

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 474**

51 Int. Cl.:

C07D 209/12 (2006.01)

C07D 317/60 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2011 PCT/US2011/033396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133751**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2011 E 11729195 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2560954**

54 Título: **Proceso de producción de compuestos indol cycloalkylcarboxamido**

30 Prioridad:

29.04.2010 US 329500 P 22.04.2010 US 327099 P
29.04.2010 US 329510 P 22.04.2010 US 327091 P
29.04.2010 US 329493 P 22.04.2010 US 327057 P
22.04.2010 US 327095 P 12.05.2010 US 333870 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2017

73 Titular/es:

VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(100.0%)
50 Northern Avenue
Boston, MA 02210, US

72 Inventor/es:

LEE, ELAINE, CHUNGMIN;
TANOURY, GERALD, J.;
HARRISON, CRISTIAN;
LITTLER, BENJAMIN, JOSEPH;
ROSE, PETER, JAMISON;
HUGHES, ROBERT, MICHAEL;
JUNG, YOUNG CHUN;
SIESEL, DAVID, ANDREW y
BELMONT, DANIEL, T.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 608 474 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

Proceso de producción de compuestos indol cycloalkylcarboxamido

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos para preparar compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por RTFQ como la fibrosis quística.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] RTFQ es un canal de aniones mediado por cAMP/ATP que se expresa en una variedad de tipos de células, incluyendo absorción y células epiteliales secretoras, donde se regula el flujo de aniones a través de la membrana, así como la actividad de otros canales de iones y proteínas. En las células epiteliales, el funcionamiento normal del RTFQ es crítico para el mantenimiento del transporte de electrolitos en todo el cuerpo, incluyendo el tejido respiratorio y digestivo. RTFQ se compone de aproximadamente 1480 aminoácidos que codifican una proteína compuesta de una repetición en tándem de dominios de transmembrana, conteniendo cada uno de los cuales seis hélices transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos. Los dos dominios de transmembrana están unidos por un dominio regulador (R) grande, polar, con múltiples sitios de fosforilación que regulan la actividad del canal y el tráfico celular.

[0003] El gen que codifica RTFQ se ha identificado y secuenciado (Véase Gregory, RJ et al (1990) Nature 347: 382-386; Rich, DP et al (1990) Nature 347: 358 a 362), (Riordan, JR y otros (1989) Science 245: 1066 - 1073). Un defecto en este gen causa mutaciones en RTFQ resultando en fibrosis quística ("CF"), la enfermedad genética fatal más común en humanos. La fibrosis quística afecta aproximadamente a uno de cada 2,500 lactantes en los Estados Unidos. Dentro de la población general de los Estados Unidos, hasta 10 millones de personas llevan una sola copia del gen defectuoso sin efectos secundarios aparentes. Por el contrario, los individuos con dos copias del gen asociado a la CF sufren los efectos debilitantes y fatales de la CF, incluida la enfermedad pulmonar crónica.

[0004] En los pacientes con fibrosis quística, las mutaciones en el RTFQ expresadas de forma endógena en el epitelio respiratorio conducen a la reducción de la secreción de aniones apicales causando un desequilibrio en el transporte de iones y fluidos. La disminución resultante en el transporte de aniones contribuye a una mayor acumulación de moco en el pulmón y las infecciones microbianas acompañantes que finalmente causan muerte en pacientes con CF. Además de las enfermedades respiratorias, los pacientes con CF suelen presentar problemas gastrointestinales e insuficiencia pancreática que, si no se tratan, producen la muerte. Además, la mayoría de los varones con fibrosis quística son infértiles y la fertilidad disminuye entre las mujeres con fibrosis quística. En contraste con los efectos graves de dos copias del gen asociado a la CF, los individuos con una sola copia del gen asociado a la CF presentan una mayor resistencia al cólera y a la deshidratación resultante de la diarrea, tal vez explicando la relativamente alta frecuencia del gen de la CF dentro de la población.

[0005] El análisis de secuencia del gen RTFQ de cromosomas CF ha revelado una variedad de mutaciones causantes de enfermedades (corte, GR et al (1990) Nature 346: 366-369; Dean, M. et al (1990) Cell 61: 863: 870 y Kerem, BS y otros (1989) Science 245: 1073 - 1080, Kerem, BS y otros (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 8447-8451). Hasta la fecha, se han identificado > 1000 mutaciones causantes de enfermedad en el gen de la CF (<http://www.genet.sickkids.on.ca/RTFQ/>). La mutación más frecuente es una deleción de fenilalanina en la posición 508 de la secuencia de ácido RTFQ amino, y se conoce comúnmente como $\Delta F508$ -RTFQ. Esta mutación ocurre en aproximadamente el 70% de los casos de fibrosis quística y se asocia con una enfermedad grave. Otras mutaciones incluyen el R117H y el G551D.

[0006] La eliminación de residuos 508 en $\Delta F508$ -RTFQ impide que la proteína naciente se pliegue correctamente. Esto da lugar a la incapacidad de la proteína mutante para salir de la ER, y el tráfico a la membrana plasmática. Como resultado, el número de canales presentes en la membrana es mucho menor que el observado en las células que expresan RTFQ de tipo salvaje. Además de la mala conducta, la mutación resulta en un defectuoso bloqueo de canales. En conjunto, el número reducido de canales en la membrana y la entrada defectuosa conducen a un transporte aniónico reducido a través de los epitelios, lo que conduce a un transporte defectuoso de iones y fluidos. (Qu Inton, PM (1990), FASEB J. 4: 2709-2727). Los estudios han demostrado, sin embargo, que los números reducidos de $\Delta F508$ -RTFQ en la membrana son funcionales, aunque menos que RTFQ de tipo salvaje. (Dalemans et al (1991), Nature Lond 354: 526 a 528; Denning et al, supra; Pasyk y Foskett (1995), J. Cell Biochem 270: 12347-50). Además de $\Delta F508$ -RTFQ, otra enfermedad que causa mutaciones en RTFQ que resultan en el tráfico defectuoso, síntesis, y/o gating de canales podría ser ascendente o descendente regulado para alterar la secreción de aniones y modificar la progresión y/o gravedad de la enfermedad.

[0007] A pesar de que RTFQ transporta una variedad de moléculas, además de aniones, es evidente que esta función (el transporte de aniones) representa un elemento en un importante mecanismo de transporte de iones y agua a través del epitelio. Los otros elementos incluyen el canal epitelial de Na^+ , ENaC , $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ co-

transportador, bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ y la membrana basolateral de K^+ , que son responsables de la absorción de cloruro en la célula.

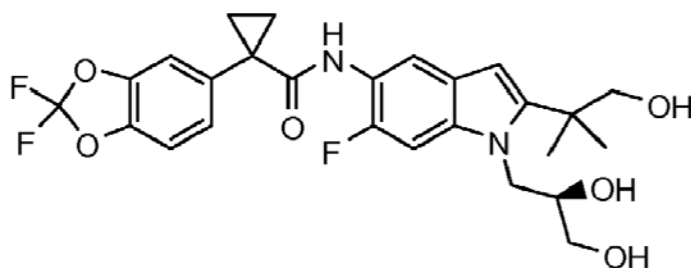
[0008] Estos elementos trabajan juntos para conseguir el transporte direccional a través del epitelio a través de su expresión selectiva y la localización dentro de la célula. Absorción de cloruro tiene lugar mediante la actividad coordinada de ENaC y RTFQ presentes en la membrana apical y bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ y los canales de Cl^- expresados en la superficie basolateral de la célula. El transporte activo secundario de cloruro desde el lado luminal conduce a la acumulación de cloruro intracelular, que después puede salir pasivamente de la célula a través de canales de Cl^- dando como resultado un transporte vectorial. Disposición de $\text{Na}^+2\text{Cl}^-/\text{K}^+$ co-transportador de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de la bomba y la membrana basolateral de canales K^+ en la superficie basolateral y RTFQ en el lado luminal coordinan la secreción de cloruro a través de RTFQ en el lado luminal. Debido a que probablemente el agua nunca se transporte activamente por sí misma, su flujo a través de los epitelios depende de gradientes osmóticos transepitheliales pequeños generados por el flujo masivo de sodio y cloruro.

[0009] Como se ha discutido anteriormente, se cree que la supresión de residuo 508 en $\Delta\text{F508-RTFQ}$ impide que la proteína naciente se pliegue correctamente, dando como resultado la incapacidad de esta proteína mutante para salir del ER, y el tráfico a la membrana plasmática. Como resultado, cantidades insuficientes de la proteína madura están presentes en la membrana plasmática y el transporte de cloruro dentro de los tejidos epiteliales se reduce significativamente. De hecho, este fenómeno celular del procesamiento ER defectuoso de los transportadores ABC por la maquinaria ER, se ha demostrado que es la base subyacente no sólo para la enfermedad de CF, sino para una amplia gama de otras enfermedades aisladas y heredadas. Las dos maneras en que la maquinaria de ER puede funcionar incorrectamente es por pérdida de acoplamiento a la exportación de ER de las proteínas que conducen a la degradación, o por la acumulación de ER de estas proteínas defectuosas/mal plegadas [Aridor M, et al., Nature Med., 5 (7), páginas 745 - 751 (1999); Shastry, BS, et al., Neurochem. International, 43, pp 1-7 (2003); Rutishauser, J., y col., Swiss Med Wkly, 132, págs. 211 - 222 (2002); Morello, JP et al., TIPS, 21, páginas 466 - 469 (2000); Bross P., y col., Human Mut., 14, pp. 186 - 198 (1999)].

[0010] (*R*)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida se describe en la solicitud de patente US20090131492 como modulador de la actividad de RTFQ y, por tanto, útil en el tratamiento de enfermedades mediadas por RTFQ tales como fibrosis quística. Sin embargo, subsiste la necesidad de procedimientos económicos para la preparación de los compuestos de cicloalquilcarboxamido-indol descritos en la presente memoria. El documento US 2009/0131492 A1 describe compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables que se dice que son útiles como moduladores de transportadores de casete de unión a ATP ("ABC") de fragmentos de los mismos, incluyendo el regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística ("RTFQ"). El documento EP 1864978 A1 describe un procedimiento para la producción de 1-(3-(2(1-benzotieno-5-il)etoxi)propilo)azetidina-3-ol o sales de los mismos. Se dice que estos compuestos son útiles como un remedio para las enfermedades nerviosas centrales y periféricas. El documento WO 02/12236 A1 describe triazolopirid(az)inas sustituidas y métodos para su producción. Se dice que los compuestos son útiles como herbicidas selectivos. Suzuki et al., Chem. Letón. 1983, páginas 193-194 describe que, cuando se calienta en triamida hexametilfosfórica en presencia de yoduro de cobre (I), los yoduros y bromuros de arilo reaccionan con el anión de cianoacetato para formar arilcianoacetatos, que pierden el grupo éster por hidrólisis, dando los arilacetónitrilos correspondientes.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] Como se describe en el presente documento, la presente invención proporciona procedimientos para preparar compuestos de fórmula I y fórmula II que se pueden usar para preparar correctores RTFQ útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por RTFQ, tales como fibrosis quística. Tales compuestos incluyen (*R*)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida (de aquí en adelante "Compuesto 1") que tiene la estructura siguiente:



Compuesto 1.

5 **[0012]** El compuesto 1 y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles para tratar o disminuir la gravedad de enfermedades mediadas por RTFQ, tales como, por ejemplo, fibrosis quística. El compuesto 1 puede existir en varias formas sólidas diferentes, tales como formas sustancialmente cristalinas o formas amorfas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10 Definiciones

[0013] Como se usa en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique lo contrario.

15 **[0014]** El término "RTFQ" tal como se utiliza en la presente memoria significa un regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística o una mutación de la misma capaz de regular la actividad, incluyendo, pero no limitado a, $\Delta F508$ RTFQ y G551D RTFQ (véase, por ejemplo, <http://www.genet.sickkids.on.ca/RTFQ/>, para mutaciones RTFQ).

20 **[0015]** El término "modular" tal como se utiliza en este documento significa el aumento o disminución, por ejemplo, actividad, en una cantidad medible.

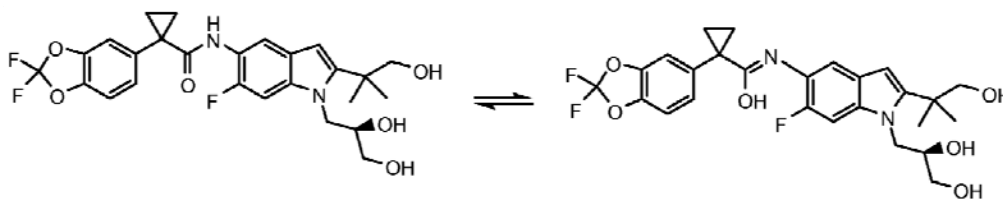
25 **[0016]** El término "químicamente estable", tal como se utiliza aquí, significa que la forma sólida del Compuesto 1 no se descompone en uno o más compuestos químicos diferentes cuando se someten a condiciones especificadas, por ejemplo, 40°C/75% de humedad relativa, durante un período de tiempo específico. Por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas o más. En algunas realizaciones, menos de un 25% de la forma sólida del Compuesto 1 se descompone, en algunas realizaciones, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 0,5% de la forma del Compuesto 1 se descompone en las condiciones especificadas. En algunas realizaciones, ninguna cantidad detectable de la forma sólida del Compuesto 1 se descompone.

35 **[0017]** El término "físicamente estable", como se usa aquí, significa que la forma sólida de Compuesto 1 no cambia en una o más formas físicas diferentes del Compuesto 1 (por ejemplo, formas sólidas diferentes tal como se mide mediante XRPD, DSC, etc.) cuando se someten a condiciones específicas, por ejemplo, 40°C/75% de humedad relativa, durante un período de tiempo específico. Por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas o más. En algunas realizaciones, menos del 25% de la forma sólida del Compuesto 1 cambia en una o más formas físicas diferentes cuando se somete a condiciones especificadas. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 0,5% de la forma sólida del Compuesto 1 cambia en una o más formas físicas diferentes del Compuesto 1 cuando se somete a condiciones especificadas. En algunas realizaciones, ninguna cantidad detectable de la forma sólida del Compuesto 1 cambia en una o más formas sólidas físicamente diferentes del Compuesto 1.

45 **[0018]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "sobre" y "aproximadamente", cuando se usa en relación con las dosis, cantidades, o por ciento en peso de los ingredientes de una composición o una forma de dosificación, significan una dosis, la cantidad o porcentaje en peso que es reconocido por un experto en la técnica para proporcionar un efecto farmacológico equivalente al obtenido a partir de la dosis, cantidad o porcentaje en peso especificados. Específicamente, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa un error aceptable para un valor particular determinado por un experto en la técnica, que depende de cómo se mide o determina el valor. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa dentro de 1, 2, 3, o 4 desviaciones estándar. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa dentro del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, o 0,05% de un valor o intervalo dado.

55 **[0019]** A menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en este documento también pretenden incluir todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de enlace doble (Z) y (E) e isómeros conformacionales (Z) y (E). Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. Todas las formas tautómeras del Compuesto 1 se incluyen aquí. Por ejemplo, el Compuesto 1 puede existir como tautómeros, ambos de los cuales se incluyen aquí:

65



5

10

[0020] Además, a menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, el Compuesto 1, en el que uno o más átomos de hidrógeno son deuterio o tritio reemplazados, o uno o más átomos de carbono se sustituyen por un carbono enriquecido por ^{13}C o ^{14}C están dentro del alcance de esta invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas, sondas en ensayos biológicos, o compuestos con perfil terapéutico mejorado.

15

[0021] El término "grupo protector" abreviado a P, como se usa en el presente documento se refiere a cualquier grupo químico que se introduce en una molécula por modificación química de un grupo funcional con el fin de obtener quimioselectividad en una reacción química subsiguiente. Los ejemplos no limitantes de grupos protectores de alcohol incluyen acetilo (Ac), benzoilo (Bz), bencilo (Bn), n-éter de metoxietoximetilo (MEM), dimetoxitritilo (DMT), éter de metoximetilo (MOM), metoxitritilo (MMT), *p*-éter de metoxibencilo (PMB), pivaloilo (VIF), tetrahidropiranilo (THP), tritilo (Tr), y trimetilsililo (TMS). En una realización, el grupo protector es Bn que tiene la estructura $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$.

20

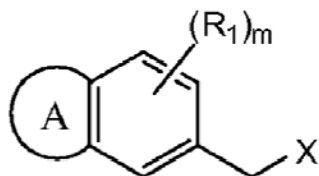
[0022] La abreviatura "DCM" significa diclorometano. La abreviatura "IPA" significa alcohol isopropílico. La abreviatura "DMSO" significa dimetilsulfóxido. La abreviatura "MTBE" significa metilo t-butilo éter. La abreviatura "THF" significa tetrahidrofurano. La abreviatura "TEA" significa trietilamina. La abreviatura "dba", como en $\text{Pd}(\text{dba})_2$ representa dibencilidenacetona. La abreviatura "dppf" como en $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ representa 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno.

25

30

[0023] En un aspecto, la invención presenta un método para preparar un compuesto de fórmula I:

35



40

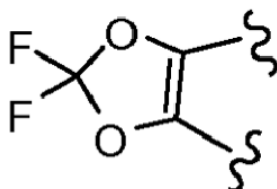
I

45

En el que, independientemente de cada ocurrencia:

el anillo A es

50



55

60

R_1 se selecciona independientemente de $-\text{R}^j$, $-\text{OR}^j$, $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{NO}_2$, halógeno, $-\text{CN}$, $-\text{C}_{1-4}$ haloalquilo, $-\text{C}_{1-4}$ haloalcoxi, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{NR}^j\text{C}(\text{O})\text{R}^j$, $-\text{SOR}^j$, $-\text{SO}_2\text{R}^j$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{NR}^j\text{SO}_2\text{R}^j$, $-\text{COR}^j$, $-\text{CO}_2\text{R}^j$, $\text{NR}^j\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^j)_2$ - COCOR^j ;

65

R^j es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

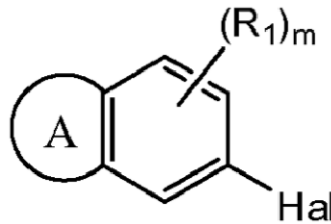
X es CN o CO₂R;

R es C₁₋₆alifático o arilo; y

m es un número entero de 0 a 3 inclusive;

Que comprende las etapas de

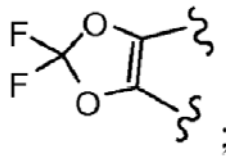
a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IA en un primer disolvente orgánico



IA

En el que, independientemente de cada ocurrencia:

anillo A es



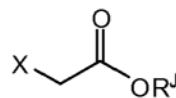
R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^J C(O)R^J, -S O^J, -SO₂ R^J, -SO₂ N(R^J)₂, -NR^J SO₁ R^J, -COR^J, -CO₂ R^J, -NR SO₂ N(R^J)₂, -COCOR^J;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

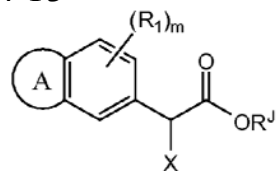
Hal es un haluro;

Con un compuesto de fórmula IB:



IB

en el que R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático, para formar un compuesto de fórmula IC:



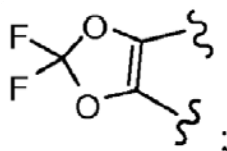
IC

5

En el que, independientemente de cada ocurrencia:

10 el anillo A es

15



20

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -S OR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₁R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;
 R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;
 X es CN o CO₂R;
 R es R es C₁₋₆alifático o arilo; y
 m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

25

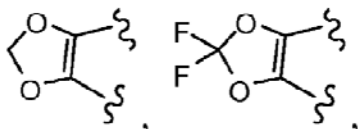
30

b) eliminar el grupo a partir del compuesto IC -CO₂R^J en un segundo disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula I.

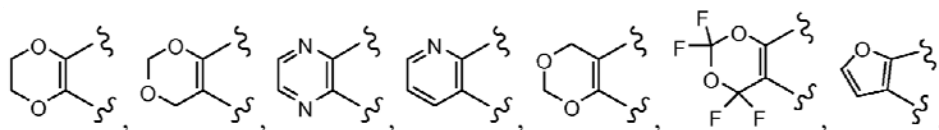
35

[0024] Un método en el que el anillo A es un heterocicloalquilo fusionado o heteroarilo también se da a conocer en el presente documento. En otro caso, el anillo A se selecciona entre

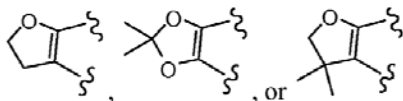
40



45

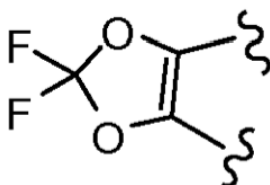


50



55 El anillo A es

60



65

[0025] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que X es CN. En otra realización, X es CO₂ Et.

[0026] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que m es 0.

[0027] En otra realización, la invención presenta el método anterior en la que R^J es un C₁₋₆alifático. En otra forma de realización, R^J es -CH₂CH₃.

[0028] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que Hal es Br.

[0029] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que el primer disolvente orgánico es un solvente de ácido aprótico. En otra realización, el primer disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo *t*-butilo éter, metilo etil cetona, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otra realización, el primer disolvente orgánico se selecciona entre acetonitrilo, tolueno, benceno o xilenos. En otra realización, el primer disolvente orgánico es tolueno.

[0030] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que la etapa a) se lleva a cabo en presencia de un catalizador de metal de transición. En otra realización, la etapa a) se lleva a cabo en presencia de un catalizador de paladio. En otra realización, la etapa a) se lleva a cabo en presencia de un catalizador de paladio seleccionado de paladio (II) acetato de etilo, Pd (dppf) Cl₂, Pd (dba)₂, tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) o tris (dibencilidenacetona) Dipaladio (0). En otra realización, la etapa a) se lleva a cabo en presencia de Pd (dba)₂.

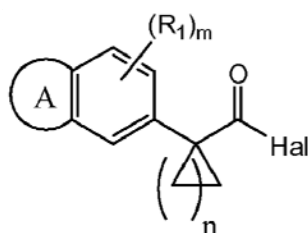
[0031] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que se lleva a cabo la etapa a) en alrededor de 50°C a 90°C. En otra realización, la etapa a) se lleva a cabo a aproximadamente 60°C a 80°C. En otra realización, la etapa a) se lleva a cabo a aproximadamente 70°C.

[0032] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que el segundo disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otra realización, el segundo disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, éter de *metilo-t-butilo*, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otra realización, el segundo disolvente orgánico es dimetilsulfóxido.

[0033] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que la etapa b) se lleva a cabo en presencia de un ácido inorgánico. En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo en presencia de un ácido inorgánico seleccionado entre ácido clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico o bórico. En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo en presencia de ácido clorhídrico.

[0034] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 55°C a 95°C. En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 65°C a 85°C. En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 75°C.

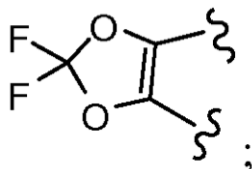
[0035] En otro aspecto, la invención presenta un método para preparar un compuesto de fórmula II:



II

En el que, independientemente de cada ocurrencia:

anillo A es



5

Hal es un haluro;

10 R_1 se selecciona independientemente de $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SO^J$, $-SO_2 R^J$, $-SO_2 N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2 R^J$, $-COR^J$, $-CO_2 R^J$, $-NR^J SO_2 N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

15 R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

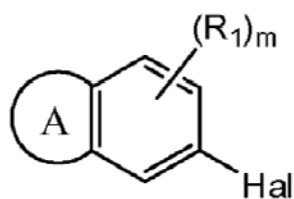
m es un número entero de 0 a 3 inclusive; Y

n es un número entero de 1 a 4 inclusive;

20 que comprende las etapas de

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIA en un primer disolvente orgánico

25



30

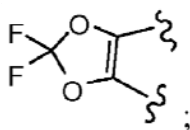
IIA

35

40 En el que, independientemente de cada ocurrencia:

40

anillo A es



45

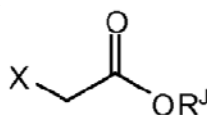
50 R_1 se selecciona independientemente de $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SO^J$, $-SO_2 R^J$, $-SO_2 N(R^J)_2$, $-NR^J SO_1 R^J$, $-COR^J$, $-CO_2 R^J$, $-NR^J SO_2 N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

55 R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

Hal es un haluro;

60 Con un compuesto de fórmula IIB:



IIB

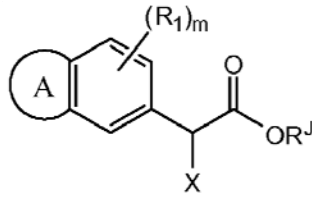
5 donde

X es CN o CO₂R;

R es C₁₋₆alifático o arilo; y

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático, para formar un compuesto de fórmula IIC:

10



15

20

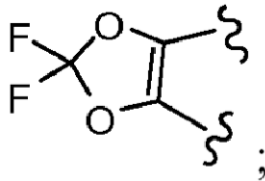
IIC

En el que, independientemente de cada ocurrencia:

25

anillo A es

30



35

40

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^J C(O)R^J, -S O^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

45

X es CN o CO₂R;

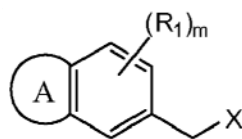
R es C₁₋₆alifático o arilo; y

50

m es un número entero desde 0 hasta 3 inclusive;

b) eliminar el grupo -CO₂R^J a partir del compuesto IIC en un segundo disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula I:

55



60

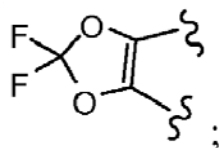
I

65

En el que, independientemente de cada ocurrencia:

anillo A es

5



10

R_1 se selecciona independientemente de $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SO^J$, $-SO_2 R^J$, $-SO_2 N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2 R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2 N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

15

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

X es CN o CO_2R ;

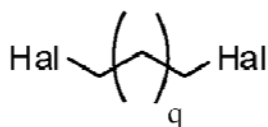
20

R es C_{1-6} alifático o arilo; y

m es un número entero de 0 a 3 inclusive;

c) hacer reaccionar un compuesto de fórmula I con un compuesto de fórmula IID en presencia de una base:

25



30

IID

35

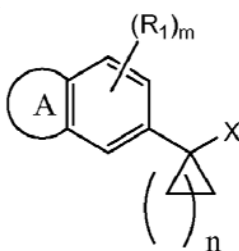
En donde, independientemente de cada ocurrencia:

Hal es un haluro; y

40

q es un número entero de 0 a 3 inclusive; para producir un compuesto de fórmula IIE:

45



50

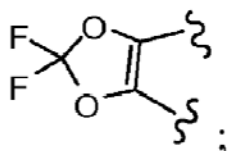
IIE

55

En donde, independientemente de cada ocurrencia:

El anillo A es

60



65

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SO^J, -SO₂R^J, -SO₂ N(R^J)₂, -NR^JSO₂ R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

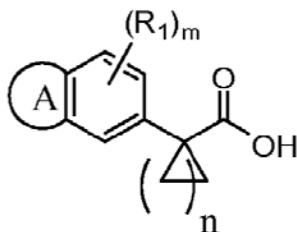
m es un número entero de 0 a 3 inclusive;

X es CN o CO₂R;

R es C₁₋₆alifático o arilo; y

n es un número entero de 1 a 4 inclusive;

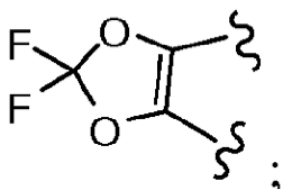
d) hacer reaccionar secuencialmente un compuesto de fórmula IIE con una base de hidróxido y un ácido para formar un compuesto de fórmula IIF:



IIF

En el que, independientemente de cada ocurrencia:

anillo A es



R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^J C(O)R^J, -SO^J, -SO₂R^J, -SO₂ N(R^J)₂, -NR^JSO₂ R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

n es un número entero de 1 a 4 inclusive; y

e) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIF con un agente halogenante en un tercer disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula II.

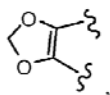
[0036] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa a), el primer disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otra realización, el primer disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, éter *metilo-t-butilo*, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidiona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otra realización, el primer disolvente orgánico es tolueno.

[0037] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa a), m es 0.

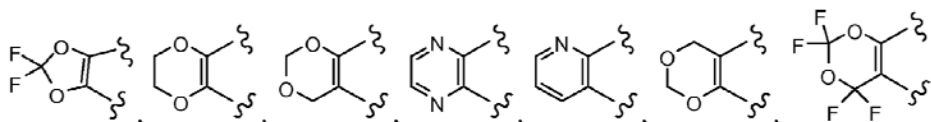
[0038] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa a), Hal es Br.

[0039] Un método en el que en la etapa a), el anillo A es un anillo heterocíclico o heteroarilo condensado también se describe en la presente memoria. En otro Ejemplo, el anillo A se selecciona de

5

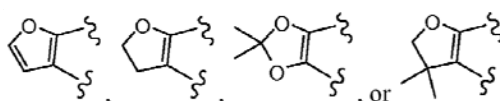


10



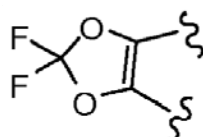
15

20



El anillo A es

25



30

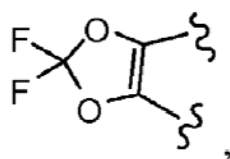
[0040] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa a), X es CN. En otra realización, X es CO₂Et.

35

[0041] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa a) R^j es Et.

[0042] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la fórmula IIC, el anillo A es

40



45

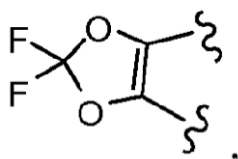
m es 0, X es CN, y R^j es Et.

[0043] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa b), el segundo disolvente es un disolvente aprótico. En otra realización, el segundo disolvente se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, éter metilo *t*-butilo, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otra realización, el segundo disolvente es dimetilsulfóxido.

55

[0044] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la fórmula I, el anillo A es

60



65

m es 0 y X es CN.

[0045] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa c), la base es una base inorgánica. En otra realización, la base es un hidróxido. En otra realización, la base es NaOH.

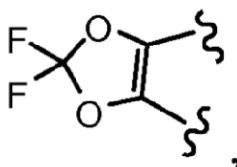
[0046] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la fórmula IID, q es 1.

[0047] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la fórmula IID, un Hal es Cl y el otro Hal es Br.

[0048] En otra realización, la invención presenta el método anterior en la que en la etapa d), la base es NaOH. En otra realización, en la etapa d), el ácido es HCl.

[0049] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa d), la reacción con una base de hidróxido se lleva a cabo a aproximadamente 60°C a 100°C. En otra realización, la reacción con un hidróxido tiene lugar a aproximadamente 70°C a 90°C. En otra realización, la reacción con un hidróxido tiene lugar a aproximadamente 80°C.

[0050] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la fórmula IIE, el anillo A es



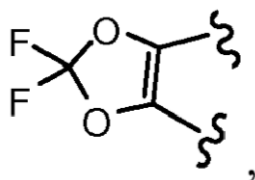
m es 0, n es 1, y X es CN.

[0051] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa e), el tercer disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otra realización, en la etapa e), el tercer disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, éter metilo *t*-butilo, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otra realización, en la etapa e), el tercer disolvente orgánico es tolueno.

[0052] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la etapa e), el agente de halogenación es SOCl₂.

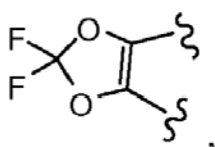
[0053] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que la etapa e) se lleva a cabo a aproximadamente 40°C a 80°C. En otra realización, la etapa e) tiene lugar a aproximadamente 50°C a 70°C. En otra realización, la etapa e) tiene lugar a aproximadamente 60°C.

[0054] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la fórmula IIF, el anillo A es



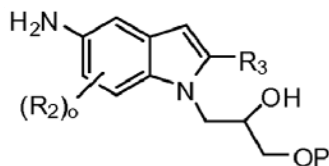
m es 0 y n es 1.

[0055] En otra realización, la invención presenta el método anterior en el que en la fórmula II, el anillo A es



m es 0, n es 1 y Hal es Cl.

[0056] Se describe aquí un método para preparar un compuesto de fórmula III:



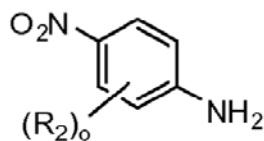
III

En donde, independientemente de cada ocurrencia:

R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SO^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;
 R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;
 R^3 es C_{1-6} alifático opcionalmente sustituido con OH, OP, $-O-C_{1-6}$ alifático, arilo, heteroarilo, $-O$ -arilo, u $-O$ -heteroarilo; P es un grupo protector; y
o es un número entero de 0 a 3;

Que comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIIA:



IIIA

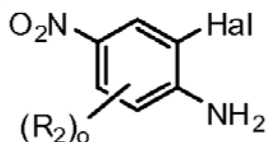
En donde, independientemente de cada ocurrencia:

R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático; y

o es un número entero de 0 a 3;

Con un reactivo de halogenación en un primer disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula IIIB:



IIIB

En donde, independientemente, para cada ocurrencia:

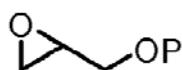
R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

o es un número entero de 0 a 3; y

Hal es un haluro;

b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula IIIB en un segundo disolvente orgánico con un compuesto de fórmula IIIC:

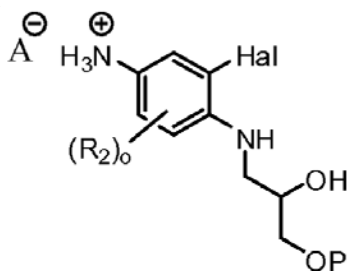


IIIC

donde:

P es un grupo protector;

Seguido de reducción y tratamiento con ácido para formar un compuesto de fórmula IIID:



IIID

donde:

R₂ es -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

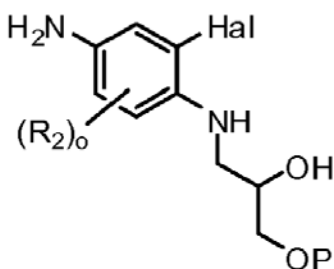
o es un número entero de 0 a 3;

Hal es un haluro;

P es un grupo protector; y

A[⊖] es un anión;

c) neutralizar un compuesto de fórmula IIID en presencia de una base para formar un compuesto de fórmula IIID-a:



IIID-a

5 donde:

R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

10 R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

o es un número entero de 0 a 3;

Hal es un haluro; y

15

P es un grupo protector;

d) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIID - a en un tercer disolvente orgánico con un compuesto de fórmula IIIE:

20



25

III E

30

En donde, independientemente de cada ocurrencia:

35 R^3 es un C_{1-6} alifático opcionalmente sustituido con OH, OP, $-OC_{1-6}$ alifático, arilo, heteroarilo, $-O$ -arilo, $-O$ - o heteroarilo;

En presencia de un catalizador para formar un compuesto de fórmula III.

40 **[0057]** En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IIIA, o es 1. En otro caso, o es 1 y R_2 es F.

[0058] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa a), el reactivo de halogenación es N-bromosuccinimida.

45 **[0059]** En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa a), el primer disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otra realización, el primer disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo *t*-butilo éter, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otro caso, el primer disolvente orgánico es acetato de etilo.

50

[0060] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que la etapa a) se lleva a cabo en alrededor de 2°C a 42°C. En otro caso, la etapa a) se lleva a cabo en alrededor de 12°C a 32°C. En otro caso, la etapa a) se lleva a cabo en alrededor de 22°C.

55 **[0061]** En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IIIB, o es 1, R_2 es F, y Hal es Br.

[0062] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IIIC, P es bencilo.

60 **[0063]** En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa b), el segundo disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otro caso, en el paso b), el segundo disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo *t* butilo éter, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otro caso, en el paso b), el segundo disolvente orgánico es tolueno.

65

[0064] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa b), la reacción con un compuesto de fórmula IIIC se lleva a cabo a aproximadamente 60°C a 100°C. En otro caso, en la etapa b), la reacción con un compuesto de fórmula IIIC se lleva a cabo a aproximadamente 70°C a 90°C. En otro caso, en la etapa b), la reacción con un compuesto de fórmula IIIC se lleva a cabo a aproximadamente 80°C.

[0065] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa b), la reducción se lleva a cabo con hidrógeno.

[0066] en otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa b), el ácido es ácido p-toluenosulfónico.

[0067] en otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IIID, o es 1, R₂ es F, Hal es Br, a⁻ es Tos⁻, y P es bencilo.

[0068] en otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IIIE, R³ es C(CH₃)₂CH₂O(bencilo).

[0069] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa c), la base es una base inorgánica.

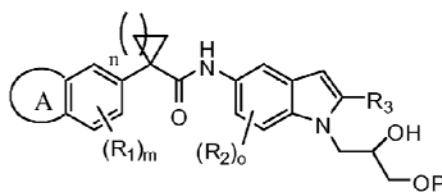
[0070] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa c), la base es NaHCO₃.

[0071] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa d), el tercer disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otro caso, en el paso d), el tercer disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo *t* butilo éter, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otro caso, en el paso d), el tercer disolvente orgánico es acetonitrilo.

[0072] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 60°C a 100°C. En otro caso, la etapa d) se lleva a cabo en alrededor de 70°C a 90°C. En otro caso, la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 80°C.

[0073] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa d), el catalizador es un catalizador de paladio. En otro caso, en el paso d), el catalizador se selecciona de acetato de paladio (II), Pd (dppf) Cl₂, Pd (dba)₂, (MeCN)₂ PdCl₂, tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) o tris (dibencilidenacetona) dipaladio (0). En otro caso, en el paso d), el catalizador es acetato de paladio (II).

[0074] Se describe aquí un método para preparar un compuesto de fórmula IV:



IV

en el que, independientemente para cada caso:

el anillo A es un cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, o un anillo heteroarilo condensado;

R₁ y R₂ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SO^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

R³ es un C₁₋₆alifático opcionalmente sustituido con OH, OP, -OC₁₋₆alifático, arilo, heteroarilo, -O-arilo, u -O-heteroarilo;

P es un grupo protector;

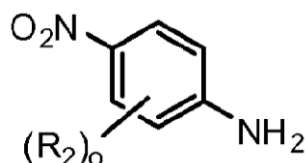
m es un número entero de 0 a 3 inclusive;

n es un número entero de 1 a 4 inclusive; y

o es un número entero de 1 a 3 inclusive;

que comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIIA:



IIIA

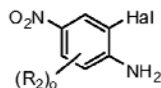
en la que, independientemente para cada caso:

R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifática; y

o es un número entero de 0 a 3;

con un reactivo de halogenación en un primer disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula IIIB:



IIIB

en la que, independientemente para cada caso:

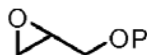
R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

o es un número entero de 0 a 3; y

Hal es un haluro;

b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula IIIB en un segundo disolvente orgánico con un compuesto de fórmula IIIC:

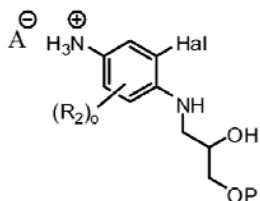


IIIC

en la que:

P es un grupo protector;

seguido de reducción y tratamiento con ácido para formar un compuesto de fórmula IIID:



IIIID

donde:

R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

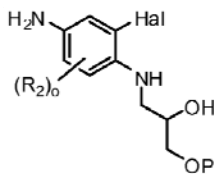
o es un número entero de 0 a 3;

Hal es un haluro;

P es un grupo protector; y

A^\ominus es un anión;

c) neutralizar un compuesto de fórmula IIIID en presencia de una base para formar un compuesto de fórmula IIIID-a:



IIIID-a

donde:

R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

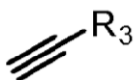
R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

o es un número entero de 0 a 3;

Hal es un haluro; y

P es un grupo protector;

d) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIIID en tercer disolvente orgánico con un compuesto de fórmula IIIE:



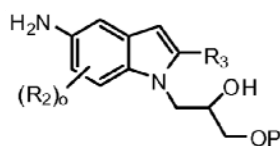
IIIIE

en el que, independientemente para cada caso:

R^3 es un C_{1-6} alifático opcionalmente sustituido con OH, OP, $-OC_{1-6}$ alifático, arilo, heteroarilo, $-O$ -arilo, $-O$ - o heteroarilo;

en presencia de un catalizador para formar un compuesto de fórmula III:

5



10

III

en el que, independientemente para cada caso:

15

R_2 es $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

20

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

R^3 es C_{1-6} alifático opcionalmente sustituido con OH, OP, $-OC_{1-6}$ alifático, arilo, heteroarilo, $-O$ -arilo, u $-O$ -heteroarilo;

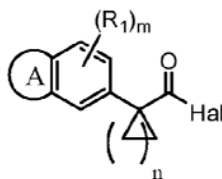
25

P es un grupo protector; y

o es un número entero de 0 a 3;

e) hacer reaccionar el compuesto de fórmula III en un cuarto disolvente orgánico con un compuesto de fórmula II:

30



35

II

40

en el que, independientemente para cada caso:

el anillo A es un cicloalquilo condensado, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo;

Hal es un haluro;

45

R_1 se selecciona independientemente de $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

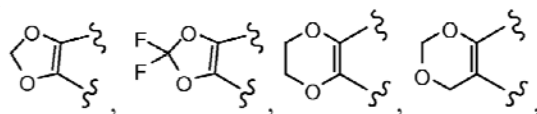
50

n es un número entero de 1 a 4 inclusive;

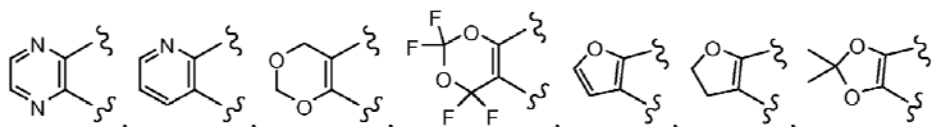
para formar el compuesto de fórmula IV.

[0075] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IV, el anillo A se selecciona de

55



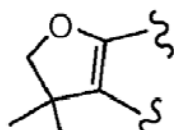
60



65

o

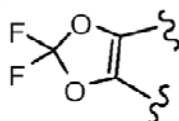
5



10

En otro caso, en la fórmula IV, el anillo A es

15



20

[0076] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IV, m es 0. En otro caso, en la fórmula IV, n es 1. En otro caso, en la fórmula IV, o es 1 y R₂ es F.

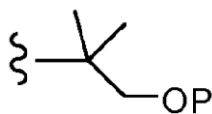
25

[0077] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IV, P es bencilo.

30

[0078] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IV, R³ es un C₄alifático opcionalmente sustituido con OP. En otro caso, en la fórmula IV, R³ es

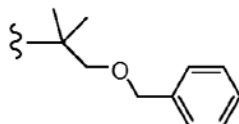
35



40

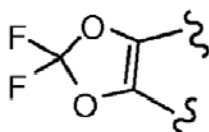
En otro caso, en la fórmula IV, R³ es

45



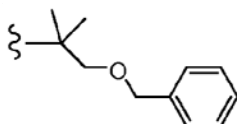
[0079] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IV, el anillo A es

50



m es 0, n es 1, o es 1 y R₂ es F, P es bencilo, y R³ es

55



[0080] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa a), el reactivo de halogenación es N-bromosuccinimida.

60

[0081] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa a), el primer disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otro caso, en el paso a), el primer disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo *t* butilo éter, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otro caso, en el paso a), el primer disolvente orgánico es acetato de etilo.

65

[0082] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que la etapa a) se lleva a cabo en alrededor de 2°C a 42°C. En otro caso, la etapa a) se lleva a cabo en alrededor de 12°C a 32°C. En otro caso, la etapa a) se lleva a cabo en alrededor de 22°C.

5 **[0083]** En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IIIB, o es 1, R₂ es F, y Hal es Br.

[0084] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la fórmula IIIC, P es bencilo.

10 **[0085]** En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa b), el segundo disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otro caso, en el paso b), el segundo disolvente orgánico se selecciona de 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo *t* butilo éter, cetona de metilo etilo, cetona de metilo isobutilo, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano, o dimetilsulfóxido. En otro caso, en el paso b), el segundo disolvente orgánico es tolueno.

15 **[0086]** En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa b), la reacción con un compuesto de fórmula IIIC se lleva a cabo a aproximadamente 60°C a 100°C. En otro caso, en la etapa b), la reacción con un compuesto de fórmula IIIC se lleva a cabo a aproximadamente 70°C a 90°C. En otro caso, en la etapa b), la reacción con un compuesto de fórmula IIIC tiene lugar a aproximadamente 80°C.

20 **[0087]** En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa b), la reducción se lleva a cabo con hidrógeno.

25 **[0088]** En otro ejemplo, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa b), el ácido es ácido *p*-toluensulfónico.

[0089] En otro ejemplo, la descripción presenta el método anterior en el que en la fórmula IIID, o es 1, R₂ es F, Hal es Br, A- es Tos- y P es bencilo.

30 **[0090]** En otro ejemplo, la descripción presenta el método anterior en el que en la fórmula IIIE, R₃ es C(CH₃)₂CH₂O (bencilo).

[0091] En otro ejemplo, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa c), la base es una base inorgánica.

35 **[0092]** En otro ejemplo, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa c), la base es NaHCO₃.

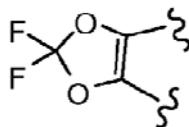
40 **[0093]** En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa d), el tercer disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otro caso, en la etapa d), el tercer disolvente orgánico se selecciona entre 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo *t*-butilo éter, metiletilcetona, metilisobutilcetona, acetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano o dimetilsulfóxido. En otro caso, en la etapa d), el tercer disolvente orgánico es acetonitrilo.

45 **[0094]** En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que la etapa d) tiene lugar entre aproximadamente 60°C y 100°C. En otro caso, la etapa d) tiene lugar a aproximadamente 70°C a 90°C. En otro caso, la etapa d) tiene lugar a aproximadamente 80°C.

50 **[0095]** En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa d), el catalizador es un catalizador de paladio. En otro caso, en la etapa d), el catalizador se selecciona entre acetato de paladio (II), Pd (dppf) Cl₂, Pd (dba) 2, tetradis (trifenilfosfina) paladio (0) o tris (dibencilidenoacetona)dipaladio. En otro instante, en la etapa d), el catalizador es acetato de paladio (II).

[0096] En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa e), el anillo A es

55



60

m es 0, n es 1 y Hal es Cl.

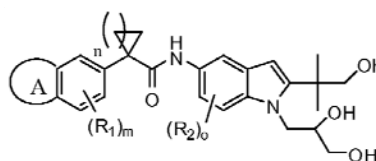
65 **[0097]** En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa e), el cuarto disolvente orgánico es un disolvente aprótico. En otro caso, en la etapa e), el cuarto disolvente orgánico se selecciona entre 1,2-dimetoxietano, dioxano, acetonitrilo, tolueno, benceno, xilenos, metilo de *t*-butilo éter, metiletilcetona,

metilisobutilcetona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidinona, acetato de etilo, diclorometano o dimetilsulfóxido. En otro caso, en la etapa e), el cuarto disolvente orgánico es diclorometano.

5 **[0098]** En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que la etapa e) tiene lugar a aproximadamente -20°C a 20°C. En otro caso, la etapa e) tiene lugar a aproximadamente -10°C a 10°C. En otro caso, la etapa e) tiene lugar a aproximadamente 0°C.

10 **[0099]** En otro caso, la descripción presenta el método anterior en el que en la etapa e), el compuesto de fórmula II se prepara in situ por halogenación del precursor ácido y se hace reaccionar con el compuesto de fórmula III sin aislamiento.

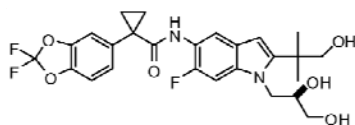
15 **[0100]** En otro ejemplo, la descripción presenta el método anterior que comprende además eliminar los dos grupos protectores del compuesto de fórmula IV para formar un compuesto de fórmula IVA:



IVA.

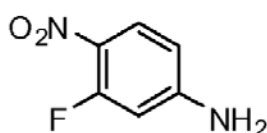
25 **[0101]** En otro ejemplo, los grupos protectores se eliminan por hidrogenación.

30 **[0102]** Se describe aquí un método para preparar el Compuesto 1:

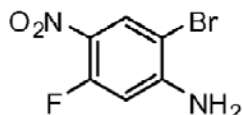


35 que comprende las etapas de:

40 a) hacer reaccionar el compuesto 2:

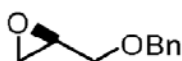


45 con un reactivo de bromación para formar un compuesto 3:



3

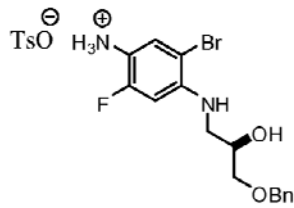
50 b) hacer reaccionar el compuesto 3 con el compuesto 4:



4

seguido de reducción para formar el compuesto 5:

5



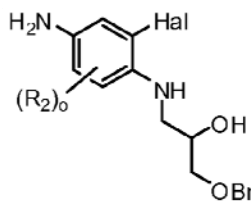
10

5

15

seguido de neutralización compuesto 5 con una base para dar el compuesto 5a:

20



25

5a

30

c) hacer reaccionar el compuesto compuesto 5a with 6:

35

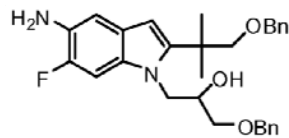


6

40

en presencia de un catalizador para formar el compuesto 7:

45

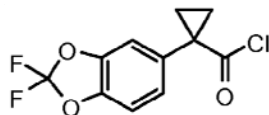


7

50

d) hacer reaccionar el compuesto 7 con el compuesto 8:

55

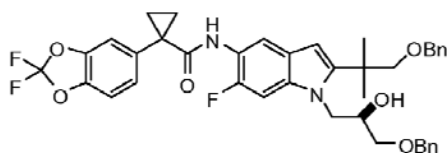


8

60

a compuesto 9 formar:

65



9

y

e) la eliminación de los dos grupos protectores Bn para formar el Compuesto 1.

[0103] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa a), el agente de bromación es N-bromosuccinimida.

[0104] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en etapa b), la reducción se lleva a cabo con hidrógeno.

[0105] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en etapa b), la base es una base inorgánica.

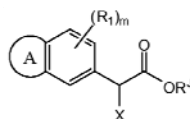
[0106] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en etapa b), la base es NaHCO₃.

[0107] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa c), el catalizador es un catalizador de paladio. En otro caso, en el paso c), el catalizador se selecciona de acetato de paladio (II), Pd(dppf)Cl₂, Pd(dba)₂, tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) o tris(dibencilidenacetona) dipaladio(0). En otro caso, en el paso c), el catalizador es acetato de paladio (II).

[0108] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa d), el compuesto 8 se hace in situ por halogenación del precursor ácido sin aislamiento.

[0109] En otro caso, la divulgación presenta el método anterior en el que en la etapa e), los grupos protectores Bn se eliminan por hidrogenación.

[0110] Se describe aquí un compuesto de fórmula 23:



23

donde:

el anillo A es un cicloalquilo condensado, heterocicloalquilo, arilo, o heteroarilo;

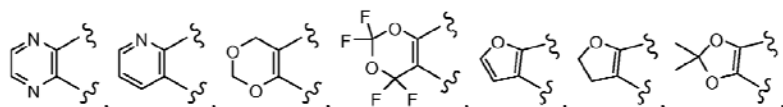
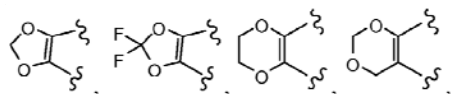
R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SO^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J; R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

X es CN o CO₂R;

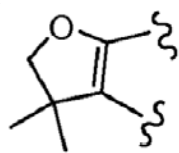
R es C₁₋₆alifático o arilo; y

m es un número entero de 0 a 3 inclusive.

[0111] También se describe en este documento es un compuesto de fórmula 23 y las definiciones concomitantes, en el que el anillo A es un heterocicloalquilo o heteroarilo condensado. En otra realización, el anillo A se selecciona de

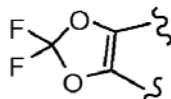


5



En otro caso, el anillo A es

10



15

[0112] También se describe aquí un compuesto de fórmula 23 y las definiciones concomitantes, en el que X es CN. En otro caso, X es CO₂ Et.

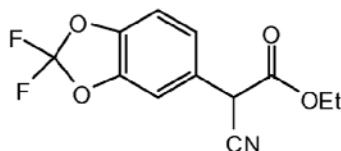
20

[0113] También se describe aquí un compuesto de fórmula 23 y las definiciones concomitantes, en el que m es 0.

[0114] En otro ejemplo, la invención presenta un compuesto de fórmula 23 y las definiciones concomitantes, en la que R^j es C₁₋₆alifáticos. En otro caso, R^j es -CH₂ CH₃.

25

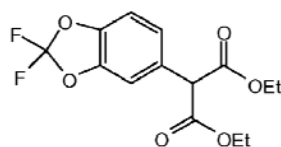
[0115] Se describe aquí el compuesto



30

[0116] Se describe aquí el compuesto

35

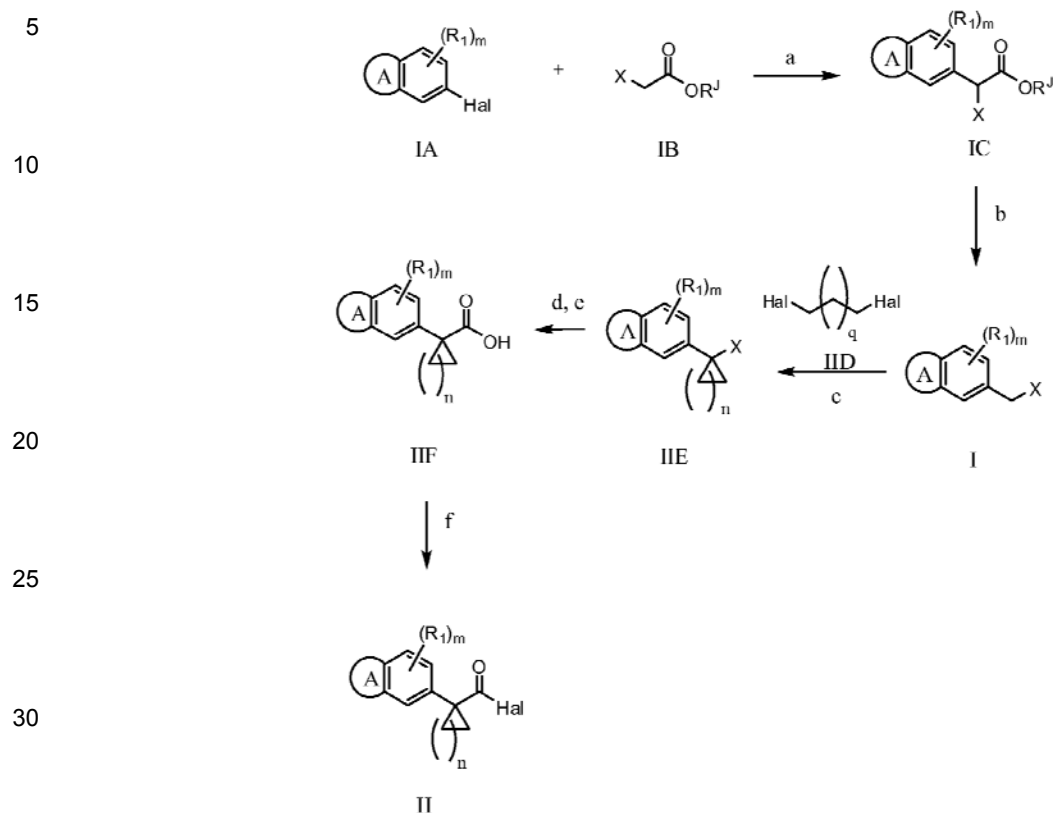


40

45 Métodos de preparación de los compuestos de fórmulas I, II, III, y IV

[0117] Los compuestos de fórmulas I, II, III y IV se pueden preparar por los procedimientos de los Esquemas 1-3.

Esquema 1. Compuestos de fórmula I y II.



a = Pd(0) catalizador; b = ácido; c = base; d = base de hidróxido; e = ácido; f = agente de halogenación; en donde el anillo A, R₁, m, X, R^J, Hal, Q y n son como se definen anteriormente.

[0118] En el Esquema 1, un haluro de arilo IA se hace reaccionar con éster de IB en presencia de un catalizador de metal de transición en un disolvente adecuado (por ejemplo, tolueno) para producir éster IC. En ésteres IB y IC, X puede ser o bien CN o CO₂R. El tratamiento de la IC con un ácido en un disolvente adecuado (por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO)) produce I. La reacción de I con el dihaluro de IID en presencia de una base da la cicloalquilideno IIE. Hidrolización del grupo éster o cianuro restante dependiendo de la identidad de X da la IIF ácido carboxílico que se halogena para producir el haluro de ácido II.

[0119] En una realización, IA está disponible comercialmente. En una realización, el anillo A es un anillo de dioxilo de 5 miembros. En una realización, Hal es Br en IA. En una realización, la reacción de IA y IIB se lleva a cabo en tolueno en presencia de un catalizador Pd(0), por ejemplo Pd(dba)₂. En una realización adicional, la reacción tiene lugar en presencia de una fosfina de alquilo, por ejemplo *t*-Bu₃P y el fosfato de sal, por ejemplo Na₃PO₄. En otra realización, la reacción de IA y IIB se lleva a cabo a aproximadamente 70°C. En otra realización, R^J es Et.

[0120] En una realización, la de-esterificación de IC a I se realiza con un ácido inorgánico. En una realización adicional, el ácido inorgánico es HCl. La conversión se lleva a cabo en un disolvente aprótico adecuado (por ejemplo DMSO) a aproximadamente 75°C.

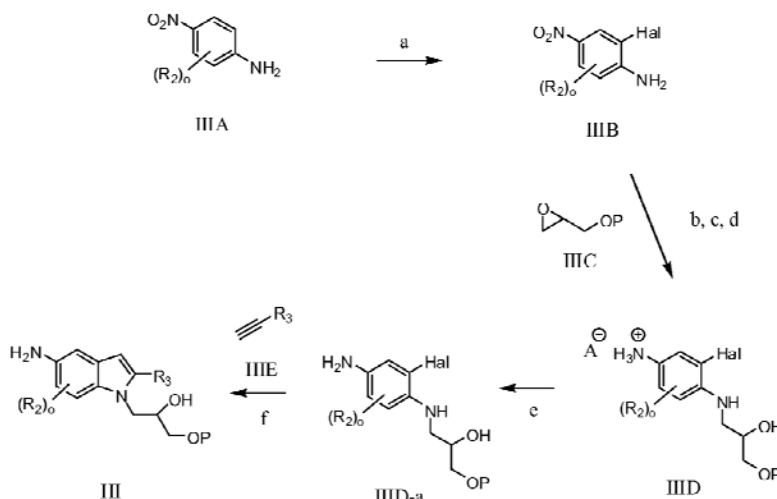
[0121] En una realización, que se hace reaccionar con NaOH y un dihaluro de alquilo para dar el cicloalquilideno en un disolvente adecuado (por ejemplo, MTBE). El proceso es adaptable a varios anillos espirocíclicos eligiendo el dihaluro de alquilo apropiado. Por ejemplo, un anillo de butano espirocíclico puede ser producido mediante la reacción de I con, por ejemplo, 1-bromo-3-cloropropano. Se ha encontrado que un bromo y cloro dihaluro de mezclado funciona mejor en una escala económica ya que se cree que la termodinámica de la reacción son más favorables.

[0122] En una realización, IIE se hidroliza al ácido carboxílico IIF en presencia de agua y una base (por ejemplo NaOH) en un disolvente adecuado (por ejemplo etanol). Tratamiento posterior con un ácido tal como HCl produce IIF. En otra realización, IIF se elabora por recristalización a partir de tolueno.

[0123] En una realización, el agente de halogenación que convierte IIF a II es cloruro de tionilo. En otra realización, se añade el cloruro de tionilo a IIF en tolueno a aproximadamente 60°C. En una realización, este paso precede directamente el acoplamiento entre II y la amina III (véase más adelante) y se lleva a cabo en el mismo recipiente de reacción.

[0124] Hay varias ventajas no limitativas para la formación de II de acuerdo con el Esquema 1 y las realizaciones descritas arriba y en la aplicación en otros lugares. Estas ventajas son evidentes aún más cuando se fabrica II en una escala económica e incluyen lo siguiente. La reacción global requiere sólo 5 pasos, que es menos de lo que se ha informado anteriormente (es decir, a partir de un ácido carboxílico de arilo, que se reduce al alcohol de metilo, que se convierte en un cloruro de metilo, que se hace reaccionar con NaCN). Esta vía de síntesis introduce el grupo CN o un éster (es decir, X), sin una reacción de cloración separada. El uso de etanol como el codisolvente en la hidrólisis IIE a los resultados IIF en una mezcla de reacción homogénea facilitando el muestreo y control de la reacción. Recristalización a partir de tolueno IIF elimina la necesidad de formar una sal de dicitohexilamina (DCA) como se informó anteriormente.

Esquema 2. Compuestos de fórmula III.



un agente de halogenación =; b = Zn (II) catalizador; c = H₂, Pt; d = ácido; e = base; f = Pd(II) catalizador;
 en la que R₂, o, Hal, A[⊖], y P se definen como anteriormente.

[0125] En un caso, en la zona IIIa, R₂ es F y es meta con respecto al grupo amina. En otro caso, IIIA se broma con N-bromosuccinimida en un disolvente adecuado (por ejemplo, acetato de etilo) a aproximadamente 22°C.

[0126] En otro ejemplo, IIIB se hace reaccionar con epóxido IIIC, efectuando una reacción de apertura de anillo con el grupo amina de IIIB para formar IIID. En un caso, el grupo protector, P, en IIIC es bencilo (Bn). En otro caso, epóxido IIIC es quiral. En un caso, IIIC es (*R*) IIIC. En otro caso, IIIC es (*S*) IIIC. En un caso, la reacción de apertura del anillo se lleva a cabo en un disolvente adecuado (por ejemplo, tolueno) a aproximadamente 80°C. En otro ejemplo, la reacción de apertura del anillo se lleva a cabo en presencia de un catalizador de Zn(II) (por ejemplo, Zn(ClO₄)₂). En otro ejemplo, la conversión de IIIB a IIID comprende la reacción de apertura del epóxido de anillo con IIIC, seguido por hidrogenación, y después el tratamiento con un ácido para formar IIID. En otro ejemplo, la hidrogenación se lleva a cabo con H₂/Pt(S)/C. En un ejemplo adicional, el ácido es ácido sulfónico de tolueno, de manera que A[⊖] es un anión de tosilato.

[0127] En otro ejemplo, alquino IIIE está acoplado con IIID en un disolvente adecuado (por ejemplo acetonitrilo) a aproximadamente 80°C. En otro ejemplo, la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en presencia de un catalizador de Pd(II), tal como Pd(OAc)₂. La reacción inicial no resulta en el cierre del anillo, solamente la sustitución del haluro en IIID. El cierre del anillo se lleva a cabo a través de la reacción con otro catalizador de Pd(II), tal como (MeCN)₂PdCl₂ en un disolvente adecuado (por ejemplo acetonitrilo). En un caso, el cierre del anillo se lleva a cabo en alrededor de 80°C. En un caso, R³ en alquino IIIE es -C(CH₃)₂CH₂OBn. En un caso, el producto de la reacción de acoplamiento no es aislado, pero se recogió en acetonitrilo y se hizo reaccionar con (MeCN)₂PdCl₂.

[0128] Hay varias ventajas no limitativas para el compuesto III de formación de acuerdo con el Esquema 2 y las

formas de realización descritas anteriormente y en otras partes de la aplicación. Estas ventajas son evidentes aún más cuando la fabricación III a escala económica e incluyen lo siguiente. El número total de pasos se han reducido en comparación con lo que se dio a conocer con anterioridad a tan sólo 3 pasos. Otras ventajas incluyen la eliminación de la cromatografía y los subproductos de los grupos protectores.

5

Esquema 3. Compuestos de fórmula IV.

10

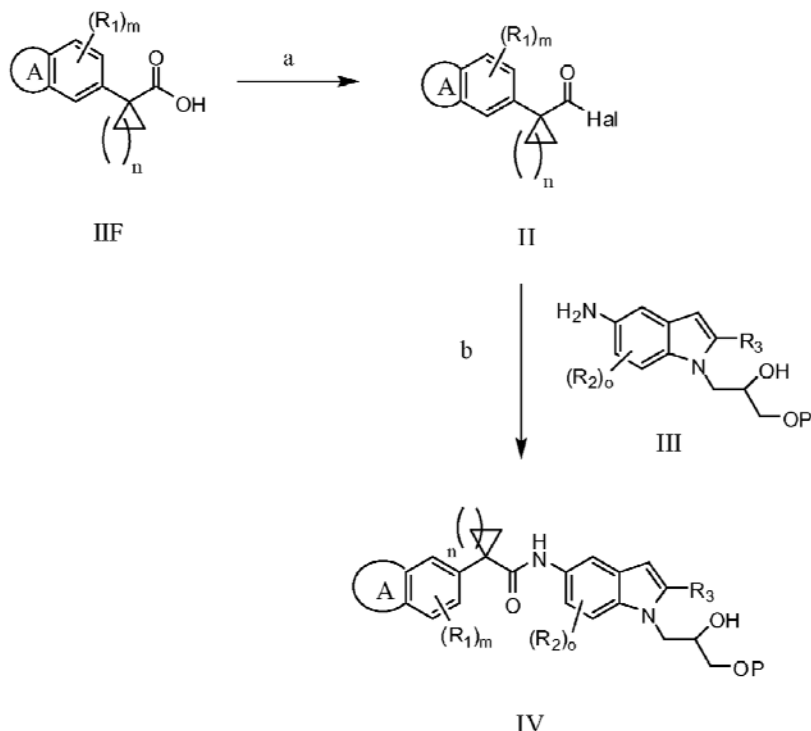
15

20

25

30

35



40

a = agente de halogenación =; b = disolvente aprótico;

en donde el anillo A, R₁, m, n, hal, R₂, o, p, y R³ son como se definen anteriormente.

45

[0129] Una reacción a base de ácido entre II y III en un disolvente adecuado (por ejemplo, diclorometano (DCM)) se obtiene el análogo protegido del Compuesto 1. En una realización, el haluro de ácido II se prepara a partir de IIF como se representa en el Esquema 1 en el mismo recipiente de reacción y no está aislado. En otro caso, la reacción a base de ácido se lleva a cabo en presencia de una base tal como trietilamina (TEA). En un caso, la cantidad de té es de 2 equivalentes con relación a II. En un caso, después de un tiempo de reacción de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 0°C y el calentamiento a la temperatura ambiente durante la noche, se añade agua a la mezcla y se agitó durante otros 30 minutos. La fase orgánica se separa y IV se aísla por destilación del disolvente de reacción. En un caso, IV se recoge por filtración de almohadilla de sílice.

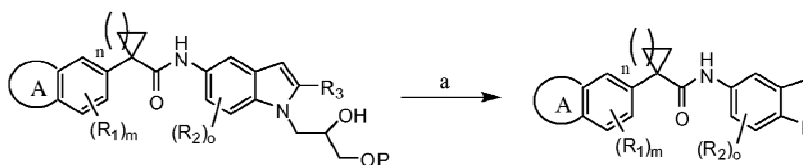
50

[0130] En otro ejemplo, los compuestos de fórmula IV se puede desproteger para formar compuestos de fórmula IVa según el Esquema 4.

55

Esquema 4. Compuestos de desprotección de fórmula IV

60



65

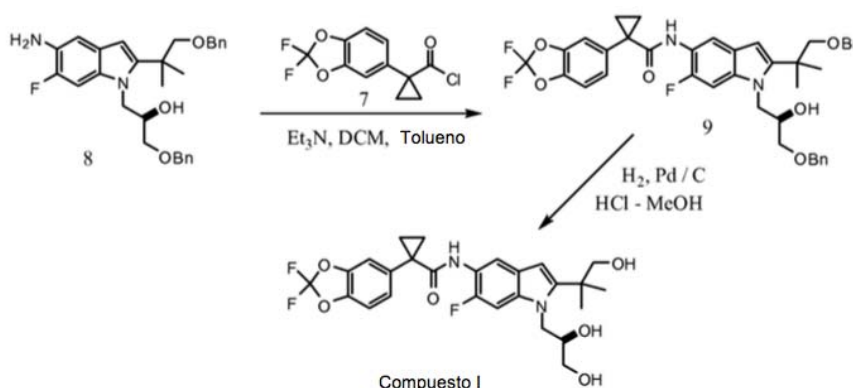
a = H₂/Pd/C;

en donde el anillo A, R₁, m, n, R₂, o, R³, y P se definen como anteriormente.

[0131] En un caso, la presurización de hidrógeno es de 3 bares. En otro caso, la velocidad de agitación de hidrogenación se aumentó a 800 rpm. En otro ejemplo, después de la absorción de hidrógeno rápida disminuye, el recipiente de hidrogenación se calienta a aproximadamente 50°C durante 2 días. En otro ejemplo, después de los 2 días, se añadió más catalizador y la hidrogenación continúa durante otros 4 días. En otro caso, IV se disuelve en un disolvente adecuado (por ejemplo THF).

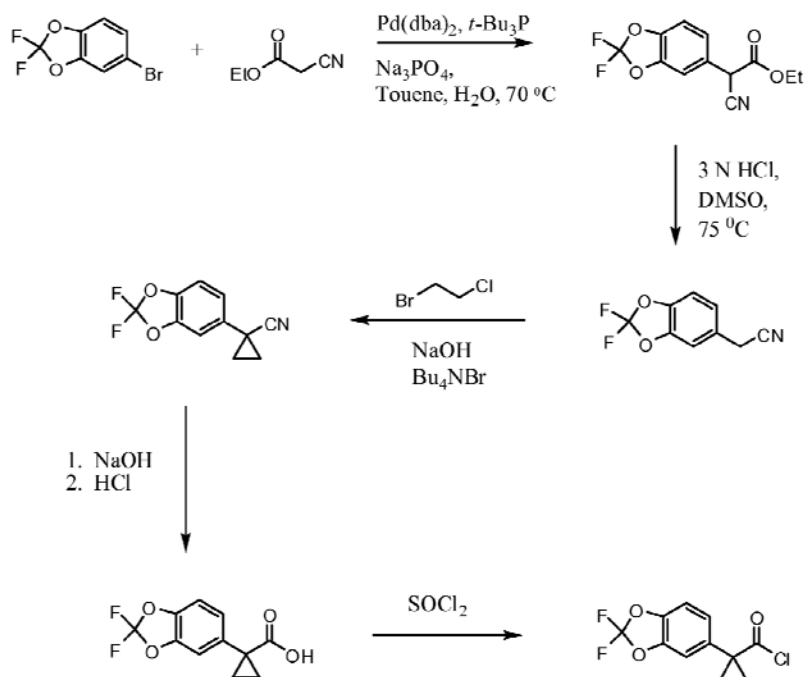
[0132] En otro ejemplo, el Compuesto 1 se puede preparar por acoplamiento del resto de haluro de ácido 7 con el resto de amina 8 para formar el compuesto 9 seguido de la desprotección de acuerdo con el Esquema 5.

Esquema 5. Preparación del Compuesto I.



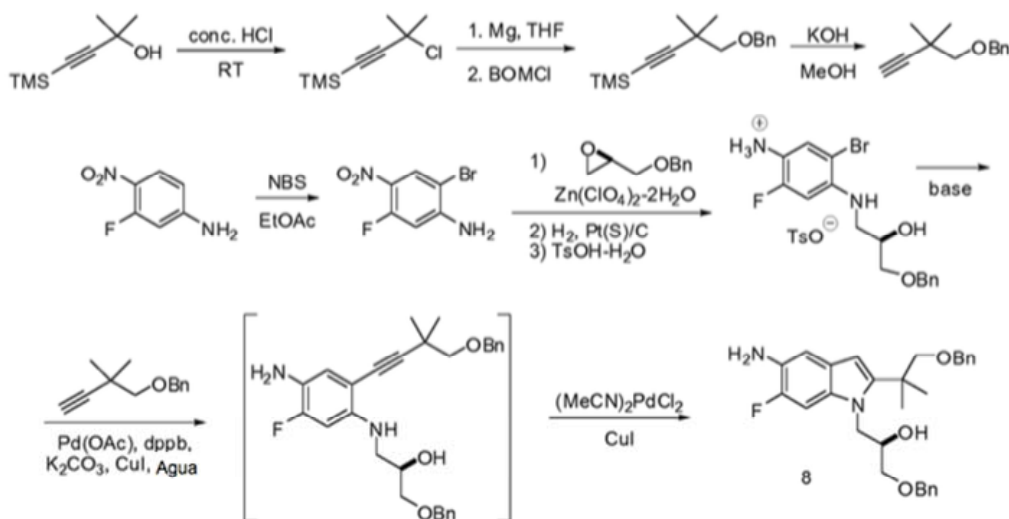
[0133] la que el compuesto 7 se prepara de acuerdo con el Esquema 6.

Esquema 6.



[0134] la que el compuesto 8 se prepara de acuerdo con el Esquema 7.

Esquema 7.



Usos, Formulación y Administración

Composiciones farmacéuticamente aceptables

[0135] Las composiciones farmacéuticamente aceptables se dan a conocer, en las que estas composiciones comprenden Forma A de Compuesto 1 o Compuesto 1 amorfo como se describe en el presente documento, y comprenden opcionalmente un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertos casos, estas composiciones comprenden además opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

[0136] Como se describió anteriormente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención comprenden, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante o vehículo, que, como se usa aquí, incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, u otro vehículo líquido, dispersión o auxiliares de suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, tal como adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta edición, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) da a conocer diversos portadores utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en tanto que cualquier medio portador convencional es incompatible con los compuestos de la invención, tales como mediante la producción de cualquier efecto biológico indeseable o de otro modo interactuar de manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéuticamente aceptable, contemplándose su uso dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias de tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, o sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, fosfato potásico de hidrógeno, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de polietileno-polioxipropileno de bloques, grasa de lana, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo;

agar; agentes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio tamponantes; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico, y tampón de fosfato de soluciones, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como sulfato sódico de laurilo y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden también estar presente en la composición, según el juicio del formulador.

Usos de compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables

[0137] En otro ejemplo, un compuesto o composición para uso en un método de tratamiento de una afección, enfermedad, o trastorno implicado por RTFQ se da a conocer en el presente documento. En ciertos casos, una composición que comprende el Compuesto 1 se da a conocer en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una afección, enfermedad, o trastorno implicado por una deficiencia de la actividad de RTFQ, comprendiendo dicho método la administración de una composición que comprende un compuesto 1 descrito en este documento a un sujeto, preferiblemente un mamífero, en necesidad del mismo.

[0138] Una "enfermedad mediada por RTFQ", como se usa en el presente documento es una enfermedad seleccionada de la fibrosis quística, el asma, el humo inducido por EPOC, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, la infertilidad masculina causada por la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD), enfermedad leve pulmonar, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad del hígado, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias de coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditaria de tipo 1, deficiencias de procesamiento de lípidos, tales como la hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia de tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como la enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar de tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, la deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glucanosis CDG de tipo 1, el hipertiroidismo congénito, la osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurofisaria, DI neprogénica, síndrome de Charcot-Marie Tooth, Perlizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, Plasy supranuclear progresiva, enfermedad de pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina tales como el Huntington, ataxia espinocerebelar de tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, palidoluisiana dentatorubal, y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob (debido a un defecto de procesamiento de la proteína priónica), la enfermedad de Fabry, síndrome de Straussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco, o enfermedad de Sjogren, la osteoporosis, la osteopenia, la curación del hueso y el crecimiento óseo (incluyendo la reparación ósea, la regeneración ósea, reduciendo resorción ósea y el aumento de la deposición de hueso), el síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro tales como miotonía congénita (formas Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, la enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosomal, síndrome de Angelman, y discinesia ciliar primaria (DCP), un término para trastornos hereditarios de la estructura y/o función de los cilios, incluyendo PCD con situs inverso (también conocido como síndrome de Kartagener), PCD y sin situs y la aplasia ciliar. En otra realización, la enfermedad mediada RTFQ es la fibrosis quística, enfisema, COPD, o osteoporosis. En otro ejemplo, la enfermedad mediada RTFQ es la fibrosis quística.

[0139] En ciertos casos, la presente invención proporciona una composición que comprende el compuesto 1 descrito en este documento para su uso en un método para tratar una enfermedad mediada por RTFQ en un ser humano, en el que el método comprende la etapa de administrar a dicho ser humano una cantidad eficaz de una composición que comprende el compuesto 1 descrito en este documento.

[0140] Según la descripción, una "cantidad eficaz" de Forma A de Compuesto 1 o el Compuesto amorfo 1 o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo es la cantidad eficaz para tratar o reducir la gravedad de cualquiera de las enfermedades indicadas anteriormente.

[0141] Compuesto 1 o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o disminuir la gravedad de una o más de las enfermedades citadas anteriormente.

[0142] En ciertos casos, el Compuesto 1 se describe en el presente documento o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo es útil para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en los pacientes que presentan actividad RTFQ residual en la membrana apical de los epitelios respiratorios y no respiratorios. La presencia de actividad de RTFQ residual en la superficie epitelial se puede detectar fácilmente usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, electrofisiológicos estándar, bioquímicos, o técnicas histoquímicas. Tales métodos identifican actividad de RTFQ utilizando técnicas electrofisiológicas *in vivo* o *ex vivo*, la medición de sudor o saliva Cl⁻ concentraciones, o técnicas bioquímicas o histoquímicas *ex vivo* para controlar la densidad de la superficie celular. El uso de tales métodos, la actividad RTFQ residual se puede detectar fácilmente en pacientes homocigotos o heterocigotos para una variedad de diferentes mutaciones, incluyendo pacientes homocigotos o heterocigotos para la mutación más común, hF508.

5 **[0143]** En un caso, el compuesto 1 descrito en este documento o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo es útil para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en los pacientes dentro de ciertos genotipos que presentan actividad RTFQ residual, por ejemplo, mutaciones de clase III (regulación deteriorada o gating), mutaciones de clase IV (conductancia alterada), o mutaciones de clase V (síntesis de reducción) (Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521 - 529, 2000). Otros genotipos de pacientes que exhiben actividad RTFQ residual incluyen pacientes homocigotos para una de estas clases o heterocigotos con cualquier otra clase de mutaciones, incluyendo mutaciones de clase I, mutaciones de clase II, o una mutación que carece de clasificación.

10 **[0144]** En un caso, el Compuesto 1 descrito en este documento o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo es útil para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en los pacientes dentro de ciertos fenotipos clínicos, por ejemplo, un moderado a fenotipo clínico leve que por lo general se correlaciona con la cantidad de actividad RTFQ residual en la membrana apical de los epitelios. Tales fenotipos incluyen pacientes que presentan insuficiencia pancreática o pacientes con diagnóstico de pancreatitis idiopática y la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes, o enfermedad pulmonar leve.

15 **[0145]** La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y condición general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración, y similares. Los compuestos de la invención se formulan preferiblemente en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria" tal como se utiliza aquí, se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiado para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El término "paciente" o "sujeto", como se usa aquí, significa un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano.

20 **[0146]** Las composiciones farmacéuticamente aceptables descritas en este documento pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como por polvos, pomadas o gotas), bucal, como una pulverización oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se está tratando. En ciertos casos, los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral o parenteral a niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

25 **[0147]** En ciertos casos, la cantidad de dosis del Compuesto 1 en la forma de unidad de dosificación es de 100 mg a 1.000 mg. En otro caso, la cantidad de dosis del Compuesto 1 es de 200 mg a 900 mg. En otro caso, la cantidad de dosis del Compuesto 1 es de 300 mg a 800 mg. En otro caso, la cantidad de dosis del Compuesto 1 es de 400 mg a 700 mg. En otro caso, la cantidad de dosis del Compuesto 1 es de 500 mg a 600 mg.

30 **[0148]** Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente no tóxico parenteralmente aceptable o disolvente, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, USP y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo suave puede ser empleado incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico se usan en la preparación de inyectables.

35 **[0149]** Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

40 **[0150]** Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de esta invención con excipientes no irritantes adecuados o portadores tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

45 **[0151]** Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con excipiente o vehículo al

menos un inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, inona polivinilpirrolidina, sacarosa, y acacia, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes de desintegración, tales como agar - agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio de cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, sulfato de sodio de laurilo, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

[0152] Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente activo solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

[0153] Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se indicó anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de liberación controlada y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólida el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de compresión y otros ayudantes de compresión tal como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente activo solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

[0154] También se apreciará que el Compuesto 1 descrito en el presente documento o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo se puede emplear en terapias de combinación, es decir, el Compuesto 1 se puede administrar simultáneamente con, antes de, o posteriormente a, uno o más de otros agentes terapéuticos deseados o procedimientos médicos. La combinación particular de terapias (agentes terapéuticos o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos deseados y/o procedimientos y el efecto terapéutico deseado. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden conseguir diferentes efectos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). Tal como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad particular, o condición, son conocidos como "apropiados para la enfermedad o afección que se está tratando".

[0155] En un caso, se selecciona el agente adicional de un agente mucolítico, broncodilatador, un anti-biótico, un agente anti-infectivo, un agente anti-inflamatorio, un modulador RTFQ que no sea un compuesto de la presente invención, o un agente nutricional.

[0156] En un caso, el agente terapéutico adicional es un antibiótico. Antibióticos ejemplares útiles en este documento incluyen tobramicina, incluyendo tobramicina inhalada en polvo (TIP), azitromicina, aztreonam, incluyendo la forma de aerosol de aztreonam, amikacina, incluyendo formulaciones liposomales de los mismos, ciprofloxacina, incluyendo sus formulaciones adecuadas para la administración por inhalación, levofloxacina, incluyendo formulaciones en aerosol de los mismos y combinaciones de dos antibióticos, por ejemplo, la fosfomicina y tobramicina.

[0157] En otro caso, el agente adicional es un mucolito. Ejemplos de mucolitos útiles en esta invención incluye Pulmozyme®.

[0158] En otro ejemplo, el agente adicional es un broncodilatador. Broncodilatadores ejemplares incluyen albuterol, sulfato de metaprotenerol, acetato de pirbuterol, salmeterol, o sulfato de tetrabulina.

[0159] En otro caso, el agente adicional es eficaz en la restauración de superficie líquida de vías respiratorias pulmonares. Tales agentes de mejora de la circulación de sal en y fuera de las células, permitiendo que el moco en

las vías respiratorias del pulmón se hidraten y, por lo tanto, se aclaren con más facilidad. Los ejemplos de tales agentes incluyen la solución salina hipertónica, tetrasodio de denufosol ([[(3S, 5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidina-1-il)-3-hidroxiolano-2-il]metoxi-hidroxifosforilo](((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxopirimidina-1-il)-3,4-dihidroxiolano-2-il]metoxi-hidroxifosforilo]oxihidroxifosforilo] fosfato de hidrógeno), o bronchitol (formulación de manitol inhalado).

[0160] En otro ejemplo, el agente adicional es un agente anti-inflamatorio, es decir, un agente que puede reducir la inflamación en los pulmones. Los ejemplos de tales agentes útiles en esta invención incluyen ibuprofeno, ácido docosahexanoico (DHA), sildenafilo, inhalado glutatión, pioglitazona, hidroxiclороquina, o simvastatina.

[0161] En otro caso, el agente adicional es un modulador RTFQ que no sea el compuesto 1, es decir, un agente que tiene el efecto de modular la actividad de RTFQ. Los ejemplos de tales agentes incluyen ataluren ("PTC124®"; 3-[5-(2-fluorofenilo)-1,2,4-oxadiazol-3-il]benzoico), sinapultida, lancovutida, depelestato (un inhibidor de la elastasa de neutrófilos humana recombinante), cobiprostona (7-[(2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-difluoro-3-metilpentilo]-2-hidroxi-6-oxooctahidrociclopenta[b]pirano-5-il]heptanoico), y N- (5-hidroxi-2,4-di-ter-butilo-fenilo)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida.

[0162] En otro caso, el agente adicional es un agente nutricional. Agentes nutricionales ejemplares incluyen pancrealipasa (reemplazo enzimático de pancreación), incluyendo Pancrease®, Pancreacarb®, Ultrase®, o Creon®, Liprotomase® (anteriormente Trizytec®), Aquadeks®, o la inhalación de glutatión. En un caso, el agente nutricional adicional es pancrelipasa.

[0163] En otro caso, el agente adicional es un compuesto seleccionado de gentamicina, la curcumina, ciclofosfamida, 4-fenilbutirato, miglustato, felodipino, nimodipino, filoxina B, geniesteina, apigenina, moduladores cAMP/cGMP como rolipram, sildenafilo, milrinona, tadalafilo, amrinona, isoproterenol, albuterol, y almeterol, desoxiespergualina, inhibidores HSP 90, inhibidores HSP 70, inhibidores de proteosoma como epoxomicina, lactacistina, etc.

[0164] En otro caso, el agente adicional es un compuesto descrito en el documento WO 2004028480, WO 2004110352, WO 2005094374, WO 2005120497, o WO 2006101740.

[0165] En otro caso, el agente adicional es un derivado de benzo(c)quinolizinio que presenta actividad de modulación de RTFQ o un derivado de benzopirano que presenta actividad de modulación de RTFQ.

[0166] En otro ejemplo, el agente adicional es un compuesto descrito en US7202262, US6992096, US20060148864, US20060148863, US20060035943, US20050164973, WO2006110483, WO2006044456, WO2006044682, WO2006044505, WO2006044503, WO2006044502, o WO2004091502.

[0167] En otro caso, el agente adicional es un compuesto descrito en WO2004080972, WO2004111014, WO2005035514, WO2005049018, WO2006099256, WO2006127588, o WO2007044560.

[0168] Estas combinaciones son útiles para el tratamiento de las enfermedades descritas en el presente documento incluyendo la fibrosis quística. Estas combinaciones son también útiles en los kits descritos en este documento.

[0169] La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no será más que la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende ese agente terapéutico como el único agente activo. Preferiblemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones actualmente descritas variará de aproximadamente 50% a 100% de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende ese agente como el único agente terapéuticamente activo.

[0170] A fin de que la invención aquí descrita pueda ser entendida más completamente, los siguientes ejemplos se exponen. Se debe entender que estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes de esta invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Métodos y materiales

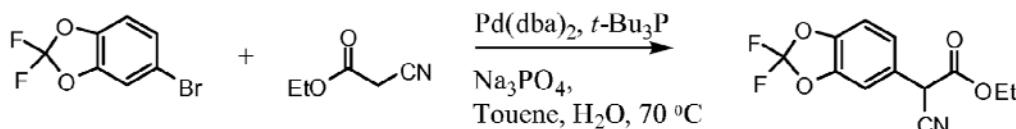
[0171] Vitride® (sodio bis(2-metoxietoxi)aluminio [o $\text{NaAlH}_1(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$], solución de 65 % en peso en tolueno) se adquirió de Aldrich Chemicals. 3-fluoro-4-nitroanilina se adquirió de Capot Chemicals. 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol se adquirió de Alfa Aesar. 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-carboxílico se adquirió de Saltigo (una filial de la Lanxess Corporation).

[0172] En cualquier parte de la presente solicitud en que el nombre de un compuesto no describa correctamente la estructura del compuesto, la estructura reemplaza el nombre.

Síntesis del Compuesto 1

Resto de Ácido**Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-1-acetato de etilo-acetonitrilo**

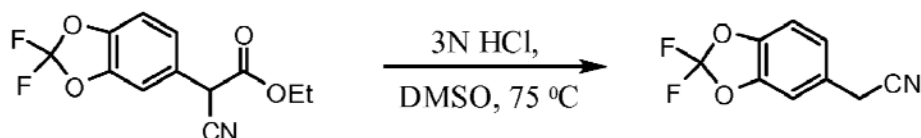
[0173]



[0174] Un reactor se purgó con nitrógeno y se cargó con 900 ml de tolueno. El disolvente se desgasifica mediante burbujeo de nitrógeno durante no menos de 16 h. Al reactor se cargó después Na_3PO_4 (155,7 g, 949,5 mmol), seguido de bis(dibencilidenoacetona) paladio (0) (7,28 g, 12,66 mmol). Una solución de 10% en peso de terc-butilfosfina en hexanos (51,23 g, 25,32 mmol) se cargó sobre 10 min a 23°C de un purgado con nitrógeno embudo de adición. La mezcla se dejó en agitación durante 50 min, momento en que se añadió 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (75 g, 316,5 mmol) durante 1 min. Después de agitarse durante 50 minutos adicionales, la mezcla se cargó con cianoacetato de etilo (71,6 g, 633,0 mmol) durante 5 min seguido de agua (4,5 ml) en una porción. La mezcla se calentó a 70°C durante 40 min y se analizó por HPLC cada 1-2 h para el porcentaje de conversión del reactivo en el producto. Después se observó la conversión completa (típicamente 100% de conversión después de 5-8 h), la mezcla se enfrió a 20 - 25°C y se filtró a través de una almohadilla de celite. La almohadilla de celite se aclaró con tolueno (2 X 450 ml) y los orgánicos combinados se concentraron a 300 ml a vacío a 60 - 65°C. El concentrado se cargó con 225 ml de DMSO y se concentró a vacío a 70-80°C hasta que la destilación del disolvente activo cesó. La solución se enfrió a 20 - 25°C y se diluyó a 900 ml con DMSO en la preparación para el pSO_2 . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,16 a 7,10 (m, 2H), 7,03 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 4,63 (s, 1H), 4,19 (m, 2H), 1,23 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Síntesis de acetonitrilo (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo).

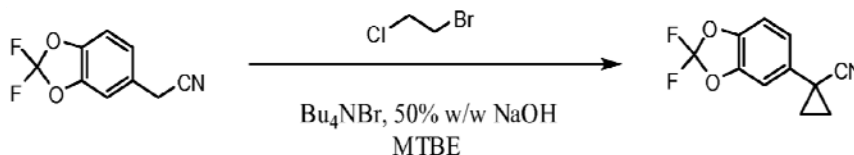
[0175]



[0176] La solución de DMSO de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-1-acetato de etilo-acetonitrilo de antes se cargó con 3 N HCl (617,3 ml, 1,85 mol) durante 20 min mientras se mantenía una temperatura interna <40°C. La mezcla se calentó entonces a 75°C durante 1 h y se analizó por HPLC cada 1-2 h para el % de conversión. Cuando se observó una conversión de > 99% (típicamente después de 5 a 6 h), la reacción se enfrió a 20 - 25°C y se extrajo con MTBE (2 X 525 ml), con el tiempo suficiente para permitir la separación de fases completa durante las extracciones. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaCl al 5% (2 X 375 ml). A continuación, la solución se transfirió a un equipo apropiado para una destilación al vacío 1,5 - 2,5 Torr que estaba equipado con un matraz receptor enfriado. La solución se concentró a vacío a <60°C para eliminar los disolventes. (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)acetonitrilo se destila a partir del aceite resultante a 125-130°C (temperatura del horno) y 1,5 a 2,0 Torr. (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il) acetonitrilo Se aisló como un aceite claro con un rendimiento del 66% a partir de 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (2 pasos) y con una pureza HPLC de 91,5% AUC(corresponde a ensayo de 95 de % en peso). ^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,44 (s ancho, 1H), 7,43 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,22 (dd, $J = 8,2$, 1,8 Hz, 1H), 4,07 (s, 2H).

Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-ciclopropanocarbonitrilo.

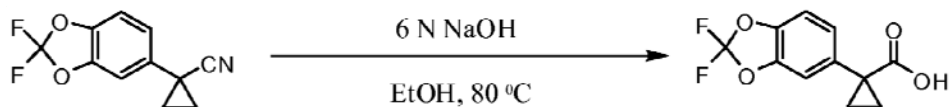
[0177]



[0178] Una solución madre de 50% en peso NaOH se desgasificó mediante burbujeo de nitrógeno para no menos de 16 h. Una cantidad apropiada de MTBE se desgasificó de manera similar durante varias horas. A un reactor purgado con nitrógeno, se cargó MTBE desgasificado (143 ml) seguido de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il) acetonitrilo (40,95 g, 207,7 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (2,25 g, 10,38 mmol). Se tomó nota del volumen de la mezcla y la mezcla se desgasificó mediante burbujeo de nitrógeno durante 30 min. MTBE desgasificado suficiente se carga a devolver la mezcla al volumen original antes de la desgasificación. A la mezcla en agitación a 23,0°C, se cargó desgasificado 50% en peso NaOH (143 ml) durante 10 min seguido de 1-bromo-2-cloroetano (44,7 g, 311,6 mmol) durante 30 min. La reacción se analizó por HPLC en intervalos de 1 h para conversión de %. Antes del muestreo, se detuvo la agitación y las fases se dejaron separar. La fase orgánica superior se tomaron muestras para su análisis. Cuando se observó un % de conversión > 99% (típicamente después de 2,5 a 3 h), la mezcla de reacción se enfrió a 10°C y se cargó con agua (461 ml) a una velocidad para mantener una temperatura <25°C. La temperatura se ajustó a 20-25°C y se separaron las fases. Nota: hay que dejar suficiente tiempo para la completa separación de las fases. La fase acuosa se extrajo con MTBE (123 ml), y la fase orgánica combinada se lavó con 1 N HCl (163mL) y 5% de NaCl (163 ml). La solución de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo en MTBE se concentró a 164 ml bajo vacío a 40 - 50°C. La solución se cargó con etanol (256 ml) y se concentró de nuevo a 164 ml a vacío a 50 - 60°C. Se cargó etanol (256 ml) y la mezcla se concentró a 164 ml a vacío a 50 - 60°C. La mezcla resultante se enfrió a 20 - 25°C y se diluyó con etanol para 266 ml en la preparación para el siguiente paso. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,43 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,30 (dd, J = 8,4, 1,9 Hz, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,53 (m, 2H).

Síntesis de 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ácido ciclopropanocarboxílico.

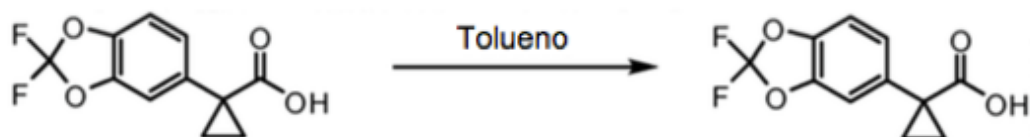
[0179]



[0180] La solución de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo en etanol de la etapa anterior se cargó con 6 N NaOH (277 ml) durante 20 min y se calienta a una temperatura interna de 77-78°C durante 45 min. El progreso de la reacción se controló por HPLC después de 16 h. Nota: el consumo de ambos (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol- 5-il)-ciclopropanocarbonitrilo y la amida primaria resultante de la hidrólisis parcial de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo fueron monitoreados. Cuando se observó un % de conversión > 99% (típicamente 100% de conversión después de 16 h), la mezcla de reacción se enfrió a 25°C y se cargó con etanol (41 ml) y DCM (164 ml). La solución se enfrió a 10°C y se cargó con 6 N HCl (290 ml) a una velocidad tal como para mantener una temperatura <25°C. Después de calentarse a 20 - 25°C, las fases se dejaron separar. Se recogió la fase orgánica inferior y la fase acuosa superior se extrajo de nuevo con DCM (164 ml). Nota: la fase acuosa fue algo nublada antes y después de la extracción, debido a una alta concentración de sales inorgánicas. Los compuestos orgánicos se combinaron y se concentraron al vacío a 164 ml. Se cargó tolueno (328 ml) y la mezcla se condensó a 164 ml en 70 a 75°C. La mezcla se enfrió a 45°C, cargado con MTBE (364 ml) y se agitó a 60°C durante 20 min. La solución se enfrió a 25°C y el pulido se filtró para eliminar las sales inorgánicas residuales. Se utilizó MTBE (123 ml) para enjuagar el reactor y los sólidos recogidos. Los orgánicos combinados se transfirieron a un reactor limpio en preparación para el siguiente paso.

Aislamiento de 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il) ácido ciclopropanocarboxílico.

[0181]



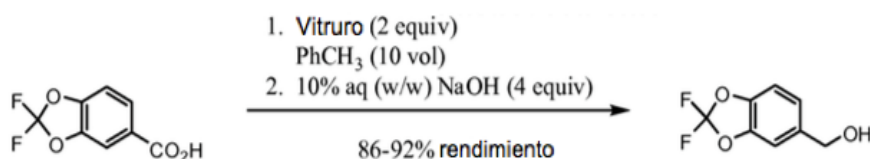
[0182] La solución de 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il) ácido ciclopropanocarboxílico de la etapa anterior se concentró al vacío a 164 ml, cargado con tolueno (328 ml) y se concentró hasta 164 ml a 70-75°C. La mezcla se calentó entonces a 100-105°C para dar una solución homogénea. Después de agitarse a esa temperatura durante 30 min, la solución se enfrió a 5°C durante 2 horas y se mantuvo a 5°C durante 3 horas. Después, la mezcla se filtró

y el reactor y sólido recogido se lavó con 1:1 de tolueno/n-heptano (2 X 123 ml) frío. El material se secó a vacío a 55°C durante 17 horas para proporcionar 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il) ácido ciclopropanocarboxílico como un sólido cristalino de color blanquecino. 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il) ciclopropanocarboxílico se aisló con un rendimiento del 79% a partir de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetonitrilo (3 pasos incluyendo aislamiento) y con una pureza HPLC de 99,0% AUC. ESI-MS m/z calc. 242,04, encontrado 241,58 (M+1)⁺; ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 12,40 (s, 1H), 7,40 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,17 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 1,46 (m, 2H), 1,17 (m, 2H).

Síntesis Alternativa del Resto Acídico

Síntesis de metanol (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo).

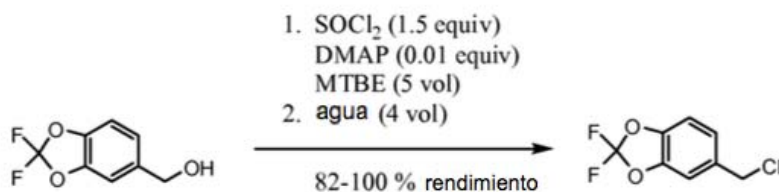
[0183]



[0184] 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ácido carboxílico comercialmente disponible (1,0 eq) se suspendió en tolueno (10 vol). Se añade Vitride® (2 eq) a través de un embudo de adición a una velocidad para mantener la temperatura a 15-25°C. Al final de la adición la temperatura se aumenta a 40°C durante 2 h, después 10% (en peso) aq. Se añadió cuidadosamente NaOH (4,0 eq) a través de un embudo de adición manteniendo la temperatura a 40-50°C. Después de agitarse durante 30 minutos, las capas se dejaron separar en 40°C. La fase orgánica se enfrió a 20°C después se lavó con agua (2 x 1,5 vol), se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró para dar (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-metanol bruto que se utiliza directamente en la siguiente etapa.

Síntesis de 5-clorometilo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol.

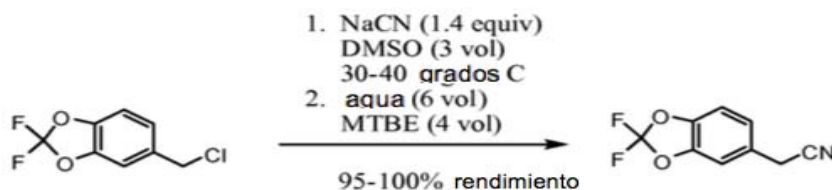
[0185]



[0186] (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-metanol (1,0 eq) se disuelve en MTBE (5 vol). Se añade una cantidad catalítica de DMAP (1 mol%) y se añade SOCl₂ (1,2 eq) a través de un embudo de adición. El SOCl₂ se añade a una velocidad para mantener la temperatura en el reactor a 15-25°C. La temperatura se aumenta a 30°C durante 1 hora, después se enfría a 20°C y después se añade agua (4 vol) a través de un embudo de adición manteniendo la temperatura a menos de 30°C. Después de agitarse durante 30 minutos, las capas se dejaron separar. La capa orgánica se agita y se añade 10% (peso/volumen) aq. NaOH (4,4 vol). Después de agitarse durante 15 a 20 minutos, las capas se dejaron separar. La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), se filtra, y se concentra para proporcionar el 5-clorometilo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol crudo que se utiliza directamente en la siguiente etapa.

Síntesis de acetonitrilo (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo).

[0187]



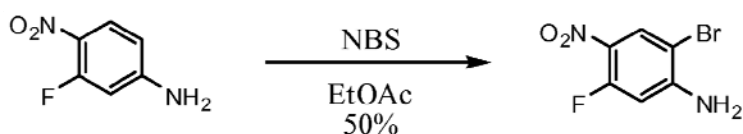
[0188] Una solución de 5-clorometilo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (1 eq) en DMSO (1,25 vol) se añadió a una suspensión de NaCN (1,4 eq) en DMSO (3 vol) manteniendo la temperatura entre 30-40°C. La mezcla se agitó durante 1 hora y después con agua (6 vol) se añade seguido por MTBE (4 vol). Después de agitarse durante 30 min, las capas se separan. La capa acuosa se extrae con MTBE (1,8 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1,8 vol), se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró para dar (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetonitrilo bruto (95%) que se utiliza directamente en la siguiente etapa.

[0189] Los pasos restantes son los mismos que se han descrito anteriormente para la síntesis del resto de ácido.

Resto de amina

Síntesis de 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina.

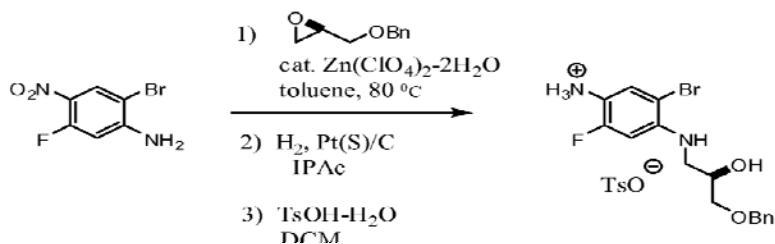
[0190]



Un matraz se cargó con 3-fluoro-4-nitroanilina (1,0 equiv) seguido de acetato de etilo (10 vol) y se agita para disolver todos los sólidos. Se añadió N-bromosuccinimida (1,0 equiv) como en porciones como para mantener la temperatura interna de 22°C. Al final de la reacción, la mezcla de reacción se *concentró a vacío* en un rotavapor. El residuo se suspendió en agua destilada (5 vol) para disolver y eliminar la succinimida. (La succinimida también puede ser eliminada por procedimiento de tratamiento de agua.) Se decantó el agua y el sólido se suspendió en 2-propanol (5 vol) durante la noche. La suspensión resultante se filtró y la torta húmeda se lavó con 2-propanol, se secó en horno de vacío a 50°C durante la noche con N₂ de purga hasta que se consiguió un peso constante. Se aisló un sólido marrón amarillento (rendimiento del 50%, 97,5% AUC). Otras impurezas eran un bromo-regioisómero (1,4% AUC) y un aducto de di-bromo (1,1% AUC). ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,19 (1 H, d, J = 8,1 Hz), 7,06 (br. s, 2 H), 6,64 (d, 1 H, J = 14,3 Hz).

Síntesis de *p* de sal de ácido toluenosulfónico de (R)-1-((4-amino-2-bromo-5-fluorofenilo) amino)-3-(benciloxi)propano-2-ol.

[0191]



[0192] Una matraz totalmente seca bajo N₂ se cargó con los siguientes: tamices moleculares activados en polvo 4A (50% en peso basado en 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina), 2-Bromo-5-fluoro-4 nitroanilina (1,0 equiv), zinc dihidrato perclorato (20% mol), y tolueno (8 vol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min NMT. Por último, (R)-bencilo-glicidil éter (2,0 equiv) en tolueno (2 vol) se añadió en un flujo constante. La reacción se calentó a 80°C (temperatura interna) y se agitó durante aproximadamente 7 horas o hasta 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina fue <5% AUC.

[0193] La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió celite (50% en peso), seguido por acetato de etilo (10 vol). La mezcla resultante se filtró para eliminar celite y tamices y se lavó con acetato de etilo (2 vol). El filtrado se lavó con solución de cloruro de amonio (4 vol, 20% w/v). La capa orgánica se lavó con solución de bicarbonato de sodio (4 vol x 2,5% w/v). La capa orgánica se *concentró a vacío* en un evaporador rotatorio. La suspensión resultante se disolvió en acetato de isopropilo (10 vol) y esta solución se transfirió a un hidrogenador Buchi.

[0194] El hidrogenador se cargó con 5% en peso de Pt(S)/C(1,5% mol) y la mezcla se agitó bajo N₂ a 30°C (temperatura interna). La reacción se lavó abundantemente con N₂ seguida de hidrógeno. La presión hidrogenador se ajustó a 1 bar de hidrógeno y la mezcla se agitó rápidamente (> 1200 rpm). Al final de la reacción, el catalizador se filtró a través de una almohadilla de celite y se lavó con diclorometano (10 vol). El filtrado se *concentró al vacío*.

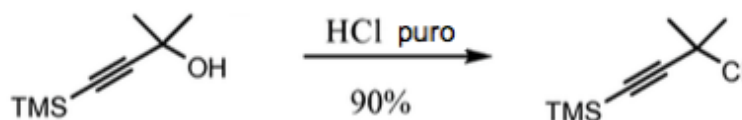
Cualquier acetato de isopropilo restante fue perseguido con diclorometano (2 vol) y se concentró en un rotavapor hasta sequedad.

[0195] El residuo resultante se disolvió en diclorometano (10 vol). *P*- monohidrato de ácido toluenosulfónico (1,2 equiv) se añadió y se agitó durante la noche. El producto se filtró y se lavó con diclorometano (2 vol) y se secó por succión. La torta húmeda se transfirió a bandejas de secado y en un horno de vacío y se secó a 45°C con N₂ de purga hasta que se consiguió un peso constante. Sal de *p*-ácido toluenosulfónico de (*R*)-1-((4-amino-2-bromo-5-fluorofenilo)amino)-3-(benciloxi)propano-2-ol se aisló como un sólido de color blanquecino.

[0196] La pureza quiral se determinó que era > 97% ee.

Síntesis de (3-cloro-3-metilbut-1-inil) trimetilsilano.

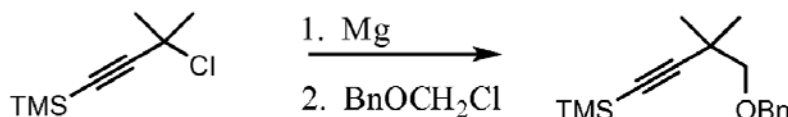
[0197]



[0198] Alcohol propargílico (1,0 equiv) se cargó a un recipiente. Se añadió ácido clorhídrico acuoso (37%, 3,75 vol) y la agitación comenzó. Durante la disolución del alcohol sólido, se observa una endotermia modesta (5-6°C). La mezcla resultante se agitó durante la noche (16 h), poco a poco convirtiéndose en rojo oscuro. Un recipiente encamisado de 30 L se carga con agua (5 vol) que se enfría a continuación a 10°C. La mezcla de reacción se transfiere lentamente en el agua mediante vacío, manteniendo la temperatura interna de la mezcla por debajo de 25°C. Hexanos (3 vol) se añade y la mezcla resultante se agita durante 0,5 h. Las fases se establecieron y la fase acuosa (pH <1) se drenó y se descartó. La fase orgánica se *concentró a vacío* usando un evaporador rotatorio, el suministro de producto en forma de aceite de color rojo.

Síntesis de (4-(benciloxi)-3,3-dimetilbut-1-inil) trimetilsilano.

[0199]



Método A

[0200] Todos los descriptores equivalentes y volumen en esta parte se basan en una reacción de 250 g. Virutas de magnesio (69,5 g, 2,86 mol, 2,0 equiv) se cargaron en un reactor de 4 bocas de 3 L y se agitó con un agitador magnético en atmósfera de nitrógeno durante 0,5 h. El reactor se sumergió en un baño de hielo-agua. Una solución del cloruro de propargilo (250 g, 1,43 mol, 1,0 equiv) en THF (1,8 L, 7,2 vol) se añadió lentamente al reactor, con agitación, hasta que se observó una exotermia inicial (~10°C). La formación reactiva de Grignard fue confirmada por IPC usando espectroscopía ¹H-NMR. Una vez que la reacción exotérmica se calmó, se añadió el resto de la solución lentamente, manteniendo la temperatura del lote <15°C. La adición requirió ~ 3,5 h. La mezcla de color verde oscuro resultante se decantó en un frasco tapado de 2 L.

[0201] Todos los descriptores equivalentes y volumen en esta parte se basan en una reacción de 500 g. Un reactor de 22 L se cargó con una solución de éter de clorometilo de bencilo (95%, 375 g, 2,31 mol, 0,8 equiv) en THF (1,5 L, 3 vol). El reactor se enfrió en un baño de hielo-agua. Dos lotes de reactivo de Grignard preparado como se describe anteriormente se combinaron y después se añadieron lentamente a la solución de éter de clorometilo bencilo a través de un embudo de adición, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 25°C. La adición requirió 1,5 h. La mezcla de reacción se agitó durante la noche (16 h).

[0202] Todos los descriptores equivalentes y volumen en esta parte se basan en una reacción de 1 kg. Una solución de cloruro de amonio 15% se preparó en un reactor encamisado 30 L (1,5 kg en 8,5 kg de agua, 10 vol). La solución se enfrió a 5°C. Dos mezclas de reacción de Grignard preparado como se describe anteriormente se combinaron y se transfieren a continuación a la solución de cloruro de amonio a través de un recipiente de cabecera. Una exotermia se observó en este enfriamiento rápido, que se llevó a cabo a una velocidad tal como para mantener la temperatura interna por debajo de 25°C. Una vez que la transferencia se completa, la temperatura de la camisa

recipiente se fijó a 25°C. Se añadieron hexanos (8 L, 8 vol) y la mezcla se agitó durante 0,5 h. Después de establecerse las fases, la fase acuosa (pH 9) se drenó y se desecha. La fase orgánica restante se lavó con agua (2 L, 2 vol). La fase orgánica se concentró a vacío usando un evaporador rotatorio de 22 l, proporcionando el producto bruto como un aceite naranja.

5

Método B

[0203] Virutas de magnesio (106 g, 4,35 mol, 1,0 eq) se cargaron en un reactor de 22 L y después se suspendieron en THF (760 ml, 1 vol). El recipiente se enfrió en un baño de hielo-agua de manera que la temperatura del lote alcanzó 2°C. Se añadió una solución del cloruro de propargilo (760 g, 4,35 mol, 1,0 equiv) en THF (4,5 L, 6 vol) lentamente al reactor. Después se añadió 100 ml, se detuvo la adición y la mezcla se agitó hasta que se observó una exotermia de 13°C, lo que indica la iniciación reactiva de Grignard. Una vez que la reacción exotérmica se calmó, se añadió otros 500 ml de la solución de cloruro de propargilo lentamente, manteniendo la temperatura del lote <20°C. La formación de reactivo de Grignard se confirmó por IPC usando ¹H-RMN-espectroscopia. Se añadió lentamente el resto de la solución de cloruro de propargilo, manteniendo la temperatura del lote <20°C. La adición requirió ~ 1,5 h. La solución de color verde oscuro resultante se agitó durante 0,5 h. La formación del reactivo de Grignard fue confirmada por el IPC utilizando espectroscopia ¹H-RMN. Éter de clorometilo bencilo puro se cargó en el embudo de adición de reactor y después se añadió gota a gota en el reactor, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 25°C. La adición requirió 1,0 h. La mezcla de reacción se agitó durante la noche. El tratamiento acuoso y la concentración se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento y cantidades relativas de los materiales como en el Método A para dar el producto como un aceite naranja.

10

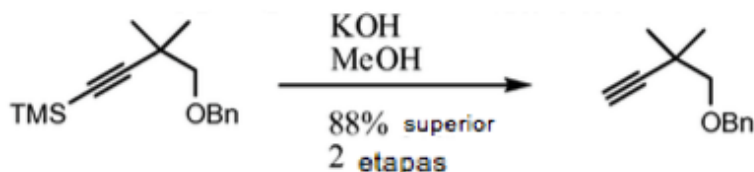
15

20

Synthesis de 4-benciloxi-3,3-dimetilbut-1-ino.

25 [0204]

30



35

[0205] Un reactor encamisado de 30 L se cargó con metanol (6 vol) que después se enfrió a 5°C. Se añadió hidróxido potásico (85%, 1,3 equiv) en el reactor. Una exotermia de 15-20°C se observó a medida que el hidróxido de potasio disuelto. La temperatura de camisa se fijó a 25°C. Se añadió una solución de 4-benciloxi-3,3-dimetil-1-trimetilsililbut-1-ino (1,0 equiv) en metanol (2 vol) y la mezcla resultante se agitó hasta que se completó la reacción, según se monitoriza mediante HPLC. El tiempo de reacción típica a 25°C es de 3-4 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (8 vol) y después se agitó durante 0,5 h. Hexanos (6 vol) se añadió y la mezcla resultante se agitó durante 0,5 h. Las fases se dejaron sedimentar y después la fase acuosa (pH 10 a 11) se drenó y se descartó. La fase orgánica se lavó con una solución de KOH (85%, 0,4 equiv) en agua (8 vol) seguido de agua (8 vol). Después, la fase orgánica se concentró abajo usando un evaporador rotatorio, dando el material del título como un aceite amarillo-naranja. La pureza típica de este material está en el intervalo de 80% con principalmente una impureza individual presente. ¹H RMN (400 MHz, C₆D₆) δ 7,28 (d, 2 H, J = 7,4 Hz), 7,18 (t, 2 H, J = 7,2 Hz), 7,10 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 4,35 (s, 2 H), 3,24 (s, 2 H), 1,91 (s, 1 H), 1,25 (s, 6 H).

40

45

Síntesis de N-bencilglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol.

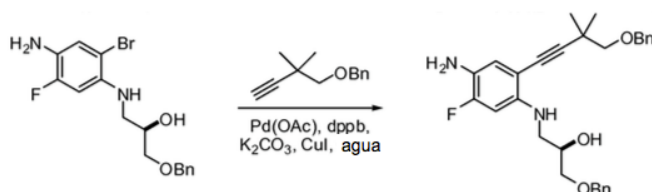
Método A

Síntesis de (R)-1-((4-amino-2-(4-(benciloxi)-3,3-dimetilbut-1-in-1-il)-5-fluorofenilo)amino)-3-(benciloxo)propano-2-ol.

55

[0206]

60



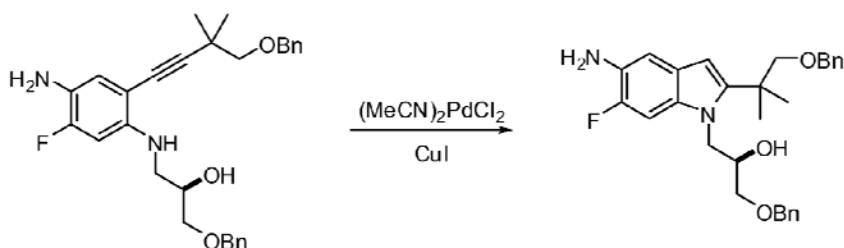
65

[0207] Sal *p*-ácido toluenosulfónico de (R)-1-((4-amino-2-bromo-5-fluorofenilo)amino)-3-(benciloxi) propano-2-ol se convirtió en base libre por agitación del sólido en diclorometano (5 vol) y solución saturada de NaHCO₃ (5 vol) hasta lograrse una capa orgánica clara. Las capas resultantes se separaron y la capa orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (5 vol) seguida de salmuera y se *concentraron al vacío* para obtener (R)-1-((4-amino-2-bromo-5-fluorofenilo)amino)-3-(benciloxi)propano-2-ol de base libre como un aceite.

[0208] Acetato de paladio (0,01 eq), dppb (0,015 eq), CuI (0,015 eq) y carbonato de potasio (3 eq) se suspendió en acetonitrilo (1,2 vol). Después de agitarse durante 15 minutos, se añade una solución de 4-benciloxi-3,3-dimetilbut-1-ino (1,1 eq) en acetonitrilo (0,2 vol). La mezcla se roció con gas nitrógeno durante 1 h y después se añade una solución de (R)-1-((4-amino-2-bromo-5-fluorofenilo)amino)-3-(benciloxi) propano-2-ol de base libre (1 eq) en acetonitrilo (4,1 vol). La mezcla se aspersó con gas nitrógeno durante otra hora y después se calienta a 80°C. El progreso de la reacción se controló por HPLC y la reacción se completa normalmente dentro de 3-5 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y después se filtró a través de celite. La torta se lavó con acetonitrilo (4 vol). Los filtrados combinados se sometieron a destilación azeotrópica hasta sequedad y después la mezcla se filtra en el siguiente reactor. La solución de acetonitrilo de (R)-1-((4-amino-2-(4-(benciloxi)-3,3-dimetilbut-1-in-1-il)-5-fluorofenilo)amino)-3-(benciloxi)propano-2-ol así obtenido se utiliza directamente en el procedimiento siguiente (ciclación) sin manipulación adicional.

Síntesis de *N*-bencilglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol.

[0209]

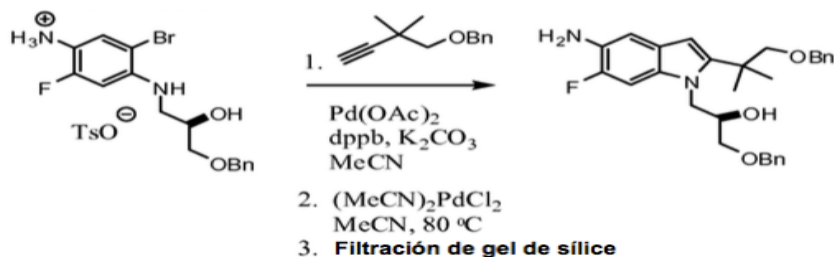


[0210] Bis-acetonitrildicloropaladio (0,1 eq) y CuI (0,1 eq) se cargan en el reactor y después se suspenden en una solución de (R)-1-((4-amino-2-(4-(benciloxi)-3,3-dimetilbut-1-in-1-il)-5-fluorofenilo)amino)-3-(benciloxi) propano-2-ol obtenido anteriormente (1 eq) en acetonitrilo (9,5 vol total). La mezcla se aspersó con gas nitrógeno durante 1 h y después se calienta a 80°C. El progreso de la reacción se controló por HPLC y la reacción es típicamente completa dentro de 1-3 h. La mezcla se filtró a través de celite y la torta se lava con acetonitrilo. Un intercambio de disolvente en acetato de etilo (7,5 vol) se lleva a cabo. La solución de acetato de etilo se lava con solución acuosa de NH₃-NH₄Cl (2 x 2,5 vol), seguido de salmuera al 10% (2,5 vol). La solución de acetato de etilo se agitó a continuación con gel de sílice (1,8 eq en peso) y Si-TMT (eq 0,1 en peso) durante 6 h. Después de la filtración, la solución resultante se concentra hacia abajo. El aceite residual se disuelve en DCM/heptano (4 vol) y después se purificó por cromatografía en columna. El aceite así obtenido se cristaliza después a partir de EtOAc 25%/heptano (4 vol). Cristalina (R)-1-(5-amino-2-(1-(benciloxi)-2-metilo-2-il)-6-fluoro-1H-indol-1-il)-3-(benciloxi)propano-2-ol se obtiene típicamente en 27 a 38% de rendimiento. ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 7,38-7,34 (m, 4 H), 7,32-7,23 (m, 6 H), 7,21 (d, 1 H, *J* = 12,8 Hz), 6,77 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 6,06 (s, 1 H), 5,13 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz), 4,54 (s, 2 H), 4,46 (br, s, 2 H), 4,45 (s, 2 H), 4,33 (d, 1 H, *J* = 12,4 Hz), 04/09 a 04/04 (m, 2 H), 3,63 (d, 1H, *J* = 9,2 H z), 3,56 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz), 3,49 (dd, 1H, *J* = 9,8, 4,4 Hz), 3,43 (dd, 1H, *J* = 9,8, 5,7 Hz), 1,40 (s, 6 H).

Síntesis de *N*-bencilglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol.

Método B

[0211]



[0212] Acetato de paladio (33 g, 0,04 eq), dppb (94 g, 0,06 eq), y carbonato de potasio (1,5 kg, 3,0 eq) se cargan en un reactor. El aceite de base libre bencilglicolado 4-amonio-2-bromo-5-fluoroanilina (1,5 kg, 1,0 eq) se disolvió en acetonitrilo (8,2 L, 4,1 vol) y después se añadió al reactor. La mezcla se aspersó con gas nitrógeno para NLT 1 h. Se añadió una solución de 4-benciloxi-3,3-dimetilbut-1-ino (70%, 1,1 kg, 1,05 eq) en acetonitrilo a la mezcla que después se aspersó con gas nitrógeno para NLT 1 h. La mezcla se calentó a 80°C y después se agitó durante la noche. IPC por HPLC se lleva a cabo y la reacción se determina que es completa después de 16 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y después se filtró a través de una almohadilla de celite (228 g). El reactor y la almohadilla de celite se lavaron con acetonitrilo (2 x 2 L, 2 vol). Las fases combinadas se concentran en un evaporador rotatorio 22 L hasta que se han recogido 8 L de disolvente, dejando el producto en bruto en 7 L (3,5 vol) de acetonitrilo.

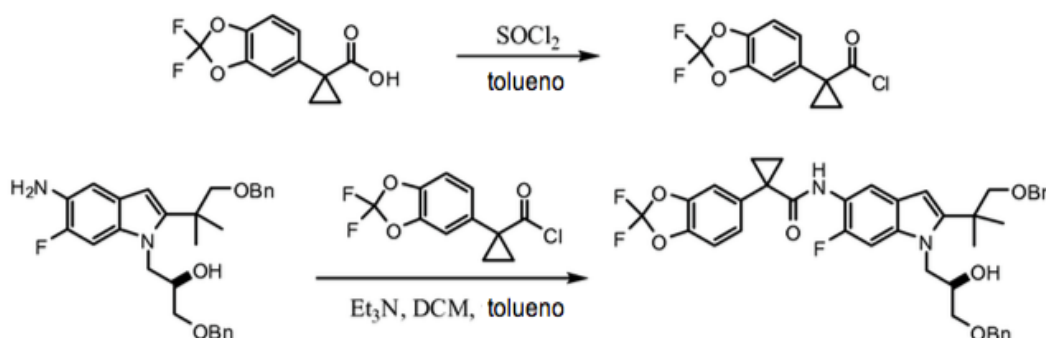
[0213] Bis-acetonitrildicloropaladio (144 g, 0,15 eq) se cargó en el reactor. La solución en bruto se transfirió de nuevo en el reactor y el bulbo roto-vap se lavó con acetonitrilo (4 L, 2 vol). Las soluciones combinadas se aspersó con gas nitrógeno para NLT 1 h. La mezcla de reacción se calentó a 80°C para NLT 16 h. El control de proceso por HPLC muestra el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite (300 g). La torta de reactor y el filtro se lavaron con acetonitrilo (3 L, 1,5 vol). Los filtrados combinados se concentraron a un aceite por evaporación rotatoria. El aceite se disolvió en acetato de etilo (8,8 L, 4,4 vol). La solución se lavó con cloruro de amonio 20% (5 L, 2,5 vol), seguido de salmuera al 5% (5 L, 2,5 vol). Se añadió gel de sílice (3,5 kg, 1,8 en peso. eq.) de gel de sílice a la fase orgánica, que se agitó durante la noche. Se añadieron eliminador de metales Deloxan THP II (358 g) y heptano (17,6 L) y la mezcla resultante se agitó durante NLT 3 h. La mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado. La torta del filtro se lavó con acetato de etilo al 30% en heptano (25 L). Los filtrados combinados se concentraron a presión reducida para dar N-bencilglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol como una pasta marrón (1,4 kg).

Síntesis del Compuesto 1

Síntesis de Compuesto 1 de bencilo protegido.

[0214]

30

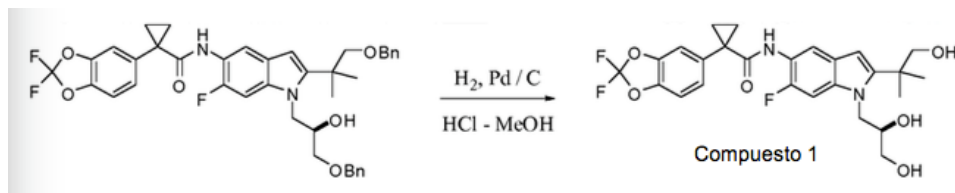


[0215] 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-yl)ciclopropanocarboxílico (1,3 equiv) se suspendió en tolueno (2,5 vol, basado en 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-yl)ciclopropanocarboxílico). Se añadió cloruro de tionilo (SOCl₂, 1,7 equiv) a través de embudo de adición and la mezcla se calentó a 60°C. La mezcla resultante se agitó durante 2 h. El tolueno y el exceso de SOCl₂ se separaron por destilación usando rotavop. Se añadió tolueno adicional (2,5 vol, basado en 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-yl)ciclopropanocarboxílico) y la mezcla se destiló a 1 vol de tolueno. Una solución de (R)-1-(5-amino-2-(1-(benciloxi)-2-metilo-2-il)-6-fluoro-1H-indol-1-il)-3-(benciloxi)propano-2-ol (1 eq) y trietilamina (3 eq) en DCM (4 vol) se enfría a 0°C. Se añade la solución de cloruro de ácido en tolueno (1 vol), manteniendo la temperatura del lote por debajo de 10°C. El progreso de la reacción se controla mediante HPLC, y la reacción se completa normalmente en una cuestión de minutos. Después de calentarse a 25°C, la mezcla de reacción se lava con 5% NaHCO₃ (3,5 vol), 1M NaOH (3,5 vol) y 1 M HCl (5 vol). Un intercambio de disolvente en metanol (2 vol) se realiza y la solución resultante de (R)-N-(1-(3-(benciloxi)-2-hidroxiopropilo)-2-(1-(benciloxi)-2-metilpropano-2-il)-6-fluoro-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo [d][1,3] di-oxol-5-il) ciclopropanocarboxamida en metanol es utilizado sin manipulación adicional en la siguiente etapa (hidrogenolisis).

Síntesis del Compuesto 1.

[0216]

5



10 [0217] 5% de paladio sobre carbón vegetal (~ 50% húmedo, 0,01 eq) se carga a un recipiente de hidrogenación apropiado. El (R)-N-(1-(3-(benciloxi)-2-hidroxiopropilo)-2-(1-(benciloxi)-2-metilo-2-il)-6-fluoro-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarbamida solución en metanol (2 vol) obtenida anteriormente se añade con cuidado, seguido de una solución 3 M de HCl en metanol. El recipiente se purgó con gas nitrógeno y después con hidrógeno gaseoso. La mezcla se agita vigorosamente hasta que la reacción es completa, como se determina por análisis de HPLC. El tiempo de reacción típica es de 3-5 h. La mezcla de reacción se filtra a través de celite y la torta se lavó con metanol (2 vol). Un intercambio de disolvente en isopropanol (3 vol) se lleva a cabo. VX-661 crudo se cristaliza en 75% de IPA-heptano (4 vol, es decir, 1 vol heptano añadido a 3 vol de IPA) y los cristales resultantes se maduran en 50% de IPA-heptano (es decir, 2 vol de heptano añadido a la mezcla). Los rendimientos típicos de compuesto 4 a partir del rango de procedimiento de acilación/hidrogenolisis de dos pasos de 68% a 84%. El compuesto 4 se puede recrystalizar a partir de IPA-heptano siguiendo el mismo procedimiento que acabamos de describir.

15 [0218] El compuesto 1 también se puede preparar por una de varias rutas sintéticas descritas en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos US20090131492.

25

[0219] La Tabla 10 a continuación recita datos analíticos para el compuesto 1.

Tabla 10.

30

Nº de compuesto	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
1	521,5	1,69	1H NMR (400,0 MHz, C ₃ D ₃ DN) δ 7,69 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,39 (dd, J = 1,7, 8,3 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,27 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,20 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 6,34 (s, 1H), 4,32 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 4,15 - 4,09 (m, 1H), 3,89 (dd, J = 6,0, 11,5 Hz, 1H), 3,63 - 3,52 (m, 3H), 3,42 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 3,21 (dd, J = 6,2, 7,2 Hz, 1H), 3,04 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 1,59 (dd, J = 3,8, 6,8 Hz, 2H), 1,44 (s, 3H), 1,33 (s, 3H) y 1,18 (dd, J = 3,7, 6,8 Hz, 2H) ppm.

35

40

ENSAYOS

Ensayos para la detección y medición de propiedades de corrección de compuestos AF508-RTFQ

45 Métodos ópticos potencial de membrana para ensayar propiedades de modulación de compuestos AF508-RTFQ

50 [0220] El ensayo de potencial de membrana óptica utilizó sensores FRET sensibles al voltaje descritos por González y Tsien (Véase, González, J.E. y R.Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells" Biophys J 69 (4): 1272-1280, y González, JE y RY Tsien (1997) "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer" Chem Biol 4 (4): 269-77) en combinación con instrumentación para medir cambios de fluorescencia tales como el Lector de Sonda de Voltaje/Ion (VIPR) (Véase, González, JE, K. Oades, et al (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" Drug Discov Today 4 (9): 431-439).

55 [0221] Estos ensayos sensibles a voltaje se basan en el cambio en la transferencia de energía de fluorescencia de resonancia (FRET) entre el colorante de membrana soluble, sensible a la tensión, DiSBAC₂ (3), y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que está unido a la cara externa de la membrana plasmática y actúa como donador de FRET. Los cambios en el potencial de membrana (V_m) hacen que la carga negativa DiSBAC₂ (3) se redistribuyen a través de la membrana plasmática y la cantidad de transferencia de energía de CC2-DMPE se cambia en consecuencia. Los cambios en la emisión de fluorescencia se controlaron usando VIPRTM II, que es un manipulador de líquidos y detector fluorescente integrado diseñado para realizar pantallas basadas en células en placas de microtitulación de 96 o 384 pocillos.

60

1. Identificación de compuestos de corrección

[0222] Para identificar pequeñas moléculas que corrigen el defecto asociado con el tráfico ΔF_{508} -RTFQ; Se desarrolló un formato de ensayo HTS de adición única. Las células se incubaron en medio libre de suero durante 16 horas a 37°C en presencia o ausencia (control negativo) de compuesto de ensayo. Como control positivo, células sembradas en placas de 384 pocillos se incubaron durante 16 horas a 27°C a "la temperatura correcta" ΔF_{508} -RTFQ. Las células se aclararon posteriormente 3X con solución de Krebs Ringers y se cargaron con los tintes sensibles al voltaje. Para activar ΔF_{508} -RTFQ, 10 μ M de Forskolina y el potenciador de RTFQ, la genisteína (20 μ M), se añadieron junto con medio libre de Cl^- a cada pocillo. La adición de medio libre de Cl^- promovió flujo de salida Cl^- en respuesta a activación ΔF_{508} -RTFQ y la despolarización de la membrana resultante se controló ópticamente usando los tintes de tensión de sensores basados en FRET.

2. Identificación de Compuestos Potenciadores

[0223] Para identificar potenciadores de ΔF_{508} -RTFQ, se desarrolló un formato de ensayo de doble adición de HTS. Durante la primera adición, un medio de Cl^- con o sin compuesto de ensayo se añadió a cada pocillo. Después de 22 segundos, una segunda adición de medio libre de Cl^- que contiene 2-10 μ M de forskolina se añadió para activar ΔF_{508} -RTFQ. La concentración extracelular Cl^- después de ambas adiciones era de 28 mM, que promovió flujo de salida Cl^- en respuesta a activación ΔF_{508} -RTFQ y la despolarización de la membrana resultante se controló ópticamente usando los tintes de tensión de sensores basados en FRET.

3. Soluciones

[0224]

25	Solución de Bath #1: (en mM)	NaCl 160, KCl 4,5, CaCl ₂ 2, MgCl ₂ 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.
	Solución del baño libre de cloro:	Sales de cloruro en la solución del baño #1 se sustituyen por sales de gluconato.
30	CC2-DMPE:	Preparada como una solución madre 10 mM en DMSO y se almacena a -20°C.
	DiSBAC ₂ (3):	Preparada como reserva 10 mM en DMSO y se almacena a -20°C

4. Cultivo celular

[0225] NIH3T3 fibroblastos de ratón que expresan de forma estable ΔF_{508} -RTFQ se utilizan para las mediciones ópticas del potencial de membrana. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ y 90% de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamín 2mM, suero bovino fetal al 10%, 1 X NEAA, β -Me, 1 X pen/strep, y 25 HEPES en 175 cm² frascos de cultivo. Para todos los ensayos ópticos, las células se sembraron a 30.000/pocillo en placas de 384 pocillos recubiertas de matrigel y se cultivaron durante 2 horas a 37°C antes de cultivar a 27°C durante 24 horas para el ensayo de potenciador. Para los ensayos de corrección, las células se cultivan a 27°C o 37°C con y sin compuestos durante 16 - 24 horas.

Ensayos electrofisiológicos para ensayar propiedades de modulación de compuestos ΔF_{508} -RTFQ

1. Cámara de Ensayo de Ussing

[0226] El uso de experimentos en cámara se realizaron en células epiteliales polarizadas que expresan ΔF_{508} -RTFQ para caracterizar mejor los moduladores ΔF_{508} -RTFQ identificados en los ensayos ópticos. Células epiteliales FRT ^{ΔF_{508} -RTFQ} cultivadas en insertos de cultivo de células Costar Snapwell se montaron en una cámara de Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), y las monocapas sufrieron cortocircuitos utilizando un sistema de fijación de voltaje (Departament of Bioengineering, University of Iowa, IA, and, Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA). Resistencia transepitelial se midió mediante la aplicación de un pulso de 2 mV. En estas condiciones, los epitelios de FRT demostraron resistencias de 4 K Ω /cm² o más. Las soluciones se mantuvieron a 27°C y burbujearon con aire. El potencial de compensación de electrodo y la resistencia de fluido se corrigieron usando un inserto sin células. En estas condiciones, la corriente refleja el flujo de Cl^- a través de ΔF_{508} -RTFQ expresada en la membrana apical. La I_{SC} fue adquirida digitalmente usando una interfaz MP100A-CE y el software AcqKnowledge (v3.2.6; BIOPAC Systems, Santa Bárbara, CA).

2. Identificación de compuestos de corrección

[0227] El protocolo típico utiliza un basolateral a gradiente de concentración Cl^- de membrana apical. Para configurar este gradiente, se utilizó timbre normal sobre la membrana basolateral, mientras que clavo apical fue reemplazado por gluconato sódico equimolar (valorado a pH 7,4 con NaOH) para dar un gradiente de concentración Cl^- grande a través del epitelio. Todos los experimentos se realizaron con monocapas intactas. Para activar completamente DF508-RTFQ, Forskolina (10 μM) y el inhibidor de PDE, IBMX (100 μM), se aplicaron seguido de la adición del potenciador RTFQ, la genisteína (50 μM).

[0228] Como se observa en otros tipos de células, la incubación a bajas temperaturas de células FRT que expresan DF508-RTFQ de forma estable aumenta la densidad funcional de RTFQ en la membrana plasmática. Para determinar la actividad de los compuestos de corrección, las células se incubaron con 10 μM del compuesto de ensayo durante 24 horas a 37°C y posteriormente se lavaron 3X antes de la grabación. El I_{SC} mediado por cAMP y genisteína en las células tratadas con el compuesto se normalizó a los controles 27°C y 37°C y se expresaron como porcentaje de actividad. La preincubación de las células con el compuesto de corrección aumentó significativamente el cAMP y la I_{SC} mediada por genisteína en comparación con los controles de 37°C.

3. Identificación de Compuestos Potenciadores

[0229] El protocolo típico utiliza un basolateral a la membrana apical de gradiente de concentración Cl^- . Para configurar este gradiente, timbres normales se utilizaron en la membrana basolateral y se permeabilizaron con nistatina (360 $\mu\text{g/ml}$), mientras que NaCl apical fue reemplazada por gluconato sódico equimolar (valorado a pH 7,4 con NaOH) para dar un gradiente de concentración Cl^- grande a través del epitelio. Todos los experimentos se realizaron 30 min después de la permeabilización de la nistatina. Forskolina (10 μM) y todos los compuestos de ensayo se añaden a ambos lados de los insertos de cultivo celular. La eficacia de los potenciadores putativos $\Delta\text{F508-RTFQ}$ se comparó con la del potenciador conocido, genisteína.

4. Soluciones

[0230]

Solución basolateral (en mM):	NaCl (135), CaCl_2 (1,2), MgCl_2 (1.2), K_2HPO_4 (2,4), KH_2PO_4 (0,6), N-2-hidroxietilo-piperazina-N'-2-ácido etanosulfónico (HEPES) (10) y dextrosa (10). La solución se ajustó a pH 7,4 con NaOH.
Solución apical (en mM):	Igual que la solución basolateral con NaCl sustituida con Na Gluconato (135).

5. Cultivo celular

[0231] Las células epiteliales de rata Fisher (FRT) que expresan $\Delta\text{F508-RTFQ}$ ($\text{FRT}^{\Delta\text{F508-RTFQ}}$) se utilizaron para experimentos de cámara de Ussing para los moduladores putativos $\Delta\text{F508-RTFQ}$ identificados a partir de nuestros ensayos ópticos. Las células fueron cultivadas en insertos de cultivo de células de Costar Snapwell y se cultivaron durante cinco días a 37°C y 5% de CO_2 en medio de Ham F-12 modificado de Coon suplementado con 5% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin. Antes de su uso para la caracterización de la actividad potenciadora de los compuestos, las células se incubaron a 27°C durante 16-48 horas para corregir $\Delta\text{F508-RTFQ}$. Para determinar la actividad de los compuestos de corrección, las células se incubaron a 27°C o 37°C con y sin los compuestos durante 24 horas.

6. Grabaciones de células enteras

[0232] La corriente macroscópica $\Delta\text{F508-RTFQ}$ ($I_{\Delta\text{F508}}$) en células NIH3T3 corregidas por temperatura y compuesto de prueba de forma estable que expresan $\Delta\text{F508-RTFQ}$ se controlaron mediante el parche perforado, células enteras de grabación. En pocas palabras, las grabaciones de fijación de voltaje de $I_{\Delta\text{F508}}$ se realizaron a temperatura ambiente usando un amplificador de pinzamiento zonal Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Todos los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y filtrada q paso bajo a 1 kHz. Pipetas tenían una resistencia de 5-6 M Ω cuando se llena de la solución intracelular. Bajo estas condiciones de grabación, el potencial calculado de reversión para Cl^- (E_{Cl}) a temperatura ambiente era de -28 mV. Todas las grabaciones tenían una resistencia de sellado > 20 G Ω y una resistencia en serie < 15 M Ω . La generación de pulsos, la adquisición de datos y el análisis se realizaron usando un PC equipado con una interfaz Digidata 1320 A/D junto con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). El baño contenía <250 μl de solución salina y se perfundió continuamente a una velocidad de 2 ml/min usando un sistema de perfusión por gravedad.

7. Identificación de Compuestos de Corrección

[0233] Para determinar la actividad de los compuestos de corrección para aumentar la densidad de $\Delta F508$ -RTFQ funcional en la membrana plasmática, se utilizaron las técnicas de grabación de parche perforado descritas anteriormente para medir la densidad de corriente después de un tratamiento de 24 horas con los compuestos de corrección. Para activar completamente $\Delta F508$ -RTFQ, 10 μM de Forskolina y 20 μM genisteína se añadieron a las células. Bajo nuestras condiciones de grabación, la densidad de corriente después de la incubación de 24 horas a 27°C fue mayor que la observada después de la incubación de 24 horas a 37°C. Estos resultados son consistentes con los efectos conocidos de incubación a baja temperatura sobre la densidad de $\Delta F508$ -RTFQ en la membrana plasmática. Para determinar los efectos de los compuestos de corrección en la densidad de corriente RTFQ, las células se incubaron con 10 μM del compuesto de ensayo durante 24 horas a 37°C y la densidad de corriente se comparó con los controles 27°C y 37° (% de actividad). Antes de la grabación, las células se lavaron 3X con medio de registro extracelular para retirar cualquier compuesto de ensayo restante. La preincubación con 10 μM de los compuestos de corrección aumentó significativamente el cAMP y la genisteína dependiente actual en comparación con los controles 37°C.

8. Identificación de Compuestos Potenciadores

[0234] La capacidad de potenciadores $\Delta F508$ -RTFQ para aumentar la corriente macroscópica Cl^- $\Delta F508$ -RTFQ ($I_{\Delta F508}$) en las células NIH3T3 que expresan de forma estable $\Delta F508$ -RTFQ también se investigó el uso de técnicas de grabación de parche perforado. Los potenciadores identificados a partir de los ensayos ópticos evocaron un aumento dependiente de la dosis en $I_{\Delta F508}$ con una potencia similar y eficacia observada en los ensayos ópticos. En todas las células examinadas, el potencial de inversión antes y durante la aplicación potenciador fue de alrededor de -30 mV, que es la E_{Cl} calculada (-28 mV).

9. Soluciones**[0235]**

30	Solución intracelular (en mM):	Cs-aspartato (90), de CsCl (50), MgCl_2 (1), HEPES (10), y 240 m g/ml de anfotericina-B (pH ajustado a 7,35 con CsOH).
35	Solución extracelular (en mM):	N-metilo-D-glucamina (NMDG)-Cl (150), MgCl_2 (2), CaCl_2 (2), HEPES (10) (ad- pH justed a 7,35 con HCl).

10. Cultivo de la célula

[0236] Fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan $\Delta F508$ -RTFQ de forma estable se utilizan para las grabaciones de células enteras. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO_2 y 90% de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10%, 1 X NEAA, β -Me, 1 X pen/strep, y 25 mM HEPES en frascos de cultivo 175 cm^2 . Para grabaciones de células enteras, 2.500 - 5.000 células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24 - 48 horas a 27°C antes de su uso para poner a prueba la actividad de los potenciadores; y se incubaron con o sin el compuesto de la corrección a 37°C para medir la actividad de los correctores.

11. Grabaciones de monocal

[0237] Las actividades monocanales de $\Delta F508$ -RTFQ corregida por temperatura establemente expresados se observaron en las células NIH3T3 y actividades de compuestos potenciadores utilizando parche de membrana extirpado de dentro a fuera. Brevemente, las grabaciones de fijación de voltaje de la actividad monocal se realizaron a temperatura ambiente con un amplificador de fijación de parche de Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.). Todos los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y de paso bajo filtrada a 400 Hz. Pipetas de parche fueron fabricadas a partir de vidrio Corning Kovar Sealing #7052 (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) y tenían una resistencia de 5 - 8 M Ω cuando se llena con la solución extracelular. El $\Delta F508$ -RTFQ se activó después de la escisión, mediante la adición de 1 mM Mg-ATP, y 75 nM de la proteína quinasa dependiente de AMPc, subunidad catalítica (PKA; Promega Corp. Madison, WI). Después de la actividad del canal estabilizado, el parche se perfundió usando un sistema de microperfusión por gravedad. La afluencia fue colocada adyacente al parche, dando como resultado el intercambio de solución completa dentro de 1 - 2 segundos. Para mantener la actividad $\Delta F508$ -RTFQ durante la rápida perfusión, el inhibidor de fosfatasa no específico de F^- (10mM NaF) se añadió a la solución del baño. Bajo estas condiciones de grabación, la actividad del canal permaneció constante durante toda la duración de la grabación de parche (hasta 60 min). Las corrientes producidas por la carga positiva en movimiento de las soluciones intra a extracelulares (aniones que se mueven en la dirección opuesta) se muestran como corrientes positivas. El potencial de la pipeta (V_p) se mantuvo a 80 mV.

[0238] La actividad del canal se analizó a partir de parches de membrana que contienen ≤ 2 canales activos. El número máximo de aberturas simultáneas determinó el número de canales activos durante el transcurso de un experimento. Para determinar la amplitud de la corriente de un solo canal, los datos registrados de 120 segundos de actividad $\Delta F508$ -RTFQ se filtró "off-line" a 100 Hz y después se usa para construir histogramas de amplitud de todos los puntos que fueron equipados con funciones multigaussianas utilizando software de Analisis Bio-Patch (Bio-Logic Comp. Francia). La corriente microscópica total y la probabilidad de apertura (P_o) se determinaron a partir de 120 segundos de la actividad del canal. La P_o se determinó utilizando el software de Bio-Patch o de la relación $P_o = I/i(N)$, donde I = corriente media, i = amplitud de corriente monocanal actual, y N = número de canales activos en el parche.

12. Soluciones

[0239]

Solución extracelular (en mM): NMDG (150), ácido aspártico (150), $CaCl_2$ (5), $MgCl_2$ (2), y HEPES (10) (pH ajustado a 7,35 con base Tris).

Solución intracelular (en mM): NMDG-Cl (150), $MgCl_2$ (2), (5) EGTA, TES (10), y base de Tris (14) (pH ajustado a 7,35 con HCl).

13. Cultivo de célula

[0240] Fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan $\Delta F508$ -RTFQ de forma estable se utilizan para grabaciones de fijación de parche de membrana extirpada. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO_2 y 90% de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 2mM de glutamina, suero bovino fetal al 10%, 1 X NEAA, β -Me, 1 X pen/strep, y 25 HEPES mM en frascos de cultivo de 175 cm^2 . Para las grabaciones de canales individuales, 2.500 - 5.000 células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24 - 48 horas a 27°C antes de su uso.

[0241] Usando los procedimientos descritos anteriormente, la actividad, es decir, CE50, del Compuesto 1 se ha medido y se muestra en la Tabla 11.

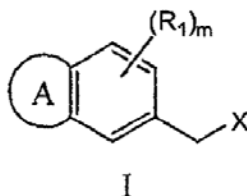
Tabla 11.

CE50 Ubicaciones: +++ $\leq 2,0$ <+ $\leq 5,0$ <+		
Por cien Ubicaciones: + $\leq 25,0$ <+ $\leq 100,0$ <+++		
Comp. N°.	CE50 agrupada	Eficacia máxima agrupada
1	+++	+++

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un compuesto de fórmula I:

5



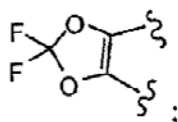
10

15

en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A es

20



25

R_1 se selecciona independientemente de $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

30

R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

X es CN o CO_2R ;

R es C_{1-6} alifático o arilo; y

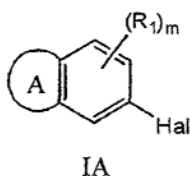
m es un número entero de 0 a 3 inclusive;

35

comprendiendo las etapas de

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IA en un primer disolvente orgánico

40



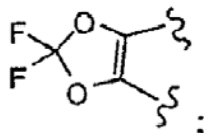
45

50

en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A es

55



60

R_1 se selecciona independientemente de $-R^J$, $-OR^J$, $-N(R^J)_2$, $-NO_2$, halógeno, $-CN$, $-C_{1-4}$ haloalquilo, $-C_{1-4}$ haloalcoxi, $-C(O)N(R^J)_2$, $-NR^J C(O)R^J$, $-SOR^J$, $-SO_2R^J$, $-SO_2N(R^J)_2$, $-NR^J SO_2R^J$, $-COR^J$, $-CO_2R^J$, $-NR^J SO_2N(R^J)_2$, $-COCOR^J$;

65

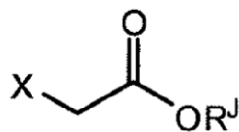
R^J es hidrógeno o C_{1-6} alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

Hal es un haluro;

con un compuesto de fórmula IB:

5

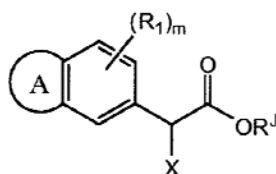


10

IB

15 en la que R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático, para formar un compuesto de fórmula IC:

20



25

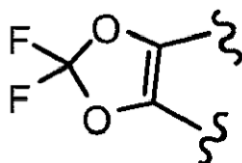
IC

en la que, independientemente para cada caso:

30

el anillo A es

35



40

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

45

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

X es CN o CO₂R;

R es C₁₋₆alifático o arilo; y

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

50

b) eliminar el -CO₂R^J grupo a partir del compuesto IC en un segundo disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula I.

2 El método de la reivindicación 1, en el que X es CN o CO₂Et R^J es un C₁₋₆alifático, y Hal es Br.

55

3 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el primer disolvente orgánico es un disolvente aprótico que es tolueno y la etapa a) se lleva a cabo a aproximadamente 50°C a 90°C en presencia de un catalizador de paladio seleccionado de paladio (II) acetato de etilo, Pd(dppf) Cl₂, Pd(dba)₂, tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) o tris(dibencilidenaetona) dipaladio (0).

60

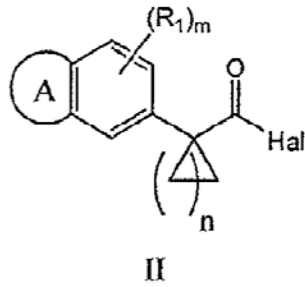
4 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el segundo disolvente orgánico es un disolvente aprótico que es dimetilsulfóxido y la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 55°C a 95°C en presencia de un ácido inorgánico.

65

5 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa a) se lleva a cabo en presencia de Pd(dba)₂ a aproximadamente 70°C y la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 75°C.

6 Un método para preparar un compuesto de fórmula II:

5

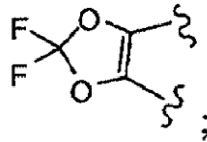


10

15 en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A

20



25

Hal es un haluro;

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

30

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

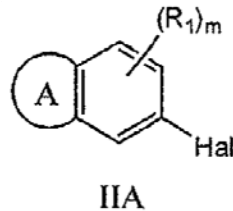
n es un número entero de 1 a 4 inclusive;

comprendiendo las etapas de

35

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIA en un primer disolvente orgánico

40

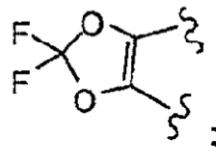


45

en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A es

50



55

60

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

65

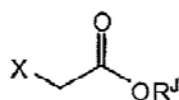
R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

Hal es un haluro;

con un compuesto de fórmula IIB:

5



IIB

10

donde

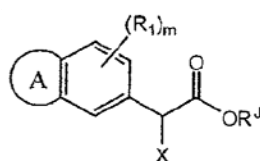
X es CN o CO₂R;

R es C₁₋₆alifático o arilo; y

15

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático, para formar un compuesto de fórmula IIC:

20



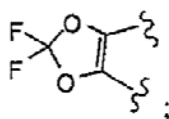
IIC

25

en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A es

30



35

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

40

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

X es CN o CO₂R;

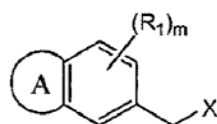
R es C₁₋₆alifático o arilo; y

m es un número entero de 0 a 3 inclusive;

45

b) eliminar el -CO₂R^J grupo a partir del compuesto IIC en un segundo disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula I:

50



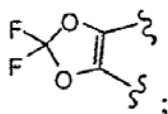
I

55

en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A es

60



65

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

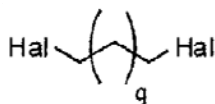
R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

X es CN o CO₂R;

R es C₁₋₆alifático o arilo; y

m es un número entero de 0 a 3 inclusive;

c) hacer reaccionar un compuesto de fórmula I con un compuesto de fórmula IID en presencia de una base:

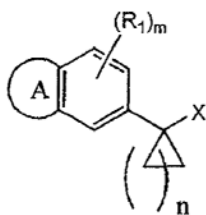


IID

en la que, independientemente para cada caso:

Hal es un haluro; y

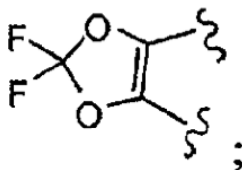
q es un número entero de 0 a 3 inclusive; para producir un compuesto de fórmula IIE:



IIE

en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A es



R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

R^J es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

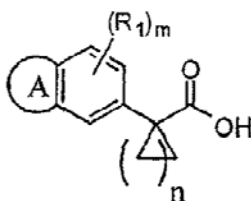
m es un número entero de 0 a 3 inclusive; X es CN o CO₂R;

R es C₁₋₆alifático o arilo; y

n es un número entero de 1 a 4 inclusive;

d) hacer reaccionar secuencialmente un compuesto de fórmula IIE con una base hidróxido y ácido para formar un compuesto de fórmula IIF:

5



10

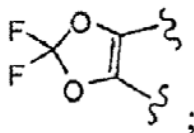
IIF

15

en la que, independientemente para cada caso:

el anillo A es

20



25

R₁ se selecciona independientemente de -R^J, -OR^J, -N(R^J)₂, -NO₂, halógeno, -CN, -C₁₋₄haloalquilo, -C₁₋₄haloalcoxi, -C(O)N(R^J)₂, -NR^JC(O)R^J, -SOR^J, -SO₂R^J, -SO₂N(R^J)₂, -NR^JSO₂R^J, -COR^J, -CO₂R^J, -NR^JSO₂N(R^J)₂, -COCOR^J;

30

R₁ es hidrógeno o C₁₋₆alifático;

m es un número entero de 0 a 3 inclusive; y

n es un número entero de 1 a 4 inclusive; y

35

e) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIF con un agente halogenante en un tercer disolvente orgánico para formar un compuesto de fórmula II.

7 El método de la reivindicación 6, en el que en la etapa a), el primer disolvente orgánico es un disolvente aprótico que es tolueno, Hal es Br, X es CN o CO₂ Et, y R^J es Et.

40

8 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que en la fórmula IIC, I, y IIE, m es 0, X es CN, y R^J es Et.

45

9 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que en el paso b), el segundo disolvente es un disolvente aprótico que es dimetilsulfóxido.

10 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que en la etapa c), la base es una base inorgánica.

50

11 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que en la fórmula IID, uno Hal es Cl y el otro Hal es Br.

12 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que:

55

en la etapa d), la base es NaOH y el ácido es HCl y la reacción con la base se lleva a cabo a aproximadamente 60°C a 100°C; y

en el paso e) el tercer disolvente orgánico es un disolvente aprótico que es el tolueno, el agente de halogenación es SOCl₂, y la etapa e) se lleva a cabo a aproximadamente 40°C a 80°C.

60

13 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que:

en la fórmula IIF, m es 0, y n es 1; y

en la fórmula II, m es 0, n es 1, y Hal es Cl.