derivato deuterato di Composto **I** può essere scelto tra:

**Ia,****Ib,****Ic,**

e

**Id.**

In alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **I** è Composto **Ia** o un suo sale accettabile farmaceuticamente. In alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **I** è Composto **Ib** o un suo sale accettabile farmaceuticamente. In alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **I** è Composto **Ic** o un suo sale accettabile farmaceuticamente. In alcune realizzazioni, il derivato deuterato di Composto **I** è Composto **Id** o un suo sale accettabile farmaceuticamente.

Qualsiasi delle realizzazioni descritte sopra può comprendere almeno un ingrediente farmaceutico attivo aggiuntivo. In alcune realizzazioni, l'almeno un ingrediente farmaceutico attivo aggiuntivo è un modulatore di CFTR. In alcune realizzazioni, l'almeno un ingrediente farmaceutico attivo aggiuntivo è un correttore di CFTR. In alcune realizzazioni, l'almeno un ingrediente farmaceutico attivo aggiuntivo è un potenziatore del CFTR.

In alcune realizzazioni, almeno un ingrediente farmaceutico attivo aggiuntivo è scelto tra agenti mucolitici, broncodilatatori, antibiotici, agenti antinfettivi e agenti antinfiammatori.

Come descritto sopra, le composizioni farmaceutiche qui descritte possono comprendere almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente. L'almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente può essere scelto tra

adiuvanti e veicoli. L'almeno un veicolo accettabile farmaceuticamente, come usato nella presente, include tutti i solventi, diluenti, altri veicoli liquidi, coadiuvanti di dispersione, coadiuvanti di sospensione, agenti tensioattivi, agenti isotonici, agenti addensanti, agenti emulsionanti, conservanti, leganti solidi e lubrificanti, tensioattivi, disintegranti e riempitivi adatti alla particolare forma di dosaggio desiderata. Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21a edizione, 2005, ed. D.B. Troy, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia e *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick e J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York descrivono vari veicoli usati nella formulazione di composizioni farmaceutiche e tecniche note per la loro preparazione. Tranne nella misura in cui qualsiasi veicolo convenzionale sia incompatibile con i composti di questa descrizione, ad esempio producendo qualsiasi effetto biologico indesiderato o altrimenti interagendo in modo deleterio con qualsiasi altro componente(i) della composizione farmaceutica, il suo uso è contemplato nell'ambito di questa descrizione. Esempi non limitativi di veicoli accettabili farmaceuticamente adatti includono, ma non sono limitati a, scambiatori di ioni, allumina, stearato di alluminio, lecitina, proteine del siero (come albumina sierica umana), sostanze tampone (come fosfati, glicina, acido sorbico e sorbato di potassio), miscele parziali di gliceridi di acidi grassi vegetali saturi, acqua, sali ed elettroliti (come solfato di protamina, disodio idrogeno fosfato, idrogeno fosfato di potassio, cloruro di sodio e sali di zinco), silice colloidale, trisilicato di magnesio, polivinil pirrolidone, poliacrilati, cere, polimeri a blocchi di polietilene-poliossipropilene, grasso di lana, zuccheri (come lattosio, glucosio e saccarosio), amidi (come amido di mais e amido di patate), cellulosa e suoi derivati (come sodio carbossimetilcellulosa, etilcellulosa e acetato di cellulosa), gomma adragante in polvere, malto, gelatina, talco, eccipienti (come burro di cacao e cere per supposte), oli (come olio di arachidi, olio di semi di cotone, olio di cartamo, olio di sesamo, olio di oliva, olio di mais e olio di soia), glicoli (come glicole propilenico e glicole polietilenico), esteri (come etil oleato ed etil laurato), agar, agenti tamponanti (come idrossido di magnesio e idrossido di alluminio), acido alginico, acqua apirogena, soluzione salina isotonica, soluzione di Ringer, alcol etilico, soluzioni tampone fosfato, lubrificanti compatibili non tossici (come stearato di magnesio), tensioattivi (come sodio lauril solfato), agenti coloranti, agenti di distacco, agenti di rivestimento, agenti dolcificanti, agenti aromatizzanti, agenti profumanti, conservanti e antiossidanti.

Si comprenderà inoltre che una composizione farmaceutica di questa descrizione, inclusa una composizione farmaceutica comprendente una qualsiasi delle combinazioni descritte in precedenza, può essere impiegata in terapie combinate; cioè, le composizioni possono essere somministrate contemporaneamente, prima o dopo almeno uno o più ingredienti farmaceutici attivi o procedure mediche. Composizioni farmaceutiche comprendenti il Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, e opzionalmente comprendenti una qualsiasi delle combinazioni descritte sopra possono essere usate per trattare CF.

Qualsiasi composizione farmaceutica adatta nota nella tecnica può essere usata per Composto **I**, derivati deuterati di Composto **I** e sali accettabili farmaceuticamente di Composto **I** o suoi derivati deuterati, Composto **II**, Composto **III**, Composto **III-d**, Composto **IV**, e loro sali accettabili farmaceuticamente. Alcune composizioni farmaceutiche illustrative per il Composto **II** e i suoi sali accettabili farmaceuticamente si possono trovare in WO 2011/119984, WO 2014/014841 e WO 2015/160787. Alcune composizioni farmaceutiche illustrative per Composto **III** e suoi sali accettabili farmaceuticamente si possono trovare in WO 2007/134279, WO 2010/019239, WO 2011/019413, WO 2012/027731 e WO 2013/130669. Alcune composizioni farmaceutiche illustrative per Composto **III-d** e i suoi sali accettabili farmaceuticamente si possono trovare in WO 2017/053455 e WO 2018/080591. Alcune composizioni farmaceutiche illustrative per Composto **IV** e i suoi sali accettabili farmaceuticamente si possono trovare in WO 2010/037066, WO 2011/127241, WO 2013/112804 e WO 2014/071122.

In alcune realizzazioni, le composizioni farmaceutiche sono una compressa. In alcune realizzazioni, le compresse sono adatte per la somministrazione orale.

Queste combinazioni sono utili per il trattamento della fibrosi cistica causata da una mutazione nel gene CFTR.

Una mutazione di CFTR può influenzare la quantità di CFTR, cioè il numero di canali CFTR sulla superficie cellulare, o può influenzare la funzione del CFTR, cioè la capacità funzionale di ciascun canale di aprirsi e trasportare ioni. Le mutazioni che influenzano la quantità di CFTR includono mutazioni che causano sintesi difettosa (difetto di Classe I), mutazioni che causano elaborazione e traffico difettosi (difetto di Classe II),

mutazioni che causano una sintesi ridotta di CFTR (difetto di Classe V) e mutazioni che riducono la stabilità superficiale di CFTR (difetto di Classe VI). Le mutazioni che influenzano la funzione di CFTR includono mutazioni che causano un azionamento difettoso (difetto di Classe III) e mutazioni che causano una conduttanza difettosa (difetto di Classe IV). Alcune mutazioni di CFTR mostrano caratteristiche di più classi.

In alcune realizzazioni, nella presente sono descritti metodi per trattare, ridurre la gravità o trattare sintomaticamente la fibrosi cistica in un paziente che comprendono la somministrazione di una quantità efficace di un composto, di un suo sale accettabile farmaceuticamente o di un analogo deuterato di uno qualsiasi dei precedenti; o una composizione farmaceutica di questa descrizione ad un paziente, come un essere umano, in cui il paziente ha CF. In alcune realizzazioni, il paziente ha un genotipo F508del/funzione minima (MF), un genotipo F508del/F508del (omozigote per la mutazione F508del), un genotipo F508del/"gating" o un genotipo F508del/funzione residua (RF). In alcune realizzazioni, il paziente è eterozigote per la mutazione F508del.

Come usato nella presente, "mutazioni con funzione minima (MF)" si riferiscono alle mutazioni del gene CFTR associate alla funzione minima di CFTR (proteina CFTR con funzionamento minimo o nullo) e includono, ad esempio, mutazioni associate a gravi difetti nella capacità del canale CFTR di aprirsi e chiudersi (noto come azionamento del canale difettoso o "mutazioni di azionamento"); mutazioni associate a gravi difetti nell'elaborazione cellulare del CFTR e nel suo rilascio sulla superficie cellulare; mutazioni associate a nessuna (o minima) sintesi di CFTR; e mutazioni associate a gravi difetti nella conduttanza del canale.

In alcune realizzazioni, il paziente ha una mutazione F508del su un allele e una mutazione sull'altro allele scelta dalla Tabella 2.

Tabella 2. Mutazioni di CFTR

Mutazione				
Q2X	L218X	Q525X	R792X	E1104X
S4X	Q220X	G542X	E822X	W1145X
W19X	Y275X	G550X	W882X	R1158X

G27X	C276X	Q552X	W846X	R1162X
Q39X	Q290X	R553X	Y849X	S1196X
W57X	G330X	E585X	R851X	W1204X
E60X	W401X	G673X	Q890X	L1254X
R75X	Q414X	Q685X	S912X	S1255X
L88X	S434X	R709X	Y913X	W1282X
E92X	S466X	K710X	Q1042X	Q1313X
Q98X	S489X	Q715X	W1089X	Q1330X
Y122X	Q493X	L732X	Y1092X	E1371X
E193X	W496X	R764X	W1098X	Q1382X
W216X	C524X	R785X	R1102X	Q1411X
185+1G→T	711+5G→A	1717-8G→A	2622+1G→A	3121-1G→A
296+1G→A	712-1G→T	1717-1G→A	2790-1G→C	3500-2A→G
296+1G→T	1248+1G→A	1811+1G→C	3040G→C	3600+2insT
405+1G→A	1249-1G→A	1811+1.6kbA→G	(G970R)	3850-1G→A
405+3A→C	1341+1G→A	1811+1643G→T	3120G→A	4005+1G→A
406-1G→A	1525-2A→G	1812-1G→A	3120+1G→A	4374+1G→T
621+1G→T	1525-1G→A	1898+1G→A	3121-2A→G	
711+1G→T		1898+1G→C		
182delT	1078delT	1677delTA	2711delT	3737delA
306insA	1119delA	1782delA	2732insA	3791delC

306delTAGA	1138insG	1824delA	2869insG	3821delT
365-366insT	1154insTC	1833delT	2896insAG	3876delA
394delTT	1161delC	2043delG	2942insT	3878delG
442delA	1213delT	2143delT	2957delT	3905insT
444delA	1259insA	2183AA→G	3007delG	4016insT
457TAT→G	1288insTA	2184delA	3028delA	4021dupT
541delC	1343delG	2184insA	3171delC	4022insT
574delA	1471delA	2307insA	3171insC	4040delA
663delT	1497delGG	2347delG	3271delGG	4279insA
849delG	1548delG	2585delT	3349insT	4326delTC
935delA	1609del CA	2594delGT	3659delC	
CFTRdele1		CFTRdele16-17b	1461ins4 1924del7	
CFTRdele2		CFTRdele17a,17b		
CFTRdele2,3		CFTRdele17a-18	2055del9→A	
CFTRdele2-4		CFTRdele19	2105- 2117del13insAGAAA	
CFTRdele3-10,14b-16		CFTRdele19-21	2372del8	
CFTRdele4-7		CFTRdele21	2721del11	
CFTRdele4-11		CFTRdele22-24	2991del32	
CFTR50kdel		CFTRdele22,23	3667ins4	
CFTRdup6b-10		124del23bp	4010del4	

CFTRdele11		602del14	4209TGTT→AA	
CFTRdele13,14a		852del22		
CFTRdele14b-17b		991del5		
A46D	V520F	Y569D	N1303K	
G85E	A559T	L1065P		
R347P	R560T	R1066C		
L467P	R560S	L1077P		
I507del	A561E	M1101K		

In alcune realizzazioni, le composizioni qui descritte sono utili per trattare o ridurre la gravità di CF in pazienti con determinati genotipi che presentano attività CFTR residua.

In alcune realizzazioni, le composizioni qui descritte sono utili per trattare, ridurre la gravità o trattare sintomaticamente la CF in pazienti con determinati fenotipi clinici, ad esempio, un fenotipo clinico da lieve a moderato che tipicamente è correlato alla quantità di attività CFTR residua nella membrana apicale degli epitelii. Tali fenotipi includono pazienti che mostrano insufficienza pancreatica.

In alcune realizzazioni, le composizioni qui descritte sono utili per trattare, ridurre la gravità o trattare sintomaticamente pazienti con diagnosi di insufficienza pancreatica, pancreatite idiopatica e assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti, o malattia polmonare lieve, in cui il paziente mostra attività CFTR residua.

In alcune realizzazioni, questa descrizione riguarda un metodo per aumentare o indurre l'attività del canale anionico *in vitro* o *in vivo*, comprendente il portare a contatto il canale con una composizione qui descritta. In alcune realizzazioni, il canale anionico è un canale del cloruro o un canale del bicarbonato. In alcune realizzazioni, il canale anionico è un canale del cloruro.

La quantità esatta di una composizione farmaceutica richiesta varierà da soggetto a soggetto, a seconda della specie, dell'età e delle condizioni generali del soggetto, della gravità della malattia, del particolare agente, della sua modalità di somministrazione e simili. I composti di questa descrizione possono essere formulati sotto forma

di unità di dosaggio per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. L'espressione "forma di unità di dosaggio" come qui usata si riferisce ad un'unità fisicamente distinta di agente appropriata per il paziente da trattare. Resta inteso, tuttavia, che l'uso giornaliero totale dei composti e delle composizioni di questa descrizione sarà deciso dal medico curante nell'ambito di un valido giudizio medico. Il livello di dose efficace specifico per ogni particolare paziente o organismo dipenderà da una varietà di fattori tra cui il disturbo da trattare e la gravità del disturbo; l'attività dello specifico composto impiegato; la composizione specifica impiegata; l'età, il peso corporeo, lo stato di salute generale, il sesso e la dieta del paziente; il tempo di somministrazione, la via di somministrazione e la velocità di escrezione del composto specifico impiegato; la durata del trattamento; farmaci usati in combinazione o in concomitanza con il composto specifico impiegato e fattori simili ben noti nelle arti mediche.

In alcune realizzazioni, la descrizione è rivolta anche a metodi di trattamento che usano derivati marcati con isotopi dei suddetti composti, che hanno le stesse strutture descritte nella presente, tranne per il fatto che uno o più atomi al loro interno sono stati sostituiti da uno o più atomi aventi una massa atomica o un numero di massa che differisce dalla massa atomica o dal numero di massa dell'atomo che di solito si trova in natura (marcato con isotopi). Esempi di isotopi disponibili in commercio e adatti per la descrizione includono isotopi di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, fosforo, fluoro e cloro, ad esempio ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F e ^{36}Cl , rispettivamente.

I composti e i sali marcati con isotopi possono essere usati in numerosi modi vantaggiosi. Essi possono essere adatti per farmaci e/o vari tipi di saggi, come saggi di distribuzione tissutale del substrato. Ad esempio, i composti marcati con trizio (^3H) e/o carbonio-14 (^{14}C) sono particolarmente utili per vari tipi di saggi, come i saggi di distribuzione tissutale del substrato, grazie alla preparazione relativamente semplice e all'eccellente rilevabilità. Ad esempio, quelli marcati con deuterio (^2H) sono terapeuticamente utili con potenziali vantaggi terapeutici rispetto ai composti non marcati con ^2H . In generale, i composti e i sali marcati con deuterio (^2H) possono avere una maggiore stabilità metabolica rispetto a quelli che non sono marcati con isotopi a causa dell'effetto isotopico cinetico descritto di seguito. Una maggiore stabilità metabolica si traduce direttamente in

un aumento dell'emivita *in vivo* o in dosaggi inferiori, che potrebbero essere desiderati. I composti e sali marcati con isotopi possono solitamente essere preparati eseguendo le procedure descritte negli schemi di sintesi e nella relativa descrizione, nella parte di esempio e nella parte di preparazione nel presente testo, sostituendo un reagente non marcato con isotopi con un reagente marcato con isotopi facilmente reperibile.

In alcune realizzazioni, i composti e i sali marcati con isotopi sono quelli marcati con deuterio (marcati con ^2H). In alcune realizzazioni specifiche, i composti e i sali marcati con isotopi sono marcati con deuterio, in cui uno o più atomi di idrogeno sono stati sostituiti da deuterio. Nelle strutture chimiche, il deuterio è rappresentato come " ^2H " o "D".

I composti e sali marcati con deuterio possono modificare il metabolismo ossidativo del composto attraverso l'effetto isotopico cinetico primario. L'effetto isotopico cinetico primario è un cambiamento della velocità di una reazione chimica che risulta dallo scambio di nuclei isotopici, che a sua volta è causato dal cambiamento nelle energie dello stato fondamentale necessarie per la formazione del legame covalente dopo questo scambio isotopico. Lo scambio di un isotopo più pesante di solito comporta un abbassamento dell'energia dello stato fondamentale per un legame chimico e quindi provoca una riduzione della rottura del legame limitante la velocità. Se la rottura del legame avviene all'interno o in prossimità di una regione del punto di sella lungo le coordinate di una reazione a più prodotti, i rapporti di distribuzione dei prodotti possono essere sostanzialmente alterati. Per spiegare: se il deuterio è legato a un atomo di carbonio in una posizione non scambiabile, sono tipiche differenze di velocità di $k_M/k_D = 2-7$. Per una discussione più approfondita, vedere S.L. Harbeson e R.D. Tung, *Deuterium In Drug Discovery and Development*, Ann. Rep. Med. Chem. 2011, 46, 403-417; e T.G. Gant "Using deuterium in drug discovery: leaving the label in the drug" J. Med. Chem. 2014, 57, 3595-3611.

Nei composti di questa descrizione, qualsiasi atomo non specificatamente designato come un particolare isotopo intende rappresentare qualsiasi isotopo stabile di quell'atomo. Se non diversamente indicato, quando una posizione è designata specificamente come "H" o "idrogeno", si intende che la posizione abbia idrogeno nella sua composizione isotopica in abbondanza naturale.

La concentrazione dell'isotopo(i) (ad esempio, deuterio) incorporato nei composti e sali marcati con isotopi della

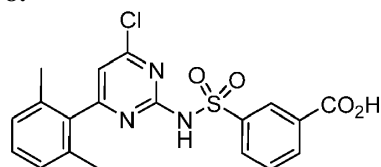
descrizione può essere definita dal fattore di arricchimento isotopico. Il termine "fattore di arricchimento isotopico" come qui usato indica il rapporto tra l'abbondanza isotopica e l'abbondanza naturale di un isotopo specificato. In alcune realizzazioni, se un sostituito in un composto della descrizione è indicato con deuterio, tale composto ha un fattore di arricchimento isotopico per ciascun atomo di deuterio designato di almeno 3500 (52,5% di incorporazione di deuterio a ciascun atomo di deuterio designato), almeno 4000 (60% di incorporazione di deuterio), almeno 4500 (67,5% di incorporazione di deuterio), almeno 5000 (75% di incorporazione di deuterio), almeno 5500 (82,5% di incorporazione di deuterio), almeno 6000 (90% di incorporazione di deuterio), almeno 6333,3 (95% di incorporazione di deuterio), almeno 6466,7 (97% di incorporazione di deuterio), almeno 6600 (99% di incorporazione di deuterio) o almeno 6633,3 (99,5% di incorporazione di deuterio).

Durante la scoperta e lo sviluppo di agenti terapeutici, l'esperto nella tecnica cerca di ottimizzare i parametri farmacocinetici mantenendo le proprietà desiderabili *in vitro*. Può essere ragionevole supporre che molti composti con profili farmacocinetici insufficienti siano suscettibili di metabolismo ossidativo.

Un esperto nella tecnica comprenderebbe che la deuterazione di una o più posizioni metabolicamente labili su un composto o metabolita attivo può portare al miglioramento di una o più proprietà DMPK superiori mantenendo l'attività biologica, rispetto ai corrispondenti analoghi con idrogeno. La proprietà o le proprietà superiori del DMPK possono avere un impatto sull'esposizione, sull'emivita, sulla *clearance*, sul metabolismo e/o anche sui requisiti alimentari per un assorbimento ottimale del prodotto farmaceutico. La deuterazione può anche modificare il metabolismo in altre posizioni non deuterate del composto deuterato.

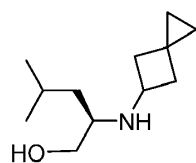
La descrizione fornisce un procedimento per preparare il Composto **I**, che comprende la reazione del composto

8:



8

con il composto **3**:



3

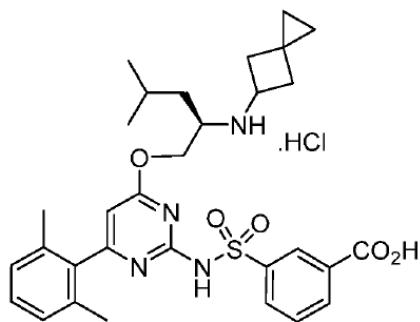
e una base e un agente di accoppiamento per produrre il Composto **I**.

In alcune realizzazioni, la base è sodio *terz*-butossido.

In alcune realizzazioni, l'agente di accoppiamento è HATU.

La descrizione fornisce un procedimento alternativo per preparare il Composto **I**, comprendente:

a) reazione del composto **8** e del composto **3** con una base e successivo trattamento con HCl per produrre il composto **9**:



9; e

b) far reagire il composto **9** con una base e un agente di accoppiamento per produrre il Composto **I**.

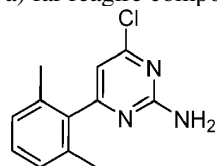
In alcune realizzazioni, la base del passaggio a) è sodio *terz*-butossido.

In alcune realizzazioni, la base del passaggio b) è trietilammina.

In alcune realizzazioni, l'agente di accoppiamento è HATU.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare il composto **8**, che comprende:

a) far reagire composto **7**:



7

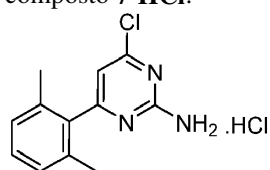
con metil 3-clorosolfonilbenzoato e una prima base, successivo trattamento con una seconda base, seguito dal trattamento della miscela di reazione con un acido per produrre il composto **8**.

In alcune realizzazioni, la prima base è litio *terz*-amossido.

In alcune realizzazioni, la seconda base è idrossido di sodio.

In alcune realizzazioni, l'acido è HCl.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare il composto **7**, che comprende il trattamento di composto **7·HCl**:



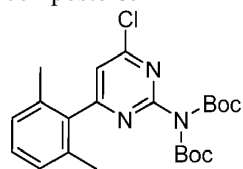
7·HCl

con una base per produrre composto **7**.

In alcune realizzazioni, la base è idrossido di sodio.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **7·HCl**, comprendente la reazione di

composto **6**:

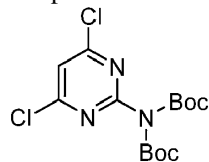


6

con HCl per produrre il composto **7·HCl**.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **6**, comprendente la reazione di

composto **5**:



5

con acido 2,6-dimetilfenilboronico, un catalizzatore di metallo di transizione e una base per produrre composto

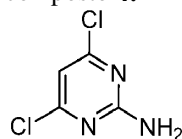
6.

In alcune realizzazioni, il catalizzatore del metallo di transizione è Pd(dppf)Cl₂.

In alcune realizzazioni, la base è carbonato di cesio.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **5**, comprendente la reazione di

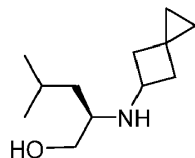
composto **4**:

**4**

con Boc₂O e una base per produrre composto **5**.

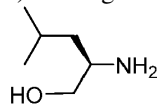
In alcune realizzazioni, la base è DMAP.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **3**:

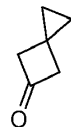
**3,**

comprendente:

a) far reagire il composto **1**:

**1**

con il composto **2**:

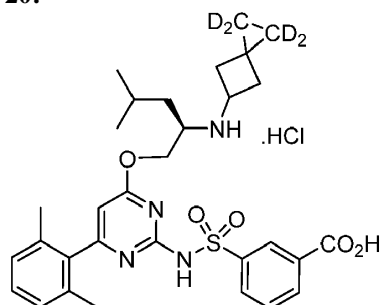
**2**

e un agente riducente per produrre composto **3**.

In alcune realizzazioni, l'agente riducente è NaBH(OAc)₃.

La descrizione fornisce un procedimento per preparare il Composto **Ia**, comprendente la reazione di composto

20:



20

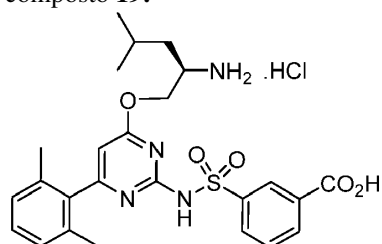
con una base e un agente di accoppiamento per produrre composto **Ia**.

In alcune realizzazioni, la base è DIEA.

In alcune realizzazioni, l'agente di accoppiamento è HATU.

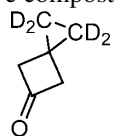
La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **20**, comprendente la reazione di

composto **19**:



19

e composto **17**:



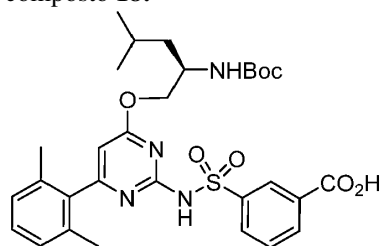
17

con un agente riducente per produrre composto **20**.

In alcune realizzazioni, l'agente riducente è $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **19**, comprendente la reazione di

composto **18**:

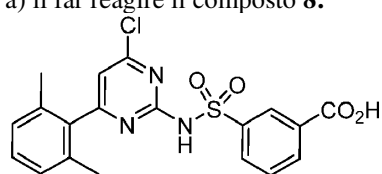


18

con HCl per produrre composto **19**.

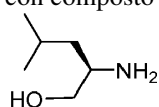
La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **18**, comprendente:

a) il far reagire il composto **8**:



8

con composto **1**:



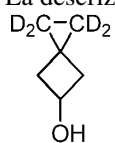
1

e una base e

b) far reagire il prodotto della fase a) con Boc_2O per produrre composto **18**.

In alcune realizzazioni, la base è sodio *terz*-butoossido.

La descrizione fornisce un procedimento per preparare composto **17**, comprendente la reazione di composto **16**:



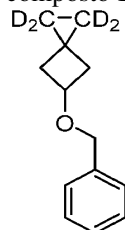
16

con un ossidante per produrre composto **17**.

In alcune realizzazioni, l'ossidante è CrO_3 /piridina.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **16**, comprendente la reazione di

composto **15**:



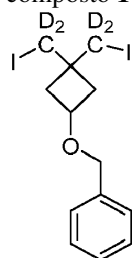
15

con H₂ e un catalizzatore di metallo di transizione per produrre composto **16**.

In alcune realizzazioni, il catalizzatore di metallo di transizione è palladio su carbone.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **15**, comprendente la reazione di

composto **14**:



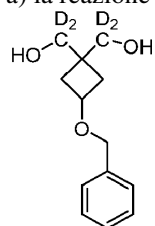
14

con un agente riducente per produrre composto **15**.

In alcune realizzazioni, l'agente riducente è Zn.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **14**, comprendente

a) la reazione di composto **13**:



13

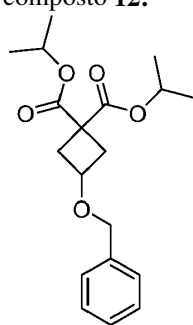
con un cloruro di solfonile e una base, e

b) la reazione del prodotto del passaggio a) con una fonte di ioduro per produrre composto **14**.

In alcune realizzazioni, il cloruro di solfonile è cloruro di metansolfonile.

In alcune realizzazioni, la fonte di ioduro è ioduro di sodio.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **13**, comprendente la reazione di composto **12**:

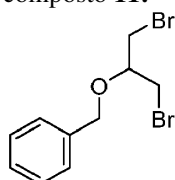


12

con un agente riducente per produrre composto **13**.

In alcune realizzazioni, l'agente riducente è LiAlD₄.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **12**, comprendente la reazione di composto **11**:



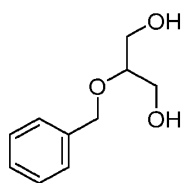
11

con un dialchilmalonato e una base per produrre composto **12**.

In alcune realizzazioni, il dialchilmalonato è diisopropilpropandioato.

In alcune realizzazioni, la base è idruro di sodio.

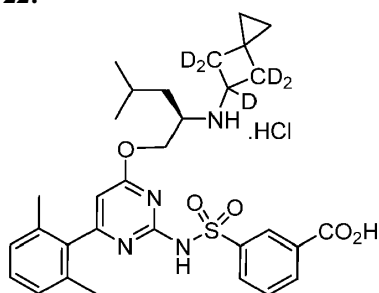
La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **11**, comprendente la conversione del composto **10**:

**10**

in composto **11**.

In alcune realizzazioni, la conversione del composto **10** nel composto **11** viene eseguita con CBr_4 e PPh_3 .

La descrizione fornisce un procedimento per preparare il Composto **Ib**, comprendente la reazione di composto **22**:

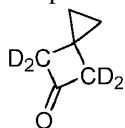
**22**

con una base e un agente di accoppiamento per produrre composto **Ib**.

In alcune realizzazioni, la base è DIEA.

In alcune realizzazioni, l'agente di accoppiamento è HATU.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **22**, comprendente la reazione di composto **19** con composto **21**:

**21**

e un agente riducente per produrre composto **22**.

In alcune realizzazioni, l'agente riducente è NaBD_3CN .

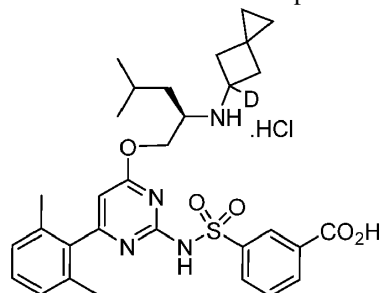
La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **21**, comprendente la reazione di

composto **2** con una base e una fonte di deuterio per produrre composto **21**.

In alcune realizzazioni, la base è carbonato di potassio.

In alcune realizzazioni, la fonte di deuterio è D₂O.

La descrizione fornisce un procedimento per preparare composto **1c**, comprendente la reazione di composto **23**:



23

con una base un agente di accoppiamento per produrre composto **1c**.

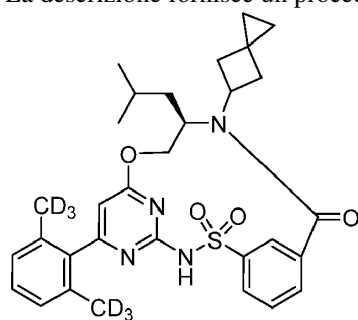
In alcune realizzazioni, la base è DIEA.

In alcune realizzazioni, l'agente di accoppiamento è HATU.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare **23**, che comprende la reazione di composto **19** con composto **2** e un agente riducente per produrre composto **23**.

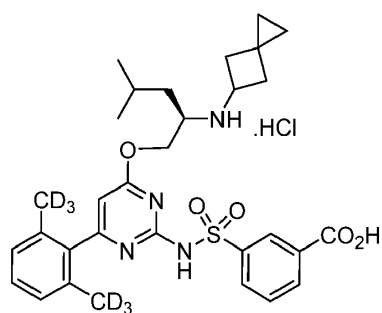
In alcune realizzazioni, l'agente riducente è NaBD₃CN.

La descrizione fornisce un procedimento per preparare il Composto **1d**:



1d,

comprendente la reazione di composto **35**:

**35**

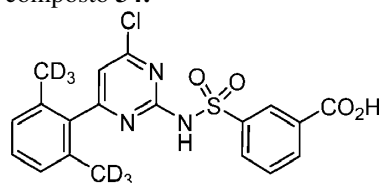
con una base e un agente di accoppiamento per produrre composto **Id**.

In alcune realizzazioni, la base è DIEA.

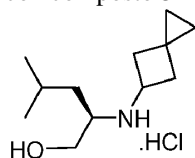
In alcune realizzazioni, l'agente di accoppiamento è COMU.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **35**, comprendente la reazione di

composto **34**:

**34**

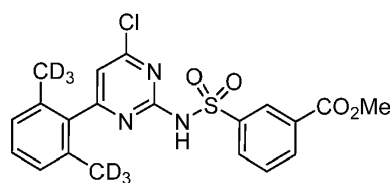
con composto **3·HCl**:

**3·HCl**

e una base per produrre composto **35**.

In alcune realizzazioni, la base è sodio *tert*-butoossido.

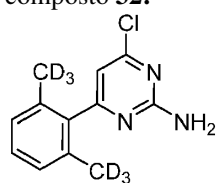
La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **34**, comprendente la reazione di composto **33**:

**33**

con una base per produrre composto **34**.

In alcune realizzazioni, la base è idrossido di sodio.

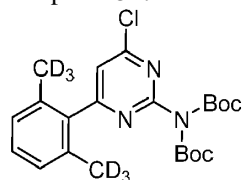
La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **33**, comprendente la reazione di composto **32**:

**32**

con metil 3-clorosolfonilbenzoato e una base per produrre composto **33**.

In alcune realizzazioni, la base è litio *terz*-amossido.

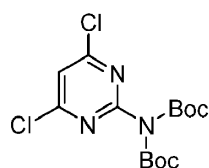
La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **32**, comprendente la reazione di composto **31**:

**31**

con un acido per produrre composto **32**.

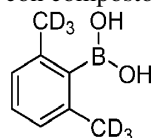
In alcune realizzazioni, l'acido è HCl.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **31**, che comprende la reazione di composto **5**:



5

con composto **30**:



30

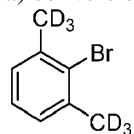
e un catalizzatore di metallo di transizione e una base per produrre composto **31**.

In alcune realizzazioni, la base è carbonato di cesio.

In alcune realizzazioni, il catalizzatore del metallo di transizione è Pd(dppf)Cl₂.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare **30**, comprendente

a) conversione del composto **29**:



29

nel derivato dello ioduro di aril magnesio,

b) reazione del prodotto della fase a) con un trialchil borato, e

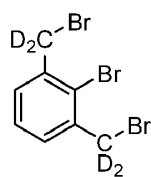
c) reazione del prodotto della fase b) con un acido per produrre composto **30**.

In alcune realizzazioni, il passaggio a) viene eseguito con Mg e I₂.

In alcune realizzazioni, il trialchil borato è trimetil borato.

In alcune realizzazioni, l'acido è HCl.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **29**, comprendente la reazione di composto **28**:

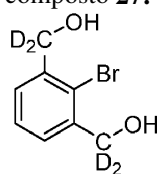
**28**

con un agente riducente per produrre composto **29**.

In alcune realizzazioni, l'agente riducente è LiAlD_4 .

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **28**, comprendente la conversione del

composto **27**:

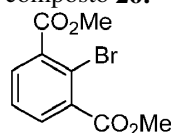
**27**

nel composto **28**.

In alcune realizzazioni, la conversione del composto **27** nel composto **28** viene eseguita con CBr_4 e PPh_3 .

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **27**, comprendente la reazione di

composto **26**:

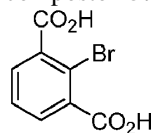
**26**

con un agente riducente per produrre composto **27**.

In alcune realizzazioni, l'agente riducente è LiAlD_4 .

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **26**, comprendente la reazione di

composto **25**:

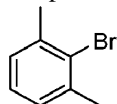
**25**

con una base e un agente alchilante per produrre composto **26**.

In alcune realizzazioni, la base è carbonato di potassio.

In alcune realizzazioni, l'agente alchilante è iodometano.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **25**, comprendente la reazione di composto **24**:



24

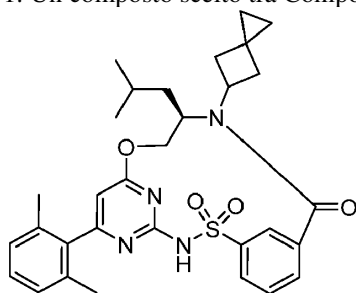
con un ossidante per produrre composto **25**.

In alcune realizzazioni, l'ossidante è permanganato di potassio.

La descrizione fornisce inoltre un procedimento per preparare composto **3·HCl**, che comprende il trattamento del composto **3** con HCl per produrre composto **3·HCl**.

Realizzazioni illustrative della descrizione includono:

1. Un composto scelto tra Composto **I**:



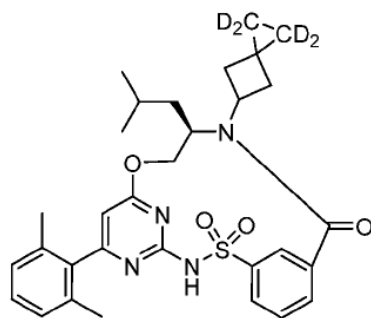
I,

derivati deuterati di Composto **I** e suoi sali accettabili farmaceuticamente.

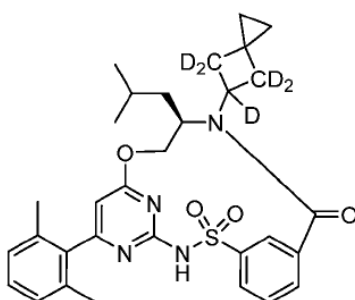
2. Il composto della realizzazione 1, in cui il composto è Composto **I**.

3. Il composto della realizzazione 1, in cui il derivato deuterato di Composto **I** è scelto tra:

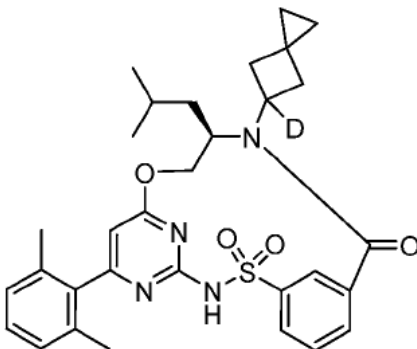
Composto Ia:

**Ia,**

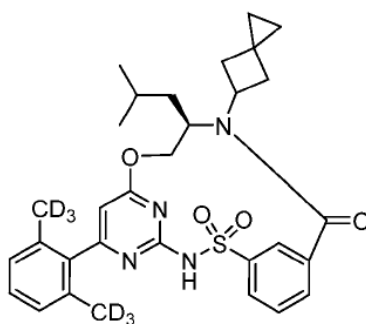
Composto Ib:

**Ib,**

Composto Ic:

**Ic,**

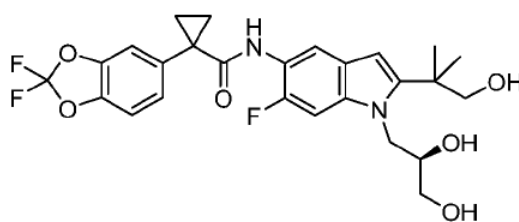
Composto Id:

**Id,**

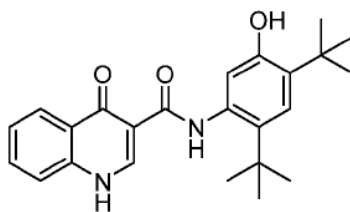
e loro sali accettabili farmaceuticamente.

4. Il composto della realizzazione 1 o 2, in cui il composto è un sale di potassio.
5. Il composto della realizzazione 1 o 2, in cui il composto è un sale di sodio.
6. Il composto della realizzazione 1 o 2, in cui il composto è un sale di calcio.
7. Un metodo per trattare un disturbo mediato da CFTR, comprendente la somministrazione di una quantità efficace del composto di una qualsiasi delle realizzazioni da 1 a 6 a un paziente che ne ha bisogno.
8. Metodo della realizzazione 7, in cui il disturbo mediato da CFTR è CF.
9. Metodo secondo la realizzazione 7, in cui il composto è Composto **I** o un suo sale accettabile farmaceuticamente.
10. Metodo di una qualsiasi delle realizzazioni da 7 a 9, comprendente inoltre la somministrazione di uno o più composti scelti tra:

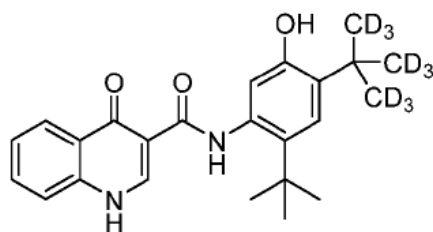
Composto II:

**II,**

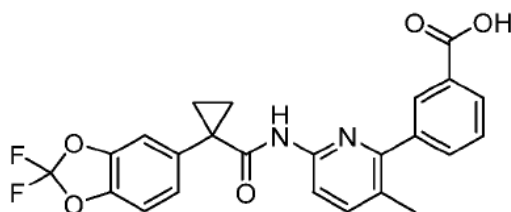
Composto III:

**III,**

Composto III-d

**III-d, e**

Composto IV:

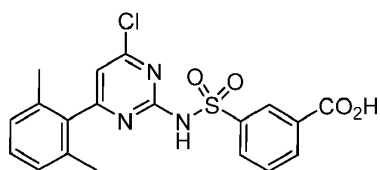
**IV,**

e sali accettabili farmaceuticamente dei Composti **II**, **III**, **III-d** e **IV**.

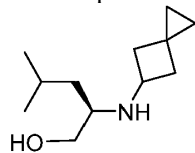
11. Il metodo della realizzazione 10, comprendente la somministrazione di Composto **I** e di Composto **III** o di Composto **III-d**.

12. Il metodo della realizzazione 10, comprendente la somministrazione di Composto **I**, Composto **II** e Composto **III** o Composto **III-d**.

13. Un procedimento per preparare il Composto **I**, comprendente il far reagire il composto **8**:

**8**

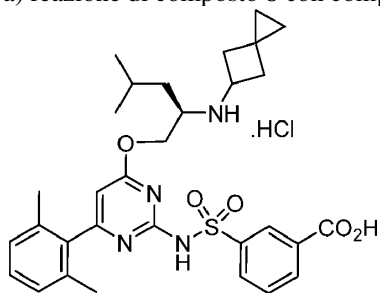
con composto **3**:

**3**

per produrre Composto **I**.

14. Un procedimento per preparare Composto **I**, comprendente:

a) reazione di composto **8** con composto **3** e successivo trattamento con HCl per produrre composto **9**:

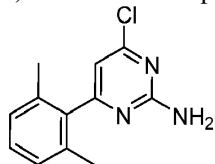
**9**,

e

b) conversione del composto **9** nel Composto **I**.

15. Il procedimento della realizzazione 13 o 14, in cui il composto **8** viene preparato mediante

a) reazione di composto **7**:

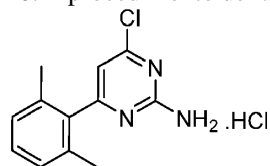
**7**

con metil 3-clorosolfonilbenzoato e una prima base,

b) trattamento con una seconda base, e

c) trattamento della miscela di reazione con HCl per produrre composto **8**.

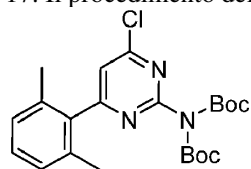
16. Il procedimento della realizzazione 15, in cui il composto **7** viene preparato convertendo il composto **7·HCl**:



7·HCl

nel composto **7**.

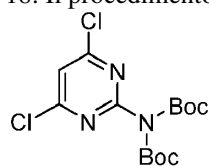
17. Il procedimento della realizzazione 16, in cui il composto **7·HCl** viene preparato convertendo il composto **6**:



6

nel composto **7·HCl**.

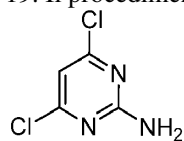
18. Il procedimento della realizzazione 17, in cui il composto **6** viene preparato facendo reagire il composto **5**:



5

con acido 2,6-dimetilfenilboronico per produrre composto **6**.

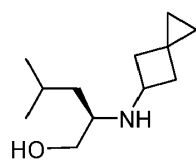
19. Il procedimento della realizzazione 18, in cui il composto **5** viene preparato convertendo il composto **4**:



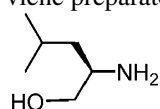
4

nel composto **5**.

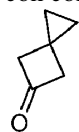
20. Processo della realizzazione 13 o 14, in cui il composto **3**:

**3**

viene preparato facendo reagire il composto **1**:

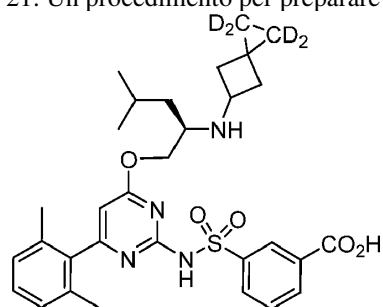
**1**

con composto **2**:

**2**

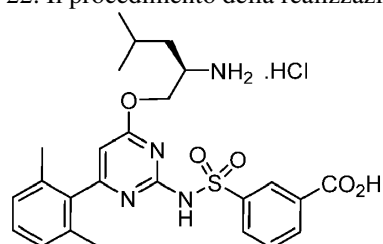
per produrre composto **3**.

21. Un procedimento per preparare Composto Ia, comprendente la conversione del composto **20**:

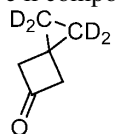
**20**

nel composto **Ia**.

22. Il procedimento della realizzazione 21, in cui il composto **20** viene prodotto facendo reagire il composto **19**:

**19**

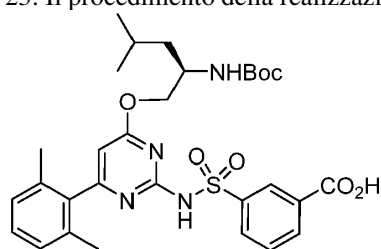
e il composto **17**:



17

per produrre composto **20**.

23. Il procedimento della realizzazione 22, in cui il composto **19** viene preparato convertendo il composto **18**:

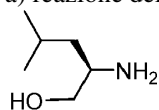


18

nel composto **19**.

24. Il procedimento della realizzazione 23, in cui il composto **18** viene preparato mediante

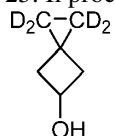
a) reazione del composto **8** con composto **1**:



1

b) conversione del prodotto nel passaggio a) nel composto **18**.

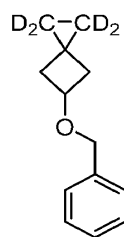
25. Il procedimento della realizzazione 22, in cui il composto **17** viene preparato convertendo il composto **16**:



16

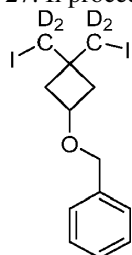
nel composto **17**.

26. Il procedimento della realizzazione 25, in cui il composto **16** viene preparato convertendo il composto **15**:

**15**

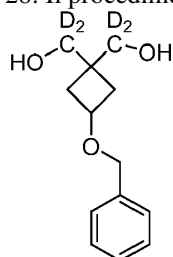
nel composto **16**.

27. Il procedimento della realizzazione 26, in cui il composto **15** viene preparato convertendo il composto **14**:

**14**

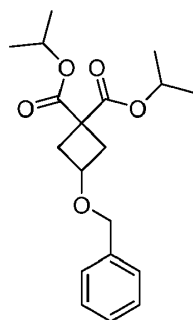
nel composto **15**.

28. Il procedimento della realizzazione 27, in cui il composto **14** viene preparato convertendo il composto **13**:

**13**

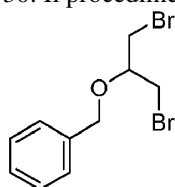
nel composto **14**.

29. Il procedimento della realizzazione 28, in cui il composto **13** viene preparato convertendo il composto **12**:

**12**

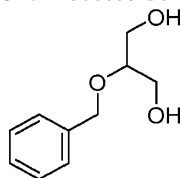
nel composto **13**.

30. Il procedimento della realizzazione 29, in cui il composto **12** viene preparato facendo reagire il composto **11**:

**11**

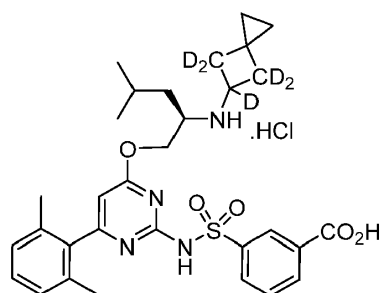
con diisopropilpropandioato per formare il composto **12**.

31. Processo della realizzazione 30, in cui il composto **11** viene preparato convertendo il composto **10**:

**10**

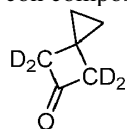
nel composto **11**.

32. Procedimento per preparare Composto **Ib**, comprendente la conversione del composto **22**:

**22**

nel composto **Ib**.

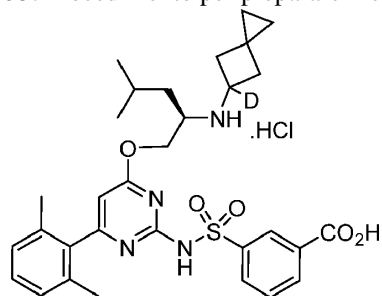
33. Il procedimento della realizzazione 32, in cui il composto **22** viene preparato facendo reagire il composto **19** con composto **21**:

**21**

per produrre composto **22**.

34. Procedimento della realizzazione **33**, in cui il composto **21** viene preparato convertendo il composto **2** nel composto **21**.

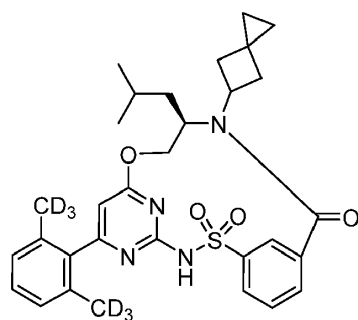
35. Procedimento per preparare il composto **Ic**, comprendente la conversione del composto **23**:

**23**

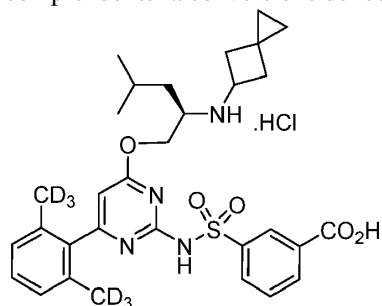
nel composto **Ic**.

36. Il procedimento della realizzazione 35, in cui il composto **23** viene preparato facendo reagire il composto **19** con composto **2** per produrre composto **23**.

37. Un procedimento per preparare Composto **Id**:

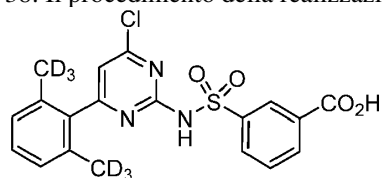
**1d,**

comprendente la conversione del composto **35**:

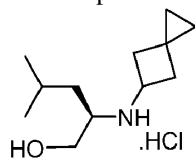
**35**

nel composto **1d**.

38. Il procedimento della realizzazione 37, in cui il composto **35** viene preparato facendo reagire il composto **34**:

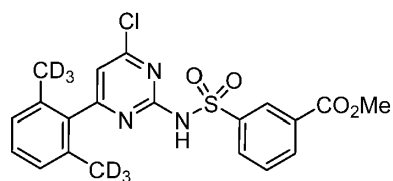
**34**

con composto **3·HCl**:

**3·HCl**

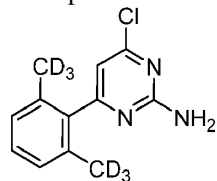
per produrre composto **35**.

39. Il procedimento della realizzazione 38, in cui il composto **34** viene preparato convertendo il composto **33**:

**33**

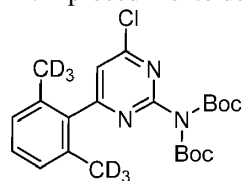
nel composto **34**.

40. Il procedimento della realizzazione 39, in cui il composto **33** viene preparato facendo reagire il composto **32**:

**32**

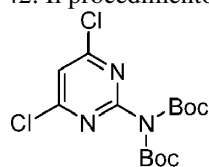
con metil 3-clorosolfonilbenzoato per produrre composto **33**.

41. Il procedimento della realizzazione 40, in cui il composto **32** viene preparato convertendo il composto **31**:

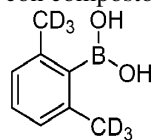
**31**

nel composto **32**.

42. Il procedimento della realizzazione 41, in cui il composto **31** viene preparato facendo reagire il composto **5**:

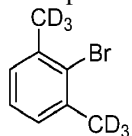
**5**

con composto **30**:

**30**

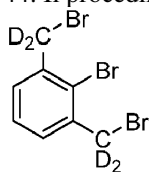
per produrre composto **31**.

43. Il procedimento della realizzazione 42, in cui il composto **30** viene preparato convertendo il composto **29**:

**29**

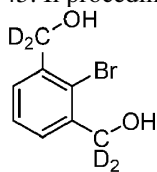
nel composto **30**.

44. Il procedimento della realizzazione 43, in cui il composto **29** viene preparato convertendo il composto **28**:

**28**

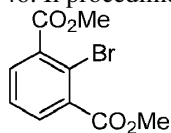
nel composto **29**.

45. Il procedimento della realizzazione 44, in cui il composto **28** viene preparato convertendo il composto **27**:

**27**

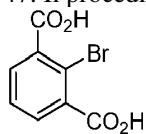
nel composto **28**.

46. Il procedimento della realizzazione 45, in cui il composto **27** viene preparato convertendo il composto **26**:

**26**

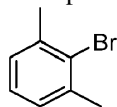
nel composto **27**.

47. Il procedimento della realizzazione 46, in cui il composto **26** viene preparato convertendo il composto **25**:

**25**

nel composto **26**.

48. Il procedimento della realizzazione 47, in cui il composto **25** viene preparato convertendo il composto **24**:



24

nel composto **25**.

49. Procedimento della realizzazione 38, in cui il composto **3·HCl** viene preparato trattando il composto **3** con HCl per produrre composto **3·HCl**.

Esempi

Abbreviazioni

Boc anidride ((Boc)₂O): di-terz-butil dicarbonato

DCM: diclorometano

DIEA (DIPEA): N,N-diisopropiletilammina

DMAP: 4-dimetilamminopiridina

DMF: N,N-dimetilformammide

DMSO: dimetilsolfossido

HATU: 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-ossido esafluorofosfato

COMU: (1-ciano-2-etossi-2-ossoetilidenamminoossi)dimetilammino-morfolino-carbenio esafluorofosfato

MeOH: metanolo

THF: tetraidrofurano

EtOAc: etilacetato

Pd(dppf)Cl₂: [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II)

MeTHF: 2-metiltetraidrofurano

Metodi analitici generali UPLC/HPLC

Metodo LC A: UPLC analitica in fase inversa usando una colonna Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 × 2,1 mm, particelle da 1,7 μm) prodotta da Waters (codice articolo: 186002350) e una corsa a doppio gradiente da 1-99%

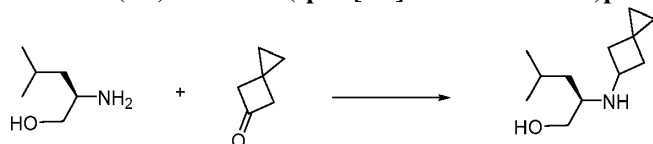
di fase mobile B su 3,0 min. Fase mobile A = H₂O (0,05% CF₃CO₂H). Fase mobile B = CH₃CN (0,035% CF₃CO₂H). Portata = 1,2 mL/min, volume di iniezione = 1,5 µL e temperatura della colonna = 60 °C.

Metodo LC B: colonna Merck Millipore Chromolith SpeedROD C₁₈ (50 × 4,6 mm) e una corsa a doppio gradiente dal 5 al 100% di fase mobile B in 6 minuti. Fase mobile A = acqua (0,1% CF₃CO₂H). Fase mobile B = acetonitrile (0,1% CF₃CO₂H).

Metodo LC C: colonna Merck Millipore Chromolith SpeedROD C₁₈ (50 × 4,6 mm) e una corsa a doppio gradiente dal 5 al 100% di fase mobile B in 12 minuti. Fase mobile A = acqua (0,1% CF₃CO₂H). Fase mobile B = acetonitrile (0,1% CF₃CO₂H).

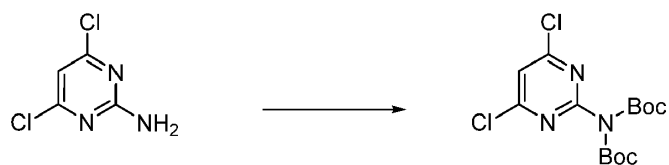
Esempio 1: Sintesi di (11R)-6-(2,6-Dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (Composto I)

Sintesi di (2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (3)



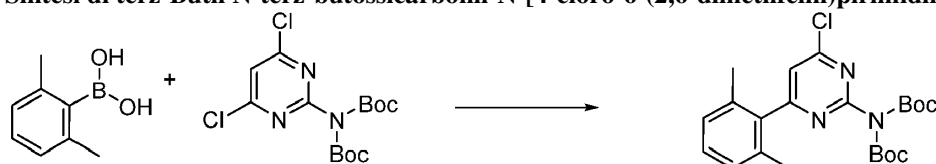
Una miscela di spiro[2.3]esan-5-one (100 g, 1,040 moli) e (2R)-2-ammino-4-metil-pentan-1-olo (123,5 g, 1,054 moli) in dicloroetano (DCE) (1,5 L) è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora. Alla miscela è stato aggiunto triacetossiboroidruo di sodio (228 g, 1,076 moli) in porzioni. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 18 ore. La miscela di reazione è stata diluita con HCl (1,1 L di 2 M, 2,200 moli) fino a quando il pH era ~1. La fase acquosa è stata separata e la fase organica è stata estratta con HCl (600 mL di 2 M, 1,200 moli). La fase organica è stata separata e lo strato acquoso è stato basificato con NaOH (550 g di 50% p/p, 6,875 moli) fornendo una soluzione a ~ pH 12. La miscela è stata estratta 2X con EtOAc (1 L) e le fasi organiche combinate sono state lavate con salamoia (150 mL), essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate *sotto vuoto* per ottenere (2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (160,7 g, 78%) come olio limpido. Usato senza ulteriore purificazione. ESI-MS m/z calc. 197,17796, trovato 198,2 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 0,54 minuti (metodo LC A).

Sintesi di terz-Butil N-terz-butossicarbonil-N-(4,6-dicloro-pirimidin-2-il)carbammato (5)



Ad una soluzione di 4,6-dicloropirimidin-2-ammina (300 g, 1,829 moli) in DCM (2,1 L) è stato aggiunto $(\text{Boc})_2\text{O}$ (838 g, 3,840 moli) seguito da DMAP (5,6 g, 45,84 mmoli). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 6 ore. È stato aggiunto altro DMAP (5,6 g, 45,84 mmoli) e la reazione è stata continuata sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. La miscela è stata diluita con acqua (2,1 L) e la fase organica è stata separata. La fase organica è stata lavata con acqua (2,1 L), 2,1 L di salamoia, essiccata su MgSO_4 , filtrata su celite e concentrata *sotto vuoto* ottenendo un olio arancione chiaro che aveva limo nell'impasto liquido. La miscela è stata diluita con circa 500 ml di eptano e filtrata usando un filtro M. Il precipitato (materiale di partenza) è stato lavato con 250 mL di eptano. Il filtrato è stato concentrato *sotto vuoto* ottenendo un olio arancione denso che è stato seminato con il solido di un precedente esperimento e cristallizzato a riposo, per fornire *tert*-butil N-*tert*-butossicarbonil-N-(4,6-dicloropirimidin-2-il)carbammato (645 g, 97%) come solido duro di colore arancione chiaro. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,07 (s, 1H), 1,44 (s, 18H). ESI-MS m/z calc. 363,07526, trovato 364,1 ($\text{M}+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 2,12 minuti (metodo LC A).

Sintesi di *tert*-Butil N-*tert*-butossicarbonil-N-[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]carbammato (6)



Tutti i solventi sono stati degassati prima dell'uso. Ad una sospensione di *tert*-butil N-*tert*-butossicarbonil-N-(4,6-dicloropirimidin-2-il)carbammato (88 g, 241,6 mmoli), sono stati aggiunti acido (2,6-dimetilfenil)boronico (circa 36,24 g, 241,6 mmoli) e Cs_2CO_3 (circa 196,8 g, 604,0 mmoli) in DME (704 mL) e acqua (176 mL). È stato aggiunto $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (circa 8,839 g, 12,08 mmoli) e la miscela è stata agitata vigorosamente sotto N_2 a 80°C (riflusso) per 1 ora (non è rimasto materiale di partenza). La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e diluita con acqua (704 mL). La fase acquosa è stata separata ed estratta con EtOAc (704 mL). La fase organica è stata lavata con 700 mL di salamoia, essiccata su MgSO_4 , filtrata e concentrata *sotto vuoto*. Il prodotto

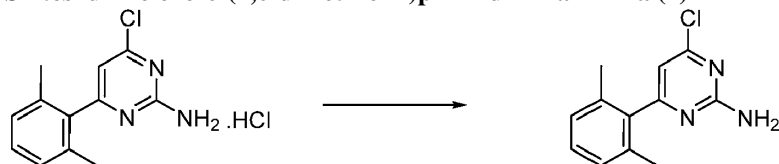
grezzo è stato cromatografato su una colonna di gel di silice da 1500 g eluendo con 0-30% EtOAc/esani. Le frazioni del prodotto (eluite al 15% di EtOAc) sono state combinate e concentrate *sotto vuoto* ottenendo *tert*-butil N-*tert*-butossicarbonil-N-[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]carbammato (81,3 g, 78%) come olio limpido, che cristallizzava a riposo. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,88 (s, 1H), 7,30 (dd, $J = 8,2, 7,0$ Hz, 1H), 7,21 - 7,16 (m, 2H), 2,03 (s, 6H), 1,38 (s, 18H). ESI-MS m/z calc. 433,17682, trovato 434,1 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 2,32 minuti (metodo LC A).

Sintesi di 4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-ammina (sale cloridrato) (7·HCl)



tert-Butil N-*tert*-butossicarbonil-N-[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]carbammato (514,8 g, 915,9 mmoli) è stato sciolto in diclorometano (4 L). È stato aggiunto acido cloridrico in *p*-diossano (1 L, 4 moli) e la miscela è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. Il precipitato risultante è stato raccolto mediante filtrazione *sotto vuoto* ed essiccato *sotto vuoto* per ottenere 4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-ammina cloridrato (213,5 g, 64%) come solido bianco (213,5 g, 82%). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7,45-6,91 (m, 3H), 6,73 (s, 1H), 2,08 (s, 6H). ESI-MS m/z calc. 233,072, trovato 234,1 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 2,1 minuti (metodo LC C).

Sintesi di 4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-ammina (7)

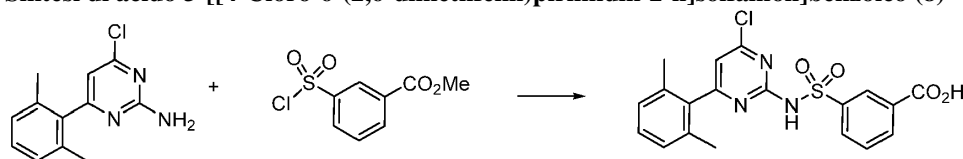


4-Cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-ammina (Sale cloridrato) (166 g, 614,5 mmoli) e 4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-ammina (sale cloridrato) (30 g, 111,0 mmoli) sono state sospese in DCM (2,5 L), trattate con NaOH (725 mL di 1 M, 725,0 mmoli) e agitate a temperatura ambiente per 1 ora. La miscela è stata trasferita in un imbuto separatore e lasciata riposare per una notte. La fase DCM è stata separata e la fase acquosa con materiale insolubile è stata estratta altre due volte con DCM (2 x 500 ml). Le fasi DCM marroni

combinare sono state agitate con solfato di magnesio e carbone per 1 ora, filtrate e la soluzione gialla concentrata fino ad un volume di ~500 mL. La soluzione è stata diluita con eptano (750 mL) e il DCM è stato rimosso a pressione ridotta a 60°C per dare una sospensione cremosa. È stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora, filtrata, lavata con eptano freddo ed essiccata per dare 4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-ammina (157 g, 91%) come solido crema.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,28 - 7,14 (m, 3H), 7,10 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 6,63 (s, 1H), 2,06 (s, 6H). ESI-MS m/z calc. 233,07198, trovato 234,0 ($M+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 1,45 minuti (metodo LC A).

Sintesi di acido 3-[[4-Cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (8)

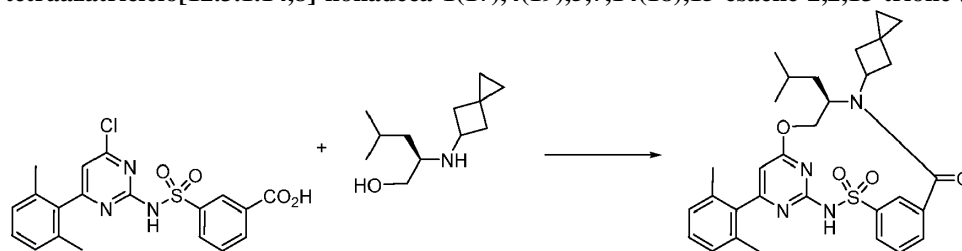


4-Cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-ammina (235 g, 985,5 mmoli) è stata sciolta in MeTHF (2,3 L) e raffreddata in un bagno di ghiaccio sotto agitazione e azoto. Alla soluzione fredda è stato aggiunto in una porzione metil 3-clorosolfonilbenzoato (347 g, 1,479 moli) (sembra leggermente endotermica) e alla soluzione giallo pallido fredda una soluzione di 2-metil-butan-2-olo (sale di litio) (875 mL di 3,1 M, 2,712 moli) (in eptano) è stata aggiunta goccia a goccia in 1,25 h (esotermico, temperatura interna da 0 °C a 10 °C). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la soluzione verdastra è stata agitata per 4 ore a temperatura ambiente. Alla soluzione verdastra è stato aggiunto HCl freddo (2 L di 1,5 M, 3,000 moli), le fasi si sono separate e la fase organica è stata lavata una volta con acqua (1 L) e una volta con salamoia (500 mL). Le fasi acquose sono state retroestrate una volta con MeTHF (350 mL) e le fasi organiche sono state combinate. Questa soluzione gialla di MeTHF di metil 3-[[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoato (ESI-MS m/z calc. 431,07065, trovato 432,0 ($M+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 1,81 minuti) è stata trattata con NaOH (2,3 L di 2 M, 4,600 moli) e agitata a temperatura ambiente per 1 ora. Le fasi sono state separate e la fase NaOH è stata lavata due volte con MeTHF (2 x 500 mL) e le fasi organiche combinate sono state estratte una volta con NaOH 2M (1 x 250 mL).

Le fasi combinate di NaOH sono state combinate, agitate in un bagno di ghiaccio e acidificate lentamente mediante aggiunta di HCl (416 mL al 36% p/p, 4,929 moli) mantenendo la temperatura interna tra 10 e 20°C. Al

termine dell'aggiunta (pH ~5-6) il pH finale è stato regolato a 2-3 mediante aggiunta di acido citrico solido. La sospensione appiccicosa gialla formata è stata agitata a temperatura ambiente durante la notte per dare una sospensione cremosa e croccante. Il solido è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con abbondante acqua e aspirato per 3 ore. Il solido è stato essiccato a pressione ridotta con fuoriuscita di azoto a 45-50°C per 120 ore. Acido 3-[[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (395 g, 96%) è stato isolato come un solido biancastro. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,44 (s, 1H), 12,46 (s, 1H), 8,48 - 8,39 (m, 1H), 8,25 - 8,15 (m, 1H), 8,15 - 8,08 (m, 1H), 7,68 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,28 - 7,18 (m, 1H), 7,10 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 1,84 (s, 6H). ESI-MS m/z calc. 417,055, trovato 418,0 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 1,56 minuti. (metodo LC A).

Sintesi di (11R)-6-(2,6-Dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]-nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (Composto I)



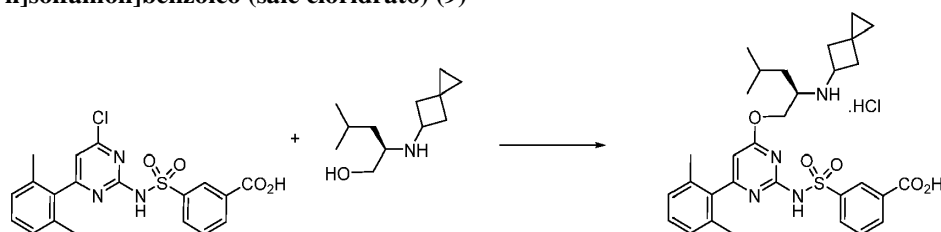
(2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (1,42 g, 7,197 mmoli), 3-[[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (3,077 g, 7,209 mmoli) e sodio terz-butossido (2,731 g, 28,42 mmoli) sono stati combinati in THF (25 mL) e agitati a temperatura ambiente per 1 ora (leggera esotermia). Dopo 1 ora, la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione agitata di HATU (5,436 g, 14,30 mmoli) in DMF (50 mL). La reazione è stata agitata per altre 16 ore a temperatura ambiente. La reazione è stata evaporata fino a ottenere un olio. L'olio risultante è stato ripartito tra etilacetato (100 mL) e una soluzione di HCl 1M (100 mL). Le sostanze organiche sono state separate, lavate con altro HCl 1M (100 mL), poi salamoia (100 mL). Le sostanze organiche sono state essiccate su solfato di sodio ed evaporate.

Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con etilacetato allo 0-80% in esani per dare (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{ amorfo spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-

3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5, 7,14(18), 15-esaene-2,2,13-trione (1,73 g, 42%).
 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13,07 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,96 - 7,85 (m, 1H), 7,77 - 7,60 (m, 2H), 7,30 - 7,20 (m, 1H), 7,12 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 6,38 (s, 1H), 5,12 (dd, $J = 10,6, 4,2$ Hz, 1H), 4,40 (t, $J = 11,1$ Hz, 1H), 4,23 (p, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,78 - 3,66 (m, 1H), 3,31 - 3,22 (m, 2H), 2,23 - 1,83 (m, 8H), 1,72 - 1,60 (m, 1H), 1,30 (s, 1H), 1,20 - 1,10 (m, 1H), 0,73 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 0,56 - 0,41 (m, 4H), 0,21 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H). ESI-MS m/z calc. 560,2457, trovato 561,4 ($\text{M}+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 2,01 minuti (metodo LC A).

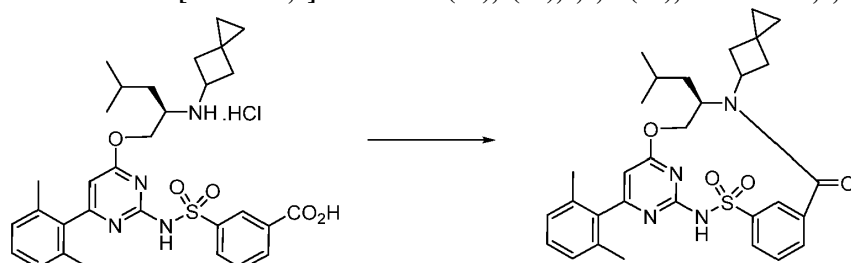
Sintesi alternativa di composto I

Sintesi di acido 3-[[4-(2,6-Dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (9)



Ad una soluzione di (2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (52,26 g, 264,9 mmoli) e acido 3-[[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (103 g, 242,8 mmoli) in MeTHF (700 mL) è stato aggiunto sodio *terz*-butossido (93,4 g, 971,9 mmoli) in porzioni mantenendo la temperatura di reazione <40°C. L'aggiunta è esotermica e la temperatura di reazione è stata regolata usando un bagno di acqua e ghiaccio e la velocità di aggiunta della base. La reazione è stata agitata per 2 ore a temperatura ambiente. La reazione è stata spenta con la lenta aggiunta di HCl (1,2 L di 1 M, 1,200 moli) e agitata per 5 minuti. La miscela è stata trasferita in un imbuto separatore usando MeTHF. La fase acquosa è stata separata ed estratta con 250 mL di MeTHF. Le fasi organiche combinate sono state lavate con 500 mL di salamoia, essiccate su MgSO_4 , filtrate e concentrate *sotto vuoto*. Il solido giallo chiaro è stato sospeso con EtOAc (200 mL) e agitato per 1 ora. Il solido è stato raccolto usando una frittata M e lavando 3 volte con 10 mL di EtOAc. Il solido biancastro è stato essiccato all'aria ed essiccato *sotto vuoto* per 20 ore per ottenere acido 3-[[4-(2,6-dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (120 g, 76%). ESI-MS m/z calc. 578,2563, trovato 579,2 ($\text{M}+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 1,02 minuti. (metodo LC A).

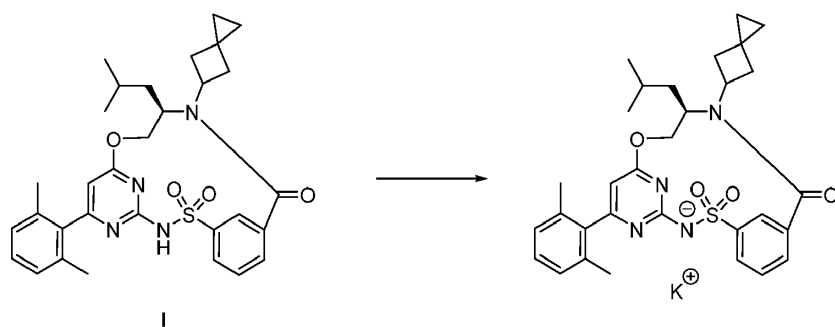
Sintesi di (11R)-6-(2,6-Dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (Composto I)



Acido 3-[[4-(2,6-dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (4,41 g, 7,169 mmoli) e HATU (2,80 g, 7,364 mmoli) sono stati combinati in DMF (100 mL) ed è stata aggiunta trietilammina (3,0 mL, 21,52 mmoli). La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 5 ore. La miscela di reazione è stata versata in una soluzione agitata di acqua (150 mL) e HCl (35 mL di 1 M, 35,00 mmoli). La miscela è stata agitata per 20 minuti e il solido bianco risultante è stato raccolto mediante filtrazione. Il solido è stato sciolto in etilacetato (100 mL) e lavato con HCl 1M (100 mL), salamoia (100 mL), poi essiccato su solfato di sodio ed evaporato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con 0-70% di etilacetato in esani per dare (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3] amorfo]esan-5-il}-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (2,94 g, 73%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,07 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,91 (s largo, 1H), 7,68 (s largo, 2H), 7,25 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 6,38 (s, 1H), 5,12 (dd, J = 10,7, 4,2 Hz, 1H), 4,40 (t, J = 11,1 Hz, 1H), 4,23 (p, J = 8,5 Hz, 1H), 3,79 - 3,65 (m, 1H), 3,31 - 3,22 (m, 2H), 2,21 - 1,84 (m, 8H), 1,72 - 1,61 (m, 1H), 1,36 - 1,23 (m, 1H), 1,21 - 1,10 (m, 1H), 0,73 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,55 - 0,41 (m, 4H), 0,21 (d, J = 6,2 Hz, 3H). ESI-MS m/z calc. 560,2457, trovato 561,5 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 2,02 minuti (metodo LC A).

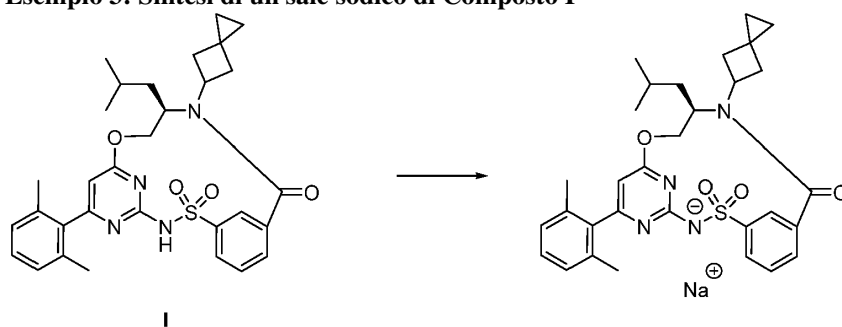
I sali del composto I sono stati preparati secondo i seguenti esempi.

Esempio 2: Sintesi di un sale di potassio di Composto I



(11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (2 g, 3,448 mmoli) è stato sciolto in metanolo (20 mL) e trattato lentamente con KOH (6,896 mL di 0,5 M, 3,448 mmoli) (in metanolo) sotto agitazione. La soluzione limpida è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora, evaporata per dare un vetro ed essiccata sotto vuoto di linea con sfiato di azoto a 50-55 °C per 16 ore per dare (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (ione potassio) (2,033 g, 98%) come solido biancastro. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,40 (s, 1H), 7,82 - 7,74 (m, 1H), 7,53 - 7,46 (m, 2H), 7,12 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 5,78 (s, 1H), 5,09 (dd, $J = 10,5, 4,3$ Hz, 1H), 4,17 (p, $J = 8,6$ Hz, 1H), 4,06 (t, $J = 11,0$ Hz, 1H), 3,88 (dq, $J = 11,1, 7,3, 5,5$ Hz, 1H), 3,28 (dt, $J = 14,5, 9,3$ Hz, 2H), 2,07 (dt, $J = 24,5, 9,2$ Hz, 2H), 1,96 (s, 6H), 1,58 (ddt, $J = 14,0, 10,9, 2,8$ Hz, 1H), 1,29 (ddt, $J = 13,3, 6,9, 2,8$ Hz, 1H), 1,17 (ddd, $J = 13,7, 10,6, 2,9$ Hz, 1H), 0,71 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 0,52 (dd, $J = 8,3, 5,6$ Hz, 2H), 0,50 - 0,40 (m, 2H), 0,21 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

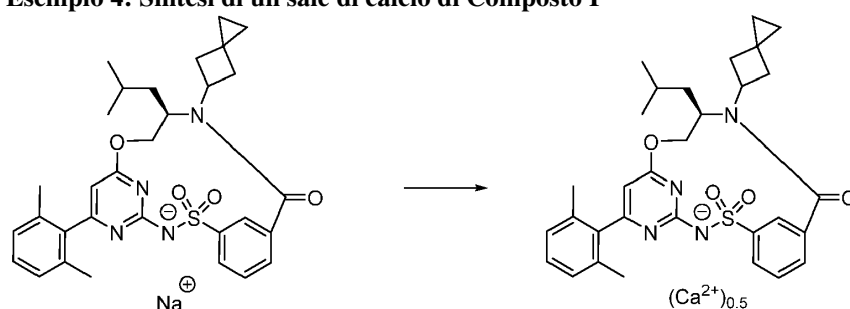
Esempio 3: Sintesi di un sale sodico di Composto I



(11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18), 15-esaene-2,2,13-trione (2 g, 3,448 mmoli) è stato

sospeso in acqua (25 mL) e trattato lentamente con NaOH (3,448 mL di 1 M, 3,448 mmoli) sotto agitazione. La sospensione è stata agitata a temperatura ambiente per 1,25 ore per dare una soluzione torbida. La soluzione torbida è stata filtrata diventando limpida su un filtro per siringa (0,2 µm) e il filtrato limpido e incolore è stato liofilizzato per due giorni per dare (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5, 7,14(18), 15-esaene-2,2,13-trione (sale di sodio) (2 g, 99%) come solido soffice incolore. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,40 (s, 1H), 7,78 (ddd, J = 5,6, 3,5, 1,6 Hz, 1H), 7,52 - 7,45 (m, 2H), 7,12 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 5,77 (s, 1H), 5,09 (dd, J = 10,5, 4,3 Hz, 1H), 4,16 (p, J = 8,5 Hz, 1H), 4,06 (t, J = 10,9 Hz, 1H), 3,89 (dq, J = 11,3, 7,5, 5,6 Hz, 1H), 3,28 (dt, J = 14,5, 9,3 Hz, 2H), 2,07 (dt, J = 24,7, 9,3 Hz, 2H), 1,96 (s, 6H), 1,58 (td, J = 11,3, 10,8, 5,7 Hz, 1H), 1,28 (ddd, J = 9,6, 6,5, 3,0 Hz, 1H), 1,17 (ddd, J = 13,6, 10,5, 2,8 Hz, 1H), 0,71 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,52 (dd, J = 8,3, 5,6 Hz, 2H), 0,50 - 0,41 (m, 2H), 0,21 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

Esempio 4: Sintesi di un sale di calcio di Composto I



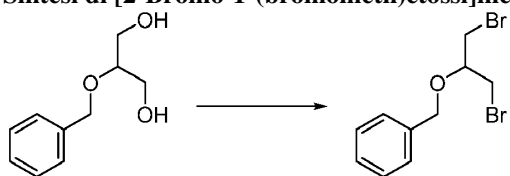
(11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18), 15-esaene-2,2,13-trione (sale di sodio) (500 mg, 0,8566 mmoli) è stato agitato in acqua (5 mL) per 10 minuti per dare una soluzione limpida. È stata aggiunta una soluzione di CaCl₂ (46,8 mg, 0,4217 mmoli) in acqua (0,5 mL) risultante nella precipitazione di un solido gelatinoso per dare una massa semisolida. È stata aggiunta un'altra porzione di acqua (5 mL) e la sospensione è stata agitata a temperatura ambiente per 23 ore. Il solido è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con abbondante acqua (~3 x 5-10 mL) ed essiccato sotto vuoto con un rilascio di azoto a 55-60 °C per 14 ore per dare (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-

tetraazatriciclo-[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (sale di calcio (0,5)) (423 mg, 85%) come un solido bianco sporco. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,40 (s, 1H), 7,78 (td, $J = 4,4$, 1,6 Hz, 1H), 7,50 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H), 7,13 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 5,81 (s, 1H), 5,09 (dd, $J = 10,5$, 4,3 Hz, 1H), 4,17 (p, $J = 8,6$ Hz, 1H), 4,08 (t, $J = 11,0$ Hz, 1H), 3,87 (dq, $J = 11,1$, 7,3, 5,4 Hz, 1H), 3,28 (dt, $J = 14,2$, 9,3 Hz, 2H), 2,07 (dt, $J = 24,3$, 9,1 Hz, 2H), 1,99 - 1,95 (m, 6H), 1,59 (ddd, $J = 14,0$, 10,8, 2,8 Hz, 1H), 1,28 (tt, $J = 6,4$, 3,0 Hz, 1H), 1,17 (ddd, $J = 13,6$, 10,4, 2,8 Hz, 1H), 0,71 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 0,55 - 0,40 (m, 4H), 0,21 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

ESI-MS m/z calc. 560,2457, trovato 561,0 ($M+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 2,1 minuti (metodo LC A).

Esempio 5: Sintesi di (11R)-6-(2,6-Dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-[(1,1,2,2-tetra deuterio)spiro[2.3]esan-5-il]-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (composto Ia)

Sintesi di [2-Bromo-1-(bromometil)etossi]metilbenzene (11)

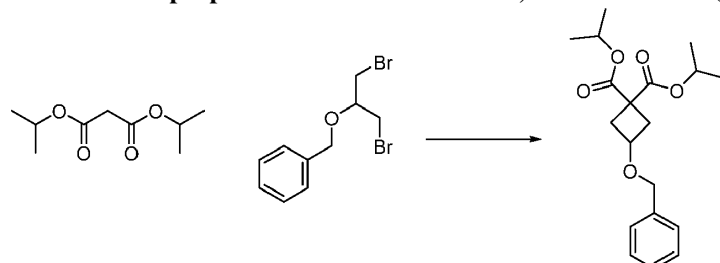


Ad una soluzione di 2-benzilossipropan-1,3-diolo (24,3 g, 129,36 mmoli) in CH_2Cl_2 anidro (350 mL) sotto atmosfera di argon a 0 °C è stato aggiunto Ph_3P (72,177 g, 272,43 mmoli) seguito da CBr_4 (91,258 g, 272,43 mmoli) (l'aggiunta di una porzione causava un'enorme generazione di gas). La miscela di reazione è stata agitata a 0°C per 2,5 ore. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti acqua (150 mL) e diclorometano (600 mL). Lo strato organico è stato separato, essiccato su solfato di sodio, filtrato e concentrato a pressione ridotta. Quindi è stato aggiunto 10% di etere in esano (500 mL), sonicato e filtrato. Il pannello solido è stato lavato con etere al 10% in esano (300 mL). Il solido è stato scartato e i filtrati combinati sono stati concentrati a pressione ridotta per dare il prodotto grezzo. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (caricato in CH_2Cl_2) (330 g di SiO_2 , eluendo da 0 a 4% di etere in esano) per ottenere [2-bromo-1-(bromometil)etossi]metilbenzene (23,39 g, 59 %) come liquido incolore.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, cloroformio-d) δ 7,49 - 7,30 (m, 5H), 4,70 (s, 2H), 3,83 (p, $J = 5,2$ Hz, 1H), 3,60 (d, $J = 5,2$

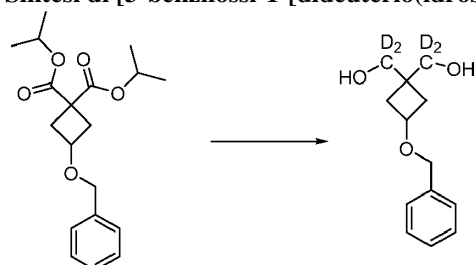
Hz, 4H). ESI-MS m/z calc. 305,92548, NON è stato osservato alcun MS. Tempo di ritenzione: 5,47 minuti (metodo LC C).

Sintesi di diisopropil 3-benzilossiciclobutan-1,1-dicarbossilato (12)



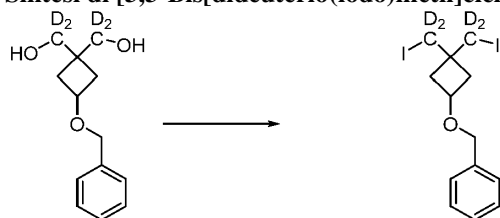
NaH (6,42 g, 160,52 mmoli, sospensione oleosa al 60%) è stato sospeso in DMF secca (280 mL) sotto Argon. Diisopropil propandioato (26,49 g, 26,731 mL, 139,33 mmoli) in DMF anidro (20 mL) è stato aggiunto goccia a goccia mantenendo la temperatura intorno a 20 °C. Alla cessazione dello sviluppo di gas, è stato aggiunto [2-bromo-1-(bromometil)etossi]-metilbenzene (21,334 g, 69,264 mmoli) in DMF anidra (20 mL). La miscela di reazione è stata agitata a 140°C per 26 ore prima di essere raffreddata a temperatura ambiente e versata in una soluzione acquosa satura di NH₄Cl (500 mL) per prevenire la formazione di emulsione. La soluzione è stata estratta con esano (3 x 500 mL), lavata con acqua (300 mL), salamoia (300 mL), essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata a pressione ridotta per rimuovere l'esano. Il prodotto grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia flash (caricato in esano) (330 g di SiO₂, eluendo con 0 fino a 15% di etere in esano) per fornire diisopropil 3-benzilossiciclobutan-1,1-dicarbossilato (26,84 g, 90%) come sostanza incolore liquida. Nota: il prodotto conteneva 22% di diisopropilpropandioato. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7,58 - 7,14 (m, 5H), 5,22 - 4,90 (m, 2H), 4,43 (s, 2H), 4,15 (p, J = 7,2 Hz, 1H), 2,89 - 2,68 (m, 2H), 2,63 - 2,40 (m, 2H), 1,43 - 0,99 (m, 12H). ESI-MS m/z calc. 334,178, trovato 335,3 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 5,94 minuti (metodo LC C).

Sintesi di [3-benzilossi-1-[dideuterio(idrossi)metil]ciclobutil]-dideuterio-metanolo (13)



Ad una soluzione di diisopropil 3-benzilossiciclobutan-1,1-dicarbossilato (26,84 g, 62,604 mmoli) in THF anidro (250 mL) a 0 °C è stato aggiunto litio tetradeuterioalumanuide (6,11 g, 145,55 mmoli) porzione per porzione. Dopo aver completato l'aggiunta, la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 giorni prima di essere nuovamente raffreddata a 0°C. Acqua (6,2 mL) è stata aggiunta goccia a goccia seguita da idrossido di sodio acquoso al 15% (6,2 mL) e acqua (18,6 mL). La soluzione risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 30 minuti prima di essere filtrata su Celite e lavata con THF. Il filtrato è stato concentrato a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato sciolto in etilacetato (450 mL), lavato con acqua (100 mL x 3) e salamoia (100 mL). Lo strato organico è stato separato e lo strato acquoso è stato estratto con etere (3 x 150 mL). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di magnesio anidro, filtrati e concentrati a pressione ridotta per ottenere un solido bianco grezzo. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (caricato in CH₂Cl₂) (330 g di SiO₂, eluendo con 0 fino a 50% di acetone in esano) per ottenere [3-benzilossi-1-[dideuterio(idrossi)metil]ciclobutil]-dideuterio-metanolo (9,95 g, 68%) come solido bianco. ¹H NMR (500 MHz, cloroformio-d) δ 7,40 - 7,32 (m, 4H), 7,32 - 7,28 (m, 1H), 4,42 (s, 2H), 4,17 - 3,99 (m, 1H), 2,48 - 2,05 (m, 4H), 1,87 - 1,79 (m, 2H). ESI-MS m/z calc. 226,1507, trovato 227,4 (M+1)⁺, tempo di ritenzione 2,94 minuti (metodo LC C).

Sintesi di [3,3-Bis[dideuterio(iodo)metil]ciclobutossi]-metilbenzene (14)



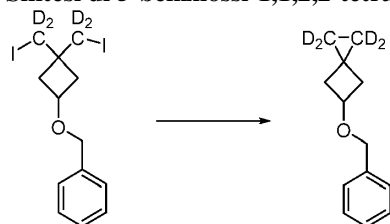
Ad una soluzione di [3-benzilossi-1-[dideuterio(idrossi)metil]-ciclobutil]-dideuterio-metanolo (9,95 g, 43,967 mmoli) in CH₂Cl₂ anidro (420 mL) è stato aggiunto Et₃N (17,860 g, 24,6 mL, 176,50 mmoli), poi raffreddato a 0 °C. È stato aggiunto goccia a goccia cloruro di metansolfonile (14,652 g, 9,9 mL, 127,91 mmoli) e la soluzione risultante è stata agitata a questa temperatura per 2 ore prima di essere raffreddata con una soluzione satura di bicarbonato di sodio (200 mL). È stato aggiunto diclorometano (400 mL); lo strato organico è stato separato, lavato con salamoia (150 mL), essiccato su solfato di magnesio anidro, filtrato e concentrato a pressione ridotta.

Il residuo ottenuto è stato posto sotto alto vuoto per fornire l'intermedio bis-mesilato come un liquido giallo pallido. Il bis-mesilato è stato sciolto in acetone anidro (300 mL) ed è stato aggiunto NaI (49,08 g, 327,43 mmoli). La soluzione di reazione è stata riscaldata a 50°C per 5 giorni. La soluzione di reazione è stata filtrata e lavata con acetone.

Il filtrato è stato concentrato a pressione ridotta. Al residuo ottenuto è stato aggiunto etere (800 mL) e una soluzione di solfito di sodio al 10% (250 mL x 2). La soluzione organica è stata separata, essiccata su solfato di sodio anidro, filtrata e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (caricato in CH₂Cl₂) (330 g di SiO₂, eluendo con 0 fino a 5% di etere in esano) per ottenere [3,3-bis[dideuterio(iodo)metil]ciclobutossi]metilbenzene (15,813 g, 81%) come un olio giallo pallido. ¹H NMR (500 MHz, cloroformio-d) δ 7,42 - 7,28 (m, 5H), 4,42 (s, 2H), 3,93 (tt, J = 7,2, 6,1 Hz, 1H), 2,40 - 2,23 (m, 2H), 2,07 - 1,92 (m, 2H).

ESI-MS m/z calc. 445,9542, trovato 464,3 (M+18)⁺; Tempo di ritenzione: 6,53 minuti (metodo LC C).

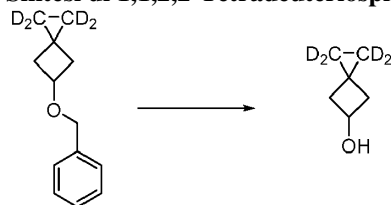
Sintesi di 5-benzilossi-1,1,2,2-tetradeterio-spiro[2.3]esano (15)



Ad una soluzione di [3,3-bis[dideuterio(iodo)metil]ciclobutossi]-metilbenzene (15,81 g, 35,441 mmoli) in una miscela di etanolo (70 mL) e acqua (30 mL) è stato aggiunto Zn (9,96 g, 152,32 mmoli). La soluzione risultante è stata tenuta a riflusso per 2 ore. La soluzione di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e poi diluita con diclorometano (400 mL) e acqua (100 mL). Lo strato organico è stato separato, lavato con salamoia, essiccato su solfato di magnesio anidro, filtrato e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (caricato in CH₂Cl₂) (220 g di SiO₂, eluendo con 0 fino a 4% di etere in esano) per ottenere 5-benzilossi-1,1,2,2-tetradeterio-spiro[2.3]esano (6,77 g, 94%) come olio incolore. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7,60 - 7,09 (m, 5H), 4,45 (s, 2H), 4,30 (p, J = 6,9 Hz, 1H), 2,41 - 2,22 (m, 2H), 2,22 - 1,99 (m, 2H). ESI-MS m/z calc. 192.14522, non è stato osservato alcun MS. Tempo di ritenzione: 5,62 minuti

(metodo LC C).

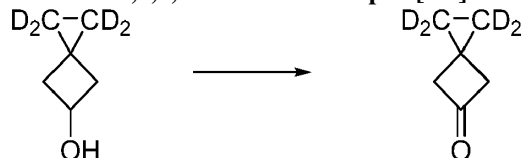
Sintesi di 1,1,2,2-Tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-olo (16)



Ad una soluzione di 5-benzilossi-1,1,2,2-tetradeuterio-spiro[2.3]esano (6,58 g, 34,219 mmoli) in metile acetato (35 mL) è stato aggiunto Pd/C al 5% (1,01 g, 9,4907 mmoli) e la miscela è stata agitata sotto atmosfera di idrogeno per 20 ore. Un'altra quantità di Pd/C al 5% (0,51 g, 4,7923 mmoli) è stata aggiunta alla miscela di reazione ed è stata agitata sotto un'atmosfera di idrogeno per altre 20 ore. Il catalizzatore è stato filtrato e lavato con etere etilico (30 mL). Il solvente è stato distillato lentamente a pressione atmosferica. Il residuo è stato distillato sotto vuoto ($Bp_{20} = 72^{\circ}\text{C}$) per dare 1,1,2,2-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-olo (3,18 g, 91%) come liquido limpido.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 4,53 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H), 2,28 - 2,19 (m, 4H), 1,72 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H).

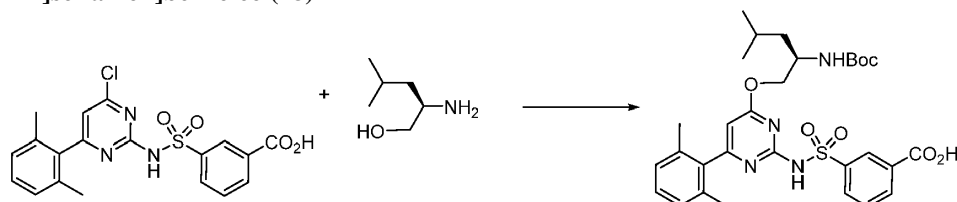
Sintesi di 1,1,2,2-Tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one (17)



Complesso di CrO_3 /piridina è stato ottenuto aggiungendo CrO_3 (9,95 g, 99,506 mmoli) in piridina (95 mL). A questa soluzione è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 1,1,2,2-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-olo (3,16 g, 30,929 mmoli) in piridina (35 mL). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 21 ore. Dopo il raffreddamento, è stata aggiunta acqua (50 mL) e poi estratta con dietil etere (200 mL x 3). La fase organica è stata lavata con HCl acquoso 2N finché la fase acquosa non ha raggiunto $\text{pH}=4$, poi lavata con NaHCO_3 acquoso saturo (200 mL) e acqua (200 mL). Dopo essere stato essiccato su solfato di sodio, il solvente è stato lentamente allontanato mediante distillazione a pressione atmosferica. Il residuo è stato distillato ($Bp_{14} = 40\text{-}43^{\circ}\text{C}$) per ottenere 1,1,2,2-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one (2,36 g, 71%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, cloroformio-

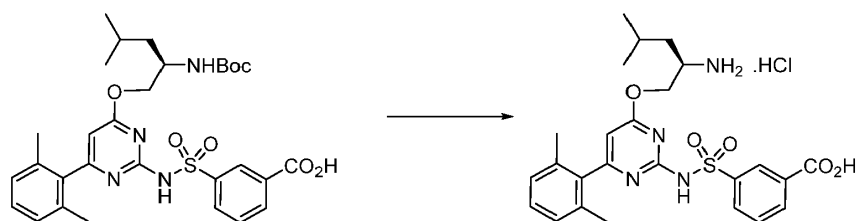
d) δ 3,16 (s, 4H).

Sintesi di acido 3-[[4-[(2R)-2-(terz-butossicarbonilammino)-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (18)



Ad una soluzione agitata di (2R)-2-ammino-4-metil-pentan-1-olo (12,419 g, 105,97 mmoli) in THF anidro (200 mL) a temperatura ambiente sotto azoto è stato aggiunto sodio terz-butossido (15,276 g, 158,95 mmoli). La miscela di reazione è stata agitata per 10 minuti ed è stato aggiunto acido 3-[[4-cloro-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (22,14 g, 52,983 mmoli). La miscela di reazione è stata posta su un bagno d'acqua preriscaldato a 60°C e agitata per 20 minuti. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, è stato aggiunto di-terz-butil dicarbonato (69,381 g, 317,90 mmoli) e la miscela di reazione è stata agitata per 3 ore. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio acquoso saturo (150 mL). Le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto e lo strato acquoso è stato acidificato a pH ~3 con acido citrico acquoso al 10%. Il prodotto è stato estratto con etilacetato (3 x 200 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (80 mL), essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati fino ad un volume residuo di ~250 mL. Il prodotto è stato fatto precipitare in esani in eccesso (750 mL) e raccolto mediante filtrazione sotto vuoto. Il solido bianco ottenuto è stato ripurificato mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di acetone allo 0-40% (tampone di acido acetico allo 0,15%) in esani (tampone di acido acetico allo 0,15%) per ottenere acido 3-[[4-[(2R)-2-(terz-butossicarbonilammino)-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (20,73 g, 61%) come solido bianco. ESI-MS m/z calc. 598,2461, trovato 599,4 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 5,85 minuti (metodo LC C).

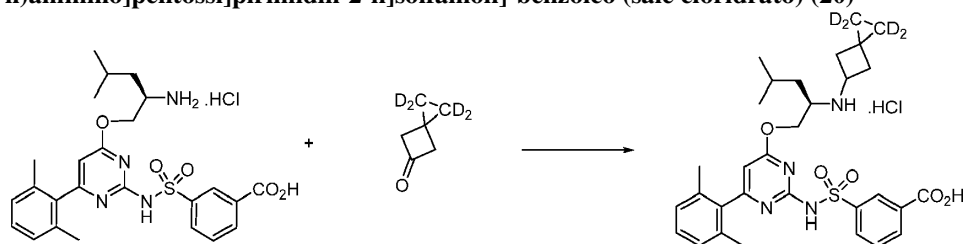
Sintesi di acido 3-[[4-[(2R)-2-ammino-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (19)



Ad una soluzione agitata di acido 3-[[4-[(2R)-2-(terz-butossicarbonilammino)-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (20,73 g, 34,624 mmoli) in DCM (200 mL) a temperatura ambiente è stato aggiunto HCl (87 mL di soluzione 4 M in 1,4-diossano, 346,24 mmoli). La miscela di reazione è stata agitata per 2 ore. I materiali volatili sono stati rimossi sotto vuoto e il solido ottenuto è stato triturato con dietil etere (150 mL). Dopo la rimozione delle sostanze volatili, il prodotto è stato essiccato sotto vuoto per fornire acido 3-[[4-[(2R)-2-ammino-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (19,68 g, 100%) come solido bianco.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ 8,56 - 8,27 (m, 4H), 8,14 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 7,70 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,34 - 7,18 (m, 1H), 7,17 - 7,02 (m, 2H), 6,31 (s, 1H), 4,42 - 4,23 (m, 1H), 4,23 - 4,06 (m, 1H), 3,5-3,4 (m, 1H, sovrapposto con acqua), 2,01 (s, 6H), 1,82 - 1,31 (m, 3H), 1,02 - 0,78 (m, 6H). ESI-MS m/z calc. 498,1937, trovato 499,3 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 1,63 minuti (metodo LC B).

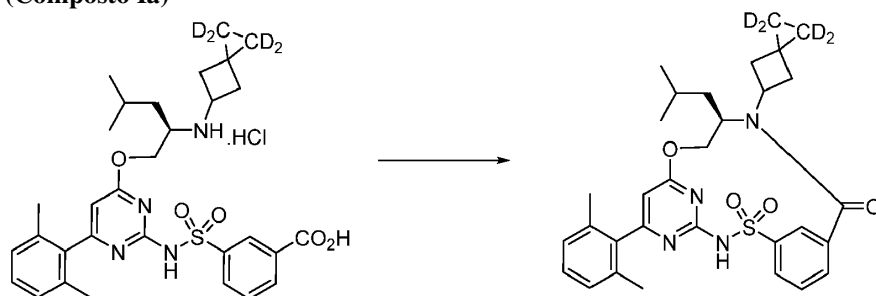
Sintesi di acido 3-[[4-(2,6-Dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-[(1,1,2,2-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-il)ammino]pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]-benzoico (sale cloridrato) (20)



Una fiala da 4 mL è stata caricata con acido 3-[[4-[(2R)-2-ammino-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (100 mg, 0,1869 mmoli), 1,1,2,2-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one (53 mg, 0,5292 mmoli), DCM anidro (0,30 mL) e sodio acetossiboroidruro (sale sodico) (133 mg, 0,6275 mmoli). La fiala è stata brevemente spurgata con azoto e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 1,5 ore, momento in cui LCMS mostrava una conversione dell'87%. È stato aggiunto

altro boroidruo (90 mg) e la miscela è stata agitata per altri 30 minuti. È stato aggiunto un po' di metanolo e la miscela è stata concentrata e sciolta in DMSO (volume finale totale 3 mL). La miscela è stata purificata mediante HPLC preparativa in fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. Le frazioni pure sono state raccolte e i solventi evaporati per dare acido 3-[[4-(2,6-dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-[(1,1,2,2-tetradeteriospiro[2.3]esan-5-il)ammino]pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (93 mg, 80%) come solido bianco. Il prodotto (puro al 94,5%, contiene il 5,5% di impurezza $M+3 = 585,51$) è stato usato per la fase successiva senza ulteriore purificazione. ESI-MS m/z calc. 582,2814, trovato 583,46 ($M+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 1,27 minuti (metodo LC A).

Sintesi di (11R)-6-(2,6-Dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-[(1,1,2,2-tetradetero)spiro[2.3]esan-5-il]-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (Composto Ia)

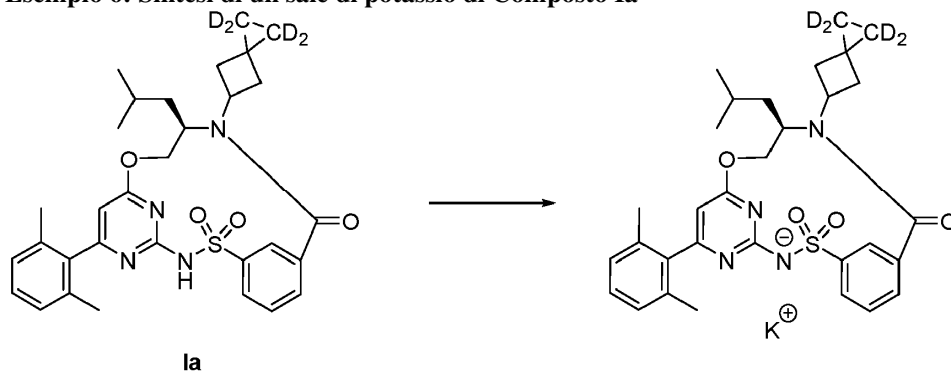


Un pallone da 20 mL è stato caricato sotto azoto con HATU (157 mg, 0,4129 mmoli), DMF anidra (6 mL) e DIEA (0,15 mL, 0,8612 mmoli). Una soluzione di acido 3-[[4-(2,6-dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-[(1,1,2,2-tetradeteriospiro[2.3]esan-5-il)ammino]pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (93 mg, 0,1502 mmoli) in DMF anidra (4 mL) è stata aggiunta goccia a goccia attraverso una siringa in un periodo di 4 minuti. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 17 ore. La miscela è stata concentrata e diluita con DMSO (2 mL). La soluzione è stata microfiltrata attraverso un disco filtrante per siringa PTFE Whatman da 0,45 μM e purificata mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. L'evaporazione ha dato un residuo che è stato tritato in DCM/esani. L'evaporazione dei solventi ha dato (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-(2-metilpropil)-12-[(1,1,2,2-tetradetero)spiro[2.3]esan-5-il]-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-

1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (48 mg, 54%) come solido biancastro. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,01 (s largo, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,92 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,78 - 7,60 (m, 2H), 7,26 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,13 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 6,38 (s, 1H), 5,13 (dd, $J = 10,7, 4,2$ Hz, 1H), 4,39 (t, $J = 11,1$ Hz, 1H), 4,23 (p, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,73 (t, $J = 11,6$ Hz, 1H), 3,30 - 3,20 (m, 2H), 2,31 - 1,77 (m, 8H), 1,67 (t, $J = 13,9$ Hz, 1H), 1,32 - 1,24 (m, 1H), 1,16 (ddd, $J = 13,7, 10,4, 2,7$ Hz, 1H), 0,73 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 0,22 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H). ESI-MS m/z calc. 564,2708, trovato 565,46 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 2,05 minuti (metodo LC A).

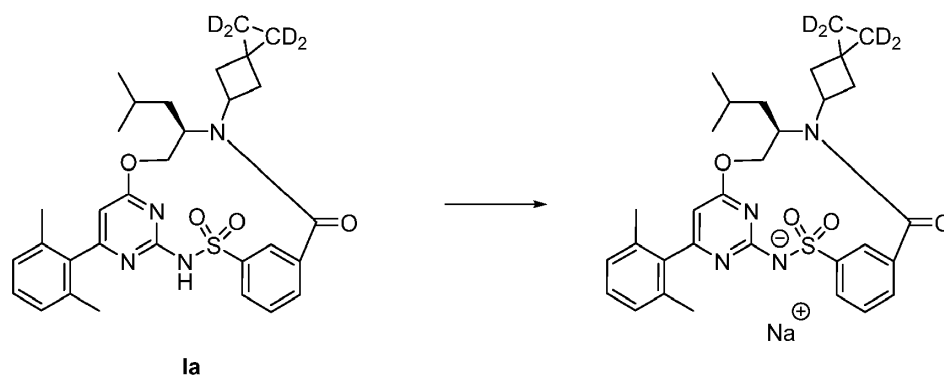
Il contenuto di deuterio è stato determinato mediante cromatografia liquida - spettrometria di massa usando uno strumento Sciex a triplo quadrupolo. Circa 0,1 mg/mL del campione sono stati sciolti in MeOH. 10 μl del campione sono stati diluiti in 1 ml di MeOH. Nello strumento è stato iniettato 1 μl del campione. Colonna: Phenomenex Synergy Fusion RP 4 μm , 80A 50x2 mm. Portata: 0,5 ml/min. Gradiente: da 40%B a 95%B in 3,5 min. Fase mobile A: 0,1% di acido formico in acqua. B: acetonitrile. È stato usato il metodo di monitoraggio di ioni selezionati. Lo spettrometro di massa è stato usato in modalità di ionizzazione positiva con una sorgente ESI. La percentuale di ciascuno ione monitorato era la seguente: D_4 : 98,52%, D_3 : 1,45%, D_2 : 0,00%, D_1 : 0,02%; D_0 : 0,02%.

Esempio 6: Sintesi di un sale di potassio di Composto Ia



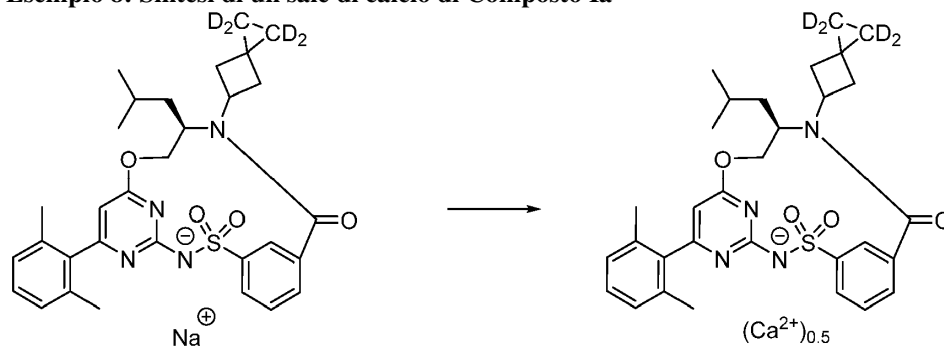
Composto **Ia** viene sciolto in metanolo e trattato lentamente con KOH (0,5 M in metanolo) sotto agitazione. La soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 1 ora, evaporata ed essiccata sotto vuoto di linea con sfiato di azoto a 50-55°C per 16 ore per dare composto **Ia** (ione potassio).

Esempio 7: Sintesi di un sale sodico di Composto Ia



Il composto **Ia** viene sospeso in acqua e trattato lentamente con NaOH (1 M) sotto agitazione. La sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 1,25 h. La soluzione viene filtrata per ottenerla limpida su un filtro a siringa (0,2 um) e il filtrato limpido viene liofilizzato per due giorni per dare il Composto **Ia** (sale sodico).

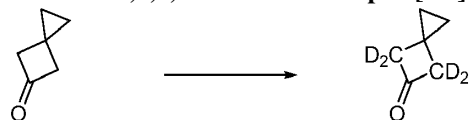
Esempio 8: Sintesi di un sale di calcio di Composto Ia



Il composto **Ia** (sale sodico) viene agitato in acqua per 10 minuti. Viene aggiunta una soluzione di CaCl₂ in acqua. Si aggiunge un'altra porzione di acqua e la sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 23 ore. Il solido viene raccolto mediante filtrazione, lavato con abbondante acqua ed essiccato sotto vuoto con un'immissione di azoto a 55-60°C per 14 ore per dare il composto **Ia** (sale di calcio (0,5)).

Esempio 9: Sintesi di (11R)-6-(2,6-Dimetilfenil)-11-isobutil-2,2-diosso-12-(4,4,5,6,6-pentadeuteriospiro[2.3]esan-5-il)-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetrazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(18),4,6,8(19),14,16-esaena-13-one (Composto Ib)

Sintesi di 4,4,6,6-Tetradeteriospiro[2.3]esan-5-one (21)



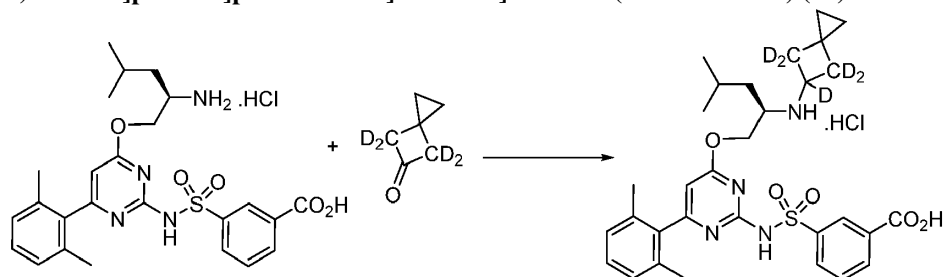
Una miscela di spiro[2.3]esan-5-one (2,17 g, 22,574 mmoli) e carbonato di potassio (8 g, 57,885 mmoli) in triglyme (24 mL) e D₂O (8 mL) è stata agitata a 70°C per 24 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la reazione è stata estratta con etere (5 x 16 mL). Gli strati eterici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e filtrati. Il filtrato è stato concentrato sotto pressione atmosferica per rimuovere l'etere etilico, e poi è stato distillato a pressione ridotta (50-60 mBar, da 50 a 60°C) per fornire 4,4,6,6-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one (1,07 g, 13%) come liquido limpido.

È stata eseguita una seconda reazione. Una miscela di spiro[2.3]esan-5-one (2 g, 20,806 mmoli) e carbonato di potassio (7,0 g, 50,649 mmoli) in triglyme (21 mL) e D₂O (7 mL) è stata agitata a 70°C per 24 ore. Dopo essere stata raffreddata a temperatura ambiente, la soluzione è stata estratta con dietil etere (5 x 14 mL). Gli strati eterici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro. L'etere è stato rimosso sotto pressione atmosferica. Il residuo è stato distillato sotto vuoto (50-60 mbar, 50-60°C) per fornire 4,4,6,6-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one (1,222 g, 37%) come liquido limpido. Entrambi i lotti di prodotto grezzo sono stati combinati e sottoposti ad un'altra reazione di scambio di deuterio.

In una soluzione di 4,4,6,6-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one grezzo (2,29 g, 8,4601 mmoli) in triglyme (6 mL) è stata aggiunta una soluzione di carbonato di potassio (2,9231 g, 21,150 mmoli) in D₂O (3 mL). La miscela di reazione è stata agitata a 70°C per 24 ore. Dopo essere stata raffreddata a temperatura ambiente, la reazione è stata estratta con dietil etere (3 x 10 mL). Gli strati eterici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati sotto pressione atmosferica. Al residuo è stata aggiunta una soluzione satura di bisolfito di sodio (20 mL) ed è stata agitata per 1 ora. Lo strato acquoso è stato estratto con dietil etere (3 x 20 mL). Lo strato organico è stato scartato. Lo strato acquoso è stato basicificato con NaOH al 10% (aq), e poi è stato estratto con etere etilico (3 x 20 mL). L'etere è stato rimosso mediante distillazione sotto pressione di 1 atm per fornire una soluzione al 9,01% di 4,4,6,6-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one (2,55 g, 27%) in triglyme ed etere etilico. Questa soluzione di triglyme è stata usata per la fase successiva senza ulteriore purificazione. ¹H NMR (250 MHz, cloroformio-d) δ 0,77 (d, J = 0,3 Hz, 4H).

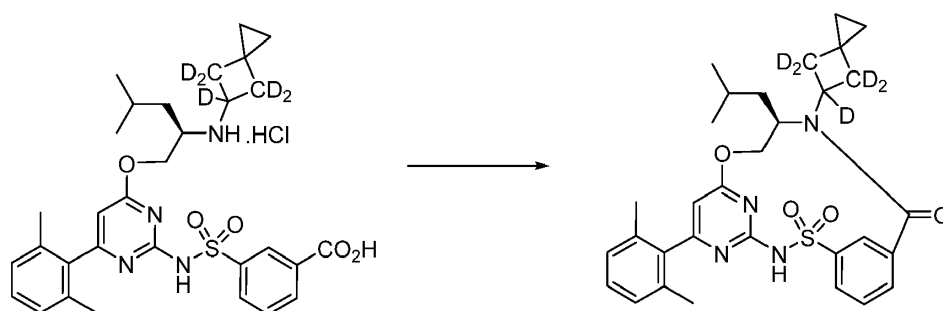
Sintesi di acido 3-[4-(2,6-Dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-[(4,4,5,6,6-pentadeuteriospiro[2.3]esan-5-

il)ammino]pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (22)



Una fiala da 4 mL è stata caricata sotto azoto con acido 3-[[4-[(2R)-2-ammino-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoile]benzoico (sale cloridrato) (43 mg, 0,08037 mmoli), 4,4,6,6-tetradeuteriospiro[2.3]esan-5-one (157 mg di 9% p/p, 0,1411 mmoli) (materiale puro al 9% in soluzione di triglyme) e ciano(trideuterio)boranuide (sale di sodio) (19 mg, 0,2885 mmoli). La fiala è stata spurgata con azoto, tappata e la sospensione risultante è stata agitata vigorosamente a temperatura ambiente per 1 ora e 15 minuti. La reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di metanolo-d₄ deuterato (1 mL, 24,68 mmoli). La soluzione è stata microfiltrata attraverso un disco filtrante per siringa PTFE Whatman da 0,45 µm e purificata mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. Le frazioni pure sono state raccolte e i solventi evaporati con un genevac per dare acido 3-[[4-(2,6-dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-[(4,4,5,6,6-pentadeuterio-spiro[2.3]esan-5-il)ammino]pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (24 mg, 48%). ESI-MS m/z calc. 583,28766, trovato 584,45 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 1,26 minuti. È visibile anche la presenza significativa del prodotto d4 (M+H = 583) (metodo LC A).

Sintesi di (11R)-6-(2,6-Dimetilfenil)-11-isobutil-2,2-diosso-12-(4,4,5,6,6-pentadeuteriospiro[2.3]esan-5-il)-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetrazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(18),4,6,8(19),14,16-esaene-13-one (Composto Ib)

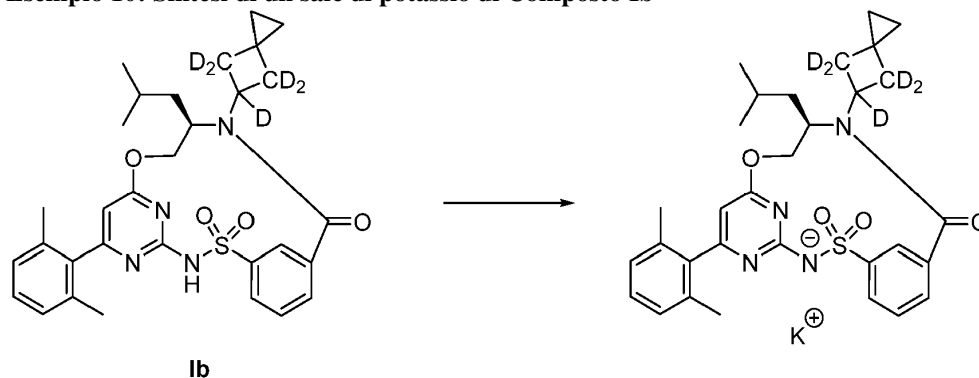


Un pallone da 100 mL è stato caricato sotto azoto con acido 3-[[4-(2,6-dimetilfenil)-6-[(2R)-4-metil-2-[(4,4,5,6,6-pentadeuteriospiro[2.3]esan-5-il)ammino]pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (24 mg, 0,03870 mmoli), HATU (53 mg, 0,1394 mmoli), DMF anidro (2,5 mL) e DIEA (40 μ L, 0,2296 mmoli). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 2,5 giorni. La miscela è stata concentrata e diluita con DMSO (2 mL). La soluzione è stata microfiltrata attraverso un disco filtrante per siringa PTFE Whatman da 0,45 μ M e purificata mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. Evaporazione in Genevac ha dato (11R)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-isobutil-2,2-diosso-12-(4,4,5,6,6-pentadeuteriospiro[2.3]esan-5-il)-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetrazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(18),4,6,8(19),14,16-esaene-13-one (4,2 mg, 19%) come solido biancastro. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,41 - 11,69 (m largo, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,91 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,77 - 7,60 (m, 2H), 7,25 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,38 (s, 1H), 5,12 (dd, J = 10,8, 4,2 Hz, 1H), 4,39 (t, J = 11,1 Hz, 1H), 3,72 (td, J = 11,4, 6,0 Hz, 1H), 2,25 - 1,85 (m, 6H), 1,66 (ddd, J = 14,0, 10,6, 2,8 Hz, 1H), 1,39 - 1,25 (m, 1H), 1,15 (ddd, J = 13,8, 10,5, 2,8 Hz, 1H), 0,72 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,54 - 0,36 (m, 4H), 0,21 (d, J = 6,3 Hz, 3H). ESI-MS m/z calc. 565,2771, trovato 566,43 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 2,04 minuti. (metodo LC A).

Il contenuto di deuterio è stato determinato mediante cromatografia liquida - spettrometria di massa usando uno strumento Sciex a triplo quadrupolo. Circa 0,1 mg/mL del campione sono stati sciolti in MeOH. 10 μ l del campione sono stati diluiti in 1 ml di MeOH. Nello strumento è stato iniettato 1 μ l del campione. Colonna: Phenomenex Synergy Fusion RP 4 μ m, 80A 50x2 mm. Portata: 0,5 ml/min. Gradiente: dal 40%B al 95%B in 3,5 min. Fase mobile A: 0,1% di acido formico in acqua. B: acetonitrile. È stato usato il metodo di monitoraggio di

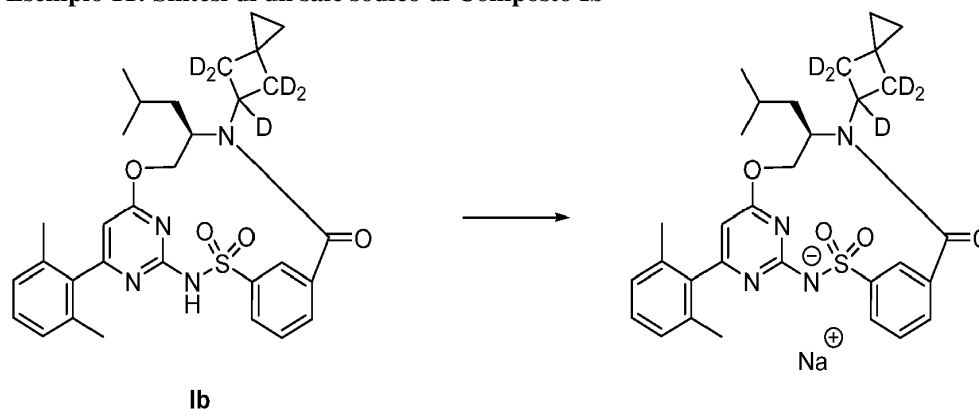
ioni selezionati. Lo spettrometro di massa è stato usato in modalità di ionizzazione positiva con una sorgente ESI. La percentuale di ciascuno ione monitorato era la seguente: D₅: 58,66%, D₄: 34,01%, D₃: 6,81%, D₂: 0,47%, D₁: 0,03%; D₀: 0,02%.

Esempio 10: Sintesi di un sale di potassio di Composto Ib



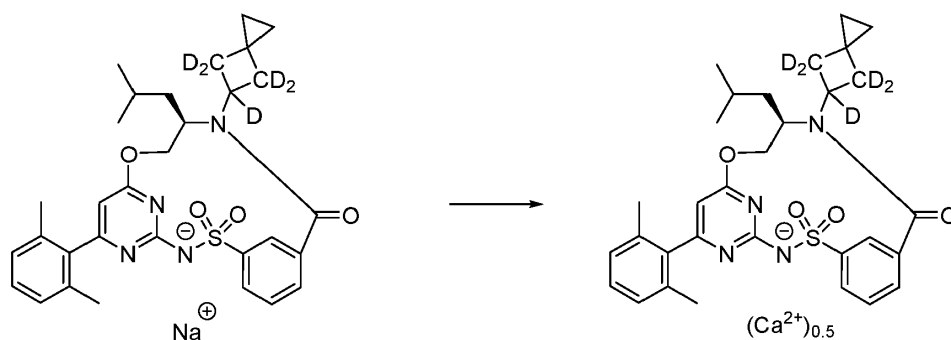
Il composto **Ib** viene sciolto in metanolo e trattato lentamente con KOH (0,5 M in metanolo) sotto agitazione. La soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 1 ora, evaporata ed essiccata sotto vuoto di linea con sfiato di azoto a 50-55°C per 16 ore per dare il composto **Ib** (ione potassio).

Esempio 11: Sintesi di un sale sodico di Composto Ib



Il composto **Ib** viene sospeso in acqua e trattato lentamente con NaOH (1 M) sotto agitazione. La sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 1,25 h. La soluzione viene filtrata limpida su un filtro a siringa (0,2 µm) e il filtrato limpido viene liofilizzato per due giorni per dare il Composto **Ib** (sale sodico).

Esempio 12: Sintesi di un sale di calcio di Composto Ib

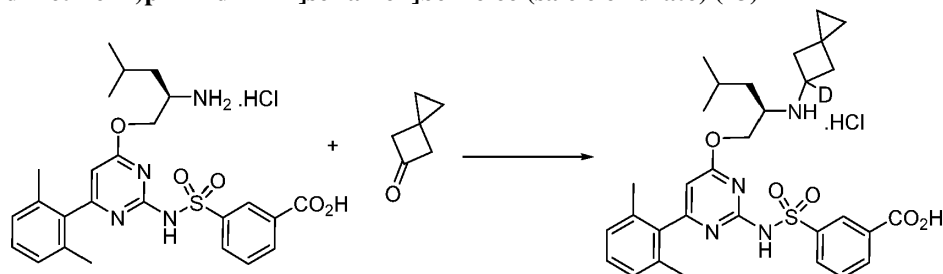


Il composto **Ib** (sale sodico) viene agitato in acqua per 10 minuti. Viene aggiunta una soluzione di CaCl_2 in acqua. Si aggiunge un'altra porzione di acqua e la sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 23 ore. Il solido viene raccolto mediante filtrazione, lavato con abbondante acqua ed essiccato sotto vuoto con un'immissione di azoto a $55\text{-}60^\circ\text{C}$ per 14 ore per dare il composto **Ib** (sale di calcio (0,5)).

Esempio 13: Sintesi di (11R)-12-(5-Deuteriospiro[2.3]esan-5-il)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-isobutil-2,2-diosso-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetrazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(18),4,6,8(19),14,16-esaene-13-one

(Composto Ic)

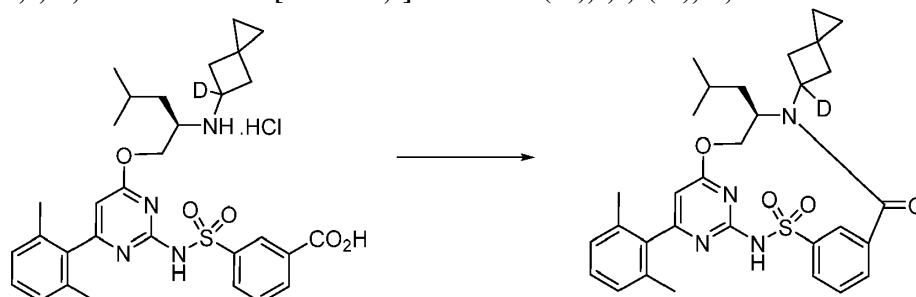
Sintesi di acido 3-[[4-[(2R)-2-[(5-Deuteriospiro[2.3]esan-5-il)ammino]-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (23)



Una fiala da 4 mL è stata caricata con acido 3-[[4-[(2R)-2-ammino-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (99 mg, 0,1850 mmoli), spiro[2.3]esan-5-one (50 mg, 0,5201 mmoli), DCM anidro (0,30 mL) e cianoborodeuteruro di sodio (36 mg, 0,5466 mmoli). La fiala è stata brevemente spurgata con azoto e la miscela (sospensione densa all'inizio) è stata agitata vigorosamente a temperatura ambiente per 2 ore, momento in cui LCMS ha mostrato una conversione di circa 50%. È stato aggiunto metanolo deuterato-d4 (1 mL, 24,62 mmoli) e la miscela è stata concentrata e sciolta in DMSO (volume

finale totale 3 mL). La miscela è stata purificata mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. Le frazioni pure sono state raccolte e i solventi evaporati per dare acido 3-[[4-[(2R)-2-[(5-deuteriospiro[2.3]esan-5-il)ammino]-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)-pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (28 mg, 25%) come solido bianco. ESI-MS m/z calc. 579,2626, trovato 580,42 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 1,42 minuti (metodo LC A).

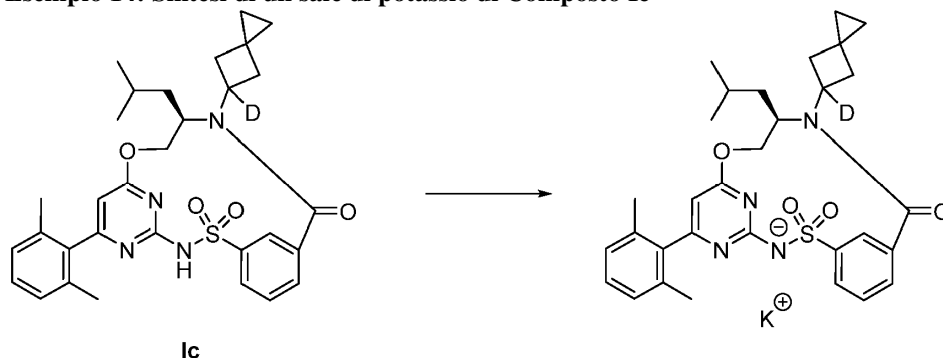
Sintesi di (11R)-12-(5-Deuteriospiro[2.3]esan-5-il)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-isobutil-2,2-diosso-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetrazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(18),4,6,8(19),14,16-esaene-13-one (Composto Ic)



Un pallone da 20 mL è stato caricato sotto azoto con HATU (48 mg, 0,1262 mmoli), DMF anidra (2 mL) e DIEA (45 μ L, 0,2584 mmoli). Una soluzione di acido 3-[[4-[(2R)-2-[(5-deuteriospiro[2.3]esan-5-il)ammino]-4-metil-pentossi]-6-(2,6-dimetilfenil)pirimidina-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (28 mg, 0,04544 mmoli) in DMF anidro (1 mL) è stata aggiunta goccia a goccia attraverso la siringa e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 14 ore. La miscela è stata concentrata e diluita con DMSO (2 mL). La soluzione è stata microfiltrata attraverso un disco filtrante per siringa PTFE Whatman da 0,45 μ M e purificata mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. L'evaporazione ha dato un residuo che è stato triturato in DCM/esani. L'evaporazione dei solventi ha dato (11R)-12-(5-deuteriospiro[2.3]esan-5-il)-6-(2,6-dimetilfenil)-11-isobutil-2,2-diosso-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetrazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(18),4,6,8(19),14,16-esaene-13-one (11 mg, 42 %) come solido bianco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,52 (m largo, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,90 (s largo, 1H), 7,67 (s largo, 2H), 7,24 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,37 (s largo, 1H), 5,11 (dd, J = 10,8, 4,2 Hz, 1H), 4,39 (t, J = 11,0 Hz, 1H), 3,74 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 3,27 (dd, J = 10,1, 5,0 Hz, 2H), 2,24 - 1,81 (m, 8H), 1,66 (t, J

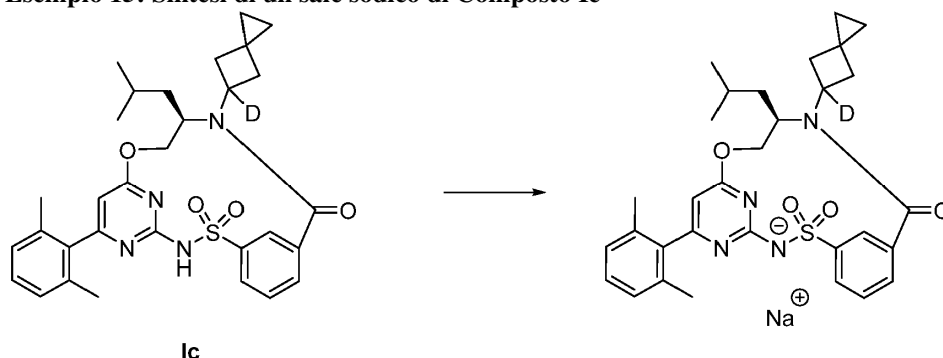
= 11,8 Hz, 1H), 1,38 - 1,23 (m, 1H), 1,23 - 1,00 (m, 1H), 0,72 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,59 - 0,37 (m, 4H), 0,21 (d, J = 6,2 Hz, 3H). ¹H NMR mostra circa il 95% dell'analogo D₁ e circa 5% dell'analogo non deuterato. ESI-MS m/z calc. 561,252, trovato 562,48 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 2,07 minuti (metodo LC A).

Esempio 14: Sintesi di un sale di potassio di Composto **Ic**



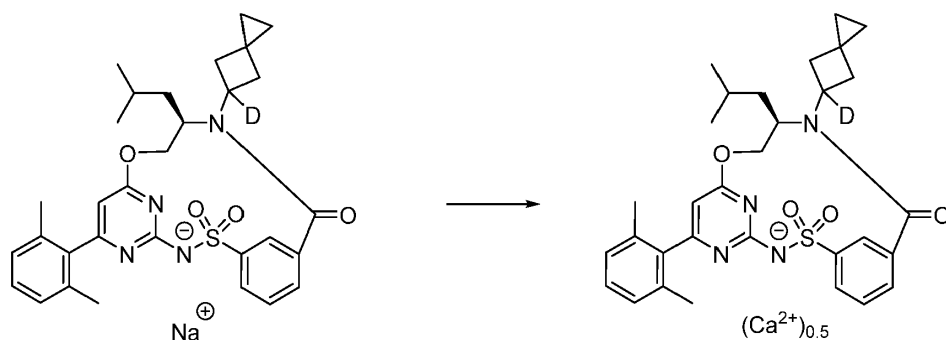
Il composto **Ic** viene sciolto in metanolo e trattato lentamente con KOH (0,5 M in metanolo) sotto agitazione. La soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 1 ora, evaporata ed essiccata sotto vuoto di linea con sfiato di azoto a 50-55°C per 16 ore per dare il composto **Ic** (ione di potassio).

Esempio 15: Sintesi di un sale sodico di Composto **Ic**



Il composto **Ic** viene sospeso in acqua e trattato lentamente con NaOH (1 M) sotto agitazione. La sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 1,25 h. La soluzione viene filtrata limpida su un filtro a siringa (0,2 μm) e il filtrato limpido viene liofilizzato per due giorni per dare il composto **Ic** (sale sodico).

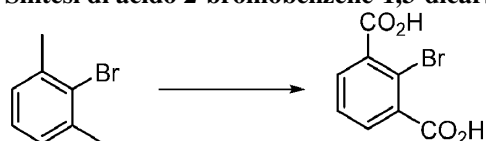
Esempio 16: Sintesi di un sale di calcio di Composto **Ic**



Il composto **Ic** (sale sodico) viene agitato in acqua per 10 minuti. Viene aggiunta una soluzione di CaCl_2 in acqua. Si aggiunge un'altra porzione di acqua e la sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 23 ore. Il solido viene raccolto mediante filtrazione, lavato con abbondante acqua ed essiccato sotto vuoto con un'immissione di azoto a $55\text{-}60^\circ\text{C}$ per 14 ore per dare il composto **Ic** (sale di calcio (0,5)).

Esempio 17: Sintesi di (11R)-6-[2,6-di(trideutero)metilfenil]-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2 λ^6 -tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (ID composto)

Sintesi di acido 2-bromobenzene-1,3-dicarbossilico (25)

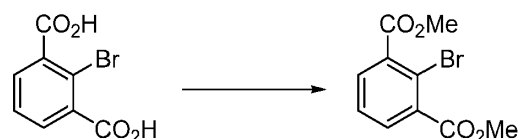


Ad una soluzione agitata di 2-bromo-1,3-dimetil-benzene (35,25 g, 190,48 mmoli) in una miscela di terz-butanolo (150 mL) e acqua (150 mL) a temperatura ambiente è stato aggiunto in porzioni permanganato di potassio (61 g, 385,99 mmoli). Una volta completata l'aggiunta, la miscela di reazione è stata riscaldata a 85°C per 3 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, è stata aggiunta un'altra porzione di permanganato di potassio (62 g, 392,32 mmoli). La miscela di reazione è stata poi riscaldata a 85°C per 16 ore. La miscela di reazione è stata filtrata a caldo attraverso un tampone di celite, e il pannello di filtrazione è stato lavato con una miscela calda 1:1 di terz-butanolo e acqua (2 x 100 mL). I filtrati combinati sono stati concentrati sotto vuoto fino ad un volume residuo di ~200 mL e acidificati a $\text{pH}\sim 1$ con acido solforico concentrato. La miscela è stata raffreddata a 0°C e lasciata riposare per 2 ore. Il prodotto precipitato è stato raccolto mediante filtrazione e il filtrato acquoso è stato inoltre estratto con etilacetato (2 x 80 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati

con salamoia (40 mL), essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Tutte le frazioni del prodotto sono state combinate, lavate con esani (2 x 100 mL) ed essiccate sotto vuoto per ottenere acido 2-bromobenzene-1,3-dicarbossilico (24,86 g, 51%) come solido bianco. Il prodotto è stato portato al passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

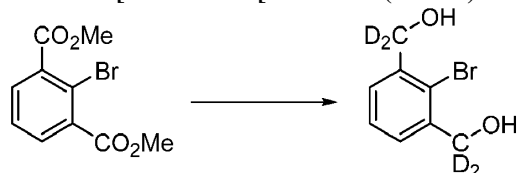
$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7,71 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,53 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H). ESI-MS m/z calc. 243,9371, trovato 245,3 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 1,63 minuti (metodo LC C).

Sintesi di dimetil 2-bromobenzene-1,3-dicarbossilato (26)



Ad una soluzione agitata di acido 2-bromobenzene-1,3-dicarbossilico (25,15 g, 102,64 mmoli) in DMF anidra (250 mL) a temperatura ambiente sotto azoto è stato aggiunto K_2CO_3 anidro (31,5 g, 227,92 mmoli), seguito da iodometano (32,376 g, 14,2 mL, 228,10 mmoli). La miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 24 ore. La miscela di reazione è stata versata in salamoia (750 mL) e il prodotto è stato estratto con etilacetato (3 x 250 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (450 mL), essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati per ottenere dimetil 2-bromobenzene-1,3-dicarbossilato (28,45 g, 94%) come olio ambrato. Il prodotto è stato portato al passaggio successivo senza ulteriore purificazione. $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ 7,91 - 7,74 (m, 2H), 7,70 - 7,52 (m, 1H), 3,88 (s, 6H). ESI-MS m/z calc. 271,9684, trovato 273,4 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 4,23 minuti (metodo LC C).

Sintesi di [2-Bromo-3-[dideuterio(idrossi)metil]fenil]-dideuterio-metanolo (27)

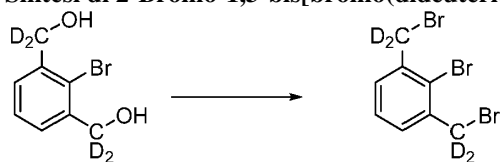


Ad una sospensione agitata di litio alluminio deuteruro (200 mg, 5,0044 mmoli) in THF anidro (3 mL) a 0°C sotto azoto è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di dimetil 2-bromobenzene-1,3-dicarbossilato (585 mg, 2,1422 mmoli) in THF anidro (1 mL). Dopo che l'aggiunta è stata completata, la miscela di reazione è stata

agitata a questa temperatura per 1 ora. La miscela di reazione è stata diluita con THF (10 mL) e spenta usando un protocollo Fieser standard. I sali sono stati filtrati e lavati con THF (2 x 10 mL). I filtrati combinati sono stati concentrati sotto vuoto per ottenere [2-bromo-3-[dideuterio(idrossi)metil]fenil]-dideuterio-metanolo (416 mg, 79%) come solido bianco. Il prodotto è stato portato al passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

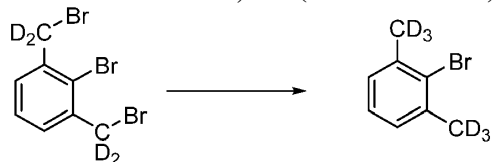
^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ 7,44 - 7,39 (m, 3H), 5,37 (s, 2H). ESI-MS m/z calc. 220,0037, trovato 203,3 ($M+1-18$) $^+$; Tempo di ritenzione: 1,8 minuti (metodo LC C).

Sintesi di 2-Bromo-1,3-bis[bromo(dideuterio)metil]benzene (28)



Ad una sospensione agitata di [2-bromo-3-[dideuterio(idrossi)metil]fenil]-dideuterio-metanolo (12,56 g, 56,811 mmoli) in DCM anidro (370 mL) a temperatura ambiente sotto azoto è stato aggiunto tetrabromuro di carbonio (45,3 g, 136,60 mmoli), seguito da un'aggiunta parziale di trifenilfosfina (35,8 g, 136,49 mmoli) in un periodo di 15 minuti. Dopo che l'aggiunta è stata completata, la miscela di reazione diventava una soluzione omogenea ed è stata agitata a questa temperatura per 1 ora. La miscela di reazione è stata concentrata sotto vuoto fino ad un volume residuo di ~100 mL e versata in dietil etere (600 mL). Il precipitato bianco è stato filtrato e lavato con etere etilico (2 x 50 mL). I filtrati combinati sono stati raccolti e concentrati sotto vuoto fino ad un volume residuo di ~100 mL e versati in esani (600 mL). Il precipitato bianco è stato filtrato e lavato con esani (2 x 100 mL). I filtrati combinati sono stati raccolti e concentrati sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etilacetato allo 0-10% in esani per ottenere 2-bromo-1,3-bis[bromo(dideuterio)metil]benzene (15,56 g, 71%) come solido bianco. ^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ 7,60 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,39 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H).

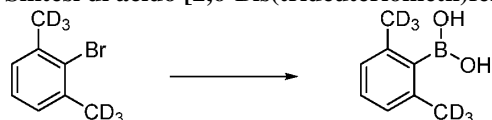
Sintesi di 2-bromo-1,3-bis(trideuteriometil)benzene (29)



Ad una sospensione agitata di litio alluminio deuteruro (3,65 g, 91,330 mmoli) in THF anidro (70 mL) a 0°C sotto azoto è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 2-bromo-1,3-bis[bromo(dideuterio)metil]benzene (15,5 g, 40,216 mmoli) in THF anidro (70 mL). Dopo che l'aggiunta è stata completata, la miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 1 ora. La miscela di reazione è stata diluita con THF (100 mL) e raffreddata usando un protocollo di elaborazione Fieser standard. I sali sono stati filtrati e lavati con THF (2 x 50 mL). I filtrati combinati furono concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato ridisciolto in esani (200 mL), filtrato e concentrato sotto vuoto per ottenere il 2-bromo-1,3-bis(trideuteriometil)benzene (5,58 g, 68%) come olio giallo pallido. Il prodotto è stato portato al passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) δ 7,23 - 7,11 (m, 3H).

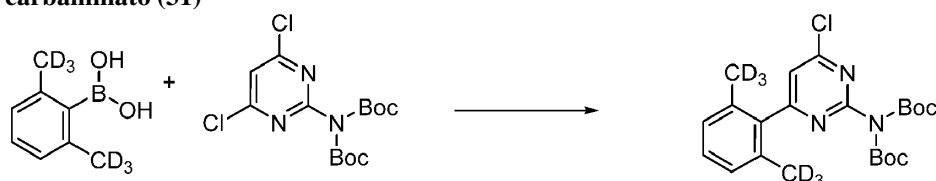
Sintesi di acido [2,6-Bis(trideuteriometil)fenil]boronico (30)



Ad una sospensione sotto agitazione di tornitura di magnesio (1,8 g, 74,059 mmoli) e iodio (15 mg, 0,0030 mL, 0,0591 mmoli) in THF anidro (20 mL) a temperatura ambiente sotto azoto è stata aggiunta lentamente una soluzione di 2-bromo-1,3-bis(trideuteriometil)benzene (9,89 g, 46,578 mmoli) in THF anidro (50 mL). Una volta iniziata, la reazione è esotermica e la velocità di aggiunta è stata regolata per mantenere la temperatura di reazione al di sotto del punto di ebollizione del THF. Una volta completata l'aggiunta, la miscela di reazione è stata agitata a 65°C per 1 ora. La soluzione preparata del reagente di Grignard è stata raffreddata a temperatura ambiente e aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di trimetil borato (24,232 g, 26 mL, 233,20 mmoli) in THF anidro (60 mL) raffreddata a -78°C sotto azoto. Una volta completata l'aggiunta, la miscela di reazione è stata agitata a -78°C per 3 ore, poi lasciata riscaldare fino a temperatura ambiente e agitata per una notte. La miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C ed è stato aggiunto lentamente HCl acquoso (95 mL di 1 M, 95,000 mmoli). Una volta completata l'aggiunta, la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per 3 ore. È stata aggiunta acqua (100 mL) e le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto. Lo strato acquoso è stato estratto con etilacetato (3 x 200 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (80 mL),

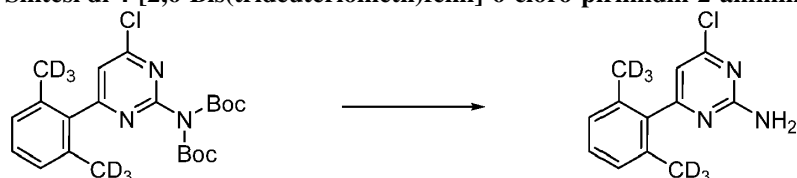
essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il residuo ottenuto è stato triturato con esani (100 ml). Il prodotto precipitato è stato raccolto mediante filtrazione ed essiccato sotto vuoto per ottenere acido [2,6-bis(trideuteriometil)fenil]boronico (4,667 g, 61%) come solido bianco. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,11 (s largo, 2H), 7,06 (dd, $J = 7,9, 7,1$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H).

Sintesi di *terz*-butil N-[4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]-N-*terz*-butossicarbonil-carbammato (31)



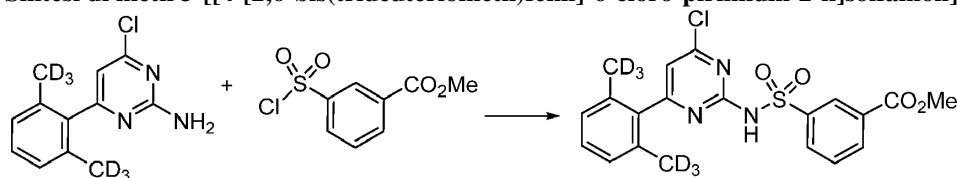
Una soluzione sotto agitazione di acido [2,6-bis(trideuteriometil)fenil]boronico (1,565 g, 10,031 mmoli) e *terz*-butil N-*terz*-butossicarbonil-N-(4,6-dicloropirimidin-2-il)carbammato (5,48 g, 15,046 mmoli) in una miscela di 1,2-dimetossietano (30 mL) e acqua (10 mL) a temperatura ambiente è stata degassata con azoto per 30 minuti. Sotto azoto sono stati aggiunti carbonato di cesio (8,18 g, 25,106 mmoli) e [1,1'-bis(difenilfosfino)-ferrocene]dicloropalladio(II) (735 mg, 1,0045 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a 80°C per 3 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata diluita con acqua (120 mL) e il prodotto è stato estratto con etilacetato (3 x 150 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (50 mL), essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere etilico da 0 - 10% in esani per ottenere *terz*-butil N-[4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]-N-*terz*-butossicarbonil-carbammato (3,6919 g, 79%) come olio giallo pallido. ESI-MS m/z calc. 439,2145, trovato 440,4 ($M+1$)⁺; Tempo di ritenzione: 7,48 minuti (metodo LC C).

Sintesi di 4-[2,6-Bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-ammina (32)

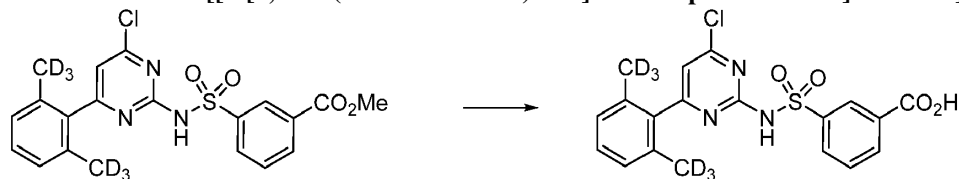


Ad una soluzione agitata di *tert*-butil N-[4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]-N-*tert*-butossicarbonil-carbammato (3,66 g, 8,3188 mmoli) in DCM (30 mL) a temperatura ambiente è stata aggiunta una soluzione di HCl (12 mL di 4 M, 48.000 mmoli) in 1,4-diossano. La miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 20 ore. I materiali volatili sono stati rimossi sotto vuoto, il solido bianco ottenuto è stato risospeso in NaHCO₃ acquoso saturo (150 mL) e agitato a temperatura ambiente per 15 minuti. Il prodotto è stato estratto con etilacetato (3 x 100 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (50 mL), essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati per ottenere 4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-ammina (1,842 g, 87 %) come solido bianco. ESI-MS *m/z* calc. 239,1096, trovato 240,3 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 4,44 minuti (metodo LC C).

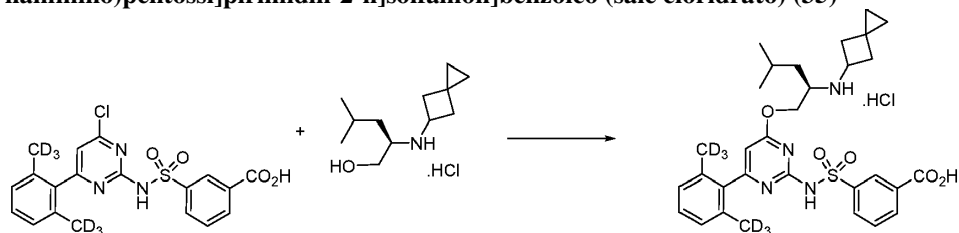
Sintesi di metil 3-[[4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]solfamoil]benzoato (33)



Ad una soluzione sotto agitazione di 4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-ammina (1,8 g, 7,5083 mmoli) e metil 3-clorosolfonilbenzoato (2,64 g, 11,250 mmoli) in THF anidro (50 mL) a 0°C sotto azoto è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di litio *tert*-amossido (3,2120 g, 11 mL al 40% p/p, 13,656 mmoli) in eptani. Una volta completata l'aggiunta, la miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 2 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata con HCl acquoso 1 M (120 mL), poi riscaldata a temperatura ambiente e le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto. Il prodotto è stato estratto con etilacetato (3 x 150 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (50 mL), essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etilacetato allo 0 - 20% in esani per ottenere metil 3-[[4-[2,6-bis(trideuterio-metil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]solfamoil]benzoato (2,786 g, 80%) come solido bianco. ESI-MS *m/z* calc. 437,1083, trovato 438,3 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 5,95 minuti La purezza finale è stata determinata mediante HPLC in fase inversa usando il metodo LC C.

Sintesi di acido 3-[[4-[2,6-Bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (34)


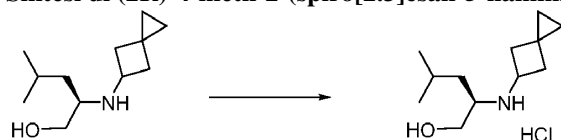
Ad una soluzione sotto agitazione di metil 3-[[4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]solfamoil]benzoato (2,751 g, 6,2818 mmoli) in THF (40 mL) a temperatura ambiente è stato aggiunto NaOH acquoso (26 mL di 1 M, 26,000 mmoli). La miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 2 ore. È stata aggiunta acqua (100 mL) e le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto. Lo strato acquoso residuo è stato estratto con etilacetato (1 x 100 mL) e lo strato organico è stato scartato. Lo strato acquoso è stato acidificato con HCl acquoso 2 M a pH ~ 1 e il prodotto è stato estratto con etilacetato (3 x 100 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (50 mL), essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati per ottenere acido 3-[[4-[2,6-bis(trideuterio-metil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (1,719 g, 62%) come solido bianco. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,43 (s, 1H), 12,44 (s, 1H), 8,44 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H), 8,18 (dt, $J = 7,8, 1,4$ Hz, 1H), 8,13 (ddd, $J = 7,9, 2,0, 1,2$ Hz, 1H), 7,68 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,24 (dd, $J = 8,0, 7,2$ Hz, 1H), 7,10 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H). ESI-MS m/z calc. 423,0927, trovato 424,0 ($M+1$) $^+$; Tempo di ritenzione: 2,28 minuti (metodo LC B).

Sintesi di acido 3-[[4-[2,6-Bis(trideuteriometil)fenil]-6-[(2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (35)


In un pallone da 20 mL, acido 3-[[4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-cloro-pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (157 mg, 0,3704 mmoli) e (2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (sale cloridrato) (90 mg, 0,3850 mmoli) sono stati caricati sotto azoto con THF anidro (2 mL) (sospensione). È stato aggiunto sodio *tert*-butossido (156 mg, 1,623 mmoli) (leggera esotermia e dissoluzione dei solidi). La sospensione è stata agitata a

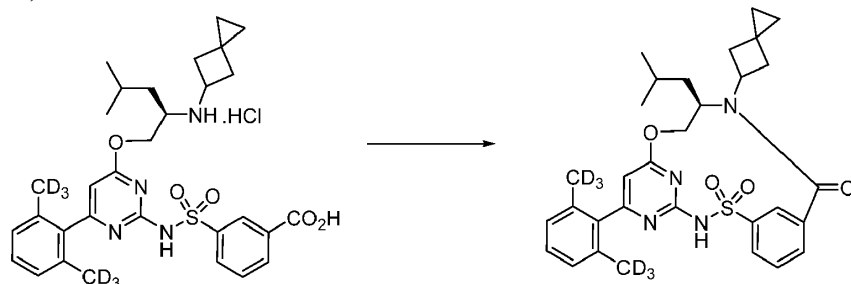
temperatura ambiente per 5,5 ore. La miscela è stata ripartita tra etilacetato (30 mL) e HCl 1M acquoso (30 mL) e salamoia (20 mL). Dopo la separazione, la fase acquosa è stata ancora estratta con EtOAc (2 x 30 ml). Gli estratti combinati sono stati essiccati su solfato di sodio e i solventi evaporati per dare un materiale grezzo. Il materiale è stato sciolto in DMSO (4 mL). La soluzione è stata microfiltrata attraverso un disco filtrante per siringa PTFE Whatman da 0,45 µM e purificata mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. L'evaporazione ha fornito acido 3-[[4-[2,6-bis(trideuterio-metil)fenil]-6-[(2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (135 mg, 59%) come solido bianco. ESI-MS m/z calc. 584,29395, trovato 585,73 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 1,22 minuti (metodo LC A).

Sintesi di (2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (sale cloridrato) (3·HCl)



HCl (354 mL di 4 M, 1,416 moli) (4 M in diossano) è stato aggiunto ad una soluzione sotto agitazione (meccanica) di (2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (254 g, 1,287 moli) in dietil etere (2,286 L) in un bagno di ghiaccio/acqua per 20 minuti, mantenendo la temperatura interna tra 10°C e 22°C. Una volta completata l'aggiunta, la soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per 1,5 ore. Il prodotto è stato filtrato e risciacquato con 2000 mL di etere etilico. Lo stesso identico procedimento è stato ripetuto di nuovo esattamente sulla stessa scala (è stato usato un totale di 508 g di materiale di partenza amminoalcolico). Il prodotto è stato essiccato sotto vuoto a 35°C durante la notte e ha dato 562,3 g. (2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentan-1-olo (sale cloridrato) (562,3 g, 93%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9,17 - 8,84 (m, 2H), 5,38 (s, 1H), 3,99 (p, J = 7,2 Hz, 1H), 3,70 - 3,60 (m, 1H), 3,55 - 3,45 (m, 1H), 3,03 - 2,91 (m, 1H), 2,63 - 2,54 (m, 2H), 2,20 - 2,05 (m, 2H), 1,73 - 1,60 (m, 1H), 1,60 - 1,48 (m, 1H), 1,43 - 1,30 (m, 1H), 0,93 - 0,83 (m, 6H), 0,55 - 0,45 (m, 2H), 0,45 - 0,36 (m, 2H).

Sintesi di (11R)-6-[2,6-di(trideutero)metilfenil]-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (composto

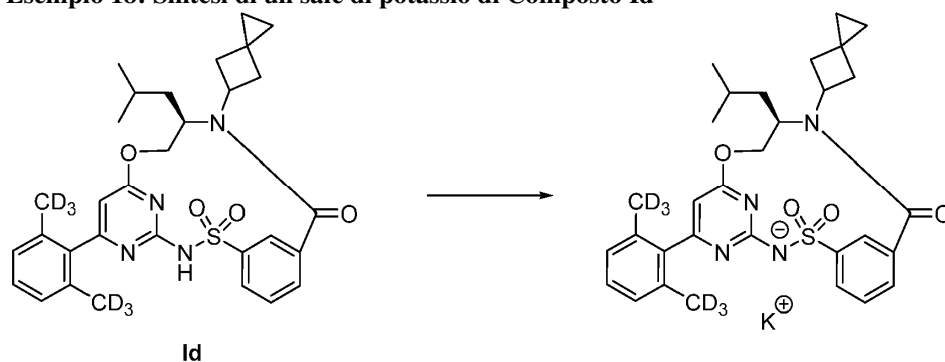
Id)

Un pallone da 20 mL è stato caricato sotto azoto con COMU (244 mg, 0,5697 mmoli), DMF anidra (8 mL) e DIEA (0,22 mL, 1,263 mmoli). Una soluzione di acido 3-[[4-[2,6-bis(trideuteriometil)fenil]-6-[(2R)-4-metil-2-(spiro[2.3]esan-5-ilammino)pentossi]pirimidin-2-il]solfamoil]benzoico (sale cloridrato) (135 mg, 0,2173 mmoli) in DMF anidro (4 mL) è stata aggiunta goccia a goccia attraverso la siringa in un periodo di 3 minuti. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 17 ore. La miscela è stata concentrata e diluita con DMSO (2 mL). La soluzione è stata microfiltrata attraverso un disco filtrante per siringa PTFE Whatman da 0,45 µm e purificata mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18) usando un gradiente di acetonitrile in acqua (da 1 a 99% in 15 minuti) e HCl come modificatore. L'evaporazione ha dato un residuo che è stato triturato in DCM/esani. L'evaporazione dei solventi ha dato (11R)-6-[2,6-di(trideutero)-metilfenil]-11-(2-metilpropil)-12-{spiro[2.3]esan-5-il}-9-ossa-2λ⁶-tia-3,5,12,19-tetraazatriciclo-[12.3.1.14,8]nonadeca-1(17),4(19),5,7,14(18),15-esaene-2,2,13-trione (73,4 mg, 60%) come solido biancastro. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,47 - 11,72 (m largo, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,99 - 7,81 (m, 1H), 7,82 - 7,52 (m, 2H), 7,26 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,37 (s largo, 1H), 5,12 (dd, J = 10,7, 4,2 Hz, 1H), 4,39 (t, J = 11,1 Hz, 1H), 4,23 (p, J = 8,5 Hz, 1H), 3,72 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,30 - 3,22 (m, 2H, sovrapposto all'acqua), 2,09 (dt, J = 19,0, 9,4 Hz, 2H), 1,66 (t, J = 12,5 Hz, 1H), 1,38 - 1,24 (m largo, 1H), 1,15 (dd, J = 14,0, 10,4 Hz, 1H), 0,72 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,61 - 0,35 (m, 4H), 0,21 (d, J = 6,2 Hz, 3H). ESI-MS m/z calc. 566,2834, trovato 567,69 (M+1)⁺; Tempo di ritenzione: 2,05 minuti (metodo LC A).

Il contenuto di deuterio è stato determinato mediante cromatografia liquida - spettrometria di massa usando uno strumento a singolo quadrupolo. Circa 0,1 mg/mL del campione sono stati sciolti in MeOH. 10 µl del campione sono stati diluiti in 1 ml di MeOH. 1 µL del campione è stato iniettato nello strumento. Colonna: Agilent SB

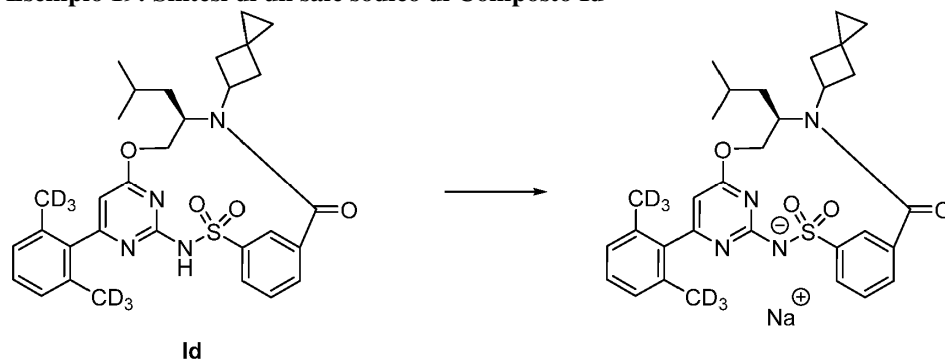
C18, 1,8 μm , 2,1 x 50 mm. Portata: 0,7 ml/min. Gradiente: da 40% B a 100% B in 2,5 minuti. Fase mobile A: acido trifluoroacetico 0,1% in acqua. B: acetonitrile. È stato usato il metodo di monitoraggio di ioni selezionati. Lo spettrometro di massa è stato usato in modalità di ionizzazione positiva con una sorgente ESI. La percentuale di ciascuno ione monitorato era la seguente: D₆: 88,49%, D₅: 8,14%, D₄: 0,93%, D₃: 0,52%, D₂: 1,93%, D₁: 0,00%; D₀: 0,00%.

Esempio 18: Sintesi di un sale di potassio di Composto Id



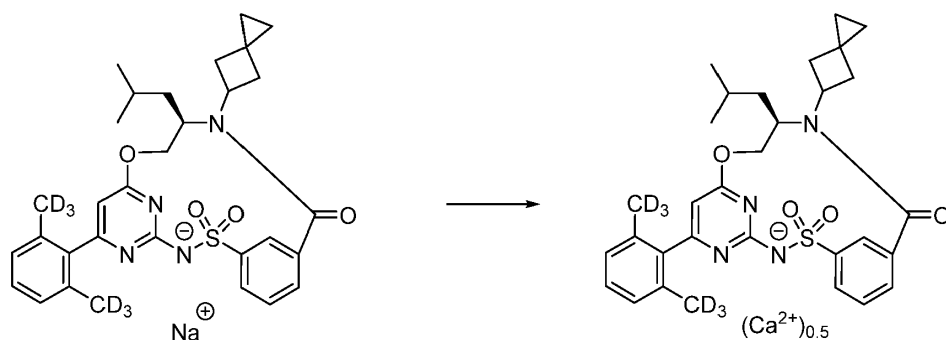
Composto **Id** viene sciolto in metanolo e trattato lentamente con KOH (0,5 M in metanolo) sotto agitazione. La soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 1 ora, evaporata ed essiccata sotto vuoto di linea con sfiato di azoto a 50-55°C per 16 ore per dare il composto **Id** (ione di potassio).

Esempio 19: Sintesi di un sale sodico di Composto Id



Il composto **Id** viene sospeso in acqua e trattato lentamente con NaOH (1 M) sotto agitazione. La sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 1,25 h. La soluzione viene filtrata fino a limpidezza su un filtro a siringa (0,2 μm) e il filtrato limpido viene liofilizzato per due giorni per dare il composto **Id** (sale sodico).

Esempio 20: Sintesi di un sale di calcio di Composto Id



Il composto **Id** (sale sodico) viene agitato in acqua per 10 minuti. Viene aggiunta una soluzione di CaCl_2 in acqua. Si aggiunge un'altra porzione di acqua e la sospensione viene agitata a temperatura ambiente per 23 ore. Il solido viene raccolto mediante filtrazione, lavato con abbondante acqua ed essiccato sotto vuoto con un'immissione di azoto a $55\text{-}60^\circ\text{C}$ per 14 ore per dare il composto **Id** (sale di calcio (0,5)).

Saggi di attività biologica

Soluzioni

Terreno di base (ADF+++), era costituito da Advanced DMEM/Ham's F12, Glutamax 2 mM, HEPES 10 mM, penicillina/streptomicina 1 $\mu\text{g/ml}$.

Il mezzo di mantenimento enteroide intestinale (IEMM) era costituito da ADF+++ , 1x supplemento B27, 1x supplemento N2, 1,25 mM N-acetil cisteina, 10 mM Nicotinamide, 50 ng/mL hEGF, 10 nM Gastrina, 1 $\mu\text{g/ml}$ hR-spondina-1, 100 ng/mL hNoggin, inibitore del TGF- β tipo 1 A-83-01, 100 $\mu\text{g/ml}$ Primocin, 10 μM inibitore P38 MAPK SB202190.

Tampone di bagno 1 era costituito da MgCl_2 1 mM, NaCl 160 mM, KCl 4,5 mM, HEPES 10 mM, Glucosio 10 mM, CaCl_2 2 mM.

Tampone privo di cloruro era costituito da 1 mM di gluconato di magnesio, 2 mM di gluconato di calcio, 4,5 mM di gluconato di potassio, 160 mM di gluconato di sodio, 10 mM di HEPES, 10 mM di glucosio.

Soluzione colorante di bagno 1 era costituita da tampone di bagno 1, 0,04% Pluronic F127, 20 μM di Metil Oxonol, 30 μM di CaCCinh-A01, 30 μM di Chicago Sky Blue.

Soluzione colorante priva di cloruro era costituita da tampone privo di cloruro, 0,04% Pluronic F127, 20 μM di metil oxonol, 30 μM di CaCCinh-A01, 30 μM di Chicago Sky Blue.

Soluzione di stimolazione colorante priva di cloruro era costituita da soluzione colorante priva di cloruro, 10 μ M di forskolina, 100 μ M di IBMX e 300 nM di Composto **III**.

Coltura cellulare

Cellule enteroidi epiteliali intestinali umane sono state ottenute dallo Hubrecht Institute for Developmental Biology and Stem Cell Research, Utrecht, Paesi Bassi ed espanse in flaconi a T come precedentemente descritto (Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, Brandsma AM, de Jong NWM, Bijvelds MJC, Scholte BJ, Nieuwenhuis EES, van den Brink S, Clevers H, van der Ent CK, Middendorp S and M Beekman JM. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. Nat. Med. 2013 Jul; 19(7):939-45.

Raccolta e semina di cellule enteroidi

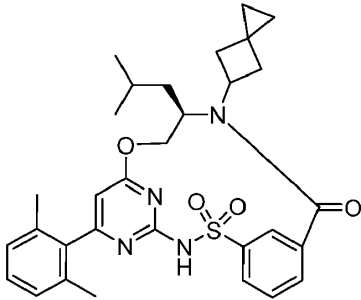
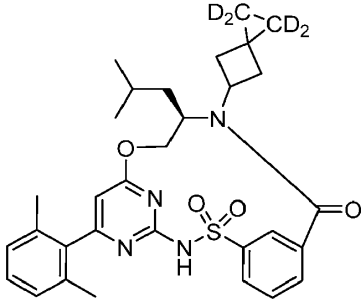
Le cellule sono state recuperate in una soluzione di recupero cellulare, raccolte mediante centrifugazione a 650 giri al minuto per 5 minuti a 4°C, risospese in TryPLE e incubate per 5 minuti a 37°C. Le cellule sono state poi raccolte mediante centrifugazione a 650 giri al minuto per 5 minuti a 4°C e risospese in IEMM contenente 10 μ M di inibitore ROCK (RI). La sospensione cellulare è stata fatta passare attraverso un setaccio cellulare da 40 μ m e risospesa a 1×10^6 cellule/mL in IEMM contenente 10 μ M RI. Le cellule sono state seminate a 5000 cellule/pozzetto in piastre multipozzetto e incubate per una notte a 37°C, 95% di umidità e 5% di CO₂ prima del saggio.

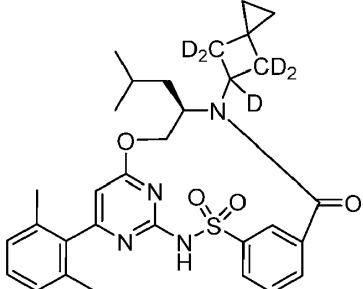
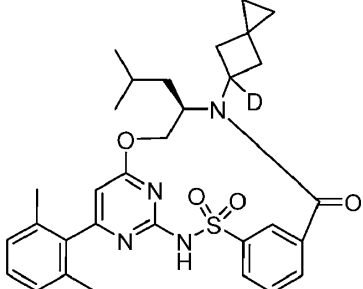
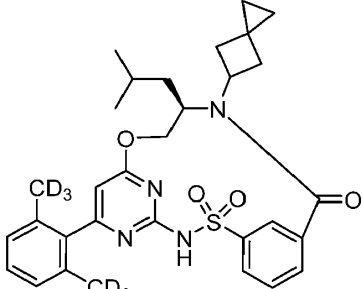
Saggio a colorante del potenziale di membrana

Le cellule enteroidi sono state incubate con composto di prova in IEMM per 18-24 ore a 37°C, 95% di umidità e 5% di CO₂. Dopo l'incubazione del composto, è stato impiegato un saggio a colorante del potenziale di membrana usando un FLIPR Tetra per misurare direttamente la potenza e l'efficacia del composto di prova sul trasporto del cloruro mediato da CFTR dopo l'aggiunta acuta di 10 μ M di forskolina e 300 nM di N-[2,4-bis (1,1-dimetiletil)-5-idrossifenil]-1,4-diidro-4-ossochinolin-3-carbossammide. In breve, le cellule sono state lavate 5 volte nel tampone di bagno 1. È stata aggiunta la soluzione colorante di bagno 1 e le cellule sono state incubate per 25 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione del colorante, le cellule sono state lavate 3 volte in

una soluzione colorante priva di cloruro. Il trasporto del cloruro è stato avviato mediante l'aggiunta di una soluzione di stimolazione di colorante priva di cloruro e il segnale di fluorescenza è stato letto per 15 minuti. Il trasporto del cloruro mediato da CFTR per ciascuna condizione è stato determinato dall'AUC della risposta di fluorescenza a stimolazione da forskolina acuta e 300 nM N-[2,4-bis(1,1-dimetiletil)-5-idrossifenil]-1,4-diidro-4-ossocinolina-3-carbossammide. Il trasporto del cloruro è stato poi espresso come percentuale del trasporto del cloruro dopo il trattamento con 1 μ M (14S)-8-[3-(2-{Dispiro[2.0.2.1]eptan-7-il}etossi)-1H-pirazol-1-il]-12,12-dimetil-2 λ^6 -tia-3,9,11,18,23-pentaazatetraciclo[17.3.1.1.11,14.05,10]-tetracosa-1(22),5,7,9,19(23),20-esaene-2,2,4-trione, 3 μ M ((R)-1-(2,2-difluoro-benzo[d][1,3]diossol-5-il)-N-(1-(2,3-diidrossipropil)-6-fluoro-2-(1-idrossi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropancarbossammide e 300 nM N-[2,4-bis(1,1-dimetiletil)-5-idrossifenil]-1,4-diidro-4-ossocinolina-3-carbossammide come controllo positivo a tripla combinazione (% di attività). Tabella 3 fornisce l'attività di modulazione del CFTR per Composto I e derivati deuterati illustrativi di Composto I.

Tabella 3. Attività di modulazione di CFTR per Composto I e derivati deuterati illustrativi di Composto I

Composto	Struttura chimica	Attività massima	EC ₅₀
Composto I		+++	+++
Composto Ia		+++	+++

Composto Ib		+++	+++
Composto Ic		+++	+++
Composto Id		+++	+++

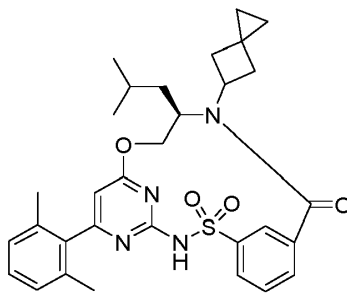
Attività massima: +++ è >60%; ++ è 30-60%; + è <30%. EC50: +++ è <1 µM.

Altre realizzazioni

La suddetta discussione divulga e descrive realizzazioni meramente illustrative di questa descrizione. Un esperto nella tecnica riconoscerà facilmente, da tale discussione e dalle rivendicazioni allegate, che vari cambiamenti, modifiche e variazioni possono essere apportati alla stessa senza allontanarsi dal campo di questa descrizione come definito nelle seguenti rivendicazioni.

RIVENDICAZIONI

1. Composto scelto tra Composto **I**:



I,

derivati deuterati di Composto I, e loro sali accettabili farmaceuticamente.

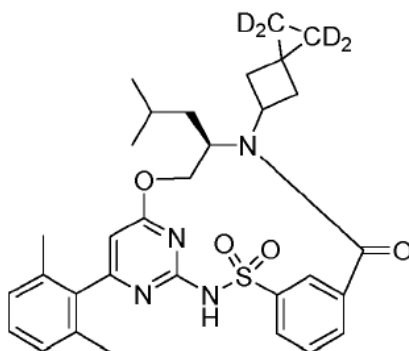
2. Composto della rivendicazione 1, in cui il composto è:

(a) Composto I; e/o

(b) un sale di potassio, un sale di sodio, o un sale di calcio.

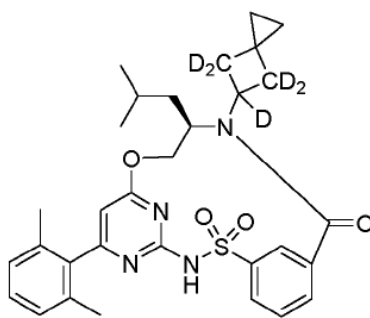
3. Composto della rivendicazione 1, in cui il derivato deuterato di Composto I è scelto tra:

Composto **Ia**:

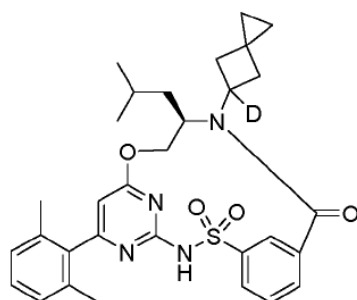


Ia,

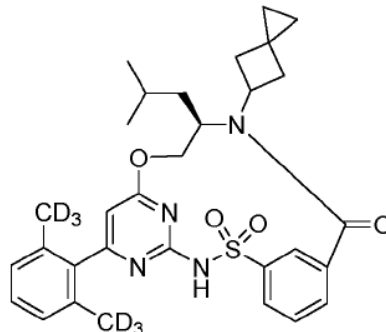
Composto **Ib**:

**Ib,**

Composto **Ic**:

**Ic,**

Composto **Id**:

**Id,**

e loro sali accettabili farmaceuticamente.

4. Composizione farmaceutica comprendente il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 e un veicolo accettabile farmaceuticamente.

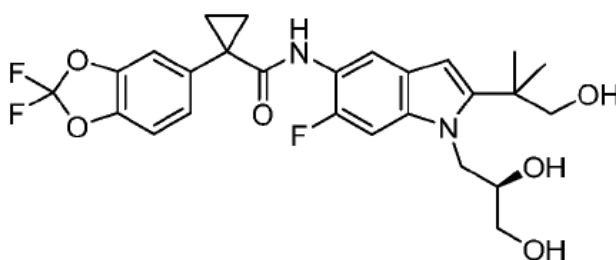
5. Composto di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, o composizione farmaceutica della rivendicazione 4, per uso in un metodo di trattamento di un disturbo mediato da CFTR, in cui il disturbo mediato da CFTR è CF.

6. Composizione farmaceutica della rivendicazione 4, o composto o composizione per l'uso della rivendicazione

5, in cui il composto è Composto I o un suo sale accettabile farmaceuticamente.

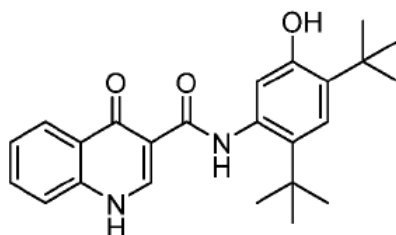
7. Composizione farmaceutica della rivendicazione 4 o 6, comprendente inoltre uno o più composti scelti tra:

Composto **II**:



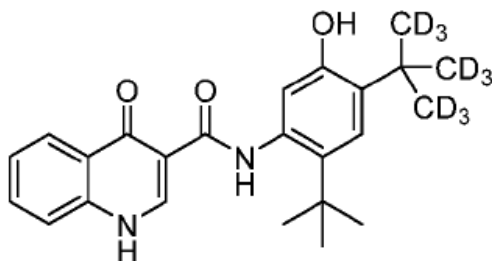
II,

Composto **III**:



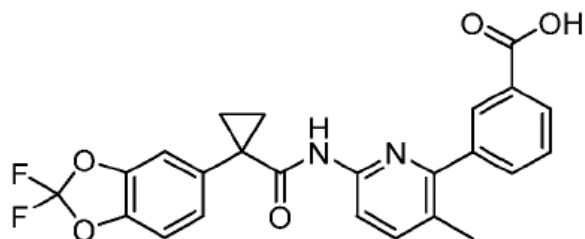
III,

Composto **III-d**:



III-d, e

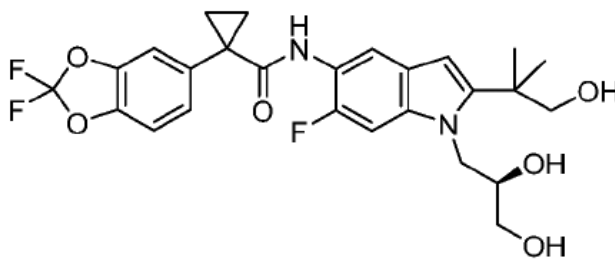
Composto **IV**:

**IV,**

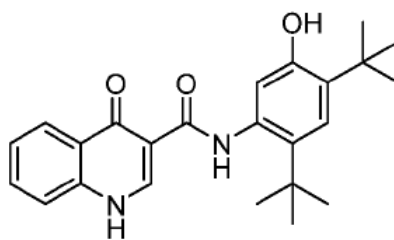
e sali accettabili farmaceuticamente dei Composti II, III, III-d e IV.

8. Composto o composizione per l'uso della rivendicazione 5 o 6 in cui il metodo comprende inoltre la somministrazione di uno o più composti scelti tra:

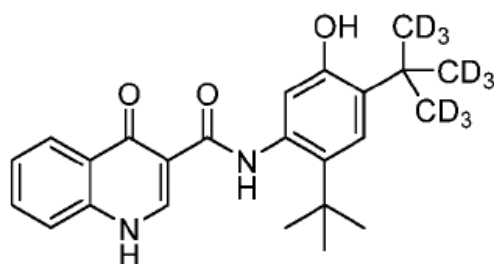
Composto **II**:

**II,**

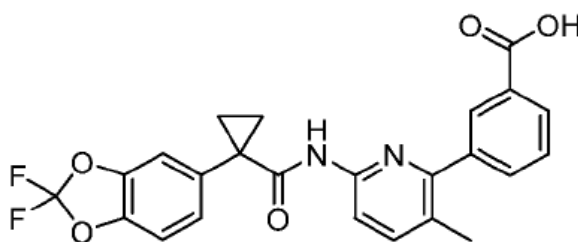
Composto **III**:

**III,**

Composto **III-d**:

**III-d, e**

Composto **IV**:

**IV,**

e sali accettabili farmaceuticamente dei Composti II, III, III-d e IV.

9. Composizione farmaceutica della rivendicazione 7, in cui la composizione farmaceutica comprende:

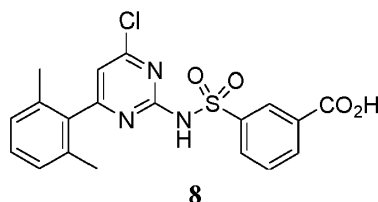
- (a) Composto I e Composto III o Composto III-d; o
- (b) Composto I, Composto II, e Composto III o Composto III-d.

10. Composto o composizione per l'uso della rivendicazione 8, in cui il metodo comprende la somministrazione di:

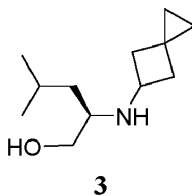
- (a) Composto I e Composto III o Composto III-d; o
- (b) Composto I, Composto II, e Composto III o Composto III-d.

11. Procedimento per preparare Composto I secondo la rivendicazione 1 comprendente:

- (i) il far reagire composto 8:

**8**

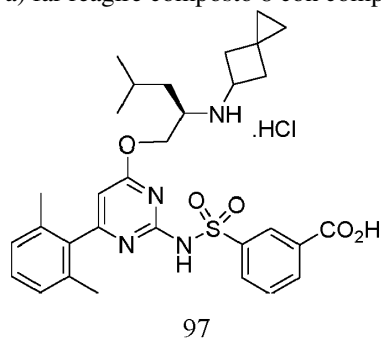
con composto 3:



per produrre Composto I; o

(ii)

a) far reagire composto 8 con composto 3, e successivo trattamento con HCl per produrre composto 9:



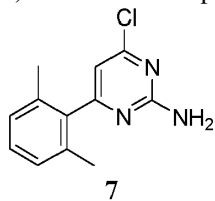
e

b) convertire composto 9 in Composto I.

12. Procedimento della rivendicazione 11, in cui:

(i) composto 8 viene preparato tramite

a) reazione di composto 7:

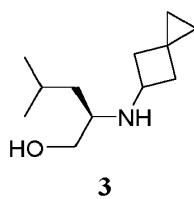


con metil 3-clorosolfonilbenzoato e una prima base,

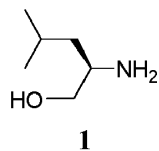
b) trattamento con una seconda base, e

c) trattamento della miscela di reazione con HCl per produrre composto 8; e/o

(ii) composto 3:



viene preparato facendo reagire composto 1:

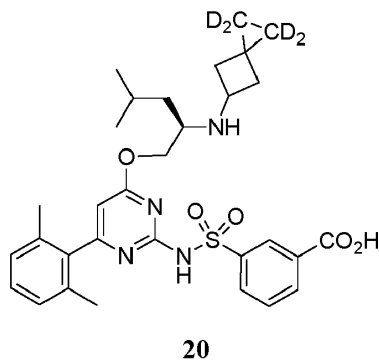


con composto 2:



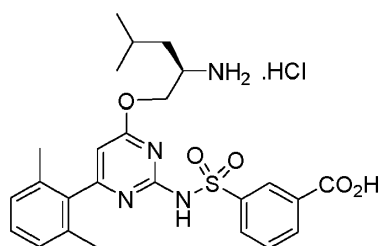
per produrre composto 3.

13. Procedimento per preparare Composto Ia secondo la rivendicazione 3, comprendente il convertire il composto 20:

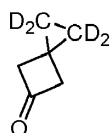


nel composto Ia.

14. Procedimento della rivendicazione 13, in cui composto 20 viene prodotto facendo reagire composto 19:

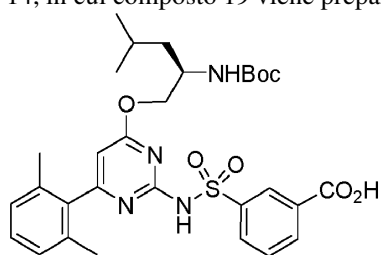
**19**

e composto 17:

**17**

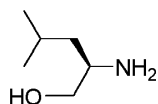
per produrre composto 20.

15. Procedimento della rivendicazione 14, in cui composto 19 viene preparato convertendo composto 18:

**18**

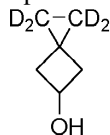
nel composto 19, opzionalmente in cui composto 18 viene preparato mediante

a) reazione del composto 8 con composto 1:

**1**

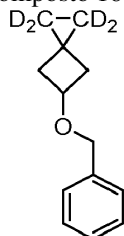
b) conversione del prodotto del passaggio a) nel composto 18.

16. Procedimento della rivendicazione 14, in cui composto 17 viene preparato convertendo composto 16:

**16**

in composto 17.

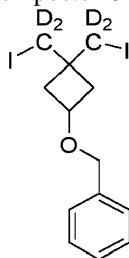
17. Procedimento della rivendicazione 16, in cui composto 16 viene preparato convertendo composto 15:



15

in composto 16.

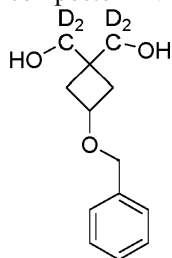
18. Procedimento della rivendicazione 17, in cui composto 15 viene preparato convertendo composto 14:



14

in composto 15.

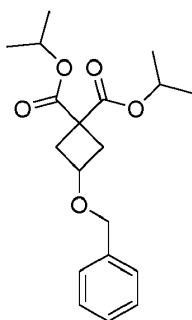
19. Procedimento della rivendicazione 18, in cui composto 14 viene preparato convertendo composto 13:



13

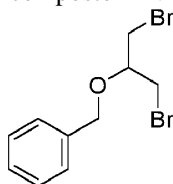
in composto 14.

20. Procedimento della rivendicazione 19, in cui composto 13 viene preparato convertendo composto 12:

**12**

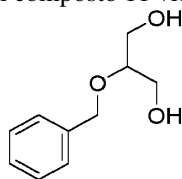
in composto 13.

21. Procedimento della rivendicazione 20, in cui composto 12 viene preparato facendo reagire composto 11:

**11**

con diisopropilpropanoato per formare composto 12.

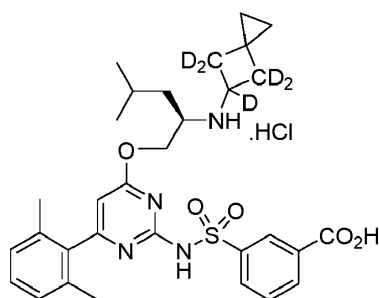
22. Procedimento della rivendicazione 21, in cui composto 11 viene preparato convertendo composto 10:

**10**

in composto 11.

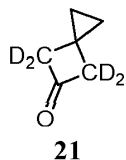
23. Procedimento per preparare Composto Ib secondo la rivendicazione 3 comprendente il convertire composto

22:

**22**

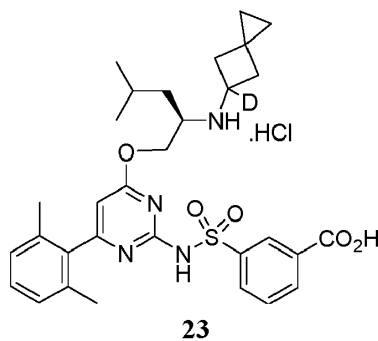
in composto Ib.

24. Procedimento della rivendicazione 23, in cui composto 22 viene preparato facendo reagire composto 19 con composto 21:



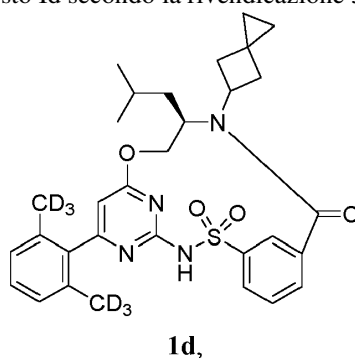
per produrre composto 22, opzionalmente in cui composto 21 viene preparato convertendo composto 2 in composto 21.

25. Procedimento per preparare Composto Ic secondo la rivendicazione 3 comprendente il convertire composto 23:

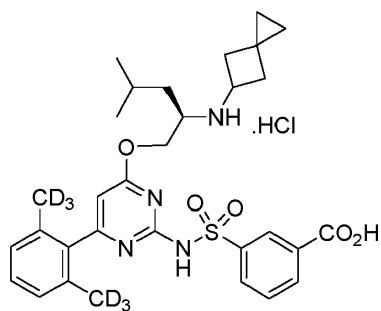


in composto Ic, opzionalmente in cui composto 23 viene preparato facendo reagire composto 19 con composto 2 per produrre composto 23.

26. Procedimento per preparare Composto Id secondo la rivendicazione 3:



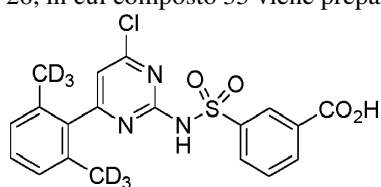
comprendente il convertire composto 35:



35

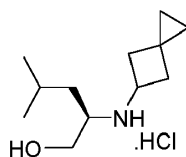
in composto Id.

27. Procedimento della rivendicazione 26, in cui composto 35 viene preparato facendo reagire composto 34:



34

con composto 3·HCl:

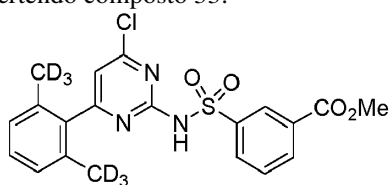


3·HCl

per produrre composto 35.

28. Procedimento della rivendicazione 27, in cui:

(a) composto 34 viene preparato convertendo composto 33:

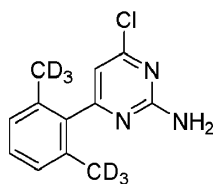


33

in composto 34; e/o

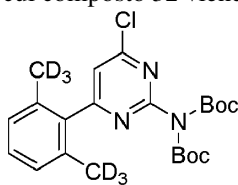
(b) composto 3·HCl viene preparato trattando composto 3 con HCl per produrre composto 3·HCl.

29. Procedimento della rivendicazione 28, in cui composto 33 viene preparato facendo reagire composto 32:

**32**

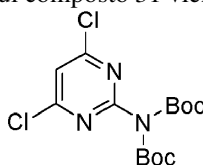
con metil 3-clorosolfonilbenzoato per produrre composto 33.

30. Procedimento della rivendicazione 29, in cui composto 32 viene preparato convertendo composto 31:

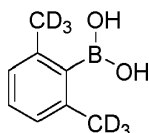
**31**

in composto 32.

31. Procedimento della rivendicazione 30, in cui composto 31 viene preparato facendo reagire composto 5:

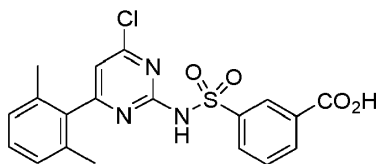
**5**

con composto 30:

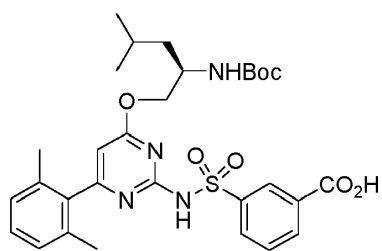
**30**

per produrre composto 31.

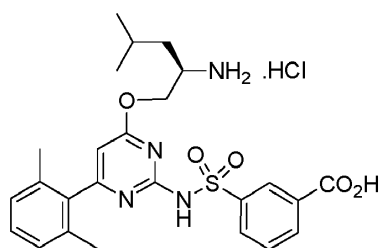
32. Composto scelto tra composto 8:

**8,**

composto 18:

**18,**

composto 19:

**19,**

loro derivati deuterati, e sali accettabili farmaceuticamente di uno qualsiasi dei suddetti.

Si dichiara che la presente traduzione è perfettamente conforme al testo originale.

Il mandatario

Società Italiana Brevetti S.p.A.