

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 166**

51 Int. Cl.:

**C07D 491/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10771606 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2488531**

54 Título: **Métodos de síntesis de compuestos de espiro-oxindol**

30 Prioridad:

**14.10.2009 US 251335 P**

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

**12.06.2014**

73 Titular/es:

**XENON PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)  
3650 Gilmore Way  
Burnaby, BC V5G 4W8, CA**

72 Inventor/es:

**CADIEUX, JEAN-JACQUES;  
CHAFEEV, MIKHAIL;  
CHOWDHURY, SULTAN;  
FU, JIANMIN;  
JIA, QI;  
ABEL, STEFANIE;  
EL-SAYED, EMAD;  
HUTHMANN, ELKE y  
ISARNO, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 467 166 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos de síntesis de compuestos de espiro-oxindol

**Campo de la invención**

5 La presente invención está dirigida a métodos mejorados de preparar determinados compuestos de espiro-oxindol, así como diversos productos intermedios implicados en los mismos. En particular, esta invención se dirige a métodos de preparar compuestos de espiro-oxindol, y sus sales farmacéuticamente aceptables, que son útiles en el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por el canal de sodio tal como dolor, así como otras enfermedades y afecciones asociadas con la mediación de los canales de sodio.

**Antecedentes de la invención**

10 Los canales de sodio juegan un conjunto diverso de papeles en el mantenimiento de los estados normales y patológicos, incluyendo el papel reconocido desde hace tiempo que los canales de sodio dependientes del voltaje desempeñan en la generación de actividad neuronal anormal y dolor neuropático o patológico. El daño a los nervios periféricos después de un traumatismo o enfermedad puede dar lugar a cambios en la actividad del canal de sodio y en el desarrollo de la actividad anormal aferente, incluidas descargas ectópicas de los aferentes axotomizados y la actividad espontánea de nociceptores intactos sensibilizados. Estos cambios pueden producir una hipersensibilidad anormal duradera a estímulos normalmente inocuos, o alodinia. Los ejemplos de dolor neuropático incluyen, pero no se limitan a neuralgia post-herpética, neuralgia del trigémino, neuropatía diabética, dolor crónico de la zona lumbar, dolor del miembro fantasma y dolor que resulta de cáncer y quimioterapia, dolor pélvico crónico, síndrome de dolor regional complejo y neuralgias relacionadas.

20 Ha habido algunos avances en el tratamiento de síntomas de dolor neuropático mediante el uso de medicamentos tales como gabapentina y, más recientemente, pregabalina como tratamientos de primera línea a corto plazo. Sin embargo, la farmacoterapia para el dolor neuropático en general ha tenido un éxito limitado con poca respuesta a fármacos reductores del dolor tales como los NSAIDs y los opiáceos. En consecuencia, todavía hay una necesidad considerable para explorar nuevas modalidades de tratamiento.

25 Sigue habiendo un número limitado de bloqueadores de los canales de sodio eficaces potentes con un mínimo de eventos adversos en la clínica. También hay una necesidad médica no satisfecha para tratar el dolor neuropático y otros estados patológicos asociados con el canal de sodio de manera eficaz y sin efectos secundarios adversos.

30 La Solicitud de Patente PCT Publicada N° WO 2006/110917, la Solicitud de Patente PCT Publicada N° WO 2010/45251 y la Solicitud de Patente PCT N° PCT/US2010/040187 describen determinados compuestos de espiro-oxindol. Estos compuestos se describen en estos documentos como útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por el canal de sodio, preferiblemente enfermedades relacionadas con el dolor, afecciones del sistema nervioso central tales como epilepsia, ansiedad, depresión y enfermedad bipolar; afecciones cardiovasculares tales como arritmias, fibrilación atrial y fibrilación ventricular; afecciones neuromusculares tales como el síndrome de piernas inquietas; neuroprotección contra la apoplejía, traumatismo neural y esclerosis múltiple; y canalopatías tales como eritromelalgia y el síndrome de dolor rectal familiar.

35 Métodos de preparación de estos compuestos y composiciones farmacéuticas que los contienen también se describen en la Solicitud de Patente PCT Publicada N° WO 2006/110917, la Solicitud de Patente PCT Publicada N° WO 2010/45251 y Solicitud de Patente PCT N° PCT/US2010/040187.

Existe, por lo tanto, una necesidad de métodos mejorados de preparar determinados compuestos espiro-oxindol.

40 Sircar et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry 2002, 10, páginas 2051 a 2066, describen la síntesis de derivados de bifenilalanina.

El documento US-A-2007/0049609 está dirigido a antagonistas de los receptores P2X3 y P2X2/3.

Guillaumet et al., Tetrahedron Letters 1988, 29(22), páginas 2665 a 2666, describen la síntesis de análogos de psoraleno.

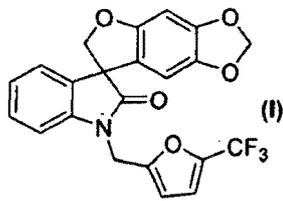
45 El documento WO-A-2005/105753 se refiere a derivados de naftalimida y a su uso en el tratamiento de enfermedades de proliferación celular.

**Compendio de la invención**

50 La presente invención se dirige a métodos para preparar determinados compuestos de espiro-oxindol como estereoisómeros individuales o enantiómeros individuales, o mezclas de los mismos, o como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Estos compuestos son útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por el canal de sodio tales como dolor.

El problema de la presente invención se resuelve sobre la base de las reivindicaciones 1 a 8.

Por consiguiente, en un aspecto, esta invención está dirigida a un método de preparar un compuesto de fórmula (I):

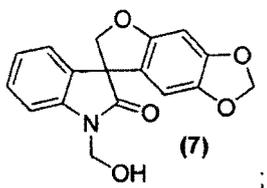


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual

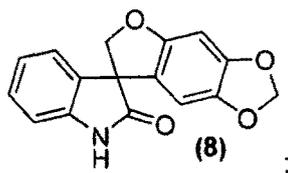
o una mezcla de los mismos;

5 en el que el método comprende:

tratar un compuesto de fórmula (7):

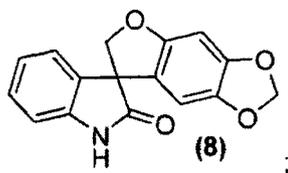


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con una base bajo condiciones adecuadas para forma un compuesto de fórmula (8):

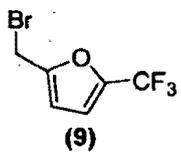


10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y tratar un compuesto de fórmula (8):

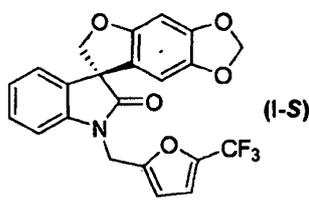


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un compuesto de fórmula (9):

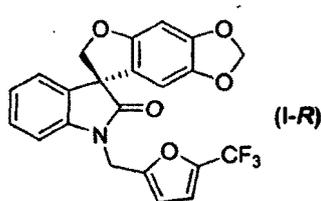


15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones adecuadas para proporcionar el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos.

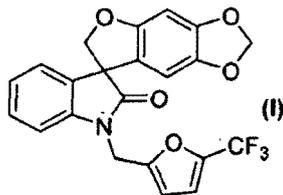
En otro aspecto, esta invención está dirigida a un método de preparar un compuesto de fórmula (I-S):



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto de fórmula (I-R):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el método comprende resolver un compuesto de fórmula (I):



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos; bajo condiciones adecuadas para proporcionar un compuesto de fórmula (I-S), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto de fórmula (I-R), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

### Descripción detallada de la invención

#### 10 Definiciones

Tal como se utiliza en la memoria y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado:

"Amino" se refiere al sustituyente -NH<sub>2</sub>.

"Ciano" se refiere al sustituyente -CN.

- 15 "Hidroxilo" se refiere al sustituyente -OH.

"Imino" se refiere al sustituyente =NH.

"Nitro" se refiere al sustituyente -NO<sub>2</sub>.

"Oxo" se refiere al sustituyente =O.

"Trifluorometilo" se refiere al sustituyente -CF<sub>3</sub>.

- 20 "Analgésia" se refiere a una ausencia de dolor en respuesta a un estímulo que normalmente es doloroso.

"Alodinia" se refiere a una afección en la que una sensación normalmente inocua tal como presión o tacto ligero es percibida como extremadamente dolorosa.

- 25 "Compuesto estable" y "estructura estable" pretenden indicar un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, y formulación en un agente terapéutico eficaz.

"Mamífero" incluye seres humanos y tanto animales domésticos como animales de laboratorio y mascotas domésticas, (p. ej., gatos, perros, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos y conejos), y animales no domésticos tales como animales salvajes.

"Sal farmacéuticamente aceptable" incluye las sales tanto por adición de ácidos como por adición de bases.

- 30 "Sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que conservan la eficacia y las propiedades de las bases libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseables, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, el ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido canfórico, ácido canfo-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico ácido, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico,
- 35

ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido múxico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiocianico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico.

"Sal por adición de bases farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Estas sales se preparan por adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Sales derivadas de bases inorgánicas incluyen las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio. Sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Sales derivadas de bases orgánicas incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se producen de forma natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio de iones, tales como amoniaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, benetamina, benzatina, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, *N*-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitclohexilamina, colina y cafeína.

"Tratar" o "tratamiento", tal como se utiliza en esta memoria, cubre el tratamiento de la enfermedad o afección de interés en un mamífero, preferiblemente un ser humano, que tiene la enfermedad o afección de interés, e incluye:

(i) prevenir que se produzca la enfermedad o afección en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero está predispuesto a la afección, pero aún no se le ha diagnosticado que la tenga;

(ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo;

(iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o afección; o

(iv) aliviar los síntomas resultantes de la enfermedad o afección, es decir, el alivio del dolor sin abordar la enfermedad o afección subyacente.

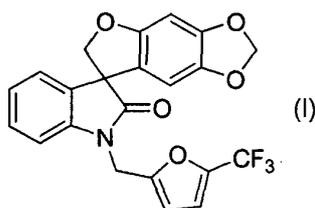
Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "enfermedad" y "afección" se pueden utilizar indistintamente, o pueden ser diferentes, ya que la enfermedad o afección particular puede no tener un agente causal conocido (de modo que la etiología aún no ha sido resuelta) y que aún no es, por tanto, reconocido como una enfermedad, sino sólo como una afección o síndrome no deseado, en el que un conjunto más o menos específico de síntomas han sido identificados por los médicos.

Los compuestos preparados en esta memoria pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden dar lugar a enantiómeros que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (*R*)- o (*S*)-, o como (*D*)- o (*L*)- para los aminoácidos. La presente invención se entiende que incluye todos estos posibles enantiómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Isómeros (+) y (-), (*R*)- y (*S*)- o (*D*)- y (*L*)- ópticamente activos se pueden preparar utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver utilizando técnicas convencionales, por ejemplo cromatografía y cristalización fraccionada, o por las técnicas descritas en esta memoria. Técnicas convencionales para la preparación/aislamiento de enantiómeros individuales incluyen síntesis quiral a partir de un precursor adecuado, ópticamente puro, o resolución del racemato (o del racemato de una sal o derivado) utilizando, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión quiral (HPLC).

Un "estereoisómero" se refiere a un compuesto formado por los mismos átomos unidos por los mismos enlaces, pero que tienen diferentes estructuras tridimensionales, que no son intercambiables. La presente invención contempla diversos estereoisómeros y mezclas de los mismos e incluye "enantiómeros", que se refiere a dos estereoisómeros cuyas moléculas son imágenes especulares una de otra que no se pueden superponer.

Los diagramas de protocolo y estructura de denominación química utilizados en esta memoria son una forma modificada del sistema de nomenclatura de la I.U.P.A.C., utilizando el programa de software 9.07 de ACD/Name version, en donde los compuestos de la invención se nombran en esta memoria como derivados de la estructura del núcleo central, es decir, la estructura 2-oxindol. Para los nombres químicos complejos empleados en esta memoria, un grupo sustituyente se nombra antes que el grupo al que se une. Por ejemplo, ciclopropiletilo comprende una cadena principal de etilo con sustituyente ciclopropilo. En los diagramas de estructura química, se identifican todos los enlaces, a excepción de algunos átomos de carbono, que se supone que están unidos a átomos de hidrógeno suficientes para completar la valencia.

Así, por ejemplo, un compuesto de fórmula (I):



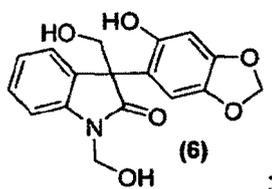
se denomina en este documento 1'-[[5-(trifluorometil)-2-furil]Metil]espiro[furo[2,3-f][1.3-benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona.

### Realizaciones de la invención

- 5 De los diversos aspectos de la invención expuesta anteriormente en el Sumario de la Invención, se prefieren determinadas realizaciones de los métodos descritos en esta memoria.

Del método de preparación de un compuesto de fórmula (I) tal como se expone anteriormente en el Compendio de la Invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos, una forma de realización es un método que comprende, además, la preparación del compuesto de fórmula (7), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde un compuesto de fórmula (6):

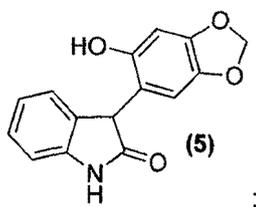
10



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se trata en condiciones de reacción de Mitsunobu estándar para formar un compuesto de fórmula (5), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

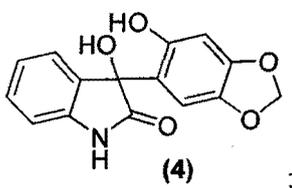
De esta realización, otra realización es un método que comprende, además, la preparación del compuesto de fórmula (6), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde un compuesto de fórmula (5):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se trata con un aldehído bajo condiciones adecuadas para formar el compuesto de fórmula (6), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

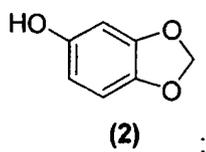
De esta realización, otra realización es un método que comprende, además, la preparación del compuesto de fórmula (5), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde un compuesto de fórmula (4):



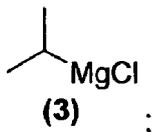
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se trata en condiciones adecuadas para formar el compuesto de fórmula (5), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25

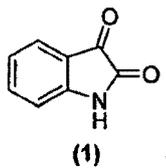
De esta realización, otra realización es un método que comprende, además, la preparación del compuesto de fórmula (4), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que un compuesto de fórmula (2):



(2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se trata con un reactivo de Grignard de fórmula (3):



bajo condiciones adecuadas para formar un producto intermedio; y el producto intermedio se hace reaccionar después con un compuesto de fórmula (1):



5 (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones adecuadas para formar el compuesto de fórmula (4), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Realizaciones específicas de los métodos de la invención, incluyendo las condiciones adecuadas para cada una de las etapas descritas anteriormente, se describen con más detalle a continuación en los Métodos de la Invención.

#### 10 **Métodos de la invención**

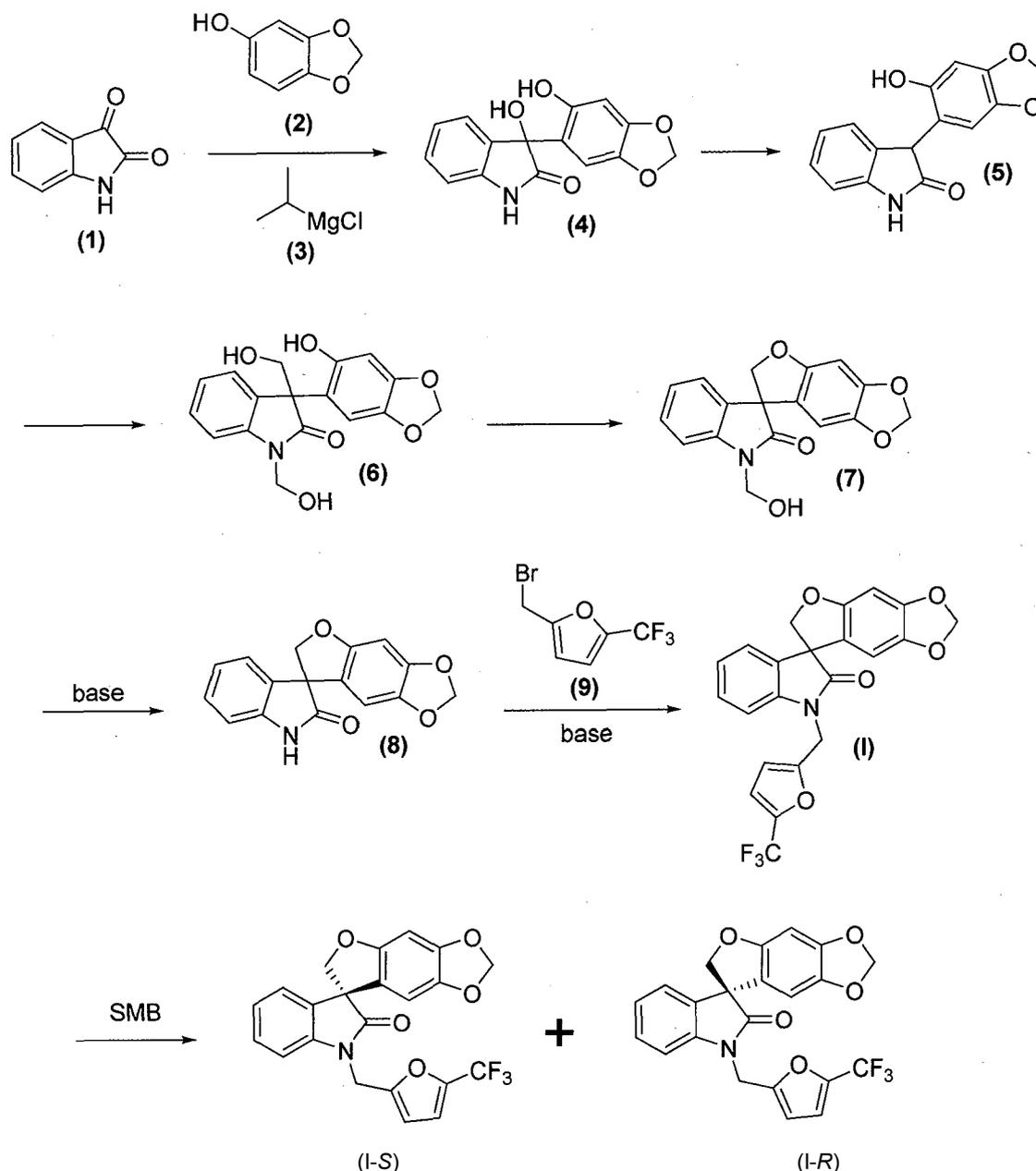
Los métodos de la invención se dirigen a métodos de preparación de compuestos de fórmulas (I) y (II) y los compuestos de fórmulas (I-S), (I-R), (II-S) y/o (II-R) tal como se describe en esta memoria, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 En general, los componentes de partida se pueden obtener a partir de fuentes tales como Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI, y Fluorochem USA, etc. o se pueden sintetizar de acuerdo con fuentes conocidas por los expertos en la técnica (véase, *p. ej.*, Smith, M.B. y J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 5ª edición (Wiley, diciembre de 2000)) o se pueden preparar tal como se describe en esta memoria o mediante los métodos descritos en la Solicitud de Patente PCT Publicada N° WO 2006/110917, la Solicitud de Patente PCT Publicada N° WO 2010/45251 y la Solicitud de Patente PCT N° 20 PCT/US2010/040187.

Preparación de los Compuestos de Fórmulas (I), (I-S) y (I-R)

Compuestos de fórmulas (I), (I-S) y (I-R) se preparan tal como se describe a continuación en el Esquema de Reacción 1:

## ESQUEMA DE REACCIÓN 1



5 Compuestos de fórmula (1), fórmula (2), fórmula (3) y fórmula (9) se encuentran comercialmente disponibles, o se pueden preparar por métodos conocidos por un experto en la técnica.

En general, los compuestos de fórmula (I), (I-S) y (I-R) se preparan por el método descrito anteriormente en el Esquema de Reacción 1, haciendo reaccionar primero un compuesto de fórmula (2) con un reactivo de Grignard adecuado (tal como el de fórmula (3)) en condiciones adecuadas tales como a una temperatura de entre aproximadamente -25°C y aproximadamente 25 °C, preferiblemente a aproximadamente 0°C, para permitir la formación de un producto intermedio de haluro de magnesio. Este producto intermedio sufre una adición nucleófila con el grupo ceto-carbonilo del compuesto de isatina de fórmula (1) en condiciones adecuadas tales como en un disolvente, preferiblemente tetrahidrofurano o diclorometano, para proporcionar el compuesto de oxindol de fórmula (4).

La separación del grupo hidroxilo en la posición C-3 del anillo de oxindol en el compuesto de fórmula (4) se consigue por tratamiento del compuesto de fórmula (4) en condiciones adecuadas, tal como tratamiento con un reactivo de silano, tal como trietilsilano, en presencia de un ácido tal como ácido trifluoroacético, para proporcionar el compuesto de fórmula (5). La separación del grupo hidroxilo también se puede lograr por tratamiento del compuesto de fórmula (4) en condiciones adecuadas tales como el tratamiento con  $\text{SOCl}_2/\text{NEt}_3$ , seguido de la reducción del compuesto intermedio resultante con polvo de Zn, para dar el compuesto de fórmula (5). Alternativamente, la separación se puede lograr por tratamiento del compuesto de fórmula (4) con ácido yodhídrico para dar el compuesto de fórmula (5).

El compuesto de fórmula (5) se trata a continuación, en condiciones adecuadas tales como el tratamiento con una base, preferiblemente diisopropilamina, diisopropiletilamina, diisopropilamida de litio, hidróxido de litio o hidróxido de sodio, seguido de reacción con formaldehído o paraformaldehído, para proporcionar el compuesto intermedio hidroximetilo de fórmula (6).

- 5 La ciclación intramolecular del compuesto de fórmula (6) para proporcionar el compuesto de fórmula (7) se logra por tratamiento del compuesto de fórmula (6) en condiciones de reacción de Mitsunobu estándares tales como el empleo de un reactivo de fosfina, preferiblemente trifenilfosfina o tributilfosfina, y un reactivo azo, preferiblemente azodicarboxilato de dietilo, azodicarboxilato de diisopropilo, azodicarboxilato de di-*terc.*-butilo o tetrametil-diazonodocarboxamida, en un disolvente, preferiblemente tetrahidrofurano, diclorometano o acetato de etilo. El compuesto resultante de fórmula (7) se puede aislar de la mezcla de reacción por técnicas estándar de aislamiento o se puede utilizar directamente en la siguiente etapa sin ser aislado de la mezcla de reacción.

Alternativamente, la ciclación intramolecular se logra por tratamiento del compuesto de fórmula (6) con un *bis*-electrófilo adecuado tal como, pero no limitado a

- 15 cloroyodometano en presencia de una base tal como, pero no limitados a carbonato de cesio, en un disolvente adecuado tal como *N,N*-dimetilformamida o metil-etil-cetona, para proporcionar un compuesto de fórmula (8).

La separación del grupo hidroximetilo en el nitrógeno del compuesto de fórmula (7) se logra por tratamiento del compuesto de fórmula (7) con una base, preferiblemente hidróxido de sodio, hidróxido de litio o hidróxido de amonio, bajo condiciones adecuadas para proporcionar un compuesto de fórmula (8), que puede ser aislado de la mezcla de reacción por técnicas estándar de aislamiento.

- 20 El compuesto de fórmula (8) se hace reaccionar después con un electrófilo de fórmula (9) en condiciones adecuadas tales como en presencia de una base, preferiblemente hidruro de sodio, carbonato de cesio o hidróxido de sodio, en un disolvente, preferiblemente *N,N*-dimetilformamida, acetonitrilo, tetrahidrofurano o acetona, para producir el compuesto de fórmula (I), que puede ser aislado de la mezcla de reacción por técnicas estándar de aislamiento.

- 25 El compuesto de fórmula (I) se puede resolver en el enantiómero (*S*) (es decir, el compuesto de fórmula (I-*S*)) y el correspondiente enantiómero (*R*) (es decir, el compuesto de fórmula (I-*R*)) en condiciones adecuadas, por ejemplo por separación cromatográfica quiral tal como cromatografía de lecho móvil simulado o HPLC quiral.

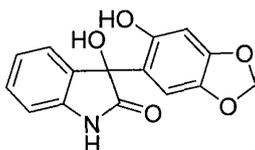
- 30 Todos los compuestos descritos anteriormente como preparados que pueden existir en forma de base libre o de ácido se pueden convertir en sus sales farmacéuticamente aceptables por tratamiento con la base o ácido inorgánico u orgánico apropiado. Sales de los compuestos preparados anteriormente se pueden convertir en su forma de base o ácido libre mediante técnicas estándar. Se entiende que todos los polimorfos, formas amorfas, anhidratos, hidratos, solvatos y sales de los compuestos de fórmula (I) pretenden estar dentro del alcance de la invención. Además de ello, todos los compuestos de fórmula (I) que contienen un grupo ácido o un grupo éster se pueden convertir en el éster o ácido correspondiente, respectivamente, por métodos conocidos para un experto en la técnica o por métodos descritos en este documento.

- 35 Las siguientes Preparaciones Sintéticas específicas (para la preparación de materiales de partida y compuestos intermedios) y los Ejemplos de Síntesis (para la preparación de los compuestos de fórmula (I) por los métodos de la invención) se proporcionan como una guía para ayudar en la práctica de la invención. En los casos en los que se dan uno o más RMNs para un compuesto particular, cada uno de los RMNs puede representar un único estereoisómero, una mezcla no racémica de estereoisómeros o una mezcla racémica de los estereoisómeros del compuesto.

- 40 Preparación sintética 1

Síntesis de 3-hidroxi-3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona

Compuesto de fórmula (4)



- 45 Un reactor de 630 L se cargó con sesamol (42,6 kg, 299 mol). Se añadió tetrahidrofurano (400 kg) y la disolución resultante se enfrió a 1°C a lo largo de 42 minutos. Cloruro de isopropilmagnesio (disolución 2 M en tetrahidrofurano, 173 kg, 337 mol) se añadió a lo largo de 2 h de modo que la temperatura interna se mantuvo entre 0 y 4 °C. Una vez que se completó la adición, la temperatura interna se redujo a -5 °C y se añadió isatina (37,9 kg, 250 mol) en cuatro porciones. La mezcla de reacción se agitó durante 2,75 h a 1 a 3 °C. Un reactor de 1000 L se cargó con cloruro de amonio (72 kg), seguido de agua desionizada (356 kg). La mezcla se agitó a 15 °C hasta que el sólido se había disuelto por completo y la disolución resultante se enfrió a 1°C a lo largo de 1 h. El contenido del reactor de 630 L se transfirió al reactor de 1000 L a lo largo de 1 h de manera que la temperatura interna se mantuvo entre 3 y 4°C. El reactor de 630 L

se aclaró con tolueno (133 kg) y la disolución de lavado se añadió al reactor de 1000 L. El contenido del reactor de 1000 L se dejó calentar a 20-25 °C a lo largo de 29 minutos y se agitó durante otros 15 minutos. Se detuvo la agitación y los contenidos del reactor se mantuvieron a 25 °C durante 15 minutos, permitiendo que se separaran las fases. La fase acuosa se retiró y una disolución de cloruro de sodio (42 kg) en agua desionizada (218 kg) se añadió a lo largo de 25 minutos a una temperatura interna de 22-24 °C. La agitación se detuvo y la mezcla se mantuvo a 25 °C durante 1 h, permitiendo que se separaran las fases. La fase orgánica se desgasificó durante 0,5 h con nitrógeno y se añadió tolueno (89 kg). Se aplicó un vacío de 300 mbar al reactor y la temperatura externa del reactor se ajustó a 50-60 °C. Los componentes volátiles de la mezcla se separaron por destilación a lo largo de un periodo de 12 h de tal manera que se recogieron 670 L de destilado. La temperatura externa del reactor se ajustó a 20-25 °C. Se depositó un precipitado de color naranja tras el enfriamiento. Se añadió tolueno (114 kg) y la suspensión se agitó durante 10 minutos. El sólido se recogió por filtración, se lavó con *tert.*-butil-metil-éter (171 kg) y heptano (85 kg) y se secó a 55-60 °C bajo una presión reducida de 170 a 4 mbar a lo largo de un periodo de 10,5 h para proporcionar 3-hidroxi-3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona (73,5 kg, rendimiento cuantitativo) en forma de un sólido rosa pálido: pureza (HPLC-UV a 300 nm) 99,3% a/a; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,18 (s, 1 H), 9,08 (s, 1 H), 7,21-7,07 (m, 2H), 6,88-6,74 (m, 3H), 6,38 (s ancho, 1H), 6,23 (s, 1 H), 5,92 (s, 2H); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 178,4, 148,4, 146,6, 143,0, 139,4, 133,2, 128,6, 123,8, 121,1, 120,1, 109,0, 106,8, 100,8, 97,4, 75,1.

## Preparación sintética 2

Síntesis de 3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona

Compuesto de fórmula (5)

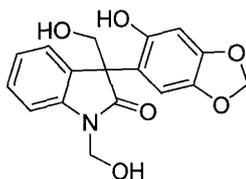


Un reactor de 1600 L se cargó con 3-hidroxi-3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona (113,1 kg, 396 moles), se hizo el vacío y se llenó con nitrógeno. Se añadió ácido trifluoroacético (679 kg) en dos porciones a lo largo de 20 minutos y la temperatura interna se redujo a 10 °C a lo largo de 1 h. Se añadió trietilsilano (69,2 kg, 595 mol) a lo largo de 2 h 05 min a 10-11 °C y la mezcla se agitó durante 0,5 h adicionales a 10-11 °C. Un reactor de 1000 L se cargó con heptano (524 kg) y *tert.*-butil-metil-éter (63 kg). El contenido del reactor de 1000 L se transfirió al reactor de 1600 L a lo largo de 13 minutos a una temperatura interna de 10-11 °C. La suspensión de color amarillo-naranja resultante se dejó calentar a 23 °C durante 1 h. El sólido se recogió por filtración, se lavó con heptano (464 kg) seguido de *tert.*-butil-metil-éter (57 kg) y se secó a 50 °C bajo una presión reducida de 58 hasta 7 mbar a lo largo de un periodo de 25 h para proporcionar 3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona (82,8 kg, 75%) en forma de un sólido de color blanco: pureza (HPLC-UV a 300 nm) 98,0% a/a; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,40 (s, 1H), 9,25 (s, 1H), 7,17-7,10 (m, 1H), 6,95-6,81 (m, 3H), 6,55 (s, 1H), 6,43 (s, 1H), 5,92-5,85 (m, 2H), 4,66 (s, 1H); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 177,9, 150,1, 146,6, 142,7, 139,6, 130,9, 127,4, 123,8, 121,2, 115,9, 109,5, 109,0, 100,7, 97,8, 55,0.

## Preparación sintética 3

Síntesis de 3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-bis(hidroximetil)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona

Compuesto de fórmula (6)



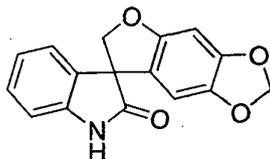
Un reactor de 1000 L se cargó con 3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona (56,3 kg, 209 mol), seguido de paraformaldehído (25,4 kg, 847 mol) y agua desionizada (285 kg). La mezcla de reacción se enfrió a una temperatura interna de 5°C a lo largo de 25 minutos y una disolución acuosa de hidróxido de sodio (113 kg, 847 mol) al 30% en peso se añadió a 5 °C a lo largo de 40 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 5°C. Un segundo reactor de 1000 L se cargó con agua desionizada (260 kg) y ácido clorhídrico al 32% (124 kg). El contenido del primer reactor se añadió al contenido del segundo reactor a 1 °C a lo largo de 80 minutos. El primer reactor se aclaró con agua desionizada (35 kg) y la disolución de aclarado se transfirió al segundo reactor. La suspensión resultante se agitó a 1 °C durante 1 h y el sólido se recogió por filtración, se lavó con una mezcla de ácido clorhídrico concentrado (11 kg) y agua (20 kg) y se secó a 55-60 °C bajo una presión reducida de 50 a 6 mbar a lo largo de un periodo de 24 horas para

proporcionar 3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-bis(hidroximetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (69,8 kg, 99%) en forma de un sólido de color pardo pálido: pureza (HPLC-UV a 230 nm) 95,4% a/a; <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) 9,06 (s, 1H), 7,17-6,84 (m, 5H), 6,19-6,10 (m, 2H), 5,86 (s, 2H), 5,12-4,92 (m, 3H), 4,11-4,06 (m, 1H), 3,79-3,73 (m, 1H), <sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz) δ 179,0, 150,5, 146,7, 143,9, 139,9, 132,6, 127,4, 124,0, 121,9, 118,2, 108,7, 108,6, 101,1, 98,0, 65,4, 63,2, 56,2.

Preparación sintética 4

Síntesis de espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona

Compuesto de fórmula (8)

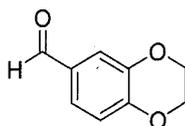


Un reactor de 1000 L se cargó con 3-(6-hidroxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-bis (hidroximetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (65,0 kg, 197 mol), seguido de tetrahidrofurano (586 kg). La disolución resultante se enfrió a -4°C a lo largo de 20 minutos y se añadió tri-*n*-butilfosfina (40,0 kg, 197 mol) a lo largo 6 minutos, seguido de una disolución de azodicarboxilato de diisopropilo (44,8 kg, 197 mol) en tetrahidrofurano (75 kg) a lo largo de 125 minutos de modo que la temperatura interna permaneció por debajo de 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a -3 °C a lo largo de otros 25 minutos y el contenido del reactor se transfirió a un reactor de 2500 L. El reactor de 1000 L se aclaró con tetrahidrofurano (16 kg) y la disolución de aclarado se añadió al reactor de 2500 L. Se añadió una disolución de amoniaco al 25% en peso en agua (118 kg) a -3 a -2°C a lo largo de 30 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar a 25°C a lo largo de 1,25 h y se agitó durante 2 h adicionales. Se añadió agua desionizada (650 kg) y acetato de etilo (585 kg) y la mezcla se calentó a 40 °C a lo largo de 40 minutos. Después de agitar durante 15 minutos adicionales, se detuvo la agitación y se dejó que las fases se separaran durante 1 h. La fase acuosa se separó y se añadió agua desionizada (650 kg). La mezcla se agitó durante 15 minutos a 40 °C. La agitación se detuvo y se dejó que las fases se separaran durante 1 h. La fase acuosa se separó y se añadió agua desionizada (325 kg). La mezcla se concentró parcialmente por destilación bajo presión reducida a una temperatura interna de 21-39 °C y una presión de 382 a 98 mbar hasta haber recogido 950 L de destilado a lo largo de un período de 4,5 h. Se añadió metanol (1600 kg) y la mezcla se calentó a 60 °C a lo largo de 35 minutos. La mezcla se concentró parcialmente por destilación bajo presión reducida a una temperatura interna de 32-58 °C y una presión de 530 a 170 mbar hasta haber recogido 1260 L de destilado a lo largo de un período de 9,33 h. La suspensión resultante se dejó enfriar a 22 °C durante 2 h y se agitó durante 6 h adicionales. El sólido se recogió por filtración, se lavó con una mezcla de metanol (34 kg) y agua desionizada (17 kg) y se secó a 55-60 °C bajo una presión reducida de 50 a 3 mbar a lo largo de un período de 31 h para proporcionar 35,8 kg de un sólido de color pardo, que se transfirió a un reactor de 400 L. Se añadió metanol (163 kg) y la suspensión resultante se agitó durante 0,5 h. La mezcla se calentó a reflujo a lo largo de un período de 35 minutos y se calentó a reflujo durante 15 minutos adicionales. Se añadió agua desionizada (33 kg) y la mezcla se calentó a reflujo durante 155 minutos. La suspensión se filtró mientras estaba caliente y la torta del filtro se lavó con una mezcla de metanol (22 kg) y agua desionizada (11 kg) y se secó a 55-60 °C bajo una presión reducida de 50 a 4 mbar a lo largo de un período de 8 h para proporcionar espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona (30,44 kg, 49%) en forma de un sólido de color pardo pálido: pureza (HPLC-UV a 230 nm) 89,4%; EM (ES+) m/z 282,3 (M + 1); <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDC<sub>3</sub>) 610,56 (s, 1 H), 7,27-6,92 (m, 4H), 6,67 (s, 1H), 6,26 (s, 1H), 5,93 (s, 2H), 4,79-4,64 (m, 2H).

Preparación sintética 5

Síntesis de 2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carbaldehído

Compuesto de fórmula (11)



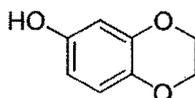
Un reactor de 2000 L se cargó con acetona (404,5 kg), seguido de carbonato de potasio (256 kg, 1852 moles) y 1,2-dibromoetano (241,5 kg, 1298 mol). La mezcla se calentó a reflujo. Un reactor de 500 L se cargó con acetona (606 kg) y 3,4-dihidroxibenzaldehído (128 kg, 926 mol). El contenido del reactor de 500 L se añadió al reactor de 2000 L a una tasa de 150-180 kg/h al tiempo que la temperatura de reacción se mantuvo a 50-60 °C. La mezcla de reacción se agitó a 54-60 °C durante 12 h, se enfrió a 20 °C y se filtró a través de un filtro de Buchner de 500 L. La torta del filtro se lavó con acetona (2 x 202 kg). Los líquidos de lavado del filtrado y de acetona se combinaron en un reactor de 2000 L y la disolución resultante se concentró a sequedad bajo presión reducida a una temperatura < 40°C. Al residuo se añadió

acetato de etilo (683 kg) y la disolución resultante se lavó con disolución acuosa de carbonato de potasio al 5% en peso (256 kg). La mezcla se agitó durante 0,5 h, se dejó sedimentar durante 0,5 h y se separó la fase acuosa. Este proceso de lavado se repitió tres veces en total. La fase orgánica se dejó temporalmente a un lado en tambores. Un reactor de 2000 L se cargó con los líquidos de lavado acuosos reunidos, seguido de acetato de etilo (113,9 kg). La mezcla se agitó durante 0,5 h, se dejó sedimentar durante 0,5 h y se separó la fase acuosa. Se añadió la fase orgánica de los tambores al reactor, seguido por una disolución acuosa de cloruro de sodio al 28% en peso (192 kg). La mezcla se agitó durante 0,5 h, se dejó sedimentar durante 0,5 h y se separó la fase acuosa. La fase orgánica se concentró a presión reducida a una temperatura < 45 °C hasta que el contenido en acetato de etilo de la mezcla estaba por debajo de 10% (según se determina por cromatografía de gases). Se añadió éter de petróleo (268,8 kg) al residuo a una tasa de 80-90 kg/h al tiempo que la mezcla se mantuvo a una temperatura de 35-45 °C. La mezcla se enfrió a 5 °C a lo largo de 3 h y se mantuvo a esta temperatura durante una 1 h más, tiempo durante el cual se depositó un precipitado. La suspensión resultante se filtró a través de un filtro de centrifuga y se secó para proporcionar 2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carbaldehído (111,4 kg, 73%) en forma de un sólido de blancuzco: pureza (HPLC-UV a 230 nm) 99,3%.

## 15 Preparación sintética 6

Síntesis de 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ol

Compuesto de fórmula (12)

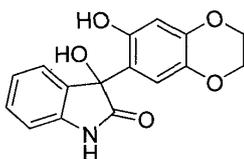


Un reactor de 2000 L se cargó con diclorometano (1303,4 kg) seguido de 2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carbaldehído (98,0 kg, 597 mol) y se agitó hasta que se obtuvo una disolución homogénea. Se añadió ácido 3-cloroperoxibenzoico (144,3 kg, 836 mol). La mezcla se calentó a reflujo a una tasa de 8-10 °C/h, se calentó a reflujo durante 6 h adicionales y se dejó enfriar a 20 °C. La suspensión resultante se filtró a través de un filtro de Buchner de 500 L y la torta del filtro se lavó con diclorometano (391 kg). El filtrado y la disolución de lavado se transfirieron a un reactor de 2000 L. Se añadió una disolución acuosa al 7% en peso de bicarbonato de sodio (212,7 kg) y la mezcla se agitó durante 0,5 h. La agitación se detuvo y las fases se dejaron separar a lo largo de 0,5 h. Se separó la capa acuosa. El proceso de lavado de bicarbonato de sodio acuoso se repitió tres veces en total. La fase orgánica se concentró a sequedad bajo presión reducida a una temperatura < 30°C. Se añadió metanol (116,1 kg) y la mezcla resultante se enfrió a 0 °C. Se añadió una disolución acuosa de hidróxido de sodio al 15,5% en peso (234,3 kg) a una tasa de 30 - 40 kg/h de modo que la temperatura de la mezcla se mantuvo entre 0-10 °C. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 2,25 h adicionales y el pH de la mezcla se ajustó a 6-7 mediante la adición de ácido clorhídrico 4 N (266,5 kg) de modo que la temperatura de la mezcla se mantuvo entre 0-10 °C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se extrajo tres veces en total con metil-terc.-butil-éter (145 kg para cada una de las extracciones) agitando durante 0,5 h, deteniendo la agitación y permitiendo que se separen las fases durante 0,5 h. Los extractos orgánicos reunidos se lavaron tres veces en total con una disolución acuosa al 7% de bicarbonato de sodio (212,7 kg para cada uno de los líquidos de lavado) agitando durante 0,5 h, deteniendo la agitación, permitiendo que las fases se separaran durante 0,5 h y separando la fase acuosa. Después, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa al 30% en peso de cloruro de sodio (212,7 kg) agitando durante 0,5 h, deteniendo la agitación, permitiendo que las fases se separaran durante 0,5 h y separando la fase acuosa. La fase orgánica se concentró a sequedad bajo presión reducida a una temperatura < 45°C. Se añadió tetrahidrofurano (170 kg) y la disolución resultante se concentró a sequedad bajo presión reducida a una temperatura < 45 °C. Se añadió tetrahidrofurano adicional (17,1 kg) y la disolución resultante se concentró a sequedad bajo presión reducida a una temperatura < 45°C. Se añadió tetrahidrofurano (122,5 kg) para proporcionar una disolución de color pardo-rojo de 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ol (86,3 kg, 95%) en tetrahidrofurano que se llevó adelante sin purificación adicional: pureza (HPLC-UV a 220 nm) 95,7%.

Preparación sintética 7

## 45 Síntesis de 3-hidroxi-3-(7-hidroxi-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona

Compuesto de fórmula (13)



Un reactor de 1000 L se cargó con tetrahidrofurano (296,8 kg). El tetrahidrofurano se calentó a reflujo durante 1 h y se dejó enfriar a la temperatura ambiente. Se añadieron magnesio (15,0 kg, 625 mol), yodo (19,5 g, cantidad catalítica) y bromoetano (147,0 g, cantidad catalítica) a una temperatura de 15-30 °C. La mezcla resultante se calentó a 50-55 °C

durante 0,5 h y se añadió 2-cloropropano (4,5 kg, 57 mol), seguido de una disolución 2 M de cloruro de isopropilmagnesio en tetrahidrofurano (7,6 kg, cantidad catalítica). 2-cloropropano (39,2 kg, 500 mol) se añadió a una tasa de 8-10 kg/h de modo que la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo entre 55-70 °C. La mezcla de reacción se calentó a 58-68 °C durante 3 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h adicionales.

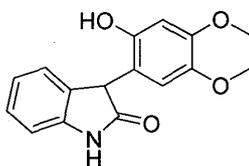
5 Un reactor de 2000 L se cargó con una disolución de 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ol (86,3 kg, 567 mol) en tetrahidrofurano (122,5 kg), seguido de tetrahidrofurano adicional (804,1 kg). La disolución resultante se enfrió a 0 °C y el contenido del reactor de 1000 L se añadió al reactor de 2000 L a una tasa de 30-50 kg/h de modo que la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo entre 0-5 °C. El reactor de 1000 L se aclaró tres veces con tetrahidrofurano (5 kg para cada uno de los aclarados) y las disoluciones de aclarado se añadieron al reactor de 2000 L.

10 La mezcla de reacción se agitó a 7-13 °C durante 1 h y se enfrió a -5°C. Se añadió isatina (69,5 kg, 472,5 mol) en tres porciones iguales a lo largo de 0,5 h y la mezcla se agitó durante 0,5 h a -5-0 °C. La mezcla de reacción se calentó a 50-55 °C durante 7,5 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Un reactor de 5000 L se cargó con agua (576,9 kg) y cloruro de amonio (118,2 kg). La disolución resultante se enfrió a 0-5 °C. El contenido del reactor de 2000 L se añadió al reactor de 5000 L a una tasa de 300-500 kg/h de modo que la temperatura de la mezcla se mantuvo entre 0-5°C. La mezcla se agitó a 15-25 °C durante 0,5 h y se detuvo la agitación. Las fases se dejaron separar durante 1 h y se separó la fase acuosa. Se añadió una disolución acuosa al 27% en peso de cloruro de sodio (69,6 kg) y la mezcla se agitó durante 0,5 h. Se detuvo la agitación, se dejó que las fases se separaran durante 1 h y se retiró la capa acuosa. El proceso de lavado con cloruro de sodio acuoso se repitió dos veces en total. La fase orgánica se transfirió a un reactor de 2000 L y se concentró a presión reducida a una temperatura de 45-55 °C. Se añadió tolueno (302,3 kg) al residuo a una tasa de 90 - 130 kg/h y a una temperatura de 45-50 °C. La mezcla resultante se enfrió a 15 °C a una tasa de 8-10 °C/h y se agitó durante a 10-15 °C durante 1 h adicional. La suspensión resultante se filtró a través de un filtro centrífugo y la torta del filtro se lavó con agua (69,5 kg) y se secó a 45-50 °C para proporcionar 3-(7-hidroxi-3-(7-hidroxi-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (130,8 kg, 93%) en forma de un sólido blancuzco: pureza (HPLC-UV a 210 nm) 99,7%.

#### 25 Preparación sintética 8

Síntesis de 3-(7-hidroxi-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona

Compuesto de fórmula (14)

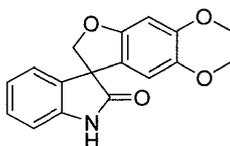


Un reactor de 2000 L se cargó con diclorometano (489,4 kg), seguido de 3-(7-hidroxi-3-(7-hidroxi-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (92,0 kg, 307 mol) en cuatro porciones de 23 kg a lo largo de 1 h. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se añadió trietilsilano (107,2 kg, 921 mol). La mezcla se enfrió a -5 °C y se añadió ácido trifluoroacético (105,1 kg, 921 mol) a una tasa de 25-30 kg/h de modo que la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 0 °C. La mezcla se agitó a -5-0 °C durante 2,5 h, se calentó a 18-20 °C, se agitó durante otras 6,5 h y se concentró a sequedad bajo presión reducida a una temperatura < 30°C. Se añadió metil-*terc*-butil-éter (139,8 kg) al residuo a 15-20 °C y la mezcla se concentró hasta casi sequedad bajo presión reducida a una temperatura < 35°C. La mezcla se filtró en un filtro centrífugo y un reactor de 2000 L se cargó con la torta de filtración, seguido de metanol (72,7 kg). La mezcla se agitó a 10-15 °C durante 0,5 h y se filtró en un filtro centrífugo. La torta del filtro se secó a presión reducida a 40-50°C para proporcionar 3-(7-hidroxi-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (68,0 kg, 78%) en forma de un sólido incoloro: pureza (HPLC-UV a 254 nm) 99,3%.

#### 40 Preparación sintética 9

Síntesis de 2,3-dihidroespiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2'(1'H)-ona

Compuesto de fórmula (15)



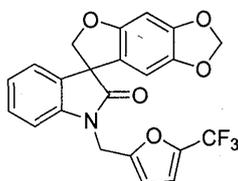
45 Un cristalizador de acero inoxidable de 2000 L se cargó *N,N*-dimetilformamida (113,7 kg) y tetrahidrofurano (1070,9 kg). El contenido se enfrió a 0-5°C y se añadió 3-(7-hidroxi-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (12,0 kg, 42,4 mol), seguido de carbonato de cesio (30,4 kg, 93,3 mol). Se añadió una disolución de cloroyodometano (9,4 kg, 53,7 mol) en *N,N*-dimetilformamida (16,9 kg) a una tasa de 39,5 kg/h de modo que se mantuvo la temperatura de la

mezcla de reacción entre 0 y 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0-5 °C durante 2 h y se calentó a 20-25 °C durante 18,5 h. La mezcla se filtró y la torta del filtro se suspendió en tetrahidrofurano (26,4 kg) y se filtró de nuevo. Los filtrados reunidos se combinaron y se concentraron hasta un volumen de 110 L a presión reducida a una temperatura < 60°C. La mezcla se enfrió a 20-25 °C y agua purificada (1200,8 kg) se añadió a una tasa de 343,1 kg / h. La mezcla se enfrió a 0-5 °C y se filtró. La torta del filtro se suspendió en agua (310,5 kg), se filtró y se secó a una temperatura < 60 °C hasta que el contenido de agua era de 10,6% en peso mediante titulación de Karl-Fisher. Un reactor de 200 L se cargó con tetrahidrofurano (98,0 kg). La torta del filtro, parcialmente secada (~ 11,0 kg) se añadió al reactor de 200 L por medio de un embudo de adición de sólidos. La mezcla se calentó a reflujo durante 4,5 h, se enfrió a 10-15 °C y se agitó durante 3,5 h a 10-15 °C. La mezcla se filtró y la torta del filtro se lavó con agua fría (0-5 °C), tetrahidrofurano (2 x 0,7 kg) y se secó en un secador de bandeja a una temperatura < 55 °C para proporcionar 2,3-dihidroespiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2'(1'H)-ona (6,88 kg, 63%) en forma de un sólido amarillo pálido: pureza (HPLC-UV a 210 nm) 98,3%; p.f. > 250°C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,58 (s ancho, 1H), 7,26-7,19 (m, 1 H), 7,09 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,99-6,90 (m, 2H), 6,47 (s, 1H), 6,16 (s, 1H), 4,74, 4,60 (ABq, J<sub>AB</sub> = 9,2 Hz, 2H), 4,20-4,07 (m, 4H); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 178,4, 154,7, 144,0, 141,8, 137,8, 132,6, 128,7, 123,8, 122,3, 121,5, 111,1, 109,8, 98,7, 79,5, 64,2, 63,6, 57,7; EM (ES +) *m/z* 295,9 (M + 1).

#### Ejemplo de síntesis 1

Síntesis de 1'-[[5-(trifluorometil)-2-furil]metil]espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona

Compuesto de fórmula (I)



Un reactor de 100 L se cargó con espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona (6,03 kg, 19,5 mol), seguido de carbonato de cesio (16,02 kg, 48,7 mol). Se añadió acetona (48,8 kg) y la suspensión resultante se calentó a reflujo durante 1 h. 2-bromometil-5-(trifluorometil) furano (4,92 kg, 21,2 mol) se añadió por medio de un embudo de adición a lo largo de un periodo de 2 h al tiempo que la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 2 h adicionales y la acetona se separó por destilación a presión atmosférica hasta que se habían recogido 37 L de destilado. Se añadió tolueno (48,8 kg) y se continuó la destilación, primero a presión atmosférica y luego a presión reducida hasta que se habían recogido 37 L de destilado. Se añadió tolueno (36,9 kg) y la destilación se continuó a 54-55 °C y una presión de 150-180 mbar hasta se habían recogido 37 L de destilado. El contenido del reactor de 100 L se dejó enfriar a 25 °C y se añadió tolueno (40,9 kg). El contenido del reactor de 100 L se transfirió a un reactor de 200 L y se añadió agua desionizada (48,8 kg). La mezcla agitada se calentó a 39 °C, se detuvo la agitación y se dejó que las fases se separaran durante 11 h. La fase inferior se separó y la fase en tolueno remanente se sometió a destilación a 55-64 °C bajo una presión reducida de 100 mbar hasta que se había recogido 18 L de destilado. La disolución resultante se diluyó con tolueno hasta un volumen total de 98 L. El contenido del reactor de 200 L se hizo pasar a través de una columna de cromatografía empaquetada con gel de sílice (20 kg) y tolueno (40 kg). La columna se eluyó con tolueno de tal manera que se recogieron diez fracciones de 30 kg. La columna se lavó con acetona (100 kg). Las fracciones 2 a 10 se transfirieron sucesivamente a un reactor de 200 L a medida que proseguía una destilación a presión reducida. Los contenidos del reactor se ajustaron con tolueno hasta un volumen de 50 L y la disolución se calentó a 79 °C. Heptano (85 kg) se añadió a lo largo de 15 minutos y la mezcla se enfrió a 10 °C a lo largo de un periodo de 3 h. La cristalización se inició a una temperatura interna de 56 °C. El sólido se recogió por filtración, se lavó con una mezcla de heptano (10,2 kg) y tolueno (5,1 kg) y se secó a 45-50 °C bajo una presión reducida de 50 mbar a lo largo de un periodo de 15 h para proporcionar 1'-[[5-(trifluorometil)-2-furil]metil]espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona (6,08 kg, 73%) en forma de un sólido incoloro: pureza (HPLC-UV a 230 nm) 99,6%; p.f. 139-141 °C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,32-6,97 (m, 5H), 6,72 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,07 (s, 1H), 5,90-5,88 (m, 2H), 5,05, 4,86 (ABq, J<sub>AB</sub> = 16,1 Hz, 2H), 4,91 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 4,66 (d, J = 9,0 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,9, 155,7, 153,5, 148,8, 142,2, 141,9, 140,8, 140,2, 139,7, 139,1, 132,1, 129,2, 124,7, 124,1, 123,7, 121,1, 120,1, 117,6, 114,5, 114,4, 110,3, 109,7, 103,0, 101,9, 93,8, 80,0, 57,8, 36,9; EM (ES+) *m/z* 430,2 (M + 1), 452,2 (M + 23); calculado para C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 61,54%; H, 3,29%; N, 3,26%; encontrado: C, 61,51%; H, 3,29%; N, 3,26%.

#### Ejemplo de síntesis 2

Resolución del compuesto de fórmula (I) mediante HPLC quiral

El compuesto de fórmula (I) se resolvió en el compuesto de fórmula (I-S) y el compuesto de fórmula (I-R) por HPLC quiral en las siguientes condiciones:

Columna: Chiralcel® OJ-RH; 20 mm D.I. x 250 mm, 5 mic; lote: OJRH CJ-EH001 (Daicel Chemical

	Industries, Ltd)
Eluyente:	Acetonitrilo/agua (60/40, v/v, isocrática)
Caudal:	10 mL / min
Tiempo de ejecución:	60 min
Carga:	100 mg de compuesto de fórmula (I) en 1 mL de acetonitrilo
Temperatura:	Ambiente

5 Bajo las condiciones de HPLC quiral anteriores, el compuesto de fórmula (I-R), es decir, (R)-1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2 '(1' H)-ona, se aisló como la primera fracción en forma de un sólido blanco; ee (exceso enantiomérico) > 99% (OJ-RH analítica, acetonitrilo al 55% en agua); p.f. 103-105 °C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,32-6,99 (m, 5H), 6,71 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,05 (s, 1H), 5,89 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 5,13, 5,02 (ABq, J<sub>AB</sub> = 16,4 Hz, 2H), 4,82, 4,72 (ABq, J<sub>AB</sub> = 9,4 Hz, 2H); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177,2, 155,9, 152,0, 149,0, 142,4, 142,0, 141,3, 132,0, 129,1, 123,9, 120,6, 119,2, 117,0, 112,6, 109,3, 108,9, 103,0, 101,6, 93,5, 80,3, 58,2, 36,9; EM (ES+) m/z 430,2 (M + 1), [α]<sub>D</sub> -17,46° (c 0,99, DMSO). El compuesto de la fórmula (I-S), es decir, (S)-1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona, se aisló como la segunda fracción en forma de un sólido blanco; ee > 99% (OJ-RH analítica, acetonitrilo al 55% en agua); p.f. 100-102 °C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,32-6,99 (m, 5H), 6,71 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,05 (s, 1H), 5,89 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 5,12, 5,02 (ABq, J<sub>AB</sub> = 16,4 Hz, 2H), 4,82, 4,72 (ABq, J<sub>AB</sub> = 9,4 Hz, 2H); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177,2, 155,9, 152,0, 149,0, 142,4, 142,0, 141,3, 132,0, 129,1, 123,9, 120,6, 119,2, 117,0, 112,6, 109,3, 108,9, 103,0, 101,6, 93,5, 80,3, 58,2, 36,9; EM(ES+) m/z 430,2 (M + 1), [α]<sub>D</sub> +14,04° (c 0,99, DMSO).

#### Ejemplo de síntesis 3

#### 15 Resolución del compuesto de fórmula (I) mediante cromatografía SMB

El compuesto de fórmula (I) se resolvió en el compuesto de fórmula (I-S) y el compuesto de fórmula (I-R) por cromatografía SMB en las siguientes condiciones:

Extracto:	147,05 mL/min
Refinado:	86,13 mL/min
Eluyente:	183,18 mL/min
Alimentación:	50 mL/min
Reciclaje:	407,88 mL/min
Tiempo de ejecución:	0,57 min
Temperatura:	25 °C
Presión:	55 bar

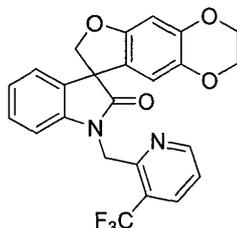
20 La disolución de alimentación (25 g de compuesto de fórmula (I) en 1,0 L de fase móvil (25:75 (v:v) de acetonitrilo / metanol)) se inyectó continuamente en el sistema SMB (Unidad de Laboratorio de Novasep Licosep), que estaba equipado con ocho columnas idénticos en configuración 2-2-2-2 que contiene 110 g (por columna, 9,6 cm, 4,8 cm D.I.) de Chiralpak-AD como fase estacionaria. El primer enantiómero de elución (el compuesto de fórmula (I-R)) estaba contenido en la corriente de refinado y el segundo enantiómero de elución (el compuesto de fórmula (I-S)) estaba contenido en la corriente de extracto. Los datos de caracterización del compuesto de fórmula (I-R) y el compuesto de fórmula (I-S) obtenidos a partir de la resolución de SMB eran idénticos a los obtenidos por encima de la utilización de HPLC quiral.

30 El compuesto de fórmula (I) se resolvió en el compuesto de fórmula (I-R) y el compuesto de fórmula (I-S) en un sistema de autopurificación de LCMS preparativa Waters. El enantiómero que eluye primero de la columna quiral fue bromado (en un sitio bien separado del centro estereogénico) para dar el derivado 5'-bromo correspondiente, que se cristalizó subsiguientemente para generar un solo cristal adecuado para cristalografía de rayos X. Se obtuvo la estructura cristalina de este derivado bromado del enantiómero que eluye primero y se encontró que su configuración absoluta era la misma que la del compuesto de fórmula (I-R). Por lo tanto, el enantiómero que eluye en segundo lugar de la columna quiral es el compuesto de fórmula (I-S). Por otra parte, el material obtenido a partir de la corriente de extracto de la resolución de SMB tenía una rotación óptica específica del mismo signo (positivo, es decir, dextrógiro) que la del material obtenido a partir de la resolución LC antes mencionada.

#### 35 Ejemplo de síntesis 4

Síntesis de 1'-[[3-(trifluorometil)piridin-2-il]metil]-2,3-dihidroespiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2'(1'H)-ona

Compuesto de fórmula (II)



Un reactor de 160 L se cargó con 1,4-dioxano (43 L) a temperatura ambiente seguido de 2,3-dihidroespiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2(1'H)-ona (6,80 kg, 23 mol). A la suspensión resultante se añadió carbonato de cesio (18,7 kg, 58 mol) y la mezcla se calentó a 82 °C a lo largo de 72 minutos. Un recipiente se aclaró con 1,4-dioxano (7 L) y se utilizó para la adición de hidrocloreuro de 2-(clorometil)-3-(trifluorometil)piridina (5,88 kg, 25 mol) en porciones a lo largo de 35 minutos. La temperatura de la mezcla de reacción se aumentó a 100 °C a lo largo de 43 minutos y la mezcla se agitó a 100 °C durante 3 h, se enfrió a 20 °C a lo largo de 90 minutos y se agitó durante 16 h adicionales. Se añadió agua desionizada (40 L) y diclorometano (40 L) y la mezcla resultante se agitó a 22 °C durante 12 minutos. La agitación se detuvo y se dejó que las fases se separaran durante 21 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron en tambores. Un reactor de 160 L se cargó con la fase acuosa y se añadió diclorometano (41 L). La mezcla se agitó a 19 °C durante 10 minutos, se detuvo la agitación y se dejó que las fases se separaran durante 10 minutos. La fase acuosa se separó y la fase orgánica de la etapa anterior se transfirió del tambor al reactor. Se añadió agua desionizada (40 L) y la mezcla se agitó a 22 °C durante 10 minutos. La agitación se detuvo y se dejó que las fases se separaran durante 43 minutos. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se concentró a sequedad bajo una presión reducida de 712-97 mbar a 19-38 °C. Al residuo se añadió metanol (56 L) a lo largo de 19 minutos. La suspensión resultante se enfrió a 3°C a lo largo de 64 minutos y se agitó durante 98 minutos. La mezcla se filtró y la torta del filtro se lavó con metanol frío (0°C) (14 L) y se secó bajo una presión reducida de 90-9 mbar a 21-46 °C durante 10,5 h para obtener 1'-[[3-(trifluorometil)piridin-2-il]metil]-2,3-dihidroespiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2(1'H)-ona (8,00 kg, 81%) en forma de un sólido blancuzco: pureza (HPLC-UV) 99,8%; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,67-8,63 (m, 1H), 8,01-7,96 (m, 1H), 7,35-7,28 (m, 1H), 7,22-7,13 (m, 2H), 7,05-6,98 (m, 1H), 6,63 (s, 1H), 6,62-6,58 (m, 1H), 6,49 (s, 1H), 5,42, 5,14 (ABq, J<sub>AB</sub> = 17,3 Hz, 2H), 5,00, 4,74 (ABq, J<sub>AB</sub> = 8,9 Hz, 2H), 4,22-4,10 (m, 4H); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 178,3, 155,3, 152,5, 144,6, 142,4, 138,4, 134,3 (q, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 5,2 Hz), 132,8, 128,7, 124,4, (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 32,6 Hz), 123,9 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 273,3 Hz), 123,8, 123,4, 122,2, 121,7, 112,6, 108,6, 99,2, 80,2, 64,6, 64,0, 58,3, 42,3 (q, <sup>4</sup>J<sub>C-F</sub> = 3,3 Hz); EM(ES+) *m/z* 454,8 (M + 1)

Ejemplo de síntesis 3

Resolución del compuesto de fórmula (I) mediante cromatografía SMB

El compuesto de fórmula (II) se resolvió en el compuesto de fórmula (II-S) y el compuesto de fórmula (II-R) por cromatografía SMB en las siguientes condiciones:

Extracto:	182,67 mL/min
Refinado:	67,44 mL/min
Eluyente:	224,11 mL/min
Alimentación:	26,0 mL/min
Reciclaje:	420 mL/min
Tiempo de ejecución:	1,05 min
Temperatura:	25 °C
Presión:	50-55 bar

La disolución de alimentación (68,4 g de compuesto de fórmula (II) en 1,0 L de fase móvil (97:3 (v:v) mezcla de diclorometano / acetona)) se inyectó continuamente en el sistema SMB (Unidad de Laboratorio de Novasep Licosep), que estaba equipado con ocho columnas idénticas en configuración 2-2-2-2 que contiene 110 g (por columna, 10,0 cm, 4,8 cm D.I.) de Chiralpak®-IC como fase estacionaria. El compuesto de fórmula (II-R) estaba contenido en la corriente de refinado y el compuesto de fórmula (II-S) estaba contenido en la corriente de extracto.

Un total de 10,62 kg del compuesto de fórmula (II) se procesó por cromatografía SMB utilizando las condiciones anteriores. Todas las fracciones del extracto con una pureza quiral (HPLC) > 99,0 a/a se combinaron, se concentraron hasta un volumen de 26 L a presión reducida y se transfirieron a un reactor de 100 L. La disolución se concentró adicionalmente bajo una presión reducida de 700-590 mbar a 26-37 °C hasta que se había recogido 13 L de destilado. Se añadió metanol (25 L) y la mezcla se concentró a una presión reducida de 650-360 mbar a 30-38 °C

5 hasta que se había recogido 15 L de destilado. La mezcla se enfrió a 20 °C y se añadió metanol (15 L). La mezcla se concentró a una presión reducida de 650-320 mbar a 20-39 °C hasta que se habían recogido 15 L de destilado y se enfrió a 1°C a lo largo de 53 minutos y se agitó durante 70 minutos adicionales. La suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con metanol frío (0 °C) (9 L) y se secó a temperatura ambiente bajo un flujo de gas nitrógeno durante 15,5 h. El sólido se secó adicionalmente a una presión reducida de 40-1 mbar a 50 °C durante 195 minutos para dar el compuesto de fórmula (II-S), es decir, (S)-1'-[[3-(trifluorometil)piridin-2-il]metil]-2,3-dihidroespiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2'(1' H)-ona (3,62 kg) en forma de un sólido incoloro: pureza (HPLC-UV) 100%; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8,67-8,63 (m, 1H), 8,01-7,96 (m, 1H), 7,35-7,28 (m, 1H), 7,22-7,13 (m, 2H), 7,05-6,98 (m, 1H), 6,63 (s, 1H), 6,62-6,58 (m, 1H), 6,49 (s, 1H), 5,42, 5,14 (ABq, J<sub>AB</sub> = 17,3 Hz, 2H), 5,00, 4,74 (ABq, J<sub>AB</sub> = 8,9 Hz, 2H), 4,22-4,10 (m, 4H); <sup>3</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 178,3, 155,3, 152,5, 144,6, 142,4, 138,4, 134,3 (q, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 5,2 Hz), 132,8, 128,7, 124,4, (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 32,6 Hz), 123,9 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 273,3 Hz), 123,8, 123,4, 122,2, 121,7, 112,6, 108,6, 99,2, 80,2, 64,6, 64,0, 58,3, 42,3 (q, <sup>4</sup>J<sub>C-F</sub> = 3,3 Hz); EM (ES +) *m/z* 454,8 (M + 1); [α]<sub>D</sub> +45,1° (c 2,02, DMSO); ee (CHIRALPAK IC, diclorometano / acetona 97/3 (v / v)) 100%.

15 El compuesto de fórmula (II-R), es decir, (R)-1'-[[3-(trifluorometil)piridin-2-il]metil]-2,3-dihidroespiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2'(1' H)-ona, se aisló a partir del refinado por procesos estándares.

#### Ensayos biológicos

20 Con el fin de que la invención descrita en este documento puede ser entendida más completamente, se recoge el siguiente ensayo biológico para demostrar la utilidad de los compuestos preparados en esta memoria. Debe entenderse que este ejemplo es sólo para fines ilustrativos y no debe interpretarse como limitante de esta invención de ninguna manera.

#### Ejemplo biológico 1

##### Ensayo de Afluencia de Guanidina (ensayo *in vitro*)

25 Este ejemplo describe un ensayo *in vitro* para el ensayo y el perfilado de agentes de ensayo frente a los canales de sodio dependientes de voltaje humano o de rata establemente expresados en células ya sea de origen endógeno o expresado de forma heteróloga. El ensayo también es útil para determinar la CI<sub>50</sub> de un compuesto de modulación del canal de sodio dependiente de voltaje (preferiblemente de bloqueo). El ensayo se basa en el ensayo de afluencia de guanidina descrito por Reddy, N.L., *et al.*, *J. Med. Chem.* (1998), 41 (17): 3298-302.

30 El ensayo de afluencia de guanidina es un ensayo de flujo radiotrazador, utilizado para determinar la actividad de flujo de iones de canales de sodio dependientes de voltaje en un formato basado en microplacas de alto rendimiento. El ensayo utiliza hidrocfluor de <sup>14</sup>C-guanidina en combinación con diversos moduladores del canal de sodio dependientes de voltaje conocidos que producen una afluencia mantenida, para ensayar la potencia de los agentes de ensayo. La potencia se determina mediante un cálculo de CI<sub>50</sub>. La selectividad se determina comparando la potencia del compuesto para el canal de sodio dependiente de voltaje de interés con su potencia frente a otros canales de sodio dependientes de voltaje (también llamado 'perfilado de selectividad').

35 Cada uno de los agentes de ensayo se ensaya contra las células que expresan los canales de sodio dependientes de voltaje de interés. Canales de sodio dependientes de voltaje se caracterizan como TTX sensibles o insensibles. Esta propiedad es útil en la evaluación de las actividades de un canal de sodio dependiente de voltaje de interés cuando reside en una población mixta con otros canales de sodio dependientes de voltaje. La siguiente Tabla 1 resume las líneas celulares útiles en la detección de una cierta actividad del canal de sodio dependiente de voltaje en presencia o ausencia de TTX.

40

TABLA 1

LÍNEA CELULAR	Expresión de ARNm	Caracterización Funcional
CHO-K1 (ovario de hámster chino; línea celular hospedante recomendada) Número de acceso ATTC CCL-61	<ul style="list-style-type: none"> <li>• la expresión de Na<sub>v</sub>1.4 ha sido mostrada por RT-PCR</li> <li>• no se ha detectado otra expresión de Na<sub>v</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El incremento de 18 a 20 veces en la afluencia de [<sup>14</sup>C]guanidina se bloqueaba por completo utilizando TTX (Na<sub>v</sub>1.4 es un canal sensible a TTX)</li> </ul>
L6 (célula de mioblasto de rata) Número de acceso ATTC CRL-1458	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión de Na<sub>v</sub>1.4 y Na<sub>v</sub>1.5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El incremento de 10 a 15 veces en la afluencia de [<sup>14</sup>C]guanidina se bloqueaba sólo parcialmente por parte de TTX a 100 nM (Na<sub>v</sub>1.5 es resistente a TTX)</li> </ul>
SH-SY5Y (neuroblastoma humano) Número de acceso ATTC CRL-2266	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión Publicada de Na<sub>v</sub>1.9 y Na<sub>v</sub>1.7 (<i>Blum et al.</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El incremento de 10 a 16 veces en la afluencia de [<sup>14</sup>C]guanidina por encima del fondo se bloqueaba sólo parcialmente por parte de TTX (Na<sub>v</sub>1.9 es resistente a TTX)</li> </ul>
SK-N-BE2C (una línea celular de neuroblastoma humano, Número de acceso ATTC CRL-2268)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión de Na<sub>v</sub>1.8</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La estimulación de células BE2C con piretroides resulta en un incremento de 6 veces en la afluencia de [<sup>14</sup>C]guanidina por encima del fondo</li> <li>• TTX bloqueaba parcialmente la afluencia (Na<sub>v</sub>1.8 es resistente a TTX)</li> </ul>
PC12 (feocromocitoma a de rata) Número ATTC CRL-1721	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión de Na<sub>v</sub>1.2 y Na<sub>v</sub>1.7</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El incremento de 8 a 12 veces en la afluencia de [<sup>14</sup>C]guanidina se bloqueaba por completo utilizando TTX (Na<sub>v</sub>1.2 y Na<sub>v</sub>1.7 son canales sensibles a TTX)</li> </ul>
HEK293 (riñón embrionario humano) Número ATTC CRL-1573	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión de hNa<sub>v</sub>1.7</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na<sub>v</sub>1.7 es un canal sensible a TTX. La CI<sub>50</sub> de TTX en el ensayo de guanidido funcional es 8 nM.</li> </ul>

También es posible emplear líneas celulares inmortalizadas que expresan de manera heteróloga canales de sodio dependientes de voltaje. La clonación, la transfección estable y la propagación de tales líneas celulares son conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Klugbauer, N, *et al.*, *EMBO J.* (1995), 14(6): 1084-1090; y Lossin, C., *et al.*, *Neuron* (2002), 34, págs. 877-884).

Las células que expresan el canal de sodio dependiente de voltaje de interés se cultivan de acuerdo con el proveedor o, en el caso de una célula recombinante, en presencia de medios de crecimiento selectivos tales como G418 (Gibco/Invitrogen). Las células se disocian de las placas de cultivo con una disolución enzimática (1X) Tripsina / EDTA (Gibco/Invitrogen) y se analizan en cuanto a la densidad y la viabilidad utilizando un hemocitómetro (Neubauer). Las células disociadas se lavan y se resuspenden en su medio de cultivo después se extienden en placas Scintiplates recubiertas con Poli-D-Lisina (Perkin Elmer) (aproximadamente 100.000 células / pocillo) y se incuban a 37 °C / 5% de CO<sub>2</sub> durante 20-24 horas. Después de un extenso lavado con disolución salina tamponada con HEPES con bajo contenido en sodio (LNHBSS) (Cloruro de Colina 150 mM, HEPES 20 mM (Sigma), Cloruro de Calcio 1 mM, Cloruro de Potasio 5 mM, Cloruro de Magnesio 1 mM, glucosa 10 mM) los agentes de ensayo se diluyen con LNHBSS y después se añadieron a cada pocillo a la concentración deseada. (Se pueden utilizar concentraciones variables de agente de ensayo). La mezcla de activación/radiomarcage contiene un alcaloide, tales como veratridina o Aconitina (Sigma) o un piretroide tal como deltametrina, veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Sigma) y <sup>14</sup>C-hidrocloreto de guanidina (ARC) para medir el flujo a través de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Después de cargar las células con el agente de ensayo y con la mezcla de activación/radiomarcage, las Scintiplates de Poli-D-Lisina recubiertas se incuban a la temperatura ambiente. Después de la incubación, las Scintiplates de Poli-D-Lisina recubiertas se lavan ampliamente con LNHBSS suplementado con guanidina (Sigma). Las Scintiplates recubiertas de Poli-D-Lisina se secan y luego se hace el recuento utilizando un Wallac MicroBeta TriLux (Perkin-Elmer Life Sciences). La capacidad del agente de ensayo de bloquear la actividad del canal de sodio dependiente de voltaje se determina mediante la comparación de la cantidad de <sup>14</sup>C-guanidina presente dentro de las células que expresan los diferentes canales de sodio dependientes de voltaje. Basándose en estos datos, se puede utilizar una diversidad de cálculos, tal como se establecen en esta memoria en otro lugar, para determinar si un agente de ensayo es selectivo para un canal de sodio dependiente de voltaje en particular.

El valor CI<sub>50</sub> de un agente de ensayo para un canal de sodio dependiente de voltaje específico se puede determinar utilizando el método general anterior. La CI<sub>50</sub> se puede determinar utilizando una curva de 3, 8, 10, 12 ó 16 puntos por

5 duplicado o triplicado con una concentración de partida de 1, 5 ó 10  $\mu\text{M}$ , diluida en serie con una concentración final que alcanza los intervalos sub-nanomolar, nanomolar y micromolar bajo. Típicamente, la concentración de punto medio de agente de ensayo se fija en 1  $\mu\text{M}$ , y se aplican las concentraciones secuenciales de semi-diluciones mayores o menores (p. ej., 0,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$  y 0,25  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$  y 0,125  $\mu\text{M}$ ; 20  $\mu\text{M}$ , etc.). La curva de la  $\text{Cl}_{50}$  se calcula utilizando la fórmula del Modelo Logístico de 4 Parámetros o Dosis-Respuesta Sigmoidal (ajuste =  $A + ((B-A)/(1 + ((C / x) ^ D)))$ )).

La veces de selectividad, factor de selectividad o múltiple de selectividad se calculan dividiendo el valor de  $\text{Cl}_{50}$  del canal de sodio dependiente de voltaje de ensayo por el canal de sodio dependiente de voltaje de referencia, por ejemplo,  $\text{Na}_v1.5$ .

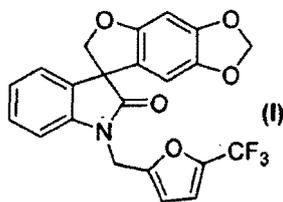
10 De acuerdo con ello, los compuestos preparados por los métodos descritos en esta memoria demostraron la actividad de bloqueo del canal de sodio dependiente de voltaje frente a  $\text{hNa}_v1.7$  tal como se recoge a continuación en la Tabla 2:

TABLA 2

Compuesto	Nombre Químico	$\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
(I)	1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,007
(I-R)	(R)-1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	4,200
(I-S)	(S)-1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]espiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,003
(II)	1'-[[3-(trifluorometil)piridin-2-il]metil]espiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,015
(II-S)	(S)-1'-[[3-(trifluorometil)piridin-2-il]metil]espiro[furo[2,3-g][1,4]benzodioxina-8,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,005

REIVINDICACIONES

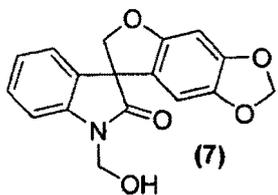
1. Un método de preparar un compuesto de fórmula (I):



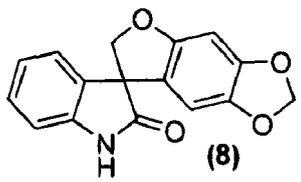
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos;

en el que el método comprende:

a) tratar un compuesto de fórmula (7):

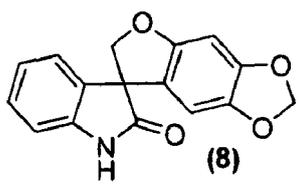


10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con una base bajo condiciones adecuadas para forma un compuesto de fórmula (8):

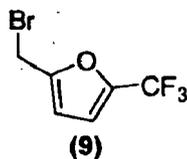


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

b) tratar el compuesto de fórmula (8):

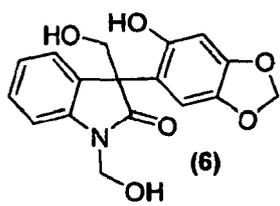


15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un compuesto de fórmula (9):



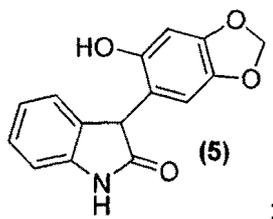
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones adecuadas para proporcionar el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos.

20 2. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, una preparación del compuesto de fórmula (7), en el que el método comprende tratar un compuesto de fórmula (6):



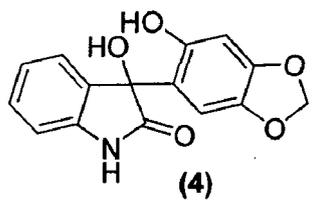
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones de reacción de Mitsunobu estándar para formar el compuesto de fórmula (7), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 3. El método de la reivindicación 2, que comprende, además, una preparación del compuesto de fórmula (6), en el que el método comprende tratar un compuesto de fórmula (5):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un aldehído bajo condiciones adecuadas para formar el compuesto de fórmula (6), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

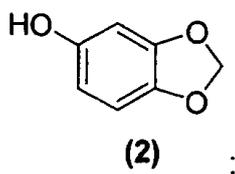
- 10 4. El método de la reivindicación 3, que comprende, además, una preparación del compuesto de fórmula (5), en el que el método comprende tratar un compuesto de fórmula (4):



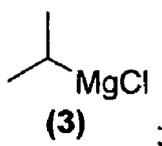
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones adecuadas para formar el compuesto de fórmula (5), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 5. El método de la reivindicación 4, que comprende, además, una preparación del compuesto de fórmula (4), en el que el método comprende:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (2):

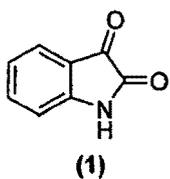


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un reactivo de Grignard de fórmula (3):



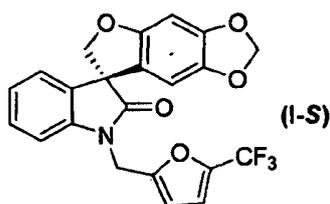
- 20 bajo condiciones adecuadas para formar un producto intermedio; y

b) hacer reaccionar el producto intermedio de a) con un compuesto de fórmula (1):

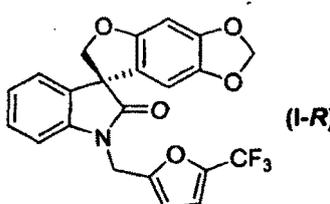


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones adecuadas para formar el compuesto de fórmula (4),  
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 6. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, resolver el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en forma de una mezcla de enantiómeros, en condiciones adecuadas para proporcionar un compuesto de fórmula (I-S):

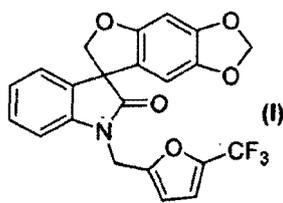


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto de fórmula (I-R):



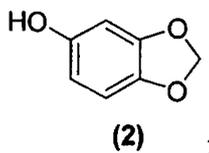
- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un método para preparar un compuesto de fórmula (I):

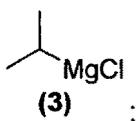


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos, en el que el método comprende:

- 15 a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (2):

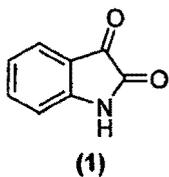


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un reactivo de Grignard de fórmula (3):

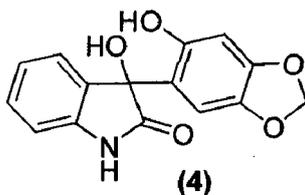


bajo condiciones adecuadas para formar un producto intermedio; y

- 20 b) hacer reaccionar el producto intermedio de a) con un compuesto de fórmula (1):

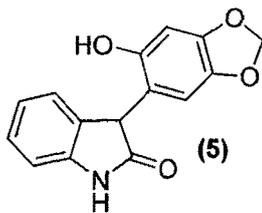


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones adecuadas para formar un compuesto de fórmula (4):



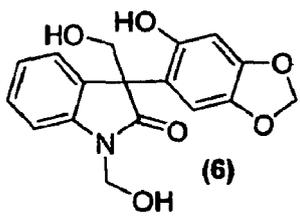
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos;

c) tratar el compuesto de fórmula (4), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos bajo condiciones adecuadas para formar un compuesto de fórmula (5):



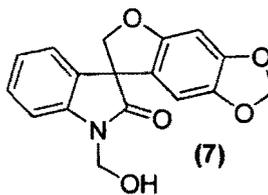
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos;

15 d) tratar el compuesto de fórmula (5), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos, con un aldehído bajo condiciones adecuadas para formar un compuesto de fórmula (6):



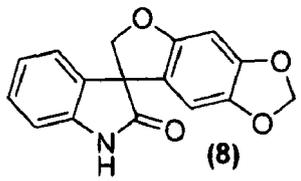
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos;

20 e) tratar el compuesto de fórmula (6), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos, bajo condiciones de reacción de Mitsunobu estándar para formar un compuesto de fórmula (7):



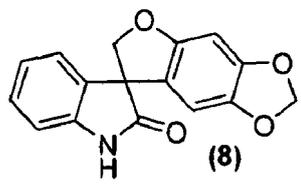
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos;

f) tratar el compuesto de fórmula (7), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos, con una base bajo condiciones adecuadas para formar un compuesto de fórmula (8):

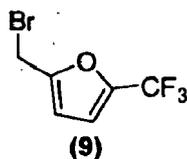


5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos;

g) tratar el compuesto de fórmula (8):

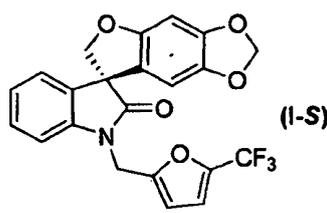


10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos, con un compuesto de fórmula (9):

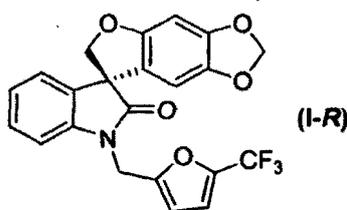


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en condiciones adecuadas para proporcionar el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un estereoisómero o enantiómero individual o una mezcla de los mismos.

15 8. El método de la reivindicación 7, que comprende, además, resolver el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en forma de una mezcla de enantiómeros, en condiciones adecuadas para proporcionar un compuesto de fórmula (I-S):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto de fórmula (I-R):



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.