

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 200**

51 Int. Cl.:

C07D 495/04 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2015 PCT/US2015/065672**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16106009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2015 E 15820005 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3237420**

54 Título: **Inhibidores de ERK**

30 Prioridad:
22.12.2014 US 201462095214 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2019

73 Titular/es:
**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:
**CORTEZ, GUILLERMO S.;
JOSEPH, SAJAN;
MCLEAN, JOHNATHAN ALEXANDER;
MCMILLEN, WILLIAM T.;
RODRIGUEZ, MICHAEL JOHN y
ZHAO, GAIYING**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 700 200 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

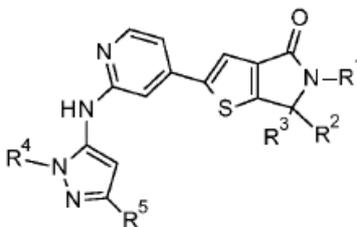
Inhibidores de ERK

5 La presente invención se refiere a compuestos tieno [2,3-c] pirrol-4-ona, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos que inhiben la actividad de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer.

10 La vía ERK/MAPK es importante para la proliferación celular y se observa frecuentemente que está activada en muchos tumores. Los genes Ras, que se encuentran corriente arriba de ERK1/2, están mutados en varios tipos de cáncer, que incluyen cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, así como tumores de mama y páncreas. La actividad de Ras alta se acompaña de una actividad elevada de ERK en muchos tumores humanos. Los estudios también han demostrado que ERK es un componente crítico de la señalización de Ras. Estas observaciones apoyan el atractivo de la vía de señalización ERK1/2 para desarrollar tratamientos anticáncer en un amplio espectro de tumores humanos.

15 Los inhibidores de ERK son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, el documento WO2013130976. Aún permanece la necesidad de proporcionar inhibidores de ERK alternativos, más particularmente para el tratamiento del cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona inhibidores de ERK1/2 que pueden ser útiles para tratar el cáncer.

La presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:



en la que:

20 R¹ es hidrógeno, 2-metoxietilo, 2-(ciclopropoxi)etilo, 2-hidroxietilo, 2-(2,2-difluoroetoxi)etilo, 2-trideuteriometoxi)etilo, 2-(trifluorometoxi)etilo, 2-metoxipropilo, (2R)-2-metoxipropilo, o (2S)-2-metoxipropilo;

R² y R³ son de modo independiente hidrógeno, metilo, o etilo o R² y R³ se pueden tomar juntos para formar ciclopropilo o ciclopentilo;

25 R⁴ es hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, ciclopentilo, difluorometilo, 2-fluoroetilo, 2,2-difluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo, o 2-metoxietilo; y

R⁵ es hidrógeno, metilo, o ciclopropilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona una realización para un compuesto de fórmula I en la que R¹ es 2-metoxietilo.

30 La presente invención también proporciona una realización para un compuesto de fórmula I en el que R² y R³ son de modo independiente metilo.

La presente invención también proporciona otra realización para un compuesto de fórmula I en el que R⁴ es metilo.

La presente invención también proporciona aún otra realización para un compuesto de fórmula I en el que R⁵ es hidrógeno.

35 Preferentemente, la presente invención proporciona un compuesto que es 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

A modo de una realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona.

40 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma., y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-

il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona.

10 La presente invención proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para usar en el tratamiento. La presente invención proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para usar en el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica que comprende 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

15 La presente invención también proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona para usar en el tratamiento. La presente invención proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona para usar en el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica que comprende 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona.

20 La presente invención proporciona el uso de 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención también proporciona el uso de 5-(2-metoxi-yetil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

25 La presente invención proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona en una forma cristalina. La presente invención también proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona en una forma cristalina (Forma cristalina 1) caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que tiene picos característicos, en $20 \pm 0,2^\circ$, que se producen a $24,2^\circ$ en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en $8,0^\circ$, $12,8^\circ$, $15,9^\circ$, $16,8^\circ$, y $19,5^\circ$. La presente invención además proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona en una forma cristalina (Forma cristalina 2), caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que tiene picos característicos, en $20 \pm 0,2^\circ$, que se producen a $18,5^\circ$ en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en $8,5^\circ$, $9,2^\circ$, $16,5^\circ$, $20,3^\circ$, y $23,3^\circ$.

30 Además, la presente invención proporciona realizaciones preferidas de los procedimientos y usos descritos en la presente, en los que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los cánceres preferidos son cáncer colorrectal, cáncer pancreático, y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

35 La presente invención también proporciona 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para usar en administración simultánea, separada o secuencial en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer.

45 La presente invención preferentemente contiene compuestos de fórmula I con las siguientes sustituciones:

- a) R^1 es 2-metoxietilo;
- b) R^2 es metilo;
- c) R^3 es metilo;
- d) R^4 es metilo; o
- 50 e) R^5 es hidrógeno.

Más preferentemente, la presente invención contiene compuestos de fórmula I con las siguientes combinaciones de sustituciones:

- a) R² y R³ son metilo;
- b) R¹ es 2-metoxietilo, R² es metilo, y R³ es metilo;
- c) R¹ es 2-metoxietilo, R⁴ es metilo, y R⁵ es hidrógeno;
- d) R² es metilo, R³ es metilo, R⁴ es metilo, y R⁵ es hidrógeno; o
- e) R¹ es 2-metoxietilo, R² es metilo, R³ es metilo, R⁴ es metilo, y R⁵ es hidrógeno.

Como se usó anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Un "vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" es un medio generalmente aceptado en la técnica para la administración de agentes biológicamente activos a mamíferos, por ejemplo, seres humanos.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" o "una sal farmacéuticamente aceptable" se refieren a las sales o sales orgánicas e inorgánicas relativamente no tóxicas del compuesto de la presente invención.

"Cantidad efectiva" significa la cantidad del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención o composición farmacéutica que contiene un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la presente invención que provocará la respuesta médica o biológica de o el efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o ser humano que es buscado por el investigador, veterinario, médico u otro clínico

Los términos "tratamiento", "tratar", "que trata", y similares, están destinados a incluir reducir la velocidad o revertir la progresión de un trastorno. Estos términos también incluyen aliviar, mejorar, atenuar, eliminar, o reducir uno o más síntomas de un trastorno o afección, incluso si el trastorno o afección no se elimina realmente, incluso si la progresión del trastorno o afección no se lentifica o revierte.

Los expertos en la técnica entenderán que los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales. Los compuestos de la presente invención contienen heterociclos básicos y, por consiguiente, reaccionan con cualquiera de una serie de ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Tales sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y una metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, No. 1, January 1977.

Los compuestos de la presente invención preferentemente se formulan como composiciones farmacéuticas administradas por una variedad de vías. Preferentemente, tales composiciones son para la administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para preparar los mismos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, et al., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005).

Los compuestos de la presente invención generalmente son efectivos en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosis por día normalmente se hallan dentro de un intervalo diario de aproximadamente 1 a 2000 mg. Preferentemente, tales dosis se hallan dentro del intervalo diario de 50 a 1000 mg. Más preferentemente tales se hallan dentro del intervalo diario de 125 a 400 mg. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los intervalos mencionados anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores, y por lo tanto los intervalos de dosificación anteriores no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Se entenderá que la cantidad del compuesto realmente administrado será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluye la afección para tratar, la vía de administración elegida, el compuesto o los compuestos reales administrados, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.

El experto en la materia apreciará que ciertos compuestos de la presente invención contienen al menos un centro quiral. La presente invención contempla todos los enantiómeros o diastereómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos, incluidos los racematos. Se prefiere que los compuestos de la presente invención que contienen al menos un centro quiral existan como enantiómeros o diastereómeros únicos. Los enantiómeros o diastereómeros únicos se pueden preparar comenzando con reactivos quirales o mediante técnicas de síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. Alternativamente, los enantiómeros o diastereómeros únicos se pueden aislar de las mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatografía quiral estándares.

La designación de "isómero 1" en un nombre del compuesto representa que el intermediario o compuesto correspondiente de la presente invención es el primero de los dos enantiómeros que se eluye cuando una mezcla de un par de enantiómeros se separa mediante cromatografía quiral. La designación de "isómero 2" en un nombre del compuesto que representa el intermediario o compuesto correspondiente de la presente invención es el

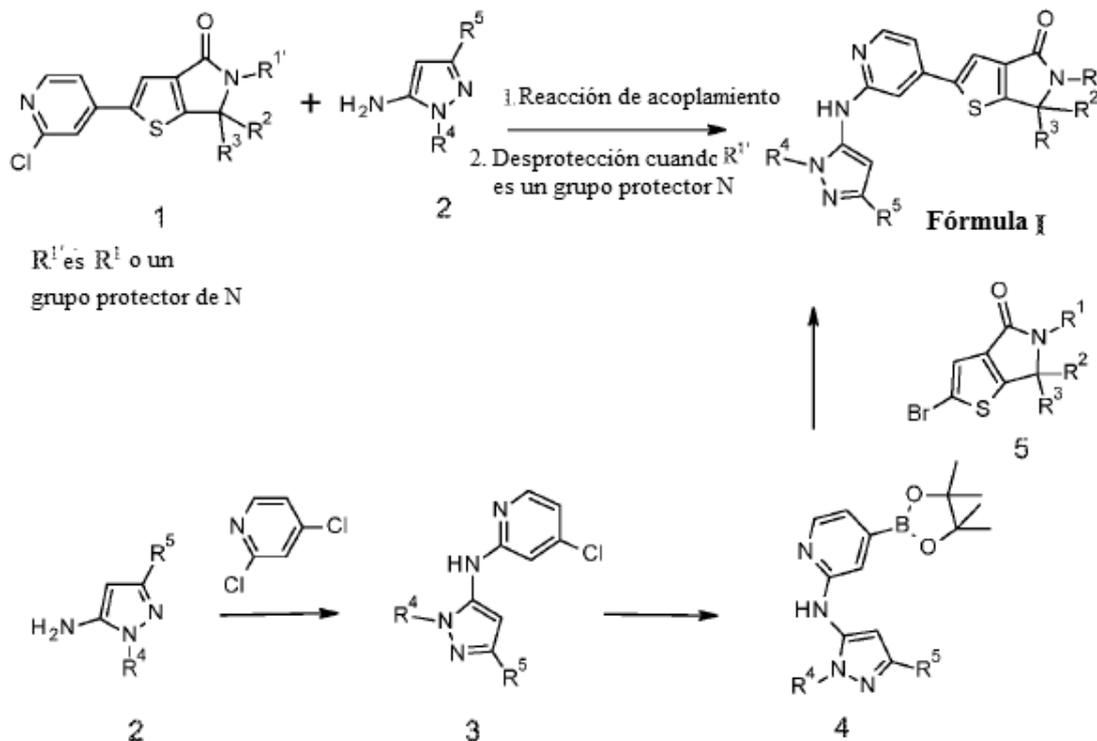
segundo de los dos enantiómeros que se eluye cuando la mezcla de un par de enantiómeros se separa por cromatografía quiral.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con procedimientos de síntesis bien conocidos y apreciados en la técnica. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estas reacciones son bien conocidas en la técnica y las sustituciones apropiadas de disolventes y co-reactivos están dentro de la experiencia de la técnica. Del mismo modo, los expertos en la materia apreciarán que los intermediarios sintéticos se pueden aislar y/o purificar mediante diversas técnicas bien conocidas, según sea necesario o deseado, y que, con frecuencia, será posible utilizar diversos intermediarios directamente en las siguientes etapas de síntesis con poco o nada de purificación. Además, el experto en la técnica apreciará que, en algunas circunstancias, el orden en el que se introducen los restos no es crítico. El orden particular de las etapas requeridas para producir los compuestos de la presente invención depende del compuesto particular que se sintetice, el compuesto de partida y la carga relativa de los restos sustituidos, como es bien sabido por el químico experto. Todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son como se definieron previamente, y todos los reactivos son bien conocidos y se aprecian en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "DCM" se refiere a diclorometano; "DMF" representa N, N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetil sulfóxido; "DTT" se refiere a ditioneitol; "EDTA" se refiere al ácido etilendiaminotetraacético; "EGTA" se refiere a ácido etilenglicol tetraacético; "ELISA" se refiere a un ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "FBS" se refiere a suero fetal bovino; "HBSS" se refiere a la solución salina equilibrada de Hank; "IC₅₀" se refiere a la mitad de la concentración inhibitoria máxima; "IVT1" se refiere a la inhibición del blanco in vivo; "MS" se refiere a la espectroscopia de masa; "MeOH" se refiere a metanol; "RMN" se dirige a la resonancia magnética nuclear; "PBST" se refiere a solución salina tamponada con fosfato que contiene Tween-20; "TED50" se refiere dosis efectiva umbral 50; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "UVW" se refiere a la longitud de onda ultravioleta, y "XRD" se refiere a la difracción de rayos X.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en la presente se denominan y numeran usando ACDLABS o Accelrys Draw 4.1.

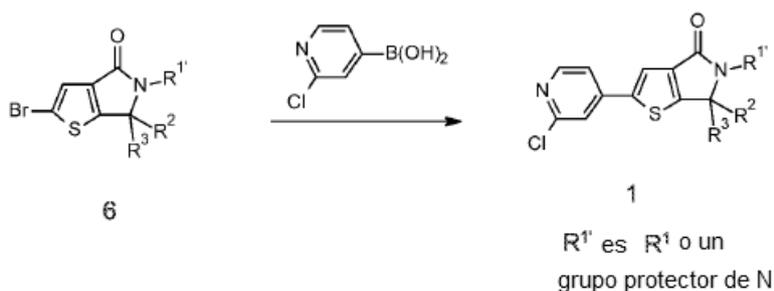
Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar como se ilustra en los siguientes esquemas, donde R¹, R², R³, R⁴, y R⁵ son como se definieron previamente.



Esquema 1: Síntesis de los compuestos de Fórmula 1

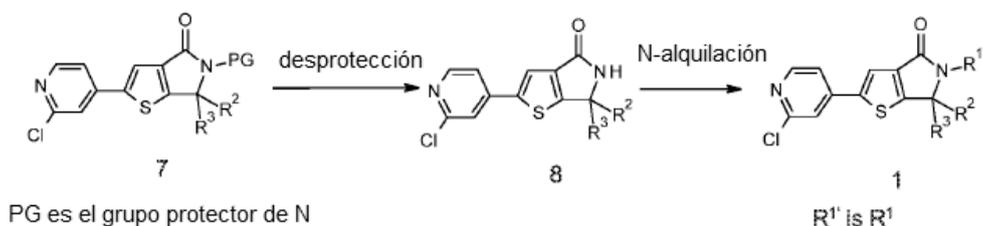
El esquema 1 ilustra el procedimiento de síntesis para obtener los compuestos de fórmula I. El compuesto 1 se hace reaccionar con el compuesto 2 en condiciones de reacción de acoplamiento de paladio bien conocidas para proporcionar compuestos de fórmula I. Más específicamente, un compuesto de fórmula I se obtiene mediante la reacción del Compuesto 1 y Compuesto 2 a una temperatura elevada en un disolvente adecuado tal como 1,4-dioxano o tolueno, con la existencia de una base adecuada tal como carbonato de cesio o terc-butóxido, un catalizador adecuado tal como acetato de paladio (II) o bis (tri-*o*-tolilfosfina) paladio (0) y un agente de ligando adecuado tal como 4,5-bis (difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno o (R)-1-[(Sp)-2-diciclohexilfosfino]ferrocenil]etil-di-terc-butilfosfina. Cuando R¹ es un grupo protector de N, el producto de acoplamiento se trata adicionalmente con un agente de desprotección adecuado tal como ácido trifluoroacético en un disolvente adecuado tal como DCM para proporcionar un compuesto de Fórmula I cuando R¹ es hidrógeno.

El compuesto de Fórmula I se puede sintetizar con un procedimiento alternativo como se ilustra en el Esquema 1. El Compuesto 2 se hace reaccionar con 2,4-dicloropiridina condiciones de reacción de acoplamiento de paladio bien conocidas para proporcionar el Compuesto 3. Más específicamente, el Compuesto 3 se obtiene por la reacción del Compuesto 2 y 2,4-dicloropiridina a una temperatura elevada en un disolvente adecuado tal como 1,4-dioxano, en presencia de un catalizador adecuado tal como tris(dibencilideno)acetone)dipaladio(0) y una base adecuada tal como carbonato de cesio. El Compuesto 3 se hace reaccionar con bis(pinacolato)diboro en condiciones de reacción de acoplamiento de paladio bien conocidas para proporcionar el Compuesto 4. Más específicamente, el Compuesto 3, bis(pinacolato)diboro, un agente ligado adecuado tal como 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-trisisopropilbifenilo y un catalizador adecuado tal como cloro(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) se calientan a una temperatura elevada en un disolvente adecuado tal como EtOH absoluto para proporcionar Compuesto 4. Compuesto 4 se hace reaccionar con Compuesto 5 condiciones de reacción de acoplamiento de paladio bien conocidas para proporcionar un compuesto de Fórmula I.



Esquema 2: Síntesis del Compuesto 1

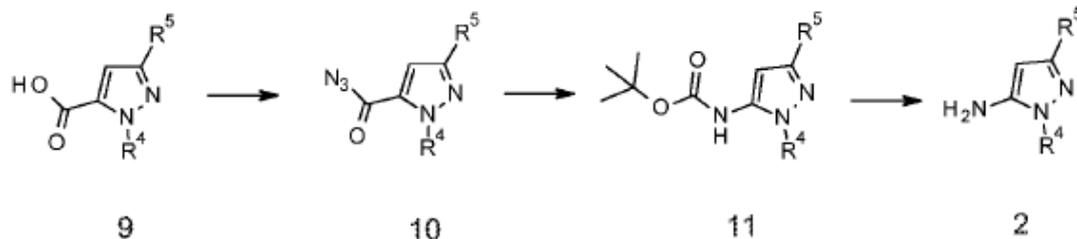
El Esquema 2 ilustra el procedimiento de síntesis del Compuesto 1. Compuesto 6 se hace reaccionar con ácido 2-cloropiridina-4-borónico en condiciones de reacción de acoplamiento de paladio bien conocidas para proporcionar Compuesto 1. Más específicamente, el Compuesto 6 se hace reaccionar a temperatura elevada con ácido 1,2-cloropiridina-4-borónico, una base adecuada tal como carbonato de sodio, un catalizador adecuado tal como trans-dicloro-bis-trifenilfosfina paladio (II) en un disolvente adecuado tal como una mezcla de EtOH y agua para proporcionar el Compuesto 1.



Esquema 3: Síntesis alternativo del Compuesto 1 cuando R¹ es R¹

El esquema 3 ilustra el procedimiento de síntesis alternativo del Compuesto 1 cuando R¹ es R¹. El Compuesto 7, que se puede obtener por el procedimiento de síntesis que se ilustra en el Esquema 2 cuando R¹ es un grupo protector de N adecuado, se hace reaccionar con un agente de desprotección adecuado tal como ácido trifluoroacético en un disolvente adecuado tal como DCM para proporcionar Compuesto 8. El Compuesto 8 también se hace reaccionar con un agente de alquilación sustituido adecuadamente para proporcionar el Compuesto 1 cuando R¹ es R¹ como se definió previamente. Más específicamente, Compuesto 7 es trata con una base

adecuada tal como hidruro de sodio y posteriormente seguido por la reacción con un agente de alquilación sustituido adecuadamente para tal como yoduro de metilo o yodoetoxiciclopropano en un disolvente adecuado tal como DMF para proporcionar Compuesto 1 cuando R^{1'} es R¹ como se definió previamente.

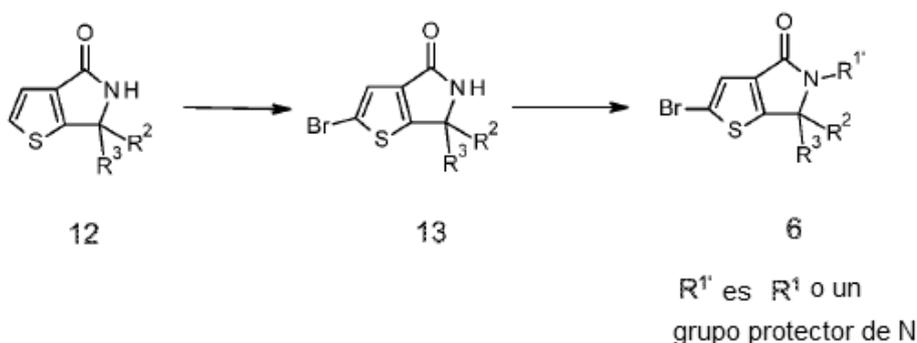


5

Esquema 4: Síntesis del Compuesto 2

El Compuesto 2 está disponible en el comercio o se obtiene por el procedimiento de síntesis que se ilustra en el Esquema 4. El Compuesto 9 se trata con difenilfosforil azida y una base adecuada tal como trietilamina en un disolvente adecuado tal como una mezcla de THF y DCM para proporcionar el Compuesto 10. El Compuesto 10 posteriormente se hace reaccionar con alcohol ter-butílico bajo temperatura elevada para proporcionar el Compuesto 11. El Compuesto 11 se trata con un agente de desprotección adecuado tal como cloruro de hidrógeno en un disolvente adecuado tal como DCM para proporcionar el Compuesto 2.

10

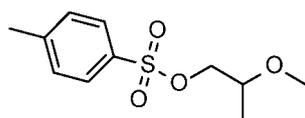


Esquema 5: Síntesis del Compuesto 6

El esquema 5 ilustra el procedimiento de síntesis para el Compuesto 6. El Compuesto 12 se hace reaccionar con un agente de bromación adecuado tal como N-bromosuccinimida en un disolvente adecuado tal como ACN para proporcionar el Compuesto 13. El Compuesto 13 se hace reaccionar con una base adecuada tal como N,N-dimetilpiridin-4-amina, N,N-diisopropiletilamina, hidruro de sodio o hexametildisilazida de sodio, y un agente de N-alquilación o protector de N adecuado tal como bromuro de 2-metoxietilo, 2-cloroetoxiciclopropano, o di-terc-butildicarbonato para proporcionar el Compuesto 6.

20 Preparación 1

2-Metoxipropil 4-metilbencensulfonato

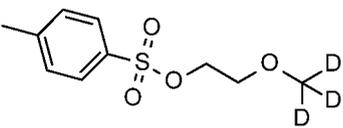


Se enfría una solución de 2-metoxipropan-1-ol (1,0 g, 11,1 mmol) en piridina (12,5 ml) y DCM (19 ml) en un baño de agua helada y se añade cloruro de 4-metilbencensulfonilo (2,54 g, 13,3 mmol). Se agita la mezcla durante la noche mientras que se deja que la temperatura se eleve lentamente a temperatura ambiente. Se inactiva la reacción con agua (40 ml) y EtOAc (50 ml). Se separan las fases y se extrae la fase acuosa dos veces con EtOAc adicional (50 ml). Se lavan las soluciones orgánicas combinadas con cloruro de amonio acuoso saturado y solución saturada NaCl. Se secan las soluciones orgánicas sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtran y concentran el filtrado para dar el compuesto del título 2,71 g (91%) como un aceite incoloro. MS (m/z): 245 (M+1).

30

El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento de preparación 1.

Tabla 1: Preparación 2

Prep Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z):
2	4- metilbencensulfonato) de 2-(Trideuteriometoxi)etilo		234 (M+1)

Preparación 3

5 2-Yodoetoxiciclopropano

En un reactor de microondas, se calienta una solución de 2-cloroetoxiciclopropano (750 mg, 6,2 mmol) y yoduro de sodio (2,8 g, 18,7 mmol) en acetona (62 ml) a 75 °C durante 18 horas. Se diluye la mezcla de reacción con una mezcla 1:1 de hexanos y pentano. Se filtra la mezcla a través de un tapón de CELITE® y se lavan los sólidos con éter. Se concentra el filtrado a presión reducida a temperatura ambiente. Se diluye el producto con éter (5 ml) y se somete a sonicación la mezcla en un baño de agua. Se filtra la suspensión resultante a través de un tapón de CELITE® adicional y se lavan los sólidos con éter. Se concentra el filtrado a un volumen mínimo (3,5 ml) y se añade sulfato de magnesio. Se usa esta solución en la próxima etapa. 1H NMR (399,83 MHz, DMSO-*d*6) δ 3,65 (t, J=6,3 Hz, 2H), 3,35-3,30 (m, 1H), 3,30 (t, J=6,3 Hz, 2H), 0,49-0,45 (m, 2H), 0,43-0,38 (m, 2H).

15 Preparación 4

N-[2-(difluorometil)pirazol-3-il]carbamato de *ter*-Butilo



Se enfría una solución de ácido 2-(difluorometil)pirazol-3-carboxílico (2,0 g, 12,3 mmol) en THF (16,5 ml) y DCM (19 ml) en un baño de agua helada y se añade trietilamina (2,6 ml, 18,5 mmol) y difenilfosforil azida (4,0 ml, 18,5mmol). Se agita la reacción durante la noche mientras que se deja que la temperatura de reacción se leve lentamente. Se añade alcohol *ter*-butílico (2,3 ml, 24,7 mmol) y se calienta la mezcla de reacción a 70 °C durante dos horas. Se elimina el calor y se agita a mezcla de reacción durante dos días. Se calienta la mezcla de reacción a 70 °C durante 15 horas adicionales y posteriormente se enfría a temperatura ambiente. Se concentra la mezcla a presión reducida y se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice (220 g de columna) eluyendo con un gradiente de 0-100% EtOAc en hexanos. Se combinan las fracciones que contienen el producto deseado y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo resultante por cromatografía de fase inversa (15 g de columna de fase inversa C-18 Gold; 0% retenida durante 5 min, gradiente de elución de ACN 0-20%/agua). También se purifica el material obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice (220 g) eluyendo con un gradiente de 0-30% EtOAc en DCM para dar el compuesto del título 1,28 g (44%). MS (m/z): 234 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 4.

35

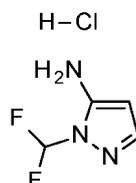
Tabla 2: Preparaciones 5-6

Prep. Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	Datos físicos
5	N-[2-(2-fluoroetil)pirazol-3-il]carbamato de terc-butilo		$^1\text{H RMN}(400,15 \text{ MHz, DMSO-}d_6) \delta$ 9,24 (br, 1H), 7,32 (d, J=2,0 Hz, 1H), 6,07 (s, 1H), 4,72 (t, J= 4,8Hz, 1H), 4,60 (t, J= 4,8 Hz, 1H), 4,30 (t, J= 4,8 Hz, 1H), 4,23 (t, J= 4,8 Hz, 1H), 1,42(s, 9H).
6	N-(2- ciclopropilpirazo-3-il) carbamato de terc-butilo		224 (M+1)

Preparación 7

Clorhidrato de 2-(Difluorometil)pirazol-3-amina

5



10

Se trata una solución de N-[2-(difluorometil)pirazol-3-il]carbamato de terc-butilo (1,28 g, 5,5 mmol) en DCM (11 ml) con cloruro de hidrógeno (4,0 M en 1,4-dioxano, 5,5 ml, 22 mmol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante dos días. Se concentra la mezcla a presión reducida para dar el compuesto del título 920 mg (99%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}(399,83 \text{ MHz, DMSO-}d_6) \delta$ 7,5-8,77 (br S, 3H), 7,58 (t, J=55,6 Hz, 1H), 7,33 (s, 1 H), 5,31 (s, 1H).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 7.

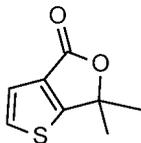
15

Tabla 3: Preparaciones 8-9

Prep. Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	Datos físicos	Comentario
8	2-(2-Fluoroetil) pirazol-3-amina		$^1\text{H RMN}(399,83 \text{ MHz, DMSO-}d_6) \delta$ 7,03 (d, J= 1,6 Hz, 1H), 5,23 (d, J= 1,7 Hz, 1H), 5,12(bs, 2H), 4,70 (t, J= 5,1 Hz, 1H), 4,58 (t, J=5,1 Hz, 1H) 4,16 (t, J= 5,1 Hz, 1H), 4,10 (t, J= 5,1 Hz, 1H),	La base libre se obtiene con bicarbonato de sodio
9	Clorhidrato de 2-Ciclopropilpirazol-3-amina		$^1\text{H RMN}(399,83 \text{ MHz, DMSO-}d_6) \delta$ 7,80 (S,1H), 6,28-7,58 (br S, 1H), 5,62 (s, 1H), 3,23-3,28 (m, J=3,6 Hz, 1H), 1,024-1,11 (m, J=3,6 Hz, 4H).	

Preparación 10

6,6-Dimetiltieno[2,3-c]furan-4-ona



5

Se enfría una solución de ácido 3-tiofencarboxílico (250 g, 1,95 mol) en THF (9750 ml) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un matraz de 3 bocas de 20 l. A esta solución, se añade n-butil litio (2,5 M en hexano, 1872 ml, 4,68 mol) lentamente mientras que se mantiene la temperatura por debajo de $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agita la mezcla de reacción durante una hora a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añade acetona (187 ml, 2,55 mol) lentamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla de reacción se deja calentar a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agita durante tres horas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. A la solución resultante, se añade 4 M ácido clorhídrico (1500 ml) a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente. Se agita la mezcla resultante durante la noche. Se filtra la mezcla de reacción a través de un lecho de tierra de diatomeas y se lava el lecho con tolueno (3 x 500 ml). Se concentra el filtrado a presión reducida. Se disuelve el residuo bruto resultante en tolueno (3750 ml) y agua (250 ml) y se añade ácido p-toluensulfónico (100,1 g, 0,526 mol) a temperatura ambiente. Se somete a reflujo la mezcla de reacción durante 16 horas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se disuelve el residuo resultante en agua y se extrae con EtOAc (2 x 10 l). Se lava la capa orgánica con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y agua. Se secan los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran y concentran a presión reducida a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para proporcionar el compuesto del título 200 g (61%) como líquido viscoso marrón. MS (m/z): 169 (M+1).

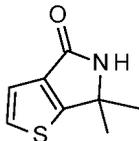
10

15

20

Preparación 11

6,6-Dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona,



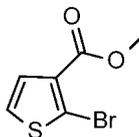
25

30

Se carga una autoclave de 5 l con una solución de 6,6-dimetiltieno[2,3-c]furan-4-ona (150 g, 0,891 mol) en hidróxido de amonio (1000 ml). En un ambiente cerrado, se lleva la mezcla de reacción con cuidado a una temperatura de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agita durante cuatro horas a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de 4 horas, se enfría la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se libera el gas amoníaco. Se extrae la mezcla de reacción con DCM (3 x 750 ml). Se lava la capa orgánica con agua (1 x 750 ml), y se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para proporcionar el compuesto del título 100 g (67%). MS (m/z): 168 (M+1).

Preparación 12

2-bromotiofen-3-carboxilato de metilo



35

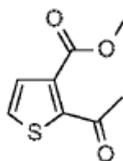
40

45

Se trata una solución de ácido 2-bromotiofen-3-carboxílico (65 g, 314 mmol) en MeOH (500 ml) con cloruro de tionilo (13,5 g, 113 mmol) a temperatura ambiente. Se agita la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se calienta la mezcla a reflujo durante tres horas. La mezcla se deja enfriar mientras se agita durante la noche. Se concentra la mezcla de reacción a presión reducida. Se añade EtOAc y se lava la solución orgánica resultante con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se separan las capas y se extrae de nuevo la solución acuosa con EtOAc adicional. Se combinan las soluciones orgánicas y se secan sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtra la solución y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 220 g y elución de la precolumna sobre una columna de 330 g con un gradiente de 10-25% de EtOAc en DCM. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentran a presión reducida para dar el compuesto del título 71 g. Se usa el material sin más purificación. ^1H RMN(400,15 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,36-7,34 (d, J=5,6 Hz, 1H), 7,22-7,20 (d, J=5,6 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H).

Preparación 13

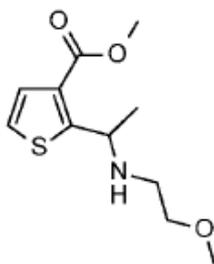
2-acetiltiofen-3-carboxilato de metilo



5 Se purga una solución de 2-bromotiofen-3-carboxilato de metilo (58,5 g, 265 mmol) y (1-etoxietenil)trimetilestanano (106 g, 294 mmol) en 1,4-dioxano (350 ml) con nitrógeno durante cinco minutos. Se añade cloruro de bis(trifenilfosfino)paladio(II) (3,71 g, 5,29 mmol) todo de una vez y se calienta la reacción a 95 °C durante 24 horas. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se trata la reacción con ácido clorhídrico 1 N (100 ml). Se agita la mezcla vigorosamente 30 minutos. Se reduce el volumen de reacción en 50% a presión reducida. Se diluye la mezcla con EtOAc (500 ml) y se filtra la solución resultante a través de CELITE®. Se lava el sólido con EtOAc adicional y se transfiere el filtrado a un embudo de separación. Se lava la solución orgánica con solución saturada NaCl. Se extrae de nuevo la solución acuosa con EtOAc adicional. Se combinan las soluciones orgánicas y se concentran a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 220 g y elución de la precolumna sobre una columna de 330 g con un gradiente de 10-25% EtOAc en hexanos para dar el compuesto del título 42,7 g (88%). MS (m/z): 185 (M+1).

Preparación 14

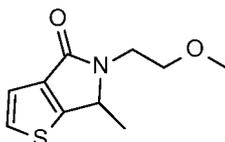
2-[1-(2-metoxietilamino)etil]tiofen-3-carboxilato de metilo



20 Se trata una solución de 2-acetiltiofen-3-carboxilato de metilo (42,7 g, 232 mmol) en MeOH (45 ml) con 2-metoxietilamina (35 g, 466 mmol) gota a gota usando un baño de agua para evitar que la temperatura suba. Se deja decantar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se trata la mezcla con 5% paladio en carbón (28 g) y se somete la mezcla a una atmósfera de hidrógeno (50 PSI) a 50 °C durante 18 horas. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se ventila el gas. Se filtra la mezcla y se lava el sólido con MeOH. Se concentra la mezcla para dar el compuesto del título 47 g (83%) como un aceite ámbar. MS (m/z): 244 (M+1).

Preparación 15

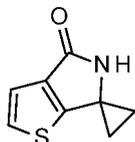
25 5-(2-Metoxietil)-6-metil-6H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



30 Se trata una solución de 2-[1-(2-metoxietilamino)etil]tiofen-3-carboxilato de metilo (9,4 g, 39 mmol) en THF (50 ml) con el aducto de bis(trimetilaluminio)-1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (0,1 g, 0,4 mmol) y se calienta la mezcla resultante a 60 °C durante la noche. Se enfría la reacción a temperatura ambiente. Se inactiva con cuidado la mezcla de reacción gota a gota con cloruro de amonio acuoso saturado seguido por ácido clorhídrico 1 N. Se añade EtOAc y se extrae. Se separan las capas y se trata la capa acuosa con ácido clorhídrico 1 N adicional hasta que la solución está límpida. Se extrae la solución acuosa con cuatro porciones de EtOAc. Se combinan los extractos orgánicos y se seca la solución entre sulfato de sodio anhidro. Se filtra la mezcla y se concentra el filtrado para dar el compuesto del título 8 g (98%) como un aceite ámbar. MS (m/z): 212 (M+1).

Preparación 16

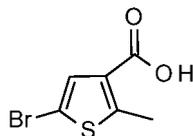
espiro[5H-tieno[2,3-c]pirrol-6,1'-ciclopropan]-4-ona



- 5 Se trata a -70 °C la solución de 2-cianotiofen-3-carboxilato de metilo (3 g, 17,4 mmol) y tetra(isopropóxido) de titanio (5,44 g, 19,2 mmol) en dietil éter (145 ml) con una solución de bromuro de etilmagnesio en dietil éter (12,8 ml, 38,3 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante 30 minutos. Se retira el baño de enfriamiento y la mezcla se deja calentar lentamente a temperatura ambiente durante una hora. Se añade eterato de trifluoruro de boro (4,4 ml, 34,8 mmol) y se agita la mezcla durante una hora adicional. Se inactiva la reacción con ácido clorhídrico 1 N (87 ml). Se diluye la reacción con dietil éter (200 ml). Se separan las capas y se extrae de nuevo la capa acuosa con dietil éter adicional. Se combinan los extractos orgánicos y se lavan con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución saturada NaCl. La solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 25 g y elución de la precolumna sobre una columna de 80 g con EtOAc para dar el compuesto del título 1,02 g (35%). MS (m/z): 166 (M+1).

Preparación 17

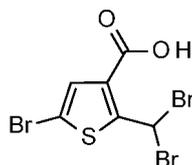
Ácido 5-Bromo-2-metil-tiofen-3-carboxílico



- 20 Se enfría una solución de ácido 2-metiltiofen-3-carboxílico (50 g, 352 mmol) en ácido acético (75 ml) y DMF (300 ml) en un baño de agua helada y se añade N-bromosuccinimida (69 g, 387 mmol). Después de la adición, se retira el baño de hielo y se agita la mezcla de reacción durante dos horas. La reacción se vierte en trozos de hielo y se añade EtOAc. Se separan las capas y se lava la capa orgánica con dos porciones de agua, una porción de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución saturada NaCl. Se extrae la solución acuosa original con tres porciones de EtOAc. Se combinan todos los extractos de EtOAc y se secan sobre sulfato de sodio. Se filtra la solución y se lava el sólido con EtOAc adicional. Se concentra el filtrado a un sólido. Se añade agua y se agita el matraz para dispersar el sólido. Se filtran los sólidos y se lavan los sólidos con agua. Se recolecta el sólido y se seca en un horno de vacío. Se extrae el filtrado con tres porciones de EtOAc, se combinan los extractos, y se concentran a un sólido. Se combinan todos los sólidos para dar el compuesto del título 46 g (59%). MS (m/z): 221/223 (M+1/M+3).

Preparación 18

Ácido 5-Bromo-2-(dibromometil)tiofen-3-carboxílico

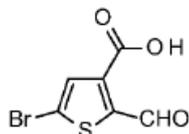


- 35 Se trata una solución de ácido 5-bromo-2-metil-tiofen-3-carboxílico (46 g, 208 mmol) en tetracloruro de carbono (500 ml) con N-bromosuccinimida (93 g, 520 mmol) y peróxido de benzoílo (2,5 g, 10,4 mmol). Se calienta la mezcla de reacción a 80 °C durante la noche. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se concentra a sequedad a presión reducida. Se añade agua y se agita la mezcla para disgregar los sólidos. Se filtra la mezcla y se lavan los sólidos con agua (1 l). Se seca al aire el sólido resultante para dar el compuesto del título 66 g (84%). ¹H RMN(400,15 MHz, DMSO-d₆) δ 7,83 (s, 1H), 7,40 (s, 1H).

45

Preparación 19

Ácido 5-Bromo-2-formil-tiofen-3-carboxílico

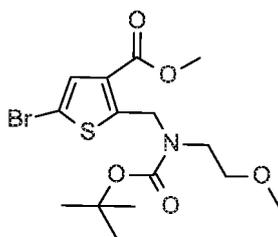


- 5 Se trata una solución de ácido 5-bromo-2-(dibromometil)tiofen-3-carboxílico (66 g, 150 mmol) en 1,4-dioxano (594 ml) y agua (132 ml) con ácido sulfúrico (12,6 ml) y se agita la mezcla a 80 °C durante la noche. Se concentra la reacción a un residuo. Se añade agua y se agita la mezcla para formar un precipitado. Se recolecta el sólido por filtración al vacío en un embudo de vidrio sinterizado y se lavan los sólidos con agua hasta que el pH de lavado está por encima de 4. Se seca el sólido para dar el compuesto del título 36 g. El compuesto se usa sin purificación
- 10 adicional. MS (m/z): 235/237 (M+1/M+3).

Preparación 20

5-bromo-2-[[terc-butoxicarbonil(2-metoxietil)amino]metil]tiofen-3-carboxilato de metilo

15

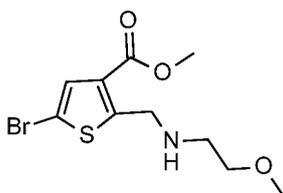


- 20 Se trata una solución de ácido 5-bromo-2-formil-tiofen-3-carboxílico (9 g, 38 mmol) en MeOH (300 ml) con 2-metoxietilamina (5,01 ml, 57 mol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se trata la reacción con cianoborohidruro de sodio (7,2 g, 115 mmol) y se agita la mezcla durante dos horas. Se añade cianoborohidruro de sodio adicional (2 g, 32 mmol) y se agita la mezcla durante una hora adicional. Se concentra la mezcla de reacción a sequedad y se co-evapora con una porción DCM. Se disuelve el residuo en 1,4-dioxano (280 ml) y agua (75 ml) y se trata la solución resultante con carbonato de potasio (11,5 g) y di-terc-butildicarbonato (16,7 g). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se diluye la reacción con agua y solución saturada NaCl. Se extrae con tres porciones de EtOAc. Se combinan los extractos orgánicos y se secan sobre sulfato de sodio anhidro. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto
- 25 sobre una precolumna de 260 g y elución de la precolumna sobre una columna de 330 g con un gradiente de 0-100% EtOAc en DCM y posteriormente un segundo gradiente de 100% EtOAc a 7% de MeOH en DCM para dar el
- 30 compuesto del título 2,76 g (18%). MS (m/z): 408/410 (M+1/M+3).

Preparación 21

5-bromo-2-[(2-metoxietilamino)metil]tiofen-3-carboxilato de metilo

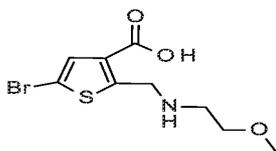
35



- 40 Se trata 5-bromo-2-[[terc-butoxicarbonil(2-metoxietil)amino]metil]tiofen-3-carboxilato, (2,75 g, 6,7 mmol) con cloruro de hidrógeno (4 M en 1,4-dioxano, 30 ml, 120 mmol) y se agita la mezcla durante 45 minutos. Se concentra la mezcla a sequedad. Se disuelve el residuo en ACN y se trata la mezcla con carbonato de potasio (1,5 g). Se calienta la mezcla a reflujo durante cuatro horas. Se concentra la mezcla a sequedad y se añade DCM. Se filtra la suspensión y se concentra el filtrado para dar el compuesto del título 2,05 g (99%) como un aceite oscuro. MS (m/z): 308/310 (M+1/M+3).

Preparación 22

Ácido 5-Bromo-2-[(2-metoxietilamino)metil]tiofen-3-carboxílico



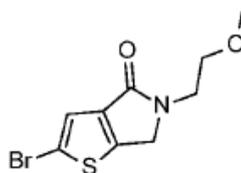
5

Se trata una solución de 5-bromo-2-[(2-metoxietilamino)metil]tiofen-3-carboxilato de metilo, (2,05 g, 6,7 mmol) en THF (75 ml) y agua (25 ml) con hidróxido de litio (558 mg, 13 mmol) y se agita la mezcla durante la noche. Se concentra la mezcla a sequedad cercana y se trata el residuo con ácido clorhídrico (4 M en 1,4-dioxano, 7 ml). Se agita la mezcla durante un minuto y se concentra a sequedad. Se disuelve el residuo en MeOH 5% en DCM y se seca la mezcla resultante con sulfato de magnesio. Se filtra la mezcla y se concentra el filtrado. Se seca el material en un horno de vacío a 50 °C durante la noche para dar el compuesto del título 1.96 g (100%). MS (m/z): 294/296 (M+1/M+3).

10

Preparación 23

2-Bromo-5-(2-metoxietil)-6H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



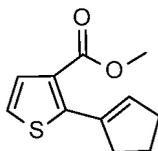
15

Se trata una solución de ácido 5-bromo-2-[(2-metoxietilamino)metil]tiofen-3-carboxílico, (1.96 g, 6,7 mmol) en DCM (10 ml) y N,N-diisopropiletilamina (10 ml) con DMF (5 ml). Se trata la solución resultante con hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (5,1 g, 13,3 mmol) y se agita la mezcla durante una hora. Se diluye la reacción con DCM y agua y se separan las capas. Se extrae la solución acuosa con dos porciones DCM. Se combinan los extractos orgánicos y se lavan con agua y solución saturada NaCl, se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 25 g y elución de la precolumna sobre una columna de 120 g con un gradiente de 20-80% de EtOAc en hexanos para dar el compuesto del título 0.920 g (50%). MS (m/z): 276/278 (M+1/M+3).

20

Preparación 24

2-(ciclopenten-1-il)tiofen-3-carboxilato de metilo



30

35

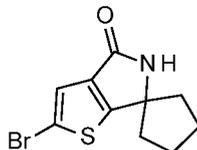
40

Se trata una solución de ácido 3-tiofencarboxílico (20 g, 156 mmol) en THF (500 ml) a -75 °C con n-butil litio (2,5 M en hexano, 150 ml, 375 mmol) gota a gota y se agita la mezcla de reacción durante una hora a -75 °C. Se añade ciclopentanona (17 ml, 93 mmol) gota a gota durante 10 minutos y se retira el baño de enfriamiento y la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente durante dos horas. Se enfría la mezcla a 0 °C y lentamente se añade ácido clorhídrico (4 M en 1,4-dioxano, 120 ml, 480 mmol) durante 30 minutos. Se lava la mezcla con agua y solución saturada NaCl. La solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se disuelve el residuo en MeOH (300 ml) y se añade ácido clorhídrico (4 M en 1,4-dioxano, 30 ml, 468 mmol). Se calienta la mezcla resultante a reflujo durante dos días. Se enfría la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. Se diluye el residuo con DCM (200 ml) y se lava con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (300 ml). Se extrae de nuevo la capa acuosa con DCM (2 x 150 ml) y se combinan las soluciones orgánicas. Se secan las soluciones orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran a presión reducida. Se purifica el residuo mediante la carga del material en un tapón de gel de sílice con DCM y elución del tapón con EtOAc 25% en hexanos para dar el compuesto del título 15 g (67%). MS (m/z): 209 (M+1). ¹H RMN(399,80 MHz, DMSO-d₆) δ 7,41-7,42 (d, J=5,2 Hz, 1H), 7,30-7,31 (d, J=5,2 Hz, 1H), 6,17-6,21 (q, J=2 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,58-2,71 (m, J=5,2 Hz, 2H), 2,50-2,93 m, J=5,2 Hz, 2H), 1,87-1,98 (m, 2H).

Preparación 25

2-Bromospiro[5H-tieno[2,3-c]pirrol-6,1'-ciclopentan]-4-ona

5



10

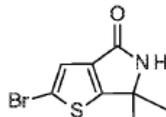
15

En un autoclave PARR®, se calienta una solución de 2-(ciclopenten-1-il)tiofen-3-carboxilato de metilo (12 g, 58 mmol) en amoníaco (7 N en MeOH, 250 ml) a 200 °C durante tres días. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se diluye con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (200 ml). Se extrae la mezcla con EtOAc (2 x 250 ml). Se combinan los extractos orgánicos y se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentra el filtrado a presión reducida. Se trata el residuo con ACN (250 ml) y N-bromosuccinimida (4,4 g, 25 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante cinco horas. Se diluye la mezcla de reacción con EtOAc (400 ml) y se lava la mezcla orgánica con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (300 ml), agua (3 x 300 ml), y solución saturada NaCl (200 ml). La solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice (330 g) eluyendo con un gradiente de hexanos a EtOAc. Se combinan las fracciones que contienen producto y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo nuevamente por cromatografía en columna de gel de sílice (330 g) eluyendo con un gradiente de hexanos a EtOAc para dar el compuesto del título 3,6 g (23%). MS (m/z): 272/274 (M+1/M+3).

20

Preparación 26

2-Bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



25

A un matraz de 20 l que contiene 6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (835 g, 4.99 mol) se añade ACN (10 l) y se enfría la solución a 10 °C. Se añade N-bromosuccinimida (444,4 g, 2,49 mol) en cuatro porciones iguales a la mezcla de reacción y se agita durante seis horas a 25 °C. Se concentra la mezcla de reacción a presión reducida y se suspende el compuesto resultante en agua y se extrae con EtOAc (3 x 4,1 l). Se lava la capa orgánica combinada con agua (3 x 4,1 l) y solución saturada NaCl (4,1 l), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, y se filtra. Se almacena la solución orgánica para la combinación con lotes adicionales.

30

Usando el mismo proceso anterior, se preparan dos lotes adicionales a partir de 650 g y 835 g 6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona respectivamente. Se combinan las soluciones orgánicas de las tres corridas y se concentra a presión reducida a 50 °C para producir 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona como material marrón pegajoso. Se suspende el producto resultante en dietil éter/hexano (2:1 v/v) y se filtra para proporcionar el compuesto del título 1542 g (45%). MS (m/z): 246/248 (M+1/M+3).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 26.

35

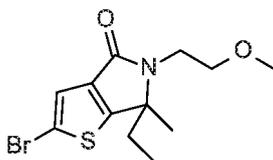
Tabla 4: Preparaciones 27-28

Prep. Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z):
27	2-Bromo-5-(2-metoxietil)-6-metil-6H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		290/292 (M+1/M+3)
28	2-Bromospiro[5H-tieno[2,3-c]pirrol-6,1'-ciclopropan]-4-ona		244/246 (M+1/M+3)

Preparación 29

2-Bromo-6-etil-5-(2-metoxietil)-6-metil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona

5

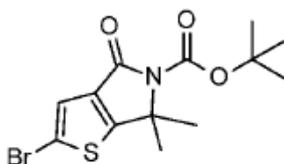


10 Se trata una solución de 2-bromo-5-(2-metoxietil)-6-metil-6H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (1,0 g, 3,4 mmol) en THF (20 ml) con hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 450 mg, 11 mmol). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añade yodoetano (1,4 ml, 17 mmol) gota a gota y se agita la mezcla durante 24 horas adicionales. Se enfría la reacción en un baño de agua helada y se inactiva con MeOH. Se añade EtOAc y se lava la solución orgánica resultante con solución saturada NaCl. Se extrae de nuevo la capa acuosa con EtOAc adicional. Se combinan los extractos orgánicos y se seca sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 40 g y elución de la precolumna sobre una columna de 320 g con 20% EtOAc en DCM para dar el compuesto del título 403 mg (37%). MS (m/z): 318/320 (M+1/M+3).

Preparación 30

2-bromo-6,6-dimetil-4-oxo-tieno[2,3-c]pirrol-5-carboxilato de terc-butilo

20

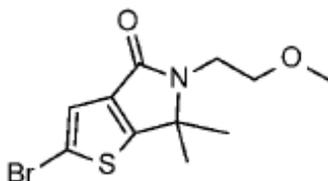


25 Se trata una solución de 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (25 g, 102 mmol), N,N-dimetilpiridin-4-amina (1,25 g, 10 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (24 ml, 138 mmol) en ACN (481 ml) con di-terc-butildicarbonato (35 g, 162 mmol). Se agita la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se añade N,N-dimetilpiridin-4-amina (560 mg), N,N-diisopropiletilamina (12 ml) y di-terc-butildicarbonato (12 g) y se continúa agitando durante cuatro horas adicionales. Se filtra la mezcla de reacción a través de un lecho de gel de sílice y se eluye el lecho con DCM 20% en hexano. Se concentra el filtrado a sequedad. Se filtra la mezcla de reacción a través de un lecho de gel de sílice adicional y se eluye el lecho con DCM 5% en hexanos. Se concentra el filtrado a sequedad para dar el compuesto del título 31 g (88%) como un aceite anaranjado. ¹H RMN (400,15 MHz, DMSO-d₆) δ 7,41 (s, 1H),

1,69 (s, 6H), 1,48 (s, 9H).

Preparación 31

2-Bromo-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



5 Procedimiento de síntesis 1:

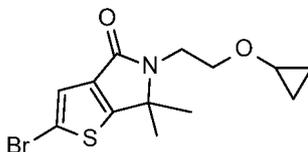
En un matraz bajo una atmósfera de nitrógeno, se disuelve 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (25 g, 102 mmol) y bromuro de 2-metoxietilo (12 ml, 127 mmol) en DMF (250 ml) y se enfría la mezcla de reacción a 0 °C. Se añade hidruro de sodio (60% en peso en aceite mineral, 4,469 g, 112 mmol) y la reacción se deja llegar a temperatura ambiente durante la noche. A temperatura ambiente, se añade bromuro de 2-metoxietilo adicional (2 ml, 21 mmol) seguido por hidruro de sodio (60% en peso en aceite mineral, 1,25 g, 31 mmol). Se agita la reacción durante 2,5 horas y se diluye con agua. Se extrae la solución resultante con tres porciones de EtOAc. Se lavan los extractos orgánicos combinados con una solución saturada 1:1 de NaCl/agua y posteriormente solución saturada NaCl. La solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. Se seca el material bajo vacío durante dos días. Se purifica el residuo por cromatografía en gel de sílice (1 kg) eluyendo con un gradiente de 30-50% EtOAc en hexano para proporcionar el compuesto del título 25,78 g (83%) como un sólido amarillo claro. MS (m/z): 304/306 (M+1/M+3).

Procedimiento de síntesis 2:

Se trata una solución de 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (150 g, 610 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (1,5 l) con hexametildisililazida de sodio (2 M en THF, 405 ml, 810 mmol) durante 30 minutos. Se añade bromuro de 2-metoxietilo (190 g, 1372 mmol) durante 30 minutos. Se calienta la reacción a reflujo durante 18 horas. Se añade bromuro de 2-metoxietilo adicional (19 g, 140 mmol) y se continúa el reflujo durante seis horas adicionales. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se diluye con EtOAc (2,5 l) y agua (2,5 l). Se separan las capas y se extrae de nuevo la solución acuosa con EtOAc (2 x 1,5 l). Se combinan los extractos orgánicos y se lavan con solución saturada NaCl (2 x 2 l). La solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en gel de sílice (700 g) eluyendo con un gradiente de 10 a 25% EtOAc en heptanos para producir 2-bromo-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona. Se tritura el sólido con hexanos (500 ml) a temperatura ambiente durante 15 minutos, se filtran y secan los sólidos para dar el compuesto del título 126 g (68%) como un sólido blanco. ¹H RMN(300 MHz, CDCl₃) δ 7,18 (s, 1H), 3,56 (m, 4H), 3,35 (s, 3H), 1,52 (s, 6H).

30 Preparación 32

2-Bromo-5-[2-(ciclopropoxi)etil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



Se trata una solución de 2-bromo-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (20 g, 81 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (163 ml) con hexametildisililazida de sodio (1 M en THF, 100 ml, 100 mmol) durante 30 minutos. Se añade 2-cloroetoxiciclopropano (24,5 g, 203 mmol) durante 30 minutos. Se calienta la reacción a reflujo durante 18 horas. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se diluye con EtOAc (500 ml) y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (300 ml). Se separan las capas y se extrae de nuevo la solución acuosa con EtOAc (200 ml). Se combinan los extractos orgánicos y se lavan con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (300 ml) y solución saturada NaCl (300 ml). La solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en gel de sílice (330 g) eluyendo con un gradiente de 0-5% de acetona en DCM para producir el compuesto del título 22 g (82%). MS (m/z): 330/332 (M+1/M+3).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 32.

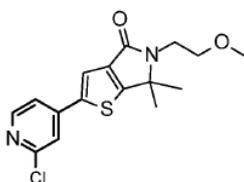
Tabla 5: Preparaciones 34-37

Prep. Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z):
33	2-Bromo-5-[2-[terc-butil(dimetil)silil]oxietil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		404/406 (M+1/M+3)
34	2'-Bromo-5'-(2-metoxietil)spiro[ciclopropano-1,6'-tieno[2,3-c]pirrol]-4'-ona		302/304 (M+1/M+3)
35	2'-Bromo-5'-(2-metoxietil)spiro[ciclopentano-1,6'-tieno[2,3-c]pirrol]-4'-ona		330/332 (M+1/M+3)
36	2-Bromo-5-(2-metoxipropil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		318/320 (M+1/M+3)

Preparación 37

2-(2-Cloro-4-piridil)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona

5

**Procedimiento de síntesis 1:**

Se combina 2-bromo-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (24,78 g, 81,46 mmol), ácido 2-cloro-piridin-4-borónico (14,1 g, 89,60 mmol), carbonato de potasio (33,8 g, 244,37 mmol), 1,4-dioxano (750 ml) y agua (150 ml) en un recipiente de reacción sellable y se desgasifica con nitrógeno durante 5 minutos. Se añade tetrakis(trifenilfosfina)paladio (7,060 g, 6,11 mmol) y se burbujea nitrógeno a través de la mezcla de reacción durante varios minutos más. Se calienta la reacción sellada a 80 °C durante la noche. Se añade ácido 2-cloropiridina-4-borónico adicional (2 g, 12,7 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (1 g, 0,9 mmol) y se mantiene el calentamiento durante 6,5 horas adicionales. Se añade ácido 2-cloropiridina-4-borónico adicional (2,5 g, 15,9 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (1 g, 0,9 mmol) y se mantiene el calentamiento durante 1,5 horas adicionales. Se añade ácido 2-cloropiridina-4-borónico adicional (2 g, 12,7 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0,4 g, 0,3 mmol) y se mantiene el calentamiento durante la noche. Se añade ácido 2-cloropiridina-4-borónico adicional (2 g, 12,7 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0,5 g, 0,5 mmol) y se mantiene el calentamiento durante 2 horas adicionales. Se enfría la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla de reacción con DCM y se lava con agua. Se extrae de nuevo la solución acuosa con dos porciones DCM. Se combinan las soluciones orgánicas y se lavan con solución saturada NaCl, se secan sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran y se concentran a presión reducida.

20

Se purifica por cromatografía en gel de sílice (1 kg) eluyendo con un gradiente de 30-70% EtOAc en hexano para producir 2-(2-cloro-4-piridil)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona 13,1 g (48%). MS (m/z): 337 (M+1). Se lava la columna de gel de sílice con EtOAc para proporcionar material adicional. Se tritura el material con metil terc-butil éter y se filtra para proporcionar el compuesto del título 7.9 g (29%). MS (m/z): 337 (M+1).

5 Procedimiento de síntesis 2:

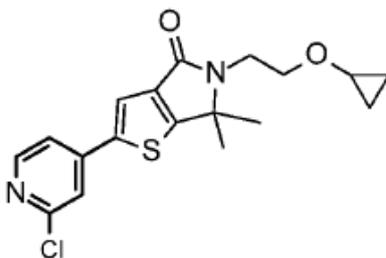
Se trata una solución de 2-bromo-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (200 g, 647 mmol) y ácido 2-cloropiridina-4-borónico (143 g, 906 mmol) en EtOH (2 l) con carbonato de sodio (2 M en agua, 970 ml, 1942 mmol). Se burbujea la mezcla con nitrógeno durante 15 minutos. Se añade trans-dicloro-bis-trifenilfosfina paladio (II) (45 g, 64,7 mmol). Se burbujea la mezcla con nitrógeno durante 15 minutos adicionales. Se calienta la mezcla de reacción a reflujo durante 22 horas. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. Se suspende el sólido resultante con agua (1 l) a temperatura ambiente durante 15 minutos y se filtra. Se suspende sólido resultante con metil terc-butil éter (2 l) durante 15 minutos y se filtra. Se suspende el sólido resultante con metil terc-butil éter (1 l) durante 15 minutos y se filtra. Se disuelve el sólido en DCM (1 l) y se absorbe la mezcla sobre gel de sílice (200 g). Se eluye la mezcla a través de una columna de gel de sílice (1,5 kg) eluyendo con un gradiente de 50-80% EtOAc en heptanos para proporcionar 2-(2-cloro-4-piridil)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona. Se tritura el sólido resultante en metil terc-butil éter (250 ml) durante 15 minutos y se filtra para dar el compuesto del título 124,5 g (57%). ¹H RMN(300 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (m, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,47 (m, 1H), 7,36 (m, 1H), 3,61 (m, 4H), 3,37 (s, 3H), 1,59 (s, 6H). MS (m/z): 337 (M+1).

Procedimiento de síntesis 3:

Se cargan tres viales de microondas separados, cada uno con 2-bromo-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (1 g, 3,3 mmol), ácido 2-cloropiridina-4-borónico (580 mg, 3,62 mmol), tris(dibencilidena)acetona) dipaladio(0) (152 mg, 0,16 mmol), tetrafluoroborato de triciclohexilfosfina (363 mg, 0,99 mmol), N-hidrato de fosfato de potasio tribásico (3,56 g, 16,8 mmol), agua (7,6 ml) y 1,4-dioxano (8 ml). Se calienta los viales en un reactor de microondas a 120 °C durante 90 minutos. Se enfrían los viales a temperatura ambiente y se combinan los contenidos de los viales. Se diluye la mezcla resultante con EtOAc (30 ml) y se añade sulfato de sodio anhidro. Se agita la mezcla durante 15 minutos y se filtra la mezcla a través de CELITE®. Se lavan los sólidos con EtOAc y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del residuo sobre una precolumna de 25 g y elución de la precolumna sobre una columna de 120 g de gel de sílice con un gradiente de 5-25% de acetona en hexanos para dar el compuesto del título 2,55 g (77%). MS (m/z): 337 (M+1).

Preparación 38

2-(2-Cloro-4-piridil)-5-[2-(ciclopropoxi)etil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



Se trata una solución de 2-bromo-5-[2-(ciclopropoxi)etil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (15,8 g, 48 mmol) y ácido 2-cloropiridina-4-borónico (10,5 g, 67 mmol) en EtOH (2 l) con carbonato de sodio (2 M en agua, 50 ml, 100 mmol). Se burbujea la mezcla con nitrógeno durante 15 minutos. Se añade trans-dicloro-bis-trifenilfosfina paladio (II) (1,0 g, 1,4 mmol). Se burbujea la mezcla con nitrógeno durante 15 minutos adicionales. Se calienta la mezcla de reacción a 60 °C durante cinco horas. Se añade ácido 2-cloropiridina-4-borónico adicional (2,2 g) y se calienta la reacción a 80 °C durante dos horas adicionales. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se diluye con EtOAc (200 ml). Se lava la solución orgánica con solución saturada NaCl. Se concentra la solución orgánica a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en gel de sílice (220 g) eluyendo con un gradiente de 0-10% de acetona en DCM para producir el compuesto del título 12.9 g (74%). MS (m/z): 363 (M+1).

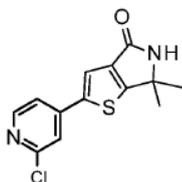
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 38.

Tabla 6: Preparaciones 40-46

Prep. Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z): (M+1)
39	5-[2-(<i>tert</i> -Butil(dimetil)silil)oxietil]-2-(2-cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		437 (M+1)
40	2-(2-cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-4-oxo-tieno[2,3-c]pirrol-5-carboxilato de <i>tert</i> -Butilo		379 (M+1)
41	Cloro-42-(2-cloro-4-piridil)-6-etil-5-(2-metoxietil)-6-metil-tieno [2,3-c]pirrol-4-ona		351 (M+1)
42	2'-(2-Cloro-4-piridil)-5'-(2-metoxietil)spiro[ciclopropane-1,6'-tieno[2,3-c]pirrol]-4'-ona		335 (M+1)
43	2'-(2-Cloro-4-piridil)-5'-(2-metoxietil)spiro[ciclopentano-1,6'-tieno[2,3-c]pirrol]-4'-ona		363 (M+1)
44	2-(2-cloro-4-piridil)-5-(2-metoxipropil)-6,6-dimetil-tieno [2,3-c]pirrol-4-ona		351 (M+1)
45	2-(2-Cloro-4-piridil)-5-(2-metoxietil)-6-metil-6H-tieno [2,3-c]pirrol-4-ona		323 (M+1)

Preparación 46

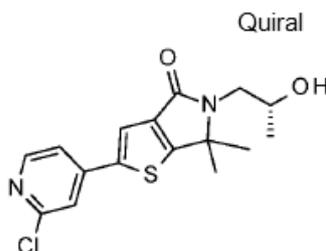
2-(2-Cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



- 5 Se trata una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-4-oxo-tieno[2,3-c]pirrol-5-carboxilato de *tert*-butilo (7,38 g, 19,5 mmol) en DCM (56 ml) con ácido trifluoroacético (65 ml, 859 mmol) y se agita la mezcla durante dos horas. Se concentra la mezcla a sequedad. Se añade DCM y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se separan las capas. Se extrae de nuevo la capa acuosa con DCM adicional. Se combinan los extractos orgánicos y se secan sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por
- 10 cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una columna de carga de 65 g y elución de la columna sobre una columna de 220 g con un gradiente de 0-70% ACN en DCM para dar el compuesto del título 2 g (37%). MS (m/z): 279 (M+1).

Preparación 47

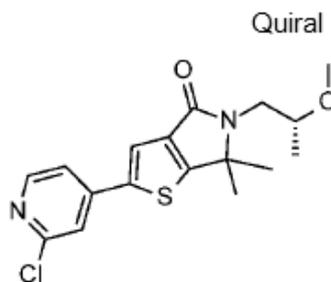
2-(2-Cloro-4-piridil)-5-[(2R)-2-hidroxiopropil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



- 15 Se calienta una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (450 mg, 1,6 mmol), óxido de (R)-(+)-propileno (1,13 ml, 16,1 mmol), y trietilamina (1,13 ml, 8,1 mmol) en DMF (2,78 ml) en un tubo sellado a 120 °C durante la noche. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se diluye la mezcla con EtOAc. Se lava la solución orgánica con tres porciones de solución acuosa de cloruro de litio 5%. Se combinan las soluciones acuosas y se extrae de nuevo con EtOAc. Se combinan los extractos orgánicos y se secan sobre sulfato de sodio.
- 20 Se filtra la mezcla y se concentra el filtrado a sequedad. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice sobre una columna de 24 g con un gradiente de 70-100% EtOAc en DCM para dar el compuesto del título 395 mg (73%). MS (m/z): 337 (M+1).

Preparación 48

2-(2-Cloro-4-piridil)-5-(2R)-2-metoxipropil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona

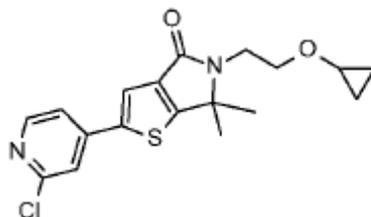


- 25 Se enfría una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-5-[(2R)-2-hidroxiopropil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (415 mg, 1,2 mmol) en THF (8 ml) en un baño de agua helada. Se trata la mezcla con hidruro de sodio (60% en peso de suspensión en aceite mineral, 79 mg, 1,3 mmol) y se agita a esta temperatura durante 15 minutos. Se trata la mezcla con yoduro de metilo (307 ml, 4,9 mmol), se retira el baño de agua helada y se agita la mezcla durante la noche. Se concentra la mezcla a presión reducida a sequedad. Se trata el residuo con DCM y se filtra la mezcla para retirar los sólidos. Se lavan los sólidos con DCM adicional y se concentra el filtrado a presión reducida a
- 30

sequedad. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice sobre una columna de 24 g con un gradiente de 30-70% EtOAc en hexano para dar el compuesto del título 379 mg (88%). MS (m/z): 351 (M+1).

Preparación 49

2-(2-Cloro-4-piridil)-5-[2-(ciclopropoxi)etil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



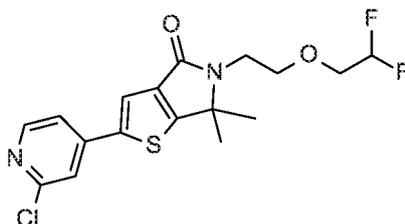
5

Se enfría una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (500 mg, 1,8 mmol) en DMF (18 ml) en un baño de agua helada. Se trata la mezcla con hidruro de sodio (60% en peso de suspensión en aceite mineral, 108 mg, 2,7 mmol) y se agita a esta temperatura durante 15 minutos. Se trata la mezcla con 2-yodoetoxiciclopropano (761 mg, 3,6 mmol), se retira el baño de agua helada y se agita la mezcla durante cuatro horas. Se inactiva la reacción con EtOAc y solución saturada NaCl. Se lava la solución orgánica con varias porciones de solución saturada de NaCl y posteriormente se seca sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtra la solución y se lava el sólido con EtOAc. Se concentra el filtrado a presión reducida para dar el compuesto del título 651 mg (99%). MS (m/z): 363 (M+1).

10

Preparación 50

15 2-(2-Cloro-4-piridil)-5-[2-(2,2-difluoroeto)etil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



20

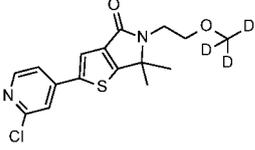
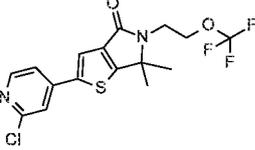
Se enfría una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-5H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (500 mg, 1,8 mmol) en DMF (18 ml) en un baño de agua helada. Se trata la mezcla con hidruro de sodio (60% en peso de suspensión en aceite mineral, 108 mg, 2,7 mmol) y se agita a esta temperatura durante 15 minutos. Se trata la mezcla con 2-(2-bromoeto)1,1-difluoroetano (678 mg, 3,6 mmol), se retira el baño de agua helada y se agita la mezcla durante la noche. Se inactiva la reacción con agua y se recolecta el precipitado resultante. Se lava el sólido con agua y dietil éter para dar el compuesto del título 625 mg (90%). MS (m/z): 387 (M+1).

25

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 50.

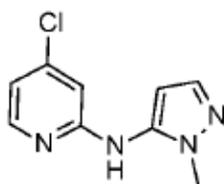
Tabla 7: Preparaciones 51-53

Prep. Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z): (M+1)
51	2-(2-Cloro-4-piridil)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		337 (M+1)

Prep. Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z): (M+1)
52	2-(2-Cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-5-[2-(trideuteriometoxi)etil]tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		340 (M+1)
53	2-(2-Cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-5-[2-(trifluorometoxi)etil]tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		391 (M+1)

Preparación 54

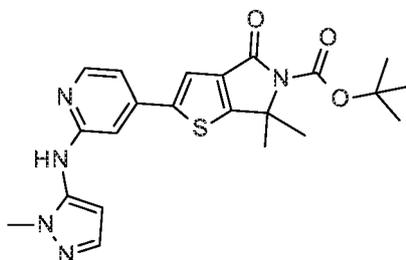
4-Cloro-N-(2-metilpirazol-3-il)piridin-2-amina



- 5 Se calienta una solución de 2,4-dicloropiridina (15,3 g, 103 mmol), 1-metil-5-aminopirazol (11 g, 113 mmol), carbonato de cesio (6 g, 10 mmol) y tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0) (4,7 g, 5 mmol) en 1,4-dioxano (750 ml) en un recipiente sellado a 75 °C durante la noche. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se diluye con agua (1,5 l). Se extrae la mezcla con tres porciones de DCM. Se filtra la capa acuosa para eliminar los sólidos y se extrae el filtrado con dos porciones EtOAc. Se combinan todos los extractos orgánicos, se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se concentra el filtrado. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 260 g y elución de la precolumna sobre una columna de 750 g con un gradiente de 1-5% MeOH en DCM para dar el compuesto del título 16,8 g (78%). MS (m/z): 209 (M+1).

Preparación 55

- 15 6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]-4-piridil]-4-oxo-tieno[2,3-c]pirrol-5-carboxilato de *tert*-butilo

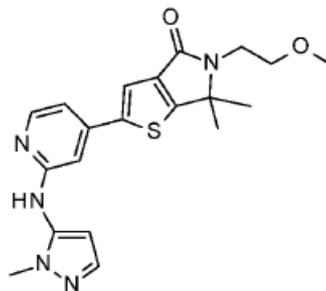


- 20 Se calienta una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-6,6-dimetil-4-oxo-tieno[2,3-c]pirrol-5-carboxilato de *tert*-butilo (400 mg, 1,06 mmol), 1-metil-5-aminopirazol (308 mg, 3,17 mmol), carbonato de cesio (1,03 g, 3,17 mmol), acetato de paladio(II) (9 mg, 0,04 mmol) y 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (37 mg, 0,06 mmol) en 1,4-dioxano (8 ml) en un recipiente sellado a 95 °C durante 16 horas. Se añade 1-metil-5-aminopirazol (103 mg, 1,06 mmol), carbonato de cesio (334 mg, 1,06 mmol), acetato de paladio (II) (9 mg, 0,04 mmol) y 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (37 mg, 0,06 mmol). Se calienta la mezcla a 95 °C durante la noche. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se diluye con agua y DCM. Después de separar las capas, se extrae la capa acuosa con MeOH 10% en DCM. Se combinan los extractos orgánicos y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo

por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una columna de carga de 5 g y elución de la columna sobre una columna de 40 g con un gradiente de 5-15% MeOH en DCM para dar el compuesto del título 75 mg (16%). MS (m/z): 440 (M+1).

Ejemplo 1

- 5 5-(2-Metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



Procedimiento de síntesis 1:

En dos recipientes a presión de vidrio con tapa de rosca, se dividen y combinan las siguientes cantidades en dos porciones iguales 2-(2-cloro-4-piridil)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (13 g, 38,59 mmol), 1-metil-5-aminopirazol (11,245 g, 115,78 mmol), carbonato de cesio (37,724 g, 115,78 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (2,010 g, 3,47 mmol), acetato de paladio(II) (520 mg, 2,32 mmol) y 1,4-dioxano (350 ml). Se sella cada recipiente y se calienta a 110 °C durante la noche. Se diluye la mezcla de reacción con 10% MeOH en DCM (2 l) y se lava la solución resultante con solución saturada NaCl. Se extrae de nuevo la solución acuosa con DCM y se combinan las soluciones orgánicas. Se secan las soluciones combinadas sobre una mezcla de sulfato de sodio anhidro y sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica por cromatografía en gel de sílice mediante la carga del residuo sobre una columna de carga de 260 g con DCM y posteriormente se eluye la columna carga sobre una columna de gel de sílice de 750 g con un gradiente de 60-100% de MeOH 10% en EtOAc en hexano para producir el compuesto del título 8,4 g (55%). MS (m/z): 398 (M+1).

Procedimiento de síntesis 2:

Se burbujea una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (100 g, 298 mmol), 1-metil-5-aminopirazol (43 g, 446 mmol), y terc-butóxido de sodio (57 g, 595 mmol) en tolueno (1,5 l) con nitrógeno durante 15 minutos. Se trata la mezcla resultante con (R)-1-[(SP)-2-(diclohexilfosfino)ferrocenil]etil-di-terc-butilfosfina (1,61 g, 3 mmol) y bis(tri-*o*-tolilfosfino)paladio(0) (2,12 g, 3 mmol). Se burbujea la mezcla con nitrógeno durante 15 minutos adicionales y se somete a reflujo durante tres horas. Se enfría la reacción a 10 °C y se recolecta el sólido resultante por filtración. Se disuelve el sólido en DCM (4 l) y se lava con solución acuosa semisaturada de bicarbonato de sodio (2 l). La solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se suspende sólido con dietil éter (500 ml) for 30 minutos y posteriormente filter. Se disuelve el sólido en DCM (1 l) y se absorbe sobre el gel de sílice (300 g). Se eluye la mezcla sobre una columna de gel de sílice (600 g) con MeOH 5% en DCM para proporcionar 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona 107 g (82%). Varios lotes del producto se producen usando el procedimiento anterior con un lote que difiere en la base (carbonato de potasio) usada. Se disuelven los lotes combinados de 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (254 g) en DCM (2,5 l). Se trata la solución con SiliaMetS® Thiol (75 g, 1,28 mmol/g, 40-63 micrómetros) y se agita la reacción durante 18 horas. Se filtra la mezcla para eliminar los sólidos y se trata el filtrado con una segunda porción de SiliaMetS® Tiol (75 g, 1,28 mmol/g, 40-63 micrómetros). Se agita la mezcla durante 15 horas adicionales. Se filtra para eliminar el sólido y se concentra el filtrado a presión reducida. Se tritura el sólido resultante en tolueno (600 ml) a 40 °C durante 30 minutos. Se recolecta el sólido por filtración al vacío. Se tritura el sólido resultante en tolueno (300 ml) a 40 °C durante 30 minutos. Se recolecta el sólido por filtración al vacío y se seca al vacío a 30 °C durante 14 horas para dar el compuesto del título 223 g. ¹H RMN(300 MHz, CDCl₃) δ 8,15 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,02 (brs, 1H), 6,95 (m, 1H), 6,63 (d, 1H), 6,19 (d, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,60 (m, 4H), 3,36 (s, 3H), 1,56 (s, 6H). MS (m/z): 398 (M+1).

Ejemplo 1, Forma cristalina 1

5-(2-Metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (Forma cristalina 1)

En un matraz, la suspensión 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (15,31 g) en MeOH y EtOAc con una mínima cantidad de DCM y se calienta en un evaporador rotatorio hasta que el material se disuelva con la menor cantidad de disolvente posible. Se concentra la

solución a sequedad. Se diluye el sólido resultante con EtOAc y una pequeña cantidad de MeOH hasta que el precipitado sólido ligeramente coloreado fluya libremente. Se diluye la solución con éter y hexanos y se centrifuga en un evaporador rotatorio. Se tritura la suspensión en un sonicador y posteriormente se deja decantar la solución. Se recolecta el sólido por filtración al vacío y se lava con éter y hexanos. Se seca el sólido en un horno al vacío para proporcionar el compuesto del título 14,1 g.

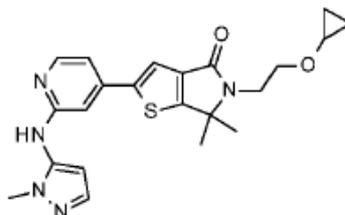
Ejemplo 1, Forma cristalina 2

5-(2-Metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (Forma cristalina 2)

10 Se calienta 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (223 g) en EtOH (200 prueba, 1200 ml) y agua (400 ml) a 60 °C hasta que persista una solución transparente. Se enfría la solución a 45-50 °C y se diluye la solución con agua (1600 ml) durante una hora. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se recolecta el sólido por filtración al vacío. Se seca el sólido resultante a 35 °C bajo vacío durante 18 horas para proporcionar el compuesto del título 209 g.

15 Ejemplo 2

5-[2-(Ciclopropoxi)etil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



Procedimiento de síntesis 1:

20 En recipientes de presión de vidrio, se combina 2-(2-cloro-4-piridil)-5-[2-(ciclopropoxi)etil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (350 mg, 0,96 mmol), 1-metil-5-aminopirazol (187 mg, 1,9 mmol), carbonato de cesio (943 mg, 2,9 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (84 mg, 0,14 mmol) y 1,4-dioxano (8 ml). Se desgasifica la mezcla durante minutos y se añade acetato de paladio(II) (22 mg, 0,1 mmol). Se sella el recipiente y se calienta a 90 °C durante la noche. Se filtra la mezcla a través de CELITE® y se lava a con EtOAc y DCM. Se concentra el filtrado.

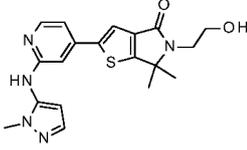
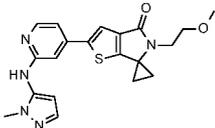
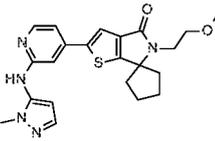
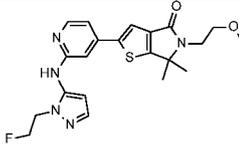
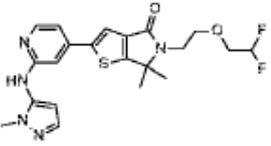
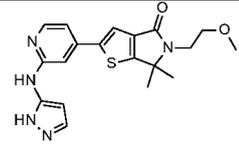
25 Se purifica el residuo por cromatografía de fase inversa (100 g de Columna de fase inversa C18 de alto rendimiento REDISEP RF GOLD®, 5-100% de ácido fórmico/ACN en ácido fórmico/agua, gradiente de 30 volumen de columna). Se concentran las fracciones apropiadas a un volumen mínimo y se divide la solución acuosa resultante entre DCM y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se separan las capas y la solución orgánica se seca sobre sulfato de sodio. Se filtra la solución y se concentra el filtrado a presión reducida. Se seca al vacío el residuo a 50 °C durante una hora para dar el compuesto del título 247 mg (60%). MS (m/z): 424 (M+1).

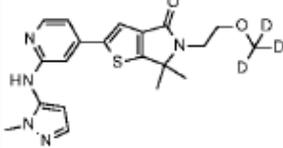
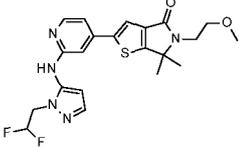
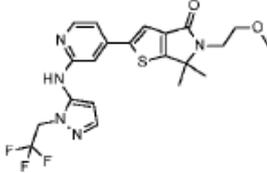
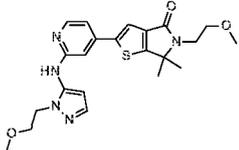
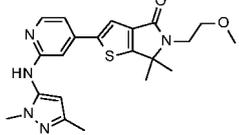
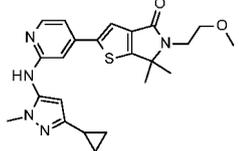
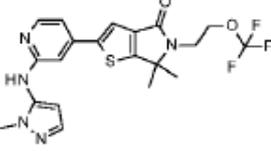
Procedimiento de síntesis 2:

35 Se burbujea una solución de 2-(2-cloro-4-piridil)-5-[2-(ciclopropoxi)etil]-6,6-dimetil-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (13,9 g, 121 mmol), 1-metil-5-aminopirazol (11 g, 113 mmol), y terc-butóxido de sodio (6,5 g, 68 mmol) en tolueno (150 ml) con nitrógeno durante 15 minutos. Se trata la mezcla resultante con (R)-1-[(SP)-2-(diciclohexilfosfino)ferrocenil]etilid-terc-butilfosfina (200 mg, 0,36 mmol) y bis(tri-*o*-tolilfosfino)paladio(0) (250 mg, 0,35 mmol). Se calienta la mezcla de reacción a reflujo durante una hora. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se diluye con EtOAc (500 ml). Se lava la solución orgánica con agua (300 ml). Se separa y concentra la fase orgánica a presión reducida. Se disuelve el residuo en DCM (150 ml) y se trata la solución con SELIAMETS® Tiol (40 g, 1,28 mmol/g, 40-63 micrómetros) y se agita la mezcla durante cuatro horas. Se filtra para eliminar el sólido y se concentra el filtrado a presión reducida para dar el compuesto del título 11,1 g (86%). MS (m/z): 424 (M+1).

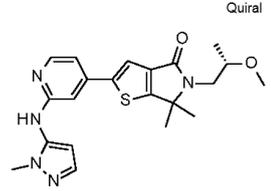
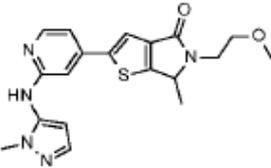
40 Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por los procedimientos del Ejemplo 2. Se indican las alteraciones en el catalizador, ligando y/o base.

Tabla 8: Ejemplos 3-24

Ejemplo No.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z):	Comentarios
3	5-(2-Hidroxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino] piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		384 (M+1)	Bis(tri- <i>o</i> -tolilfosfin) paladio(0), (R)-1-[(S)-2-(Diciclohexilfosfino)ferrocenil]etilidi- <i>tert</i> -butilfosfina, Terc-butóxido de sodio
4	5'-(2-Metoxietil)-2'-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il} spiro[ciclopropano-1,6'-tieno[2,3-c]pirrol]-4' (5'H)-ona		396 (M+1)	Carbonato de cesio
5	5'-(2-Metoxietil)-2'-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il} spiro[ciclopentano-1,6'-tieno[2,3-c]pirrol]-4' (5'H)-ona		424 (M+1)	Carbonato de cesio
6	2-(2-[(1-(2-Fluoroetil)-1H-pirazol-5-il)amino] piridin-4-il)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		430 (M+1)	Tris(dibencilidenacetona) dipaladio(0), Carbonato de cesio
7	5-[2-(2,2-Difluoroetoxi)etil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno [2,3-c]pirrol-4-ona		448 (M+1)	Cloro[2-(di- <i>tert</i> -butilfosfino)-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil] [aminoetil]fenil] paladio), 2-(Di- <i>tert</i> -butilfosfino)-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil] [2-(2-aminoetil)fenil], <i>tert</i> -butóxido de potasio
8	5-(2-Metoxietil)-6,6-dimetil-2-[2-(1H-pirazol-5-il)amino] piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		384 (M+1)	Tris(dibencilidenacetona) dipaladio(0), Carbonato de cesio

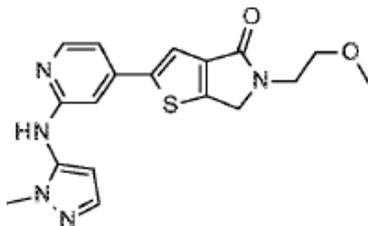
Ejemplo No.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z):	Comentarios
9	6,6-Dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il) amino]-4-piridil]-5-[2-(trideuteriometoxi)etil]tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		401 (M+1)	Carbonato de cesio
10	2-(2-[[1-(2,2-Difluoroetil)-1H-pirazol-5-il]amino]piridin-4-il)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		448 (M+1)	Carbonato de cesio
11	5-(2-Metoxietil)-6,6-dimetil-2-(2-[[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-5-il]amino]piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno [2,3-c]pirrol-4-ona		466 (M+1)	Carbonato de cesio
12	5-(2-Metoxietil)-2-(2-[[1-(2-metoxietil)-1H-pirazol-5-il]amino]piridin-4-il)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		442 (M+1)	Carbonato de cesio
13	2-{2-[(1,3-Dimetil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		412 (M+1)	Carbonato de cesio
14	2-[2-[(3-Ciclopropilo-1-metil-1H-pirazol-5-il) amino]-il]-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		438 (M+1)	Carbonato de cesio
15	6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il) amino]piridin-4-il}-5-[2-(trifluorometoxi)eth il]-5,6-dihidro-4H-tieno [2,3-c]pirrol-4-ona		452 (M+1)	Carbonato de cesio

Ejemplo No.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z):	Comentarios
16	5-(2-Metoxietil)-6,6-dimetil-2-(2-[[1-(propan-2-il)-1H-pirazol-5-il]amino] piridin-4-il)-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		426 (M+1)	Carbonato de cesio
17	2-(2-[[1-(difluorometil)-1H-pirazol-5-il]amino] piridin-4-il)-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		434 (M+1)	Carbonato de cesio
18	2-{2-[[1-Etil-1H-pirazol-5-il]amino] piridin-4-il}-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		412 (M+1)	Cloro[2-(di-terc-butilfosfino)-2',4',6'-triiisopropil-1,1'-bifenil] [2-(2-aminoetil)fenil] paladio(II), 2-(Di-terc-butilfosfino)-2',4',6'-triiisopropil-1,1'-bifenil] [2-(2-aminoetil)fenil), terc-butóxido de potasio
19	2-{2-[[1-Ciclopropilo-1H-pirazol-5-il]amino] piridin-4-il}-5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		424 (M+1)	Carbonato de cesio
20	6-Etil-5-(2-metoxietil)-6-metil-2-{2-[[1-metil-1H-pirazol-5-il]amino] piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		412 (M+1)	Carbonato de cesio
21	5-(2-Metoxipropil)-6,6-dimetil-2-{2-[[1-metil-1H-pirazol-5-il]amino] piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		412 (M+1)	Carbonato de cesio
22	5-[(2R)-2-Metoxipropil]-6,6-dimetil-2-{2-[[1-metil-1H-pirazol-5-il]amino] piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		412 (M+1)	Cloro[2-(di-terc-butilfosfino)-2',4',6'-triiisopropil-1,1'-bifenil] [2-(2-aminoetil)fenil] paladio(II),2-(Di-terc-butilfosfino)-2',4',6'-triiisopropil-1,1'-bifenil] [2-(2-aminoetil)fenil), terc-butóxido de potasio

Ejemplo No.	Nombre del compuesto	Estructura	MS (m/z):	Comentarios
23	5-[(2S)-2-Metoxipropil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		412 (M+1)	Cloro[2-(di-terc-butilfosfino)-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil][2-(2-aminoetil)fenil] paladio(II), 2-(Di-terc-butilfosfino)-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil][2-(2-aminoetil)fenil], terc-butóxido de potasio
24	5-(2-Metoxietil)-6-metil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona		384 (M+1)	Carbonato de cesio

Ejemplo 25

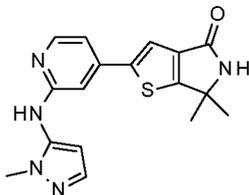
5-(2-Metoxietil)-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



- 5 Se burbujea una solución de 4-cloro-N-(2-metilpirazol-3-il)piridin-2-amina (2,0 g, 9,6 mmol), bis(pinacolato)diboro (4,9 g, 19 mmol), acetato de potasio (3,3 g, 34 mmol), 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo (228 mg, 8 mmol) y cloro(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) (226 mg, 0,29 mmol) en EtOH absoluto (170 ml) con nitrógeno durante dos minutos. Se calienta la mezcla a 60 °C durante 2,5 horas. Se aumenta al calor a 75 °C y se calienta durante la noche. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se usa el producto como una solución. Se combina una porción de esta solución (40 ml) con 2-bromo-5-(2-metoxietil)-6H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (300 mg, 1,1 mmol), N-hidrato de fosfato tribásico de potasio (692 mg, 3,26 mmol) en EtOH adicional (24 ml). Se calienta la reacción a 75 °C durante una hora. Se trata la mezcla con agua (9 ml) y se calienta la reacción a 75 °C durante la noche. Se añade tetrakis(trifenilfosfino)paladio(0) (200 mg) y se continúa calentando durante seis horas. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se diluye la reacción con DCM. Se lava la solución orgánica con solución saturada NaCl. Se extrae de nuevo la solución acuosa con DCM adicional. Se combinan los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de sodio. Se filtra la mezcla y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre a 25 g de columna de carga y elución de la columna en una columna de 40 g con un gradiente de 0-5% MeOH en DCM para proporcionar el compuesto del título 90 mg (23%). MS (m/z): 370 (M+1).

Ejemplo 26

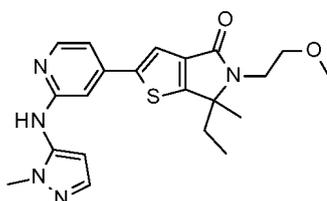
- 20 6,6-Dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona



Se trata una solución de 6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]-4-piridil]-4-oxo-tieno[2,3-c]pirrol-5-carboxilato de *tert*-butilo (120 mg, 0,27 mmol) en DCM (10 ml) con ácido trifluoroacético (5 ml). Se agita la mezcla resultante durante dos horas. Se concentra la reacción a presión reducida y se disuelve el residuo en DCM. Se lava la solución orgánica con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se separan las capas y se extrae de nuevo la capa acuosa con MeOH 10% en DCM. Se combinan las soluciones orgánicas y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 5 g y elución de la precolumna sobre una columna de 40 g con un gradiente de 4-10% MeOH en EtOAc. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice mediante la carga del producto sobre una precolumna de 25 g y elución de la precolumna sobre una columna de 40 g con un gradiente de 0-10% de MeOH en EtOAc. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentra a presión reducida para dar el compuesto del título 87 mg (94%). MS (m/z): 340 (M+1).

Ejemplo 27

6-Etil-5-(2-metoxietil)-6-metil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirro-4-ona, Isómero 1



Se purifica 6-etil-5-(2-metoxietil)-6-metil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona (Ejemplo 20) por cromatografía quiral. Chiralpak® IA; MP: MeOH 10% en ACN que contiene isopropil amina 0,2%; Flujo: 1,0 ml/min; UVW: 225 nm; 4.96 min, MS (m/z): 412 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Ejemplo 27. Se indican las condiciones de purificación alternada.

Ejemplo No.	Nombre del compuesto	Estructura	Condiciones	Tiempo de retención, MS (m/z):
28	6-Etil-5-(2-metoxietil)-6-metil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, Isómero 2	 Isómero 2	Chiralpak® IA; MP: 10% MeOH en ACN que contiene isopropil amina 0,2%; Flujo: 1,0 ml/min, 225 nM,	7,012 min, 412 (M+1)
29	5-[2-Metoxipropil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona, Isómero 1	 Isómero 1	Chiralpak® ASH; MP: 40% isopropanol/CO ₂ que contiene isopropilamina 0,2%; Flujo: 5,0 ml/min, 225 nM,	1,23 min, 412 (M+1)
30	5-[2-Metoxipropil]-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona Isómero 2	 Isómero 2	Chiralpak® ASH; MP: 40% isopropanol/CO ₂ que contiene isopropilamina 0,2%; Flujo: 5,0 ml/min, 225 nM,	1,79 min, 412 (M+1)

Difracción de rayos X de polvo

Los patrones XRD de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de rayos X de polvo Endeavor de Broker D4, equipado con una fuente de CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. La muestra se escanea entre 4 y 40° en 2 θ , con un tamaño de paso de 0,009° y una velocidad de escaneo de 0,5 segundos/paso, y con divergencia de 0,6 mm, anti-dispersión fija de 5,28 y ranuras de detector de 9,5 mm. El polvo seco se empaqueta en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa utilizando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de la forma cristalina se recogen a temperatura ambiente y humedad relativa. Es bien sabido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como la morfología y el hábito del cristal. Cuando los efectos de la orientación preferida están presentes, se alteran las intensidades de los picos, pero las posiciones pico características del polimorfo no se modifican. Además, también es bien conocido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de la posición de pico de $\pm 0,2$ en 2 θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina se puede realizar sobre la base de cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de $^{\circ}2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de la forma cristalina, recogidos a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustan sobre la base de los picos estándares de NIST 675 en 8,853 y 26,774 grados 2-theta.

Difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 1, Forma cristalina 1

Una muestra preparada del Ejemplo 1, Forma cristalina 1 se caracteriza por un patrón XRD que utiliza radiación CuK α que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 10 a continuación, y en particular que tiene picos a 24,2° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 8,0°, 12,8°, 15,9°, 16,8° y 19,5° con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 10: Picos de difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 1, Forma cristalina 1

Pico	Ángulo ($^{\circ}2\text{-Theta}$) +/- 0,2 $^{\circ}$	% Intensidad relativa (% de pico más intenso)
1	8,0	32
2	9,4	24
3	12,8	63
4	15,9	57
5	16,8	38
6	17,0	23
7	17,9	20
8	18,5	33
9	19,5	85
10	19,8	38
11	20,0	37
12	21,6	31
13	22,9	24
14	24,2	100
15	24,8	18
16	26,6	25

Difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 1, Forma cristalina 2

Una muestra preparada del Ejemplo 1 Forma cristalina 2 se caracteriza por un patrón XRD que utiliza radiación CuK α que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 11 a continuación, y en particular que tiene picos a 18,5° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 8,5°, 9,2°, 16,5°, 20,3°, y 23,3°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 11: Difracción de rayos X de polvo picos del Ejemplo 1, Forma cristalina 2

Pico	Ángulo (°2-Theta) +/- 0,2°	% Intensidad relativa (% de pico más intenso)
1	8,5	16
2	9,2	14
3	12,9	9
4	14,2	7
5	16,1	20
6	16,5	66
7	17,1	9
8	18,5	100
9	19,2	11
10	20,3	38
11	21,3	15
12	23,3	24
13	27,6	15
14	27,9	19

Varias líneas de evidencia indican que los procesos involucrados en la iniciación, crecimiento y progresión del tumor están mediados por la activación de una o más vías de señalización en las células cancerosas. La vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es un regulador clave de la proliferación y supervivencia celular. ERK es un miembro corriente abajo de esta vía y desempeña un papel central en la transmisión de señales extracelulares de las tirosina quinasa receptoras (RTK) activadas, tales como EGFR, FGFR, PDGFR, VEGFR, etc. Esta vía es una cascada de quinasa de tres niveles que consiste en la RAF, la MEK, y quinasa ERK (quinasa reguladas por señales extracelulares) y la activación de esta vía comienza con la activación de RAS, una pequeña GTPasa. La activación de RAS conduce al reclutamiento de RAF, una serina/treonina quinasa y su activación. El RAF activado posteriormente fosforila y activa MEK1/2, que a su vez fosforila y activa ERK1/2. Cuando se activa, ERK1/2 fosforila varios blancos citoplasmáticos y nucleares corriente abajo involucrados en la proliferación, crecimiento, supervivencia celular y la EMT (transición epitelial a mesenquimatosa).

La vía RAS/MAPK es una de las vías más importantes para la proliferación celular y se cree que esta vía se activa con frecuencia en ~ 30% de todos los cánceres humanos. La activación de la ruta de MAPK constitutiva puede provenir de la activación de mutaciones en RAS, BRAF, MEK1, la pérdida del supresor tumoral NF1 o la activación corriente arriba mediada por mutaciones, amplificaciones o activación mediada por ligandos de RTK. Se ha demostrado que los tres genes de la familia RAS (KRAS, NRAS y HRAS) están mutados somáticamente en varios cánceres, que incluyen cáncer colorrectal, melanoma, pulmonar y pancreático, más comúnmente como resultado de mutaciones puntuales simples en los codones 12, 13 y 61. Estas mutaciones causan la activación constitutiva de RAS que se acompaña de una mayor actividad de ERK1/2 y señalización de crecimiento. Las mutaciones en los codones 12, 13 y 61 de KRAS confieren resistencia a los compuestos y anticuerpos monoclonales que inhiben el EGFR. Las mutaciones KRAS se encuentran en el 30% de los cánceres de pulmón, el 90% de los cánceres de páncreas, el 10% de los cánceres gástricos y el 50% de los cánceres colorrectales. Se detectaron mutaciones en aproximadamente el 10-25% de los melanomas. Además, se han identificado mutaciones RAS (HRAS, KRAS y NRAS) en ~ 55-60% de los cánceres de tiroides. Las mutaciones somáticas puntuales en BRAF ocurren en aproximadamente el 8% de los tumores humanos, con mayor frecuencia en el melanoma (60%), cáncer colorrectal (10%) y de tiroides (50%). En el melanoma, todas las mutaciones BRAF parecen estar dentro del dominio quinasa

y una sustitución única (T-> A, V600E) representa el 80% de las mutaciones. Las mutaciones BRAF se encuentran, con raras excepciones, en un patrón mutuamente exclusivo con mutaciones RAS, lo que sugiere que estas alteraciones genéticas activan los efectores comunes en dirección 3'.

Ensayos biológicos

- 5 Los siguientes ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados de la presente invención son inhibidores de la actividad de la quinasa ERK1 y ERK2. Los resultados de los siguientes ensayos también demuestran que los compuestos ejemplificados de la presente invención inhiben la señalización de ERK en células cancerosas. Además, el Compuesto del Ejemplo 1 demuestra la inhibición del blanco de la vía ERK en ciertos modelos de cáncer por tumores de xenoinjerto. Además, el compuesto del Ejemplo 1 inhibe el crecimiento tumoral en ciertos modelos de
- 10 cáncer por tumores de xenoinjertos.

Ensayo de ERK1 quinasa

- El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de la quinasa ERK1. Se realiza el ensayo de quinasa ERK1 in vitro utilizando un ensayo TR-FRET. Las reacciones comienzan (12,5 µl) mediante la adición de 5 µl de enzima ERK1 (Invitrogen, #PR⁵254B, concentración final 100 ng/ml) más sustrato
- 15 GFP-ATF2 (Invitrogen, #PV4445, concentración final 0,2 µM), 5 µl de solución de ATP (Invitrogen, #PV3227, concentración final 10 µM) preparada en tampón de quinasa (Hepes 50 mM, pH 7, MgCl₂ 4,5 mM, EGTA 0,1 mM, Triton X-100 al 0,01%, DTT 1 mM) y 2,5 µl de compuestos de prueba en solución DMSO (4% final, v/v) en una placa de 384 pocillos PROXIPLATE™ (Perkin Elmer, #GRN6260). Se incuba la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se detiene la reacción mediante la adición de 12,5 µl de tampón de detención (EDTA
- 20 10 mM, anticuerpo Tb-anti-pATF2 2 nM (pThr71), Invitrogen, #PV4448) en tampón de dilución TR-FRET (Invitrogen, #PV3574). Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 60 minutos adicionales y se lee en un lector de placas ENVISION® (PerkinElmer) a la longitud de onda de excitación 340 nm. Se calcula la relación TR-FRET mediante la división de la señal de emisión del aceptor de GFP (a 520 nm) por la señal de emisión del dador de Tb (a 495 nm). Se calcula el porcentaje de inhibición utilizando los pocillos con compuesto con respecto a
- 25 los datos de la relación TR-FRET de los pocillos de control de la placa Max (control DMSO) y Min (sin enzima añadida) [% inhibición = 100- [(compuesto de prueba- mediana Min)/(mediana Max- mediana Min) X 100]]. Se analizan todos los compuestos en 10 concentraciones (20 µM a 0,001 µM) usando un esquema de dilución 1: 3. Se derivan los valores de Abs_{IC₅₀} ajustando el porcentaje de inhibición y los datos de concentración de diez puntos a una ecuación logística no lineal de 4 parámetros (ecuación 205) utilizando ACTIVITYBASE® 7,3 (ID Business Solutions Limited).
- 30

Los compuestos ejemplificados dentro del ámbito de la invención se analizan en este ensayo sustancialmente como se describió anteriormente. Los resultados de este ensayo demuestran que todos los compuestos ejemplificados inhiben la actividad de ERK1 quinasa, con valores IC₅₀ menores de 0,15 µM. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 tiene un valor de IC₅₀ de 1,50 nM (60,608, n=16).

Ensayo de quinasa ERK2

- El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de la quinasa ERK1. Se realiza el ensayo de quinasa ERK2 in vitro utilizando un ensayo TR-FRET. Las reacciones comienzan (12,5 µl) mediante la adición de 5 µl de enzima ERK2 (Invitrogen, #PV3595B, concentración final 50 ng/ml) más sustrato
- 40 GFP-ATF2 (Invitrogen, #PV4445, concentración final 0,2 µM), 5 µl de solución de ATP (Invitrogen, #PV3227, concentración final 10 µM) preparada en tampón de quinasa (Hepes 50 mM, pH 7, MgCl₂ 4,5 mM, EGTA 0,1 mM, Triton X-100 al 0,01%, DTT 1 mM) y 2,5 µl de compuestos de prueba en solución DMSO (4% final, v/v) en una placa de 384 pocillos PROXIPLATE™ (Perkin Elmer, #GRN6260). Se incuba la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se detiene la reacción mediante la adición de 12,5 µl de tampón de detención (EDTA
- 45 10 mM, anticuerpo Tb-anti-pATF2 2 nM (pThr71), Invitrogen, #PV4448) en tampón de dilución TR-FRET (Invitrogen, #PV3574). Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 60 minutos adicionales y se lee en un lector de placas ENVISION® (PerkinElmer) a la longitud de onda de excitación 340 nm. Se calcula la relación TR-FRET mediante la división de la señal de emisión del aceptor de GFP (a 520 nm) por la señal de emisión del dador de Tb (a 495 nm). Se calcula el porcentaje de inhibición utilizando los pocillos con compuesto con respecto a
- 50 los datos de la relación TR-FRET de los pocillos de control en placa Max (control DMSO) y Min (sin enzima añadida) [% inhibición = 100- [(compuesto de prueba - mediana Min)/(mediana Max - mediana Min) X 100]]. Se analizan todos los compuestos en 10 concentraciones (20 µM a 0,001 µM) usando un esquema de dilución 1:3. Se derivan los valores de Abs_{IC₅₀} ajustando el porcentaje de inhibición y los datos de concentración de diez puntos a una ecuación logística no lineal de 4 parámetros (ecuación 205) utilizando ACTIVITYBASE® 7,3 (ID Business Solutions Limited).
- 55 Los compuestos ejemplificados dentro del ámbito de la invención se analizan en este ensayo sustancialmente como se describió anteriormente. Los resultados de este ensayo demuestran que todos los compuestos ejemplificados inhiben la actividad de quinasa ERK2, con valores de IC₅₀ menores de 0,15 µM. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 tiene un valor IC₅₀ 1.93 µM (60,682, n=17).

Ensayo mecanicista celular ERK1/2 (Ensayo pRSK1 Alphascreen)

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos para inhibir la señalización de ERK en células de cáncer *in vitro*. Se realiza el ensayo Alphascreen pRSK1 utilizando la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 (ATCC, #CCL-247). Se cultivan de rutina células HCT116 en medio de crecimiento Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Hyclone, #SH30022) que contiene 5% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, n° 16000-044) en matraces T-150 y se incuban en incubador de CO₂ 5% a 37 °C. Se recolectan las células cuando se vuelvan confluentes y se congelan en medio de congelación a 1x10⁷ células/ml como "células congeladas listas para el análisis" y se almacenan en nitrógeno líquido. Para ejecutar el ensayo, se siembran 40,000 células HCT116/pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se incuban a 37 °C en un incubador de CO₂ 5% durante la noche. Los compuestos de prueba a 10 concentraciones comienzan con una concentración máxima de 20 µM y utilizan un esquema de dilución 1:3 (20 µM a 0,001 µM) con una concentración final de DMSO de 0,5% (v/v). Se añaden compuestos en 20 µL de medio de crecimiento libre de suero e incuban a 37 °C durante dos horas. Se elimina el medio de crecimiento y se añaden 50 µL de 1x de tampón de lisis [Cell Signaling Technology, #9803] que contiene 1x de proteasa holt y cóctel inhibidor de fosfatasa [Thermo, #78441] en cada pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos en un agitador. Se transfieren 4 µL de lisado celular de cada pocillo a los pocillos respectivos en una placa de ensayo de 384 pocillos [Perkin Elmer, #6006280] y se añaden 5 µL de mezcla de reacción [2000 partes de tampón de ensayo 1x (Perkin Elmer, #A1000), 1 parte de anticuerpo RSK1-biotina (Santa Cruz, #sc-231-BG), 4 partes de anticuerpo pRSK1 (Abcam, #ab32413), partes de perlasceptoras (Perkin Elmer, #6760617R)]. Se sella la placa con un sello de lámina de aluminio (Beckman Coulter, #538619) y se incuban a temperatura ambiente durante dos horas. Se añaden 2 µL de perlas de dador [20 partes de tampón de ensayo 1, 1 parte de perlas de dador] a cada pocillo y se sella la placa con un sello de placa transparente (Applied Biosystems, #4311971) y se incuban a temperatura ambiente en la oscuridad durante dos horas. Se mide la intensidad de la fluorescencia en cada pocillo mediante la lectura de las placas en el lector de placas ENVISION® (PerkinElmer). Se derivan los valores de IC₅₀ Rel ajustando el porcentaje de inhibición de pRSK1 [% de inhibición = 100- [(compuesto de prueba- mediana Mín)/(mediana Máx-mediana Mín. X 100)] y los datos de concentración de diez puntos en una ecuación logística no lineal de 4 parámetros (Abase equation 205) utilizando ACTIVITYBASE® 7,3 (ID Business Solutions Limited).

Los compuestos ejemplificados dentro del ámbito de la invención se analizan en este ensayo sustancialmente como se describe anteriormente. Los resultados de este ensayo demuestran que todos los compuestos ejemplificados inhiben la fosforilación del sustrato ERK (RSK) en células tumorales, con valores de IC₅₀ menores de 3 µM. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 tiene un valor de IC₅₀ de 0,261 µM (± 0,0876, n = 10).

Ensayo de inhibición del blanco *in vivo* (IVTI) (Ensayo ELISA pRSK1)

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la fosforilación del sustrato ERK1/2 en un modelo animal. A ratones desnudos atímicos hembra (22-25 g) de Harlan Laboratories se les implantan 5x10⁶ células HCT116 de cáncer colorrectal (ATCC, #CCL-247) por vía subcutánea en la región del flanco derecho en 200 µl de solución salina equilibrada de Hank 1: 1 (HBSS) + Solución Matrigel. Se mide el crecimiento del tumor y el peso corporal dos veces por semana a partir del séptimo día después de la implantación. Cuando los tamaños de tumores alcancen los 300-500 mm³, se aleatorizan los animales y se agrupan en grupos de cinco animales. Se trata a los animales con el compuesto en una dosis apropiada en un vehículo específico compuesto o solo por vía oral (vehículo: HEC 1%/ Tween 80 0,25%/antiespumante 0,05%) y se recolectan los tumores y la sangre en los intervalos de tiempo deseados después de la dosificación. Se sacrifican los animales usando anestesia con isoflurano más dislocación cervical. Se congelan rápidamente los tumores y se almacenan a -80 °C hasta el procesamiento de los niveles de pRSK1 mediante un ensayo ELISA. Se recolecta sangre en tubos de EDTA y se centrifugan para plasma y se congelan a -80 °C en una placa de 96 pocillos. Se determina las exposiciones del compuesto usando procedimientos estándares.

Se pulverizan los tumores en nitrógeno líquido y se lisan en un tampón de lisis 1x (MSD, #R60TX-3) que contiene 1x cóctel de inhibidor de la proteasa holt y fosfatasa (Thermo Scientific, #0861281), fluoruro de fenilmetansulfonilo 1 mM (PMSF) (Sigma, #30) 93482-50ML-F) y metavanadato de sodio 1 µM (Sigma, #590088) utilizando perlas Matrix D (MP Biomedical, #6913-500) en una máquina de disgregación celular FastPrep-24 TM (MP Biomedical) en una habitación fría (4 °C). Se transfieren los lisados tumorales a tubos nuevos después de centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Se determina la concentración de proteína del tumor o de los lisados celulares utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (cat #23225, Thermo Scientific). Este kit contiene tres componentes principales: (1) Reactivo A de BCA, que contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinónico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M, (2) Reactivo B de BCA, que contiene sulfato cúprico 4% y (3) Ampollas de albúmina estándares, que contienen 2 mg/ml en solución salina 0,9% y azida de sodio 0,05%. En una placa de 96 pocillos, se añade el estándar de proteína de albúmina sérica bovina para un intervalo de concentración de 20-2000 µg/ml en 25 µL en pocillos duplicados para generar una curva estándar. Se añaden los lisados celulares o tumorales diluidos en 25 µL de 1 x PBS para duplicar los pocillos de prueba. Se prepara el reactivo BCA de trabajo mediante la adición de Reactivo B 2% a Reactivo A (2 ml de B + 98 ml de A), se mezcla bien y se añaden 200 µL a cada muestra o estándar. Se mezcla bien, se cubre la placa y se incuban a 37 °C durante 30 minutos. Se enfría la placa a temperatura ambiente y se mide la absorbancia en o cerca de 562 nm en un lector de placas (lector de placas Envision de Perkin Elmer). Se resta la medición de absorbancia promedio de 562 nm de los replicados estándares del blanco de las mediciones de 562 nm de todos los demás replicados de muestra individuales d estándares y desconocidos

(lisado celular o tumoral). Se prepara una curva estándar mediante el graficado de la medición promedio de 562 nm corregida por blanco para cada estándar de albúmina sérica bovina versus su concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se usan la curva estándar para determinar la concentración de proteína de cada una de las muestras desconocidas usando logaritmos de ajuste de curva en Microsoft Excel. Se congelan los lisados tumorales restantes a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Se usa una vez lisados de tumores congelados y descongelados para medir la expresión de pRSK1 mediante un ELISA tipo sándwich.

Se cubren las placas de 96 pocillos (Thermo, #15042) durante la noche a $4\text{ }^\circ\text{C}$ con 40 ng de anticuerpo RSK1 de cabra (Santa Cruz, #sc231-G) y se incuban a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche. Se lavan las placas tres veces con 300 μL de PBST (solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS) que contiene Tween-20 0,05%), se bloquea con 100 μL por pocillo de tampón de bloqueo (Thermo Scientific, n.º 37532) y se incuban a temperatura ambiente durante dos horas. Se lava las placas tres veces con 300 μL de PBST y se transfieren 20 μg de lisado tumoral a cada pocillo y se incuban a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche. Las placas se lavan tres veces con 300 μL de PBST y se incuban con 100 μL de anticuerpo de conejo pRSK1 (T359/S363) (dilución 1: 1000 en tampón de bloqueo) a temperatura ambiente durante cuatro horas. Las placas se lavan tres veces con 300 μL de PBST y se incuban con 100 μL de anticuerpo secundario conjugado con HRP® de conejo (GE Healthcare UK, #NA934V; diluido 1: 10000 en tampón de bloqueo) Se incuban a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavan tres veces con 300 μL de PBST, se añaden 100 μL de sustrato de sensibilidad máxima SUPERSIGNAL® ELISA Femto (Thermo, #37075) y se incuban en un agitador durante un minuto. Se determina la señal de luminiscencia utilizando un lector de placas ENVISION®. Se determina el nivel de pRSK1 en cada lisado tumoral considerando lisados tumorales de animales tratados con vehículo (vehículo: HEC 1%/Tween 80 0,25%/antiespumante 0,05%) solo como 100%. Se analiza cada muestra por duplicado y se usan números promedio para los cálculos. Se calcula TED50 usando Excel y XL Fit.

Un compuesto dentro del ámbito de la invención se analiza en este ensayo sustancialmente como se describió anteriormente. Los resultados de este ensayo demuestran que el Compuesto del Ejemplo 1 inhibe la fosforilación de RSK1 en un modelo de xenoinjerto tumoral. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 tiene un valor TED_{50} de 12 mg/kg.

Modelos tumorales del xenoinjerto

El propósito de este ensayo es medir la reducción del volumen tumoral en respuesta a la administración de los compuestos de prueba. Se expanden células HCT116 de cáncer colorrectal (ATCC, #CCL-247) o células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas NCI-H358 (ATCC, #CRL-5807) en cultivo, se recolectan y se inyectan 5×10^6 células en 200 μL de 1:1 colorrectal (ATCC, #CCL-247) por vía subcutánea en la región del flanco derecho en 200 μL de 1: 1 HBSS + Solución Matrigel por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones desnudos atímicos hembra (22-25 g, Harlan Laboratories). Se expanden las células de cáncer pancreático humano SW1990 (ATCC, #CRL-2172) en cultivo, se recolectan e inyectan 2×10^6 células en 200 μL de solución 1: 1 de HBSS + matrigel subcutáneamente en el flanco posterior derecho de ratones desnudos atímicos hembra (22-25 gm, Laboratorios Harlan). Se expanden células de cáncer pancreático humano MIA PACA-2 (ATCC, #CRL-1420) o células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas A549 (ATCC, #CCI-185) en cultivo, se recolectan e inyectan 5×10^6 células en 200 μL de solución 1: 1 de HBSS + matrigel por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones hembra SCID CB-17 (22-25 g, Charles River Laboratories International Inc.). Se expanden células de melanoma humano A-375 (ATCC, #CRL-1619) en cultivo, se recolectan e inyectan 5×10^6 células en 200 μL de solución 1: 1 de HBSS + matrigel por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratas desnudas NIH hembra (140-160 gm, Taconic Farms). Se mide el crecimiento del tumor y el peso corporal dos veces por semana a partir del séptimo día después de la implantación. Cuando los tamaños de los tumores alcanzan los 200-400 mm^3 , se aleatorizan los animales y se agrupan en grupos de ocho a diez animales. Se prepara el compuesto de prueba en un vehículo apropiado (vehículo: HEC1%/Tween 80 0,25%/antiespumante 0,05%) y se administra por cebadura oral durante 14 a 28 días. La respuesta del tumor se determina mediante la medición del volumen del tumor realizada dos veces por semana durante el curso del tratamiento.

Un compuesto dentro del ámbito de la invención se analiza en este ensayo realizado sustancialmente como anteriormente. Se encuentra que el compuesto del Ejemplo 1 tiene valores delta T/C% como se proporciona en la Tabla 12 a continuación. Estos resultados indican que el compuesto del Ejemplo 1 demuestra una actividad antitumoral significativa en varios modelos de xenoinjerto de cáncer humano que incluyen HCT116, MIA PACA-2, CALU-6, SW1990, NCI-H358, A549 y A-375.

ES 2 700 200 T3

Tabla 12: Modelos de xenoinjerto

Modelo tumoral	Dosis (mg/kg)	Esquema	Valor p-	Delta T/C (%)	Regresión (%)
HCT116	10	BID	0,023*	55	NA
HCT116	25	BID	<0,001*	89	NA
HCT116	50	QD	<0,001*	83	NA
HCT116	50	BID	<0,001*	NA	-31
HCT116	75	QD	<0,001*	98	NA
MIA PACA-2	10	BID	<0,001*	76	NA
MIA PACA-2	25	QD	<0,001*	74	NA
MIA PACA-2	25	BID	<0,001*	NA	-15
MIA PACA-2	50	QD	<0,001*	97	NA
MIA PACA-2	50	BID	<0,001*	NA	-72
MIA PACA-2	75	QD	<0,001*	NA	-39
CALU-6	10	BID	0,013*	44	NA
CALU-6	25	QD	0,010*	46	NA
CALU-6	25	BID	<0,001*	NA	-10
CALU-6	50	QD	<0,001*	92	NA
CALU-6	50	BID	<0,001*	NA	-75
CALU-6	75	QD	<0,001*	NA	-38
SW1990	10	BID	0,364	24	NA
SW1990	30	BID	0,005*	64	NA
NCI-H358	25	BID	<0,001*	NA	-13
NCI-H358	50	BID	<0,001*	NA	-35
A549	10	BID	0,471	13	NA
A549	30	BID	<0,001*	66	NA
A-375	3	QD	0,852	10	NA
A-375	3	BID	<0,001*	NA	-60
A-375	15	BID	<0,001*	NA	-47

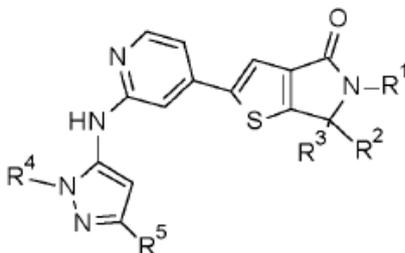
El análisis del volumen del tumor se basa en Log 10 y la estructura de covarianza SpatialPower.

*: significativo (p <0,05)

NA: No aplicable
Delta T/C% se calcula cuando el volumen del tumor de punto final en un grupo tratado está en o por encima del volumen del tumor inicial. La fórmula es $100 * (T-T_0)/(C-C_0)$, donde T y C son volúmenes tumorales de punto final promedio en el grupo tratado o de control, respectivamente. T₀ y C₀ son volúmenes tumorales medios iniciales en esos grupos.
La regresión % se calcula cuando el volumen de punto final está por debajo del valor inicial. La fórmula es $100 * (T-T_0)/T_0$. Donde T₀ es el volumen tumoral medio inicial para el grupo tratado. Para los modelos HCT116, MIA PACA-2, CALU-6, SW 1990, NCI-H358, A549 y A-375, se usó la media total de todos los grupos desde el inicio (aleatorización) el día 17, día 18, día 15, día 21, día 29, día 20, y día 24 respectivamente para calcular el% de cambio de T/C.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



en la que:

5 R¹ es hidrógeno, 2-metoxietilo, 2-(ciclopropoxi)etilo, 2-hidroxietilo, 2-(2,2-difluoroetoxi)etilo, 2-(trideuteriometoxi)etilo, 2-(trifluorometoxi)etilo, 2-metoxipropilo, (2R)-2-metoxipropilo, o (2S)-2-metoxipropilo;

R² y R³ son de modo independiente hidrógeno, metilo, o etilo o R² y R³ se pueden tomar juntos para formar ciclopropilo o ciclopentilo;

10 R⁴ es hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, ciclopropilo, difluorometilo, 2-fluoroetilo, 2,2-difluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo, o 2-metoxietilo; y

R⁵ es hidrógeno, metilo, o ciclopropilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 en el que R² y R³ son metilo.

3. El compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 2 en que R¹ es 2-metoxietilo.

15 4. El compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 3 en el que R⁴ es metilo.

5. El compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 3 en el que R⁵ es hidrógeno.

6. El compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 4 que es 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona.

20 7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 que es 5-(2-metoxietil)-6,6-dimetil-2-{2-[(1-metil-1H-pirazol-5-il)amino]piridin-4-il}-5,6-dihidro-4H-tieno[2,3-c]pirrol-4-ona.

8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

9. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en terapia.

25 10. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en el tratamiento del cáncer.

11. El compuesto o sal para usar de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

30 12. El compuesto o sal para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cáncer es cáncer colorrectal.

13. El compuesto o sal para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cáncer es cáncer pancreático.

14. El compuesto o sal para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.