

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 175**

51 Int. Cl.:

C07D 409/12 (2006.01)

A61K 31/4725 (2006.01)

C07D 409/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2015 PCT/US2015/062391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16089670**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2015 E 15805705 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 3227279**

54 Título: **Compuestos de 1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il-(tiofen-2-il-5-sustituido)-sulfonamida, formulaciones que contienen esos compuestos, y su uso como inhibidores de AICARFT en el tratamiento de cánceres**

30 Prioridad:

02.12.2014 US 201462086357 P

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

28.06.2019

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BROOKS, HAROLD BURNS;
DALLY, ROBERT DEAN;
DURHAM, TIMOTHY BARRETT;
FALES, KEVIN ROBERT;
FRIMPONG, KWAME;
MCCOWAN, JEFFERSON RAY;
NJORGE, FRANK GEORGE;
SHEPHERD, TIMOTHY ALAN;
SI, CHONG;
THRASHER, KENNETH JEFF;
TOTH, JAMES LEE y
WU, ZHIPEI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 718 175 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

Compuestos de 1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il-(tiofen-2-il-5-sustituido)-sulfonamida, formulaciones que contienen esos compuestos, y su uso como inhibidores de AICARFT en el tratamiento de cánceres

5 El ciclo metabólico del ácido fólico de los mamíferos es un proceso complejo pero importante para la transferencia de biomoléculas de unidad de un carbono. El ácido fólico no puede sintetizarse sino que se obtiene a través de la dieta. El ácido fólico de la dieta es el material de partida para la molécula fundamental del ciclo, el ácido tetrahidrofólico (tetrahidrofolato, THFA). Una función del metabolismo del ácido fólico es el soporte de la síntesis y la reparación del ADN a través de la generación de componentes básicos de ácidos nucleicos. Este proceso metabólico incluye la síntesis *de novo* de deoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a través de la adición de un grupo metilo por la enzima timidilato sintasa con fosforilación subsiguiente para dar el desoxinucleótido trifosfato. La biosíntesis *de novo* del nucleótido purina comienza con el azúcar activado 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP). A través de una serie de reacciones, incluyendo también tetrahidrofolato, esta ruta da inosina 5'-monofosfato (IMP). IMP puede convertirse subsiguientemente o bien en adenosina monofosfato (AMP) o bien en guanosina monofosfato (GMP).

15 Una etapa en la ruta de síntesis *de novo* de IMP purina se cataliza por la enzima 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa (AICARFT). AICARFT cataliza la formilación de 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosil-5'-monofosfato (ZMP) para dar 5-formilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (FAICAR) mediante N¹⁰-formil-tetrahydrofolato (10-formiltetrahydrofolato; 10-CHO-THFA). Las funciones del nucleótido de purina incluyen proliferación y autorrenovación. Debido a la importancia del nucleótido purina en la síntesis de ARN y ADN, y la consiguiente división y proliferación celular por células tanto normales como malignas, la ruta de biosíntesis de la purina se ha considerado por mucho tiempo un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos anticancerígenos.

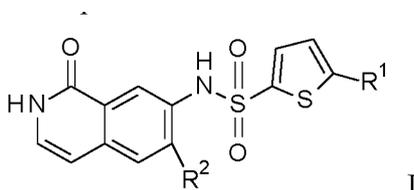
20 La interferencia con el metabolismo del folato tiene un efecto tóxico mayor sobre células que se dividen rápidamente que sobre células que se dividen normalmente. Debido a que el metabolismo del folato se requiere para la replicación y supervivencia celular, se han usado compuestos que son inhibidores metabólicos como agentes terapéuticos antitumorales, aunque con toxicidad y aplicación limitada. Aminopterina, metotrexato, ralitrexed (no disponible en Los Estados Unidos), pralatrexato y pemetrexed son ejemplos de análogos de ácido fólico (antifolatos). El agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo, aunque no se considera un análogo del ácido fólico, es también un agente terapéutico antitumoral que es un inhibidor del metabolismo del folato.

30 Aunque no se considera su mecanismo de acción principal, se notifica que tanto metotrexato como pemetrexed muestran actividad inhibidora de AICARFT. Además, en el documento WO 2000/13688 se proporcionan compuestos notificados como útiles como inhibidores de AICARFT. No obstante, hasta la fecha, no ha aparecido agente quimioterapéutico comercial inhibidor de AICARFT alguno.

35 El documento GB-A-2188319 describe derivados de quinazolina que poseen actividad antitumoral. Chemical Reviews, 2005, Vol. 105, N.º 2, páginas 593-602, DOI: 10.1021/cr0301144 proporciona una revisión de inhibidores de ácido fólico.

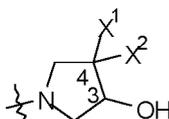
Existe una necesidad de hallar compuestos que tienen principalmente actividad inhibidora de AICARFT sobre otras enzimas en la ruta metabólica de folato. Existe una necesidad adicional de hallar compuestos que puedan contribuir a la actividad inhibidora de la señalización de la ruta de IMP en general, y particularmente a la actividad inhibidora de AICARFT.

40 Un aspecto de la invención son compuestos inhibidores de AICARFT de Fórmula I:

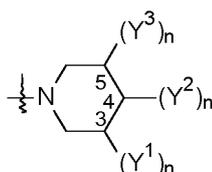


en el que:

R¹ se selecciona entre el grupo:

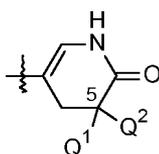


45 en el que cada uno de X¹ y X² se selecciona independientemente entre hidrógeno, flúor o-CH₃; o uno de X¹ y X² se selecciona entre -OH, -OCH₃, -N(CH₃)₂ o morfolin-4-ilo y el otro es hidrógeno;



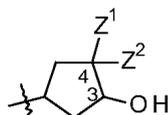
en el que cada n se selecciona independientemente entre 0, 1 o 2; Y¹, Y² e Y³ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, -OH, flúor, -NH₂ o -CF₃; con la condición de que no todos sean hidrógeno;

5 y con la condición de que no todas las n sean simultáneamente 0; y con la condición adicional de que solo una n pueda ser 2; y cuando una n es 2, cada uno de Y¹, Y² e Y³ se seleccionan independientemente entre flúor, -OH o -CF₃;

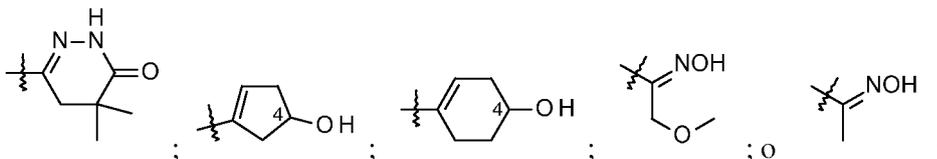


en el que Q¹ y Q² se seleccionan independientemente entre hidrógeno, -CH₃ o -CH₂CH₃;

10



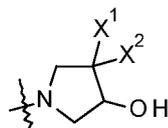
en el que cada uno de Z¹ y Z² se selecciona independientemente entre hidrógeno o flúor;



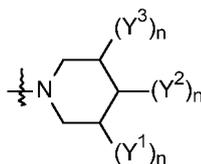
R² es hidrógeno o flúor;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Un aspecto adicional de la invención proporciona compuestos de Fórmula I en los que:

R¹ se selecciona entre el grupo:



en el que cada uno de X¹ y X² se selecciona independientemente entre hidrógeno, flúor o -CH₃; o uno de X¹ y X² se selecciona entre -OH, -OCH₃, -N(CH₃)₂ o morfolin-4-ilo y el otro es hidrógeno;

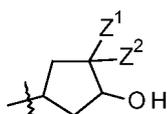


20

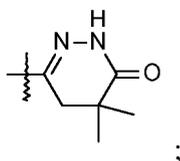
en el que cada n se selecciona independientemente entre 0, 1 o 2; Y¹, Y² e Y³ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, -OH, flúor, -NH₂ o -CF₃; con la condición de que no todos sean hidrógeno;

25

y con la condición de que no todas las n sean simultáneamente 0; y con la condición adicional de que solo una n pueda ser 2; y cuando una n es 2, cada uno de Y¹, Y² e Y³ se seleccionan independientemente entre flúor, -OH o -CF₃;



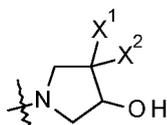
en el que cada uno de Z¹ y Z² se selecciona independientemente entre hidrógeno o flúor; o



- 5 R² es hidrógeno o flúor;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

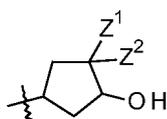
Otro aspecto de la invención proporciona compuestos de Fórmula I en los que:

R¹ se selecciona entre el grupo:

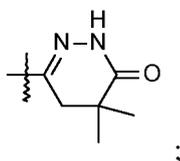


en el que cada uno de X¹ y X² se selecciona independientemente entre hidrógeno, flúor o -CH₃;

10



en el que cada uno de Z¹ y Z² se selecciona independientemente entre hidrógeno o flúor; o



- 15 Otro aspecto de la invención es un compuesto:

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxi-pirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3S)-3-hidroxi-pirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

- 20 5-[(3S,4R)-3-Fluoro-4-hidroxi-pirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

5-(3,3-Difluoro-(4R)-4-hidroxi-pirrolidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

- 25 5-(5,5-Dimetil-6-oxo-1,4-dihidropiridazin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; o

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(1R,3R)-3-hidroxiciclopentil]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Otro aspecto de la invención es un compuesto:

- 30 N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxi-pirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para tratar un cáncer que es glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (incluyendo mesotelioma), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, osteosarcoma, linfoma no Hodgkin (incluyendo linfoma de linfocitos T), sarcoma fibroblástico, leucemia mielógena crónica (CML) o leucemia linfocítica aguda (ALL; incluyendo T-ALL, leucemia linfoblástica y monocítica) en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para tratar un cáncer que es cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo mesotelioma), cáncer colorrectal, linfoma no Hodgkin (incluyendo linfoma de linfocitos T), leucemia mielógena crónica (CML) o leucemia linfocítica aguda (ALL; incluyendo T-ALL, leucemia linfoblástica y monocítica) en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto aún más adicional de la invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer que es glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (incluyendo mesotelioma), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, osteosarcoma, linfoma no Hodgkin (incluyendo linfoma de linfocitos T), sarcoma fibroblástico, leucemia mielógena crónica o leucemia linfocítica aguda (ALL; incluyendo T-ALL, leucemia linfoblástica y monocítica).

Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer que es cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo mesotelioma), cáncer colorrectal, linfoma no Hodgkin (incluyendo linfoma de linfocitos T), leucemia mielógena crónica (CML) o leucemia linfocítica aguda (ALL; incluyendo T-ALL, leucemia linfoblástica y monocítica).

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que es glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (incluyendo mesotelioma), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, osteosarcoma, linfoma no Hodgkin (incluyendo linfoma de linfocitos T), sarcoma fibroblástico, leucemia mielógena crónica o leucemia linfocítica aguda (ALL; incluyendo T-ALL, leucemia linfoblástica y monocítica).

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que es cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo mesotelioma), cáncer colorrectal, linfoma no Hodgkin (incluyendo linfoma de linfocitos T), leucemia mielógena crónica (CML) o leucemia linfocítica aguda (ALL; incluyendo T-ALL, leucemia linfoblástica y monocítica).

El término "paciente" significa mamífero y "mamífero" incluye, pero sin limitación, el ser humano y mascotas, incluyendo el gato doméstico (*Felis catus*), perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) y caballo doméstico (*Equus ferus caballus*).

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa la dosificación de un compuesto de Fórmula I, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o composición farmacéutica que contiene un compuesto de Fórmula I, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo necesaria para inhibir AICARFT en un paciente de cáncer y o bien destruir las células cancerosas objetivo o bien ralentizar o detener el avance del cáncer en un paciente. Las dosificaciones previstas de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, están en el intervalo de 100 a 800 mg/paciente/día. Se prevé que las dosificaciones preferidas estén en el intervalo de 150 a 600 mg/paciente/día. Se prevé que las dosificaciones más preferidas se encuentren en el intervalo de 225 a 500 mg/paciente/día. La dosificación exacta requerida para tratar un paciente y la duración del tiempo de tratamiento serán determinadas por un médico en vista de la fase y la gravedad de la enfermedad así como la respuesta y las necesidades específicas del paciente individual. Aunque se expresa como dosificación de forma diaria, el régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar un beneficio terapéutico más óptimo a un paciente y para gestionar o mejorar cualquier reacción adversa en un paciente.

Los términos "tratamiento", "tratar" y "tratando", tienen por objeto incluir el espectro de intervención completo para el

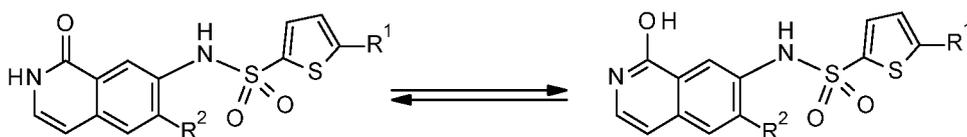
cáncer que está padeciendo el paciente, tal como la administración del compuesto activo para aliviar, ralentizar o invertir uno o más de los síntomas y para retardar el avance del cáncer incluso aunque el cáncer no se elimine realmente. El paciente a tratar es un mamífero, en particular un ser humano.

5 Un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se formula preferiblemente como una composición farmacéutica usando un vehículo farmacéuticamente aceptable y se administra por una diversidad de rutas. Preferentemente, tales composiciones son para su administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, y col., eds., 19ª ed., Mack Publishing Co., 1995). En una realización particular, la composición farmacéutica comprende N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos particularmente para el tratamiento del cáncer en general o un tipo de cáncer específico.

15 Un compuesto de la presente invención, tal como el Ejemplo 1, se denomina: N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida (IUPAC); y también puede denominarse: 2-tiofenosulfonamida, N-(6-fluoro-1,2-dihidro-1-oxo-7-isoquinolinil)-5-[(3R)-3-hidroxi-1-pirrolidinil]-(CAS); y pueden usarse otros nombres para identificar inequívocamente un compuesto de la presente invención.

20 Un experto en la materia entenderá que los compuestos de Fórmula I, particularmente los grupos R¹ y los sustituyentes en los grupos R¹ en las posiciones 3 y potencialmente 4 de un grupo pirrolidin-1-ilo; potencialmente en las posiciones 3, 4 y 5 de un grupo piperidin-1-ilo; las posiciones 3 y potencialmente 4 de un grupo ciclopentilo; potencialmente la posición 5 de un grupo 6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-ilo; la posición 4 de un grupo ciclopent-1-en-1-ilo; y la posición 4 de un grupo ciclohex-1-en-1-ilo son centros quirales, o pueden dar lugar a centros quirales, dando una mezcla racémica de dos o más estereoisómeros. Tal como se usa en el presente documento, una línea de unión de trazo continuo, en comparación con una unión de línea en cuña o sombreada a un sustituyente, salvo que se especifique adicionalmente en la medida conocida, incluye los estereoisómeros individuales de configuración no determinada y mezcla o mezclas racémicas que incluyen el compuesto nombrado. Estereoisómeros específicos pueden prepararse por síntesis estereoespecífica usando materiales de partida enantioméricamente puros o enriquecidos. Los estereoisómeros específicos de o bien materiales de partida, o bien intermedios o bien productos finales pueden resolverse por técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las halladas en Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel y S. H. Wilen (Wiley 1994) y Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J., Jacques, A. Collét, y S. H. Wilen (Wiley 1991), incluyendo cromatografía sobre fases estacionarias quirales, resoluciones enzimáticas, o cristalización fraccionada o cromatografía de diastereómeros formados para ese fin, tales como sales diastereoméricas. Cuando un compuesto quiral se aísla o se resuelve en sus isómeros, pero no se determinan las configuraciones absolutas o las rotaciones ópticas, los isómeros se designan arbitrariamente como isómero 1 e isómero 2 en correspondencia con el orden en el que cada uno se eluye de cromatografía quiral y, si se inicia pronto la cromatografía quiral en la síntesis, se aplica la misma designación a los intermedios y ejemplos subsiguientes.

35 Un experto en la materia reconocerá que los compuestos de Fórmula I pueden existir en equilibrio tautomérico. Para fines ilustrativos, el equilibrio se muestra posteriormente:



40 Por conveniencia, la forma 4-oxo se ilustra en la Fórmula I, y se usa la nomenclatura correspondiente de principio a fin de la presente memoria descriptiva. Sin embargo, tales ilustraciones incluyen la forma hidroxil tautomérica correspondiente.

45 Los compuestos empleados como materiales de partida iniciales en la síntesis de compuestos de la presente invención son bien conocidos y, en la medida en que no están disponibles en el mercado, se sintetizan fácilmente usando las referencias específicas proporcionadas, por procedimientos convencionales comúnmente empleados por los expertos en la materia, o se hallan en textos generales de referencia.

50 Los ejemplos de procedimientos y métodos conocidos incluyen los descritos en textos generales de referencia tales como Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volúmenes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5ª Edición, Michael B. Smith y Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4ª edición, Parte B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey y Richard J. Sundberg, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000, etc., y referencias citadas en ese documento.

55 Adicionalmente, determinados intermedios descritos en los siguientes esquemas pueden contener uno o más grupos protectores. El grupo protector variable puede ser el mismo o diferente en cada aparición dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particular a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por el experto y se describen en la bibliografía (véase, por ejemplo, "Greene's

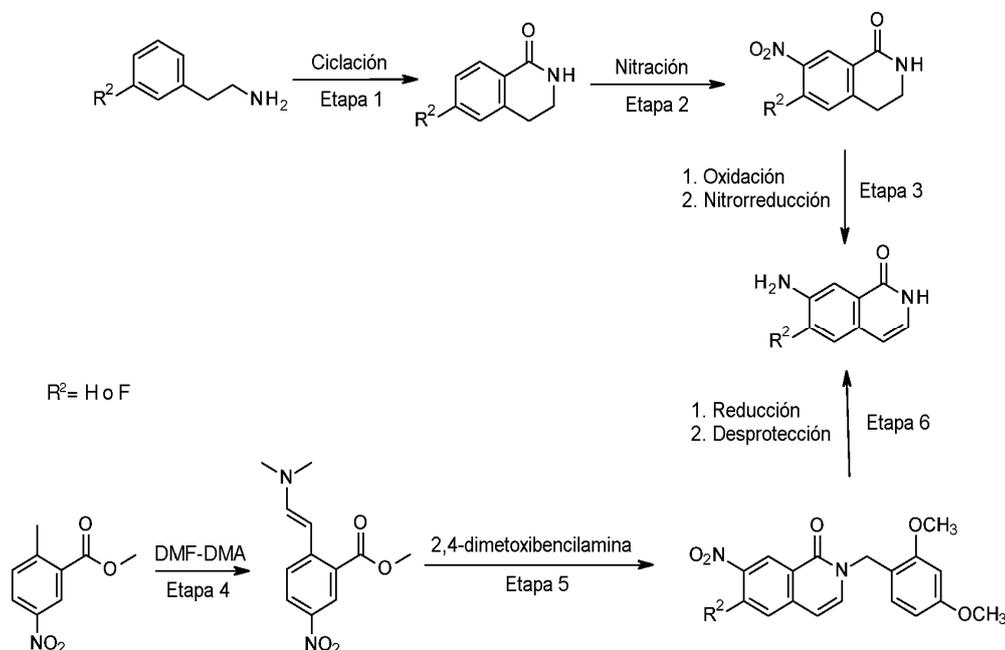
Protective Groups in Organic Synthesis", Cuarta Edición, de Peter G. M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

El compuesto de Fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, pueden prepararse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en las preparaciones y ejemplos en lo sucesivo. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las rutas descritas se pueden combinar de diferentes formas, o junto con etapas de procedimientos diferentes, para preparar compuestos de Fórmula I, o sales de los mismos. El producto de cada etapa puede recuperarse por procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. Además, todos los sustituyentes, a menos que se indique otra cosa, son como se ha definido anteriormente.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, "ACN" se refiere a acetonitrilo; "AICAr" se refiere a 5-aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribofuranosilo; "ATIC" se refiere a 5-amino-4-imidazolecarboxamida ribonucleótido transformilasa/Inosina 5'-monofosfato ciclohidralasa; "BSA" se refiere a Albúmina de Suero Bovino; "Bu" se refiere a butilo; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIPEA" se refiere a diisopropiletilamina "DMAP" se refiere a 4-dimetilaminopiridina; "DMEM" se refiere a Medio Eagle Modificado por Dulbecco; "DMF-DMA" se refiere a 1,1-dimetoxi-N,N-dimetil-metanamina; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DTT" se refiere a ditioneitol; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminatetraacético; "ee" se refiere a exceso enantiomérico; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "Ej" se refiere a ejemplo; "F12" se refiere a medio F12 de Ham; "FBS" se refiere a Suero Fetal Bovino; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico; "HOAc" se refiere a ácido acético; "HPBCD" se refiere a hidroxipropil beta-ciclodextrina; "Cl₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce un 50 % de la máxima respuesta inhibitoria posible para ese agente; "IMP" se refiere a inosina 5'-monofosfato; "IPA" se refiere a alcohol isopropílico o isopropanol; "min" se refiere a minuto o minutos; "IPTG" se refiere a isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido; "MeOH" se refiere a metanol o alcohol metílico; "MTBE" se refiere a metil *tert*-butil éter; "Ni-NTA" se refiere a níquel-ácido nitrilotriacético; "PBS" se refiere a Solución Salina Tamponada con Fosfato; "Prep" se refiere a preparación; "psi" se refiere a libras por pulgada cuadrada; "QD" se refiere a una dosificación una vez al día; "RPMI" se refiere a Roswell Park Memorial Institute; "T_r" se refiere al tiempo de retención; "SCX" se refiere a cromatografía de intercambio de cationes fuertes; "SFC" se refiere a cromatografía de fluidos supercríticos; "SEM" se refiere a error típico de la media; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Esquema 1

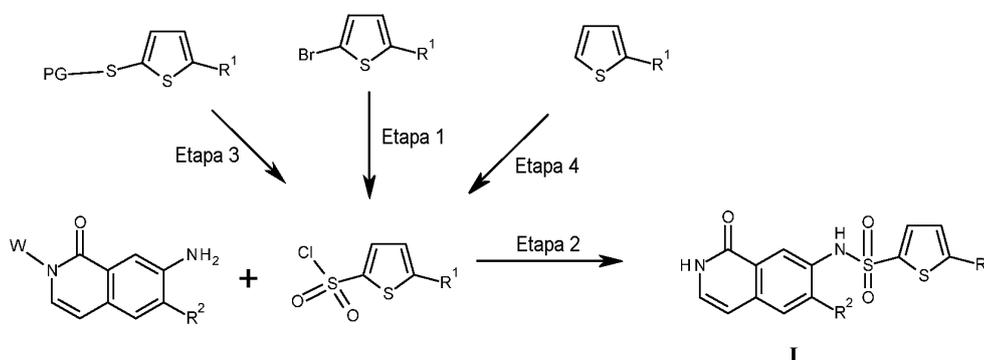


35 R² es como se ha definido anteriormente para la Fórmula I. Como se ilustra en el Esquema 1, la síntesis de la isoquinolin-1-ona comienza con la ciclación de Friedal-Crafts de una fenetilamina o 3-fluoro fenetilamina usando trifosgeno y adición gota a gota de una base orgánica tal como trietilamina con agitación seguido de la adición de un ácido de Lewis tal como tricloruro de aluminio para dar el producto de la Etapa 1. En la Etapa 2, la nitración en la posición 7 avanza en condiciones bien conocidas en la técnica, usando un ácido inorgánico tal como ácido sulfúrico y la adición en porciones de nitrato potásico. La Etapa 3 implica oxidación usando un gran exceso de dióxido de manganeso, aproximadamente 18 equivalentes, en dicloroetano con calentamiento a aproximadamente 120 °C para dar la 7-nitro-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona 6-sustituida o no sustituida. La reducción subsiguiente del grupo nitro

puede avanzar en una diversidad de condiciones conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, la hidrogenación mediada por paladio en un disolvente aprótico polar tal como MeOH a una presión de aproximadamente 50 psi y aproximadamente 60 °C da la 7-amino-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona 6-sustituída o no sustituida, (Etapa 3).

- 5 En una preparación alternativa (Esquema 1, Etapa 4), se hace reaccionar DMF-DMA con 2-metil-5-nitro-benzoato de metilo en un disolvente aprótico polar tal como acetona y calentando a aproximadamente 90-100 °C para dar un 2-[2-dimetilamino]vinil]-5-nitro-benzoato de metilo como el producto de la Etapa 4. En la Etapa 5, este intermedio se cicla usando 2,4-dimetoxibencilamina en un disolvente no polar tal como tolueno con calentamiento a aproximadamente 90-100 °C, dando 7-amino-(6-sustituída o no sustituida-2-(2,4-dimetoxibencil)isoquinolin-1(2H)-ona. El grupo nitro puede reducirse como se ha descrito anteriormente en la Etapa 3 o, como alternativa, mediante la adición de polvo de cinc en una solución de MeOH y agua aproximadamente 1:1 con cloruro de amonio y calentando a aproximadamente 40-80 °C, proporcionando 7-amino-2-(2,4-dimetoxibencil)-(6-fluoro o no sustituida)-isoquinolin-1-ona. La retirada del grupo protector 2,4-dimetoxibencilo puede completarse como se muestra en la Etapa 6 o en una etapa posterior en la síntesis usando condiciones bien conocidas en la técnica tales como con TFA o HBr en agua con calentamiento a aproximadamente 80-95 °C.

Esquema 2



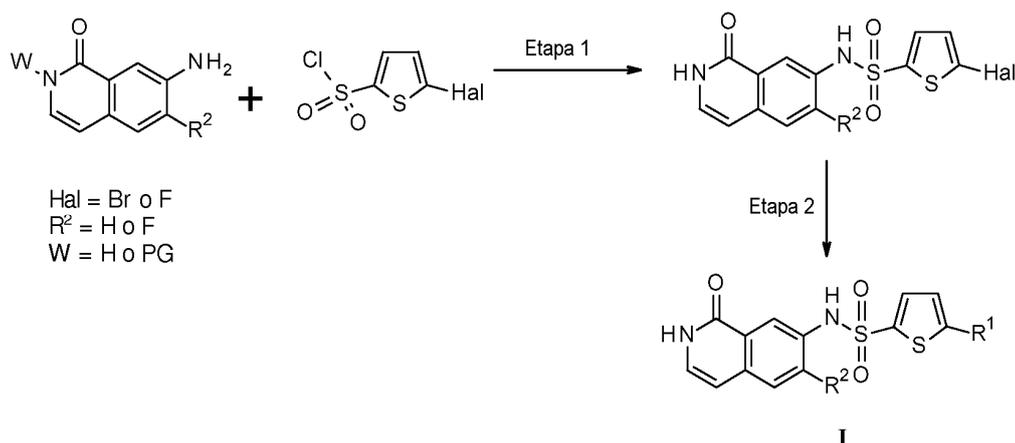
R¹ = Hal o como se ha definido anteriormente para la Fórmula I; Hal es Br o F

R² = H o F

20 W = H o PG; PG es un grupo protector

El Esquema 2 ilustra la preparación y el acoplamiento de cloruro de tiofeno-2-sulfonilo 5-sustituido con isoquinolin-1(2H)-ona protegida para dar los compuestos de sulfonamida de Fórmula I cuando R¹ es como se define para la Fórmula I. Según sea necesario para generar el cloruro de sulfonilo intermedio necesario, puede tratarse 5-bromotiofeno 2-sustituido con butil-litio en un disolvente aprótico polar tal como THF a -78 °C y después tratarse con dióxido de azufre y cloruro de sulfurilo (Etapa 1). Este intermedio puede añadirse a la 7-amino-2H-isoquinolin-1-ona en un disolvente tal como DCM y una base orgánica tal como piridina para dar compuestos de Fórmula I de la Etapa 2. Si se usa isoquinolin-1(2H)-ona protegida, el grupo protector puede retirarse con un ácido tal como TFA. Otras alternativas implican preparar el producto de la Etapa 1 a partir de un tiofeno 2-sustituido con ácido clorosulfúrico o ácido clorosulfúrico y pentacloruro de fósforo, (Etapa 4), y a partir de un tiofeno 5-sulfanil-2-sustituido protegido con 1,3-dicloro-5,5-dimetilhidantoína (Etapa 3).

Esquema 3



En una preparación alternativa como se muestra en el Esquema 3, el acoplamiento de cloruro de tiofeno-2-sulfonilo 5-halo-sustituido con isoquinolin-1(2H)-ona protegida o no protegida proporciona intermedios de sulfonamida útiles. Esto se efectúa a través de la reacción de la amina con cloruro de 5-halo-tiofeno-2-sulfonilo en presencia de una base orgánica tal como piridina, con o sin un disolvente tal como DCM a 0 °C a temperatura ambiente para dar el producto intermedio de sulfonamida de la Etapa 1. El producto intermedio de la Etapa 1 también se ilustra como que tiene retirado el grupo protector opcional, tal como con TFA. El producto intermedio de la Etapa 1 puede alquilarse adicionalmente en condiciones de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura con un ácido borónico apropiado. El experto reconocerá que hay una diversidad de condiciones útiles para facilitar tales reacciones de acoplamiento cruzado. Por consiguiente, un reactivo de paladio adecuado incluye cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) con triciclohexilfosfina, cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio (II), tetraquistrifenilfosfina de paladio o acetato de paladio (II). Una base adecuada incluye carbonato de cesio, carbonato sódico, carbonato potásico o fosfato potásico tribásico monohidrato. Las reacciones pueden calentarse a una temperatura de aproximadamente 100-150 °C en un disolvente no polar tal como dioxano.

Como alternativa, la aminación mediada por cobre de los productos de 5-bromo-tiofeno de la Etapa 1, puede realizarse usando bromuro de cobre, una base orgánica, hidroxiprolina, una amina apropiada y una base inorgánica tal como carbonato de cesio o carbonato potásico en un disolvente aprótico polar tal como DMSO y calentando a aproximadamente 100 °C, para producir compuestos de Fórmula I en la Etapa 2. Un ejemplo de acoplamiento adicional puede realizarse a través de una reacción de SnAr sobre los intermedios de la Etapa 1, en la que Hal es flúor, usando una base orgánica tal como piridina y/o DIPEA, una amina apropiada y calentando a aproximadamente 100 °C para dar compuestos de Fórmula I. En cualquier caso, cuando W es PG, el grupo protector se retira con un ácido tal como TFA.

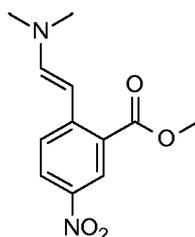
En una etapa opcional, puede formarse una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I por reacción de un compuesto de Fórmula I con una base farmacéuticamente aceptable apropiada en un disolvente adecuado en condiciones convencionales. La formación de tales sales es bien conocida y apreciada en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, y col., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); Gould, P. L., "Salt selection for basic drugs", International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin, R. J., y col. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); y Berge, S. M., y col., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977). Un experto en la materia apreciará que un compuesto de Fórmula I se convierte fácilmente en, y puede aislarse como, una sal farmacéuticamente aceptable, tal como sal de sodio, de potasio, de calcio o de magnesio.

Preparaciones y ejemplos

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Preparación 1

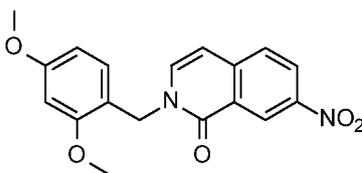
2-[(E)-2-(Dimetilamino)vinil]-5-nitro-benzoato de metilo



Añadir 2-metil-5-nitro-benzoato de metilo (1,79 kg, 9,17 mol) a acetona (16 l). Añadir DMF-DMA (1,83 kg, 15,4 mol). Agitar la mezcla resultante a 95-100 °C durante 16 horas. Enfriar a 20-25 °C y verter la mezcla en agua (48 l) con agitación para formar una pasta. Filtrar el sólido y lavar la torta con agua. Suspender el sólido con agua (2 x 16 l) y filtrar el sólido. Secar el sólido al aire durante dos días para dar el compuesto del título en bruto como un sólido de color rojo (2,42 kg, 105 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,72 (1H, d, J = 2,4 Hz), 8,06 (1H, dd, J = 9,2, 2,8 Hz), 7,46 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,21 (1H, d, J = 13,6 Hz), 6,42 (1H, d, J = 13,2 Hz), 3,92 (3H, s), 3,02 (6H, s).

Preparación 2

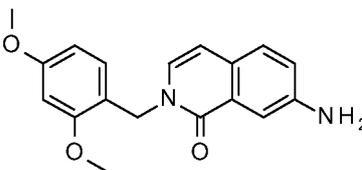
2-(2,4-Dimetoxibencil)-7-nitroisoquinolin-1(2H)-ona



- 5 Añadir 2-[(E)-2-(dimetilamino)vinil]-5-nitro-benzoato de metilo (2,4 kg en bruto, 9,65 mol), 2,4-dimetoxibencilamina (2,14 kg, 12,8 mol) y tolueno (30 l). Calentar la mezcla a 95-100 °C y agitar a esa temperatura durante 16 horas. Enfriar a 20-25 °C y recoger el sólido precipitado por filtración. Secar el sólido de color amarillo al aire durante dos días para dar el producto en bruto (2,17 kg, 66 %) que se usa sin purificación adicional. EN/EM (m/z): 341,1 (M-H).

Preparación 3

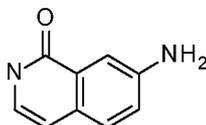
7-Amino-2-(2,4-dimetoxibencil)isoquinolin-1(2H)-ona



- 10 Añadir MeOH (10 l), agua (10 l) y cloruro de amonio (1,56 kg, 29,2 mol). Añadir 2-(2,4-dimetoxibencil)-7-nitroisoquinolin-1(2H)-ona (2 kg, 5,84 mol). Calentar la mezcla resultante a 40 °C. Después, añadir polvo de cinc (1,53 kg, 23,37 mol) a la mezcla a 40 °C. Retirar el calor. La temperatura interna aumenta a 70 °C lentamente. Calentar la reacción a 80 °C y agitar a esa temperatura durante 16 horas. Enfriar la mezcla de reacción a 15-20 °C. Filtrar la mezcla y lavar la torta con EtOAc (1 l x 2). Añadir agua (15 l) al filtrado y extraer con EtOAc (5 l x 3). Secar los extractos orgánicos combinados sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar a sequedad. Tratar el residuo resultante con MTBE/MeOH para dar el compuesto del título (942 g, 53 %). EN/EM (m/z): 311,1 (M-H).

Preparación 4

7-Aminoisoquinolin-1(2H)-ona



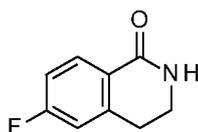
- 20 Añadir a la vez 7-amino-2-(2,4-dimetoxibencil)isoquinolin-1(2H)-ona (849 g, 2,74 mol) y TFA (5 l) para formar una mezcla de color pardo. Calentar la mezcla a 80-85 °C y agitar a esa temperatura durante 2 horas. El sólido se disuelve gradualmente y la mezcla se vuelve de color púrpura oscuro. Enfriar la mezcla de reacción a 20-25 °C. Retirar la mayoría del TFA a presión reducida. Añadir MeOH (5 l) y agitar a 40-50 °C durante 30 minutos. Filtrar la mezcla y concentrar el filtrado a sequedad. Disolver el residuo en EtOAc (5 l) y agua (5 l). Extraer la fase acuosa con EtOAc (5 l). Calentar la fase acuosa a 55-60 °C y añadir carbón activo (90 g). Agitar la mezcla a esa temperatura durante 1 hora. Filtrar la mezcla a través de tierra de diatomeas y enjuagar con agua. Enfriar el filtrado a 35 °C naturalmente y neutralizar con Na₂CO₃ sólido (153 g) a 35-40 °C a pH = 7-8. Enfriar la mezcla a 5-10 °C y agitar durante 16 horas. Recoger el sólido precipitado por filtración, lavar con agua fría y MTBE y secar al aire libre para dar el compuesto del título (260 g, 59 %). EN/EM (m/z): 161,1 (M-H).

Preparación alternativa 4

- 30 Añadir 7-amino-2-(2,4-dimetoxibencil)isoquinolin-1(2H)-ona (2,1 kg, 3,72 mol) a una solución de HBr (21 l, 40 % en H₂O). Calentar la mezcla resultante a 95 °C y agitar durante 18 horas a esa temperatura. Enfriar la reacción a 20-25 °C. Filtrar la reacción para retirar el material insoluble. Extraer el filtrado con CHCl₃/IPA (10/1, 2 x 11 l). Separar la fase orgánica. Filtrar el precipitado sólido en suspensión acuosa. Añadir la torta en CHCl₃/IPA (10/1, 11 l) y solución de HBr (1 l, 40 % en H₂O). Agitar la mezcla a 80 °C durante 2 horas. Filtrar la mezcla para dar un sólido en bruto.
- 35 Añadir el sólido en bruto a agua (1 l) y ajustar el pH a 7-8 con solución de NaOH 10 M. Filtrar el sólido y secar en horno a 40 °C durante 24 horas para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (475 g, 44 %). EN/EM (m/z): 161,1 (M+H).

Preparación 5

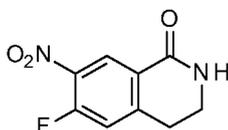
6-Fluoro-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona



- 5 Añadir una solución de 2-(3-fluorofenil)etanamina (1 kg, 7,18 mol) en DCM (2 l) a una solución de trifosgeno (852,4 g, 2,87 mol) en DCM (5 l) en un baño de hielo. Después, añadir gota a gota trietilamina (2 l, 14,36 mol). Agitar la solución resultante durante 2 horas y filtrar a través de tierra de diatomeas y lavar con DCM. Añadir el filtrado en una suspensión de AlCl_3 (3,82 kg, 28,72 mol) en DCM (6 l) a 0 °C. Dejar que la solución resultante se caliente a temperatura ambiente y agitar durante 18 horas. Inactivar la reacción mediante la adición de agua y después HCl al 10 %. Recoger la capa orgánica por separación de fases y extraer la capa acuosa con DCM. Lavar las capas de DCM combinadas con una solución saturada de bicarbonato sódico y solución de salmuera, secar sobre Na_2SO_4 , concentrar al vacío, y purificar sobre gel de sílice eluyendo con éter de petróleo / EtOAc = 2:1 para dar el compuesto del título (474,73 g, 40 %). RMN ^1H (400 MHz CDCl_3) δ 8,05-8,09 (m, 1 H), 7,02-7,04 (m, 1), 6,90-6,92 (m, 1 H), 6,77 (s a, 1 H), 3,55-3,59 (m, 2 H), 2,97-3,00 (t, 2 H).

Preparación 6

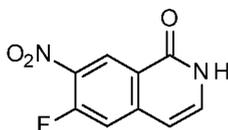
6-Fluoro-7-nitro-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona



- 15 Enfriar una solución de 6-fluoro-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona (1 kg, 6,06 mol) en H_2SO_4 (10 l) a 0 °C y añadir KNO_3 (643 g, 6,36 mol) en porciones. Agitar la mezcla resultante en un baño de hielo durante 2 horas. Verter la mezcla en hielo-agua y filtrar el sólido. Lavar el sólido con agua y secar al vacío a 50 °C durante una noche para dar el compuesto del título (1,18 kg, 93 %). RMN ^1H (400 MHz DMSO) δ 8,43-8,45 (d, 1 H), 8,26 (s a, 1 H), 7,59-7,62 (d, 1 H), 3,39-3,43 (m, 2 H), 3,01-3,04 (m, 2 H).

20 Preparación 7

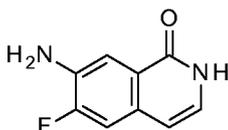
6-Fluoro-7-nitroisoquinolin-1(2H)-ona



- 25 Añadir MnO_2 (4,136 kg, 47,60 mol) a una solución de 6-fluoro-7-nitro-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona (1 kg, 4,76 mol) en dicloroetano (10 l) y calentar la mezcla a 120 °C durante 5 horas. Añadir MnO_2 (2,068 kg, 23,8 mol) y agitar la mezcla durante una noche. Añadir MnO_2 adicional (1,241 kg, 14,28 mol) y agitar la reacción durante una noche. Enfriar la mezcla a aproximadamente 80 °C, filtrar sobre tierra de diatomeas, y enjuagar con DMSO (5 x). Concentrar el filtrado para retirar el dicloroetano y verter la solución de DMSO en agua. Filtrar el sólido de color amarillo precipitado, lavar con agua y secar para obtener el compuesto del título (446 g, 45 %). RMN ^1H (400 MHz MeOD) δ 8,98-9,00 (d, 1 H), 7,62-7,65 (d, 1 H), 7,38-7,40 (d, 1 H), 6,68-6,70 (d, 1 H).

30 Preparación 8

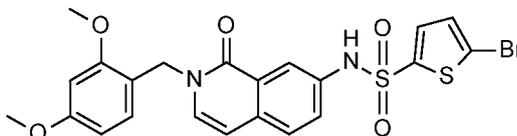
7-Amino-6-fluoroisoquinolin-1(2H)-ona



- 35 Añadir a un recipiente una mezcla de paladio al 10 % sobre carbono cuidadosamente humectado (20 g, 0,18 mol) en MeOH (1,5 l) y 6-fluoro-7-nitroisoquinolin-1(2H)-ona (100 g, 0,48 mol). Sellar el recipiente y purgar tres veces con H_2 . Agitar la mezcla resultante bajo 50 psi de H_2 durante 2,5 horas a 60 °C. Filtrar la mezcla, enjuagar repetidamente con MeOH y concentrar a sequedad. Suspender el residuo en MTBE, filtrar, enjuagar con MTBE y secar para dar el compuesto del título (81,2 g, 95 %) en forma de un sólido de color pardo. RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ 10,88 (s a, 1 H), 7,49-7,51 (d, 1 H), 7,25-7,29 (d, 1 H), 6,85-6,88 (m, 1 H), 6,32-6,34 (d, 1 H), 5,52 (s a, 2 H).

Preparación 9

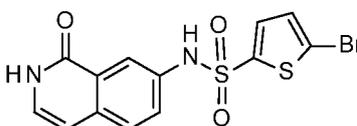
5-Bromo-N-[2-(2,4-dimetoxibencil)-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il]tiofeno-2-sulfonamida



5 Añadir piridina (78,2 ml, 966 mmol) y cloruro de 5-bromotiofeno-2-sulfonilo (69,53 g, 266 mmol) a una solución de 7-amino-2-(2,4-dimetoxibencil)isoquinolin-1(2H)-ona (75 g, 241,6 mmol) en DCM (750 ml) a 0 °C. Agitar la solución resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Añadir agua (500 ml) para precipitar un sólido oscuro. Filtrar la mezcla y lavar el sólido con agua (3x300 ml) y MTBE, secar al vacío para dar el compuesto del título (91 g, 70 %). EN/EM (m/z) (⁷⁹Br/⁸¹Br) 535/537 [M+H]⁺.

Preparación 10

5-Bromo-N-(1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



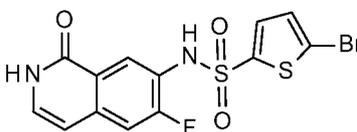
10 Calentar a 80 °C una solución de 5-bromo-N-[2-(2,4-dimetoxibencil)-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il]tiofeno-2-sulfonamida (50 g, 93,38 mmol) en TFA (100 ml) durante 3 horas. Dejar calentar a temperatura ambiente. Disolver el residuo en THF (60 ml) y añadir amoníaco (60 ml) cuidadosamente. Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una noche. Filtrar el sólido en suspensión, lavar con EtOAc, secar y recoger. Lavar el filtrado con NaHCO₃ acuoso saturado y separar las dos fases. Extraer la fase acuosa con una mezcla 9:1 de CHCl₃/IPA (4 x 250 ml) y combinar los extractos orgánicos, secar y evaporar a sequedad. Triturar el residuo en una mezcla 9:1 de MTBE/IPA hasta que precipita un sólido de color pardo claro. Filtrar el sólido, lavar con MTBE, secar y recoger el sólido. Concentrar el filtrado y purificar en una columna de gel de sílice (ACN/CH₂Cl₂ 1:1) para obtener producto adicional. Triturar los tres sólidos en una mezcla 1:1 de ACN/CH₂Cl₂. Filtrar los sólidos combinados, lavar con IPA, secar y recoger el sólido para dar el compuesto del título (24,5 g, 68 %). EN/EM (m/z) (⁷⁹Br/⁸¹Br) 385/387 [M+H]⁺.

Preparación alternativa 10

25 Añadir 7-aminoisoquinolin-1(2H)-ona (15,1 g, 94,27 mmol), cloruro de 5-bromotiofeno-2-sulfonilo (26,2 g, 97,10 mmol) y piridina (45,7 ml, 565,63 mmol) a DCM (500 ml). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. Diluir la mezcla con agua y acidificar con HCl 5 N a un pH de aproximadamente 4. Agitar durante 10 minutos. Filtrar el precipitado resultante, enjuagar con agua, éter y secar el sólido. Suspender el precipitado en MeOH y añadir NH₃/EtOH para disolverlo. Agitar la solución con carbón activado, filtrar sobre tierra de diatomeas y evaporar el filtrado. Suspender el sólido obtenido en acetona, filtrar y secar el sólido para dar el compuesto del título (24 g, 66 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido. EN/EM (m/z) (⁷⁹Br/⁸¹Br) 385/387 [M+H]⁺.

30 Preparación 11

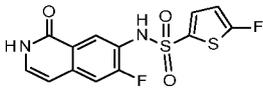
5-Bromo-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



35 Añadir cloruro de 5-bromotiofenosulfonilo (54,48 g, 202,06 mmol) en porciones a una solución de 7-amino-6-fluoroisoquinolin-1(2H)-ona (30 g, 168 mmol) en piridina (210 ml). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Diluir la mezcla con DCM (120 ml) y agua (210 ml). Acidificar la mezcla con HCl concentrado hasta un pH de aproximadamente 6. Filtrar el sólido precipitado, lavar con agua (2 x), HCl 1 N, agua (3 x) y MTBE, secar y recoger el sólido para dar el compuesto del título (53,6 g, 79 %). EN/EM (m/z) (⁷⁹Br/⁸¹Br) 403/405 [M+H]⁺.

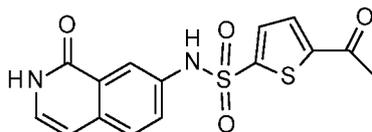
40 Preparar los siguientes compuestos esencialmente por el procedimiento de la Preparación 11 usando el cloruro de sulfonilo apropiado, enfriando la reacción a 0 °C y tratando al lavar con NaOH (1 N) y extraer con EtOAc seguido de acidificación y tratamiento como en la Preparación 11.

Tabla 1

N.º de Prep	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
12	5-Fluoro-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		343

Preparación 13

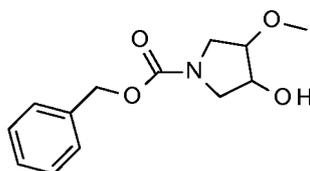
5-Acetil-N-(1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



- 5 Disolver 5-bromo-N-(1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (0,5 g, 1,3 mmol) en THF (20 ml) y enfriar la mezcla resultante bajo atmósfera de nitrógeno en un baño de hielo seco/acetona. Añadir lentamente butil-litio (1,6 M en hexanos, 2,9 ml, 4,64 mmol) y agitar con refrigeración durante aproximadamente 40 minutos tras lo cual se forma una suspensión. Después, añadir N-metoxi-N-metil-acetamida (0,17 g, 1,64 mmol) en THF (2 ml, 24,6 mmol) y dejar que la mezcla se caliente a 0 °C. Inactivar la mezcla de reacción con hielo/agua, ajustar el pH a
- 10 aproximadamente 5 y extraer la mezcla con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0-10 % de MeOH-NH₃/DCM para dar el compuesto del título de 50 % de pureza (0,52 g, 115 %) que se usa sin purificación adicional. EN/EM (m/z): 347 (M-H).

Preparación 14

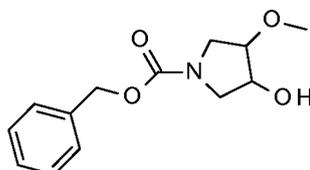
trans Bencil-3-hidroxi-4-metoxi-pirrolidina-1-carboxilato racémico



- 15 Combinar trans-4-metoxipirrolidin-3-ol racémico; clorhidrato (1,02 g, 6,64 mmol) con carbonato sódico (1,5 g, 14,15 mmol) y una mezcla de THF (20 ml, 245,8 mmol) y agua (20 ml, 1,11 mmol) y enfriar la mezcla en un baño de hielo. Añadir cloroformiato de bencilo (1,3 ml, 8,81 mmol) y agitar la mezcla bajo atmósfera de nitrógeno al tiempo que se calienta a temperatura ambiente. Después de la compleción, diluir la reacción con agua y extraer la mezcla acuosa con EtOAc. Secar los extractos combinados sobre Na₂SO₄ y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0-5 % de MeOH/DCM para dar el compuesto del título (1,68 g, 100 %) en forma de un aceite espeso. EN/EM (m/z): 252 (M-H).
- 20

Preparación 15

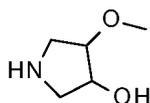
cis Bencil-3-hidroxi-4-metoxi-pirrolidina-1-carboxilato racémico



- 25 Disolver cis bencil-3-metoxi-4-(4-nitrobenzoil)oxi-pirrolidina-1-carboxilato racémico (1,80 g, 4,5 mmol) en MeOH (10 ml, 245,8 mmol), añadir amoniaco/MeOH (2 M, 50 ml, 100 mmol) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas. Concentrar la mezcla a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con THF al 0-10 %/DCM para dar el compuesto del título (0,945 g, 84 %) en forma de un aceite espeso. EN/EM (m/z): 252 (M-H).
- 30

Preparación 16

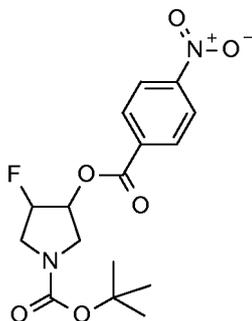
cis-4-Metoxipirrolidin-3-ol



- 5 Combinar cis bencil-3-hidroxi-4-metoxi-pirrolidina-1-carboxilato racémico (0,93 g, 3,7 mmol) con una mezcla de negro de paladio (0,023 g, 0,22 mmol) y paladio al 5 % sobre carbono (0,105 g, 0,099 mmol) en THF (20 ml) y MeOH (20 ml) y agitar bajo atmósfera de hidrógeno (345 kPa) a temperatura ambiente durante 4 horas. Filtrar la mezcla de reacción a través de tierra de diatomeas y lavar con etanol. Concentrar el filtrado a presión reducida para dar el compuesto del título (0,493 g, 113 %) en forma de un aceite espeso. EN/EM (m/z): 118 (M+H)

Preparación 17

cis [4-[(1-*terc*-Butoxicarbonil-4-fluoro-pirrolidin-3-il)oxicarbonilfenil]azinato



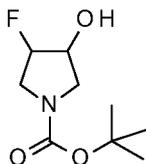
- 10 Añadir azodicarboxilato de diisopropilo (9,66 ml, 48,7 mmol) a una solución enfriada en baño de hielo (0 °C) de (3R,4R)-3-fluoro-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (5,0 g, 24,4 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (8,14 g, 48,7 mmol) y trifetilfosfina (12,8 g, 48,7 mmol) en THF (100 ml) y agitar durante 2 horas. Dejar que la reacción se caliente a temperatura ambiente y agitar durante 18 horas. Añadir una solución saturada de bicarbonato sódico para inactivar la reacción, extraer con EtOAc y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar a presión reducida para producir un aceite. Purificar el aceite a través de cromatografía de fase normal sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 25 %-hexanos para dar un sólido de color blanco con arrastre de impurezas (10,7 gramos, 124 %). CL/EM m/e 299 [M+1]⁺ - *t*-butilo. Aunque se inicia con reactivo quiral, la pureza quiral no se mantuvo a través de esta o subsiguientes preparaciones o ejemplos usando el compuesto de la Preparación 17.
- 15
- 20 Preparar el siguiente compuesto esencialmente por el procedimiento de la Preparación 17 usando trans bencil-3-hidroxil-4-metoxi-pirrolidina-1-carboxilato racémico.

Tabla 2

Prep. N.º	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
18	cis Bencil-3-metoxi-4-(4-nitrobenzoil)oxi-pirrolidina-1-carboxilato racémico		401

Preparación 19

3-Fluoro-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxilato de cis *terc*-butilo

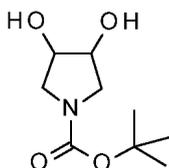


- 25 Añadir hidróxido sódico (2 N, 6 0 ml) a una solución enfriada en baño de hielo (0 °C) de [4-[(3S,4R)-1-*terc*-butoxicarbonil-4-fluoro-pirrolidin-3-il]oxicarbonilfenil]azinato (10,7 gr, 30,2 mmol) en THF (50 ml). Agitar durante 2 horas a 0 °C. Concentrar a presión reducida hasta dar un aceite. Purificar el aceite a través de cromatografía de fase

normal sobre gel de sílice, eluyendo con MTBE al 50 %-hexanos (detección a 2 214 nm) para dar un aceite transparente (2,72 g, 43,9 %). RMN ¹H (399,81 MHz, d₆-DMSO) δ 5,37 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 4,95-4,81 (m, 1H), 4,20-4,18 (m, 1H), 3,48-3,41 (m, 3H), 2,99-2,91 (m, 1H), 1,35 (d, J = 1,2 Hz, 9H). Aunque se inicia con reactivo quiral, la pureza quiral no se mantuvo a través de esta o subsiguientes preparaciones o ejemplos usando el compuesto de la Preparación 19.

5

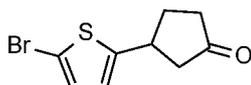
Preparación 20

Cis, 3,4-Dihidroxipirrolidina-1-carboxilato de meso-*terc*-butilo

10 Añadir N-metilmorfolina-N-óxido (1,98 gramos, 14,2 mmol) a una solución de 2,5-dihidropirrol-1-carboxilato de *terc*-butilo (2,0 gramos, 11,8 mmol), tetraóxido de osmio (0,04 M, 5,93 ml, 0,47 mmol) en acetona (50 ml) y agua (10 ml). Agitar durante 18 horas a temperatura ambiente. Concentrar la reacción a presión reducida y extraer la fase acuosa con EtOAc. Concentrar los extractos orgánicos a presión reducida. Purificar el aceite a través de cromatografía de fase normal, eluyendo con hexanos hasta 80 % de (5 % de MeOH-THF)-20 % de hexanos para dar el compuesto del título (0,51 gramos, 21,2 %). CL/EM m/e 202 [M-H]⁻

15 Preparación 21

3-(5-Bromo-2-tienil)ciclopentanona



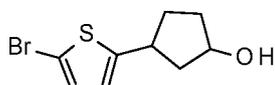
20 Añadir butil-litio 2,5 M (12,2 ml, 17,7 mmol) a una solución enfriada (-78 °C) de 2,5-dibromotiofeno (2 ml, 97,3 mmol) en THF y mantener la temperatura a -70 °C. Dejar que la reacción se caliente a -60 °C y después enfriar de vuelta a -78 °C. Añadir bromuro de cinc (4,98 g, 22,12 mmol) en forma de un sólido. Calentar la reacción a -10 °C después enfriar a -78 °C. Añadir 2-ciclopenten-1-ona (1,85 ml, 22,12 mmol), gota a gota y agitar durante 5 minutos a -78 °C; después añadir clorotrimetilsilano (2,93 ml, 23,0 mmol), gota a gota. Dejar que la reacción se caliente a temperatura ambiente y agitar durante 18 horas. Añadir HCl 1 N (100 ml) para inactivar la reacción, extraer con EtOAc y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar a presión reducida para dar un aceite de color rojo. Purificar el aceite a través de cromatografía de fase normal, eluyendo con THF al 30 %-hexanos para dar un aceite transparente (2,90 gramos, 11,82 mmol, 66,8 %). RMN ¹H (399,81 MHz, d₆-DMSO) δ 7,04 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 6,78 (dd, J = 1,0, 3,7 Hz, 1H), 3,62-3,59 (m, 1H), 2,60-2,55 (m, 1H), 2,35-2,32 (m, 4H), 1,93-1,85 (m, 1H).

25 Preparar el siguiente compuesto esencialmente por el procedimiento de la Preparación 21 usando acetato de (2-oxociclopent-3-en-1-ilo) en lugar de 2-ciclopenten-1-ona (Preparación 25).

Prep. N.º	Nombre químico	Estructura	CG EN/EM (m/z) (M+1)
22	Acetato de (2-oxociclopent-3-en-1-ilo)		(⁷⁹ Br/ ⁸¹ Br) 302/304

30 Preparación 23

3-(5-Bromo-2-tienil)ciclopentanol

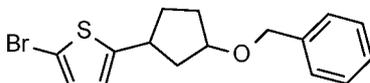


35 Añadir borohidruro sódico (0,254 g, 6,73 mmol) a una suspensión de 3-(5-bromo-2-tienil)ciclopentanona (0,55 g, 2,24 mmol) en dioxano (20 ml). Añadir MeOH (2 ml), gota a gota, y agitar durante 1 hora. Añadir MeOH (aproximadamente 20 ml), gota a gota, para inactivar la reacción. Concentrar la reacción a presión reducida. Purificar a través de cromatografía de fase normal sobre gel de sílice, eluyendo con THF al 35 %-hexanos para dar un aceite

trasparente (0,325 gramos, 58,6 %). RMN ^1H (399,81 MHz, d_6 -DMSO) δ 6,98-6,96 (m, 1H), 6,68 (td, $J = 3,6, 0,8$ Hz, 1H), 4,62 (d, $J = 4,1$ Hz, 0,7H), 4,55-4,54 (m, 0,3H), 4,23-4,19 (m, 0,3H), 4,17-4,10 (m, 0,7H), 3,47-3,43 (m, 0,3H), 3,21-3,13 (m, 0,7H), 2,32-2,27 (m, 0,7H), 2,15-2,12 (m, 0,3H), 1,99-1,93 (m, 1,3H), 1,75-1,69 (m, 3,9H).

Preparación 24

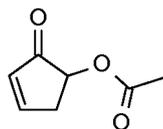
5 2-(3-Benciloxiciclopentil)-5-bromo-tiofeno



Añadir bromuro de bencilo (1,22 ml, 10,2 mmol) y yoduro sódico (0,25 g, 1,70 mmol) a una solución de 3-(5-bromo-2-tienil)ciclopentanol (2,1 g, 8,5 mmol) en THF (100 ml). Enfriar la reacción a 0 °C. Después de 5 minutos, añadir hidruro sódico (60 %, 0,41 gramos, 10,2 mmol) a la reacción y calentar a temperatura ambiente. Añadir DMF para ayudar a la solubilidad. Calentar a 50 °C durante 1 hora, añadir cloruro de amoniaco saturado para inactivar la reacción y extraer con EtOAc y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar a presión reducida para dar un aceite. Purificar el aceite a través de cromatografía de fase normal sobre gel de sílice, eluyendo con THF al 25 %-hexanos para dar un aceite de color amarillo transparente (1,3 g, 45,4 %). RMN ^1H (399,81 MHz, d_6 -DMSO) δ 7,33-7,28 (m, 5H), 6,99-6,97 (m, 1H), 6,72-6,69 (m, 1H), 4,41 (d, $J = 2,6$ Hz, 2H), 4,09-4,05 (m, 1H), 3,45-3,37 (m, 0,3H), 3,25-3,18 (m, 0,7H), 2,42-2,37 (m, 0,7H), 2,20-1,78 (m, 5,3H).

Preparación 25

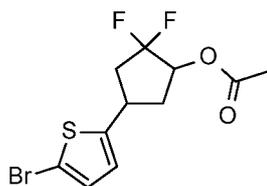
Acetato de (2-oxociclopent-3-en-1-ilo)



Añadir tetraacetato de plomo (11,7 g, 26,4 mmol) a una solución de 2-ciclopenten-1-ona (2 ml, 23,9 mmol) en benceno (100 ml), en un recipiente cerrado herméticamente. Calentar a 80 °C durante 72 horas. Enfriar a temperatura ambiente, filtrar sobre una capa de gel de sílice y lavar con DCM. Concentrar a presión reducida para dar un aceite de color pardo. Purificar el aceite por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con hexanos hasta THF al 25 %-hexanos para dar un aceite transparente (1,42 g, 42,3 %). RMN ^1H (399,80 MHz, CDCl_3) δ 7,65 (ddd, $J = 6,1, 3,0, 2,5$ Hz, 1H), 6,25 (dt, $J = 6,1, 2,1$ Hz, 1H), 5,11 (dd, $J = 3,1, 6,9$ Hz, 1H), 3,19-3,16 (m, 1H), 2,63-2,57 (m, 1H), 2,13 (d, $J = 0,5$ Hz, 3H).

Preparación 26

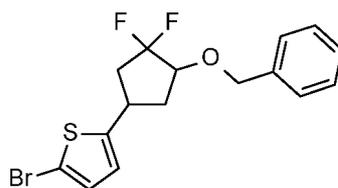
Acetato de [4-(5-bromo-2-tienil)-2,2-difluoro-ciclopentilo]



Añadir trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre (2,6 ml, 11,7 mmol) a una solución de acetato de [4-(5-bromo-2-tienil)-2-oxo-ciclopentilo] (1,18 g, 3,89 mmol) en DCM (50 ml). Agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Añadir una solución saturada de bicarbonato sódico para inactivar la reacción, agitar durante 15 minutos al tiempo que la reacción desprende gas después extraer con DCM y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar a presión reducida para producir un aceite de color pardo. Purificar el aceite por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con THF al 20 %-hexanos para dar un aceite transparente (0,77 g, 60,8 %). CG/EM m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 324/326 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Preparación 27

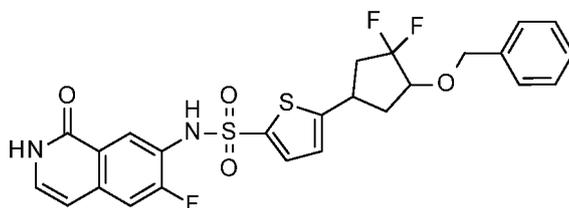
2-(4-Benciloxi-3,3-difluoro-ciclopentil)-5-bromo-tiofeno



5 Añadir carbonato potásico (0,85 g, 6,15 mmol) a una solución de acetato de [4-(5-bromo-2-tienil)-2-oxo-ciclohexilo] (1,0 g, 3,06 mmol) en MeOH (100 ml) y agitar a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas. Retirar el disolvente y secar el residuo al vacío. Añadir bromuro de bencilo (0,4 ml, 3,4 mmol) a una solución del residuo en THF (100 ml) y agitar la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Diluir la reacción con EtOAc, añadir solución de cloruro de amonio saturada para inactivar la reacción, retroextraer la fase acuosa con DCM y secar los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar a presión reducida para producir un aceite de color pardo. Purificar el aceite por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con THF al 20 %-hexanos para dar un aceite trasparente (1,0 g, 87,1 %). CG/EM *m/e* (⁷⁹Br/⁸¹Br) 372/374 [M+H]⁺.

10 Preparación 28

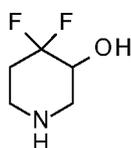
5-(4-Benciloxi-3,3-difluoro-ciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiófeno-2-sulfonamida



15 Añadir butil-litio 2,5 M (2,5 ml, 6,2 mmol) mediante una bomba de jeringa a una solución enfriada (-78 °C) de 2-(4-benciloxi-3,3-difluoro-ciclopentil)-5-bromotiófeno (2,1 g, 5,63 mmol) en THF (75 ml) y mantener una temperatura de al menos -70 °C. Agitar a -78 °C durante 1 hora y añadir a una solución saturada recién preparada de dióxido de azufre en THF (50 ml) a -78 °C (preparada por burbujeo en gas a través de un tubo rociador a -78 °C) a través de una cánula y mantener una temperatura de al menos -70 °C. Agitar la reacción durante 1 hora a -78 °C, después añadir cloruro de sulfurilo (1,4 ml, 16,9 mmol), gota a gota. Dejar que la reacción se caliente a temperatura ambiente y agitar durante 18 horas. Inactivar la reacción con HCl 2 N (100 ml), añadir cloruro sódico sólido para saturar la solución y extraer con MTBE. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar a presión reducida para dar un aceite espeso de color pardo que se disuelve en DCM (50 ml). A través de un embudo de goteo, añadir la solución de color pardo a una solución enfriada a 0 °C de 7-amino-6-fluoroisoquinolin-1-(2H)-ona (1,0 g, 5,63 mmol) en DCM (20 ml) y piridina (50 ml). Agitar la reacción durante 36 horas a temperatura ambiente. Concentrar a presión reducida para producir un aceite. Purificar el aceite por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 90 % de (10 % de MeOH-EtOAc)-10 % de hexanos para dar un sólido de color naranja (1,49 g, 49,5 %). EM (*m/z*): 535 (M+H)

Preparación 29

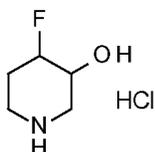
4,4-Difluoropiperidin-3-ol racémico



30 Para la preparación de 4,4-difluoropiperidin-3-ol racémico, véase Synlett 2009, N.º 12, 1933-1936 y las referencias en ese documento.

Preparación 30

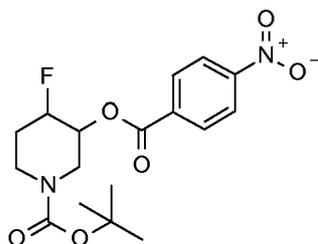
racémico, Clorhidrato de trans-4-fluoropiperidin-3-ol



Añadir HCl (57,0 ml, 228 mmol; 4 M en dioxano) a una solución de *trans-terc*-butil-4-fluoro-3-hidroxi-piperidina-1-carboxilato racémico (5 g, 22,8 mmol) en MeOH (50 ml). Agitar durante 16 horas a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida para dar el compuesto del título (3,7 g, 100 %): RMN ¹H (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,54-9,52 (m, 2H), 6,15-6,14 (m, 1H), 4,66-4,52 (m, 1H), 3,92-3,86 (m, 1H), 3,15 (d, J = 12,0 Hz, 2H), 2,97-2,82 (m, 2H), 2,22-2,15 (m, 1H), 1,94-1,85 (m, 1H).

Preparación 31

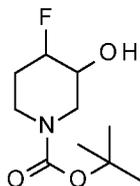
racémico, 4-Fluoro-3-(4-nitrobenzoil)oxi-piperidina-1-carboxilato de *cis-terc*-butilo



Añadir azodicarboxilato de diisopropilo (8,66 ml, 42,8 mmol) gota a gota a una mezcla de *trans*-4-fluoro-3-hidroxi-piperidina-1-carboxilato racémico (4,84 g, 21,4 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (7,3 g, 42,8 mmol) y trifetilfosfina (11,3 g, 42,8 mmol) en THF (150 ml) a 0 °C. Agitar la mezcla al tiempo que se calienta gradualmente a temperatura ambiente durante 16 horas. Inactivar con bicarbonato sódico acuoso saturado y extraer con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua, salmuera, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con acetona al 15-25 %/hexanos para dar el compuesto del título (4,4 g, 56 %). EN/EM (m/z): 391 (M+23).

Preparación 32

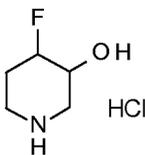
racémico, 4-Fluoro-3-hidroxipiperidina-1-carboxilato de *cis-terc*-butilo



Añadir hidróxido de litio acuoso 2 N (24 ml, 48 mmol) a una solución de 4-fluoro-3-(4-nitrobenzoil)oxi-piperidina-1-carboxilato de *cis-terc*-butilo racémico (4,4 g, 12 mmol) en THF (100 ml). Agitar durante 1 hora, diluir con agua y extraer con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a presión reducida para dar el compuesto del título (2,78 g, 100 %). EN/EM (m/z): 241 (M+23).

Preparación 33

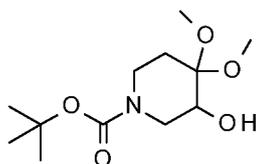
racémico, Clorhidrato de *cis*-4-fluoropiperidin-3-ol



Añadir HCl (31,7 ml, 127 mmol; 4 N en dioxano) a una solución de 4-fluoro-3-hidroxipiperidina-1-carboxilato de *cis-terc*-butilo racémico (2,78 g, 12,7 mmol) en MeOH (100 ml) y agitar durante 16 horas. Concentrar a presión reducida para dar un residuo. Triturar el residuo en éter dietílico: MeOH (10:1), filtrar el precipitado, enjuagar con éter dietílico y secar para dar el compuesto del título (1,6 g, 81 %). RMN ¹H (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,65-8,99 (m, 2H), 6,17-6,15 (m, 1H), 4,88-4,74 (m, 1H), 4,04-3,97 (m, 1H), 3,08-2,96 (m, 4H), 2,15-2,02 (m, 2H).

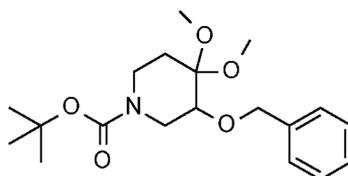
Preparación 34

3-Hidroxi-4,4-dimetoxi-piperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo



- 5 Preparar 3-hidroxi-4,4-dimetoxi-piperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo de acuerdo con el documento WO2009033581. Disolver hidróxido potásico (7,040 g, 125,47 mmol) en MeOH (150 ml) y enfriar a 0 °C. Tratar con *N-terc*-butoxicarbonil-4-piperidona (10 g, 50,19 mmol) y agitar 15 minutos antes de la adición de una solución de yodo (15,286 g, 60,23 mmol) en MeOH (200 ml) gota a gota. Agitar a 0 °C durante 1 hora después retirar el baño de refrigeración y agitar durante 1 hora. Concentrar al vacío. Mezclar con tolueno y filtrar. Concentrar a sequedad para dar el compuesto del título (13,1 g (99 %) en forma de un aceite que se usa sin purificación adicional.

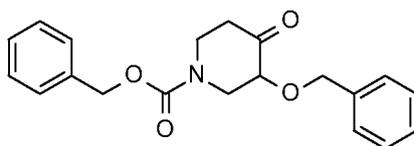
Preparación 35

3-Benciloxi-4,4-dimetoxi-piperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo

- 10 Mezclar hidruro sódico (612,222 mg, 15,31 mmol) con THF (25 ml) y enfriar a 0 °C. Añadir una solución de 3-hidroxi-4,4-dimetoxi-piperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (2 g, 7,65 mmol) en THF (10 ml). Agitar a 0 °C durante 10 minutos antes de la adición de bromuro de bencilo (2,618 g, 15,31 mmol). Agitar a temp ambiente durante 2 horas. Añadir yoduro de benciltrimetilamonio (0,2 g, 0,72 mmol) y continuar agitando 16 horas. Verter en una mezcla de EtOAc (200 ml) y salmuera (100 ml). Separar las capas, secar la capa orgánica sobre MgSO₄, y concentrar hasta dar 3,5 g de aceite. Someter a cromatografía en cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con hexanos y EtOAc 70/30 para dar el compuesto del título en forma de un aceite (2,52 g, 93 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,43 (s, 9H), 1,67-1,79 (m, 1H), 1,8-1,97 (m, 1H), 2,71-2,89 (m, 1H), 2,9-3,09 (m, 1H), 3,3 (s, 3H), 3,13 (s, 3H), 3,38-3,49 (m, 1H), 4,01-4,3 (m, 2H), 4,37-4,5 (m, 1H), 4,85-4,73 (m, 1H), 7,2-7,4 (m, 5H)

20 Preparación 36

3-Benciloxi-4-oxo-piperidina-1-carboxilato de bencilo



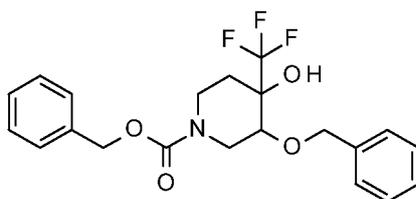
- 25 Mezclar 3-benciloxi-4,4-dimetoxi-piperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (14,56 g, 41,43 mmol) con TFA (25 ml) y H₂O (0,1 ml). Agitar a temperatura ambiente 50 horas. Concentrar hasta dar un aceite. Mezclar con H₂O (25 ml) y agitar a temp ambiente durante 1 hora. Concentrar al vacío con calentamiento mínimo hasta dar un aceite viscoso de color ámbar. Diluir con DCM (150 ml) y enfriar a 0 °C. Añadir cloroformiato de bencilo (10,601 g, 62,14 mmol) seguido de DIPEA (16,064 g, 124,29 mmol) gota a gota. Agitar 16 horas, lavar HCl 1 N (3 x 100 ml) y secar sobre MgSO₄. Concentrar a sequedad y purificar por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con hexanos y acetato de etilo 70/30 para dar el compuesto del título en forma de un aceite (13,86 g, 98 %). EN/EM (m/z): 357 (M-H).

30 Preparación 37

3-Benciloxi-4-hidroxi-4-(trifluorometil)piperidina-1-carboxilato de bencilo racémico, Diastereómero 1

Preparación 38

3-Benciloxi-4-hidroxi-4-(trifluorometil)piperidina-1-carboxilato de bencilo racémico, Diastereómero 2



Mezclar 3-benciloxi-4-oxo-piperidina-1-carboxilato de bencilo (2,6 g, 7,66 mmol) con THF (30 ml) y enfriar a 10 °C en atmósfera de N₂. Añadir (trifluorometil)trimetilsilano (1,634 g, 11,49 mmol) seguido de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M (13,835 g, 15,32 mmol) en THF gota a gota. Agitar a 10 °C durante 30 minutos, después retirar el baño de refrigeración y agitar a temp ambiente. Después de 1 hora, añadir fluoruro de tetrabutilamonio 1 M (4 ml) en THF y agitar durante 10 minutos. Inactivar la reacción con salmuera (50 ml) y separar las capas. Extraer la capa acuosa con EtOAc (50 ml) y combinar con la capa de THF original. Secar sobre MgSO₄ y concentrar a sequedad. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con hexanos EtOAc 70/30 para recuperar los compuestos del título en forma de aceites. Diastereómero 1 (1 g, 31 %), EN/EM (m/z): 410 (M-H). Diastereómero 2 (1 g, 31 %), EN/EM (m/z): 410 (M-H).

Preparación 39

4-(Trifluorometil)piperidina-3,4-diol racémico, Diastereómero 1



Mezclar 3-benciloxi-4-hidroxi-4-(trifluorometil)piperidina-1-carboxilato de bencilo, Diastereómero 1 (1,5 g, 3,66 mmol), paladio sobre carbono al 10 % (1 g), MeOH (25 ml) y ácido acético (10 ml). Agitar a temperatura ambiente al tiempo que se burbujea H₂ en la mezcla durante 16 horas. Filtrar y concentrar al vacío. Mezclar con tolueno y reconcentrar hasta dar un aceite para recuperar 0,85 g de una película oleosa. Disolver en MeOH, eluir sobre un cartucho SCX de 10 g y lavar con 1 volumen de columna de MeOH. Eluir el producto con NH₃ 2 M en MeOH. Concentrar para dar el compuesto del título en forma de un sólido (0,6 g, 88 %). RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1,36-1,48 (m, 1H), 1,57-1,65 (m, 1H), 1,8-1,97 (m, 1H), 2,2 (s a, 1H), 2,4-2,5 (m, 1H), 2,52-2,7 (m, 2H), 3,5-3,6 (m, 1H), 4,8 (s a, 1H), 5,3 (s a, 1H)

Preparar los siguientes compuestos esencialmente por el procedimiento de la Preparación 39.

Tabla 3

Prep. N.º	Nombre químico	Estructura	RMN
40	racémico, 4-(Trifluorometil)piperidina-3,4-diol, Diastereómero 2		(d ₆ -DMSO) δ 1,3-1,39 (m, 1H), 1,75-1,89 (m, 1H), 2,53-2,71 (m, 3H), 2,85-2,93 (m, 1H), 3,37 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 4,8 (s a, 1H), 5,8 (s a, 1H)

Preparación 41

4,4-Difluoro-3,5-dihidroxi-piperidina-1-carboxilato de cis, meso-*terc*-butilo, Isómero 1

Preparación 42

racémico, 4,4-Difluoro-3,5-dihidroxi-piperidina-1-carboxilato de trans-*terc*-butilo, Isómero 2

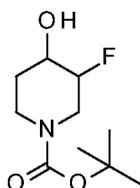
Añadir carbonato de cesio (3,13 g, 9,61 mmol) a una solución enfriada con hielo de ciclohexano-1,3-diona (1,00 g, 4,69 mmol) en ACN (30 ml) a 0 °C y agitar. Después de 15 minutos, añadir 1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octano bis(tetrafluoroborato) (Selectfluor™, 3,99 g, 11,26 mmol). Después de 30 minutos, retirar

el baño de refrigeración y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de 2 horas, filtrar y concentrar a presión reducida. Disolver el residuo en EtOAc, extraer con ácido clorhídrico acuoso 1 N, lavar con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Disolver el residuo en una mezcla de THF (50 ml) y etanol (25 ml). Enfriar a 0 °C en un baño de hielo. Añadir borohidruro sódico (887 mg, 23,5 mmol). Después de 30 min, retirar el baño de refrigeración y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, inactivar la reacción con solución de cloruro de amonio acuosa saturada. Retirar la mayoría de los disolventes a presión reducida. Disolver el residuo con EtOAc, extraer con agua y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 0-100 %/hexanos para dar una mezcla 3:1 del isómero 1 y el isómero 2 (0,43 g, 36 %) (27 % de rendimiento del isómero 1 y 9 % de rendimiento del isómero 2). RMN ¹⁹F (376 MHz, d₄-CD₃OD) δ -121,8 (d, 1F, J = 240 Hz, isómero 1), -126,5 (dd, 2F, J = 570, 240 Hz, Isómero 2), -142,0 (d, 1F, J = 240 Hz, Isómero 1). Usar sin purificación adicional.

Preparación 43

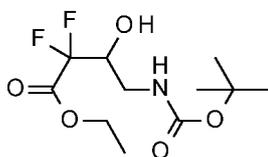
racémico, 3-Fluoro-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato de *trans*-*terc*-butilo

15 Preparación 44

racémico, 3-Fluoro-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato de *cis*-*terc*-butilo

Añadir borohidruro sódico (1,20 g, 31,7 mmol) a una solución enfriada con hielo de 3-fluoro-4-oxopiperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (4,5 g, 19,68 mmol) en MeOH (50 ml) a 0 °C. Después de 15 minutos, retirar el baño de refrigeración y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de 45 minutos, inactivar la reacción con solución de cloruro de amonio acuosa saturada. Retirar la mayoría de los disolventes a presión reducida. Disolver el residuo con EtOAc, extraer con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 20-100 %/hexanos para dar 3-fluoro-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato de *trans*-*terc*-butilo racémico (0,75 g, 17 %): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,34 (ddd, 0,5H), 4,20 (ddd, 0,5H), 4,06 (s a, 1H), 3,86-3,76 (m, 2H), 3,12 (s a, 1H), 3,06 (s a, 1H), 2,98 (ddd, 1H), 2,00-1,92 (m, 1H), 1,56-1,46 (m, 1H), 1,44 (s, 9H); y 3-fluoro-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato de *cis*-*terc*-butilo racémico (2,55 g, 59 %): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,66 - 4,57 (m, 0,5H), 4,55-4,45 (m, 0,5H), 4,00-3,78 (m, 2H), 3,70 (s a, 1H), 3,32 (s a, 1H), 3,10 (s a, 1H), 2,85 (s, 1H), 1,84 - 1,74 (m, 1H), 1,71 (s a, 1H), 1,44 (s, 9H).

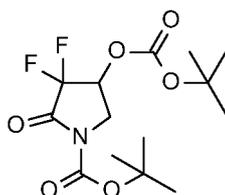
30 Preparación 45

4-((*terc*-Butoxicarbonil)amino)-2,2-difluoro-3-hidroxiutanoato de etilo

Añadir indio (8,66 g, 75,4 mmol) a una solución de 2-bromo-2,2-difluoroacetato de etilo (9,67 ml, 75,4 mmol) y (2-oxoetil)carbamato de *terc*-butilo (10,0 g, 62,8 mmol) en THF (300 ml). Calentar la mezcla a 55 °C durante 16 horas y enfriar a temperatura ambiente. Inactivar la reacción con solución de cloruro de amonio acuosa saturada. Retirar la mayoría de los disolventes a presión reducida. Disolver el residuo en EtOAc, extraer con solución de HCl acuosa 1 N, agua y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Usar el material en bruto (17,8 g, 62,8 mmol) sin purificación adicional: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,05 (s a, 1H), 4,37 (c, 2H), 4,25-4,08 (m, 2H), 3,60-3,50 (m, 1H), 3,48-3,33 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,37 (t, 3H).

40 Preparación 46

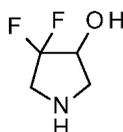
4-((*terc*-Butoxicarbonil)oxi)-3,3-difluoro-2-oxipirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo



- 5 Añadir solución de HCl 4,0 M en dioxano (100 ml) a 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2,2-difluoro-3-hidroxi-butanoato de etilo en bruto (17,8 g, 62,8 mmol). Después de 2 horas, retirar todos los disolventes a presión reducida. Disolver el residuo en ACN (75 ml). Añadir trietilamina (75 ml). Después de 17 horas, añadir DMAP (0,65 g, 5,3 mmol) y dicarbonato de di-*tert*-butilo (30,2 ml, 138 mmol). Después de 2 horas, retirar los disolventes a presión reducida. Añadir agua y salmuera al residuo. Extraer con hexanos/EtOAc 1:1. Combinar los extractos orgánicos, lavar con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (6,50 g, 31 %): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,28-5,21 (m, 1H), 4,05 (dd, 1H), 3,88-3,80 (m, 1H), 1,57 (s, 9H), 1,53 (s, 9H).

10 Preparación 47

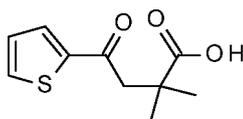
4,4-Difluoropirrolidin-3-ol



- 15 Añadir solución de HCl 4,0 M en dioxano (200 ml) a 4-((*tert*-butoxicarbonil)oxi)-3,3-difluoro-2-oxopirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (6,00 g, 17,8 mmol). Después de 8 horas, retirar los disolventes a presión reducida. Disolver el residuo en THF (150 ml) y enfriar la mezcla de reacción a 0 °C en un baño de hielo. Añadir una solución al 60 % en peso de hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio en tolueno (Red-Al™, 17,4 ml, 88,9 mmol). Después de 30 min, retirar el baño de refrigeración y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de 3 horas, enfriar la mezcla de reacción a 0 °C en un baño de hielo. Inactivar la reacción con sulfato sódico decahidrato. Retirar el baño de refrigeración y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Después de 30 minutos, retirar por filtración los sólidos, lavar con THF y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0 a 10 % de solución de amoníaco 7 M en MeOH/DCM para dar el compuesto del título (1,80 g, 82 %). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 4,12-3,98 (m, 1H), 3,36-3,23 (m, 1H), 3,22-3,02 (m, 2H), 2,90-2,75 (m, 1H).

Preparación 48

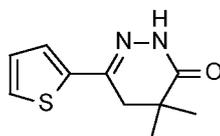
- 25 Ácido 2,2-dimetil-4-oxo-4-(2-tienil)butanoico



- 30 Añadir tricloruro de aluminio (3,12 g, 23,4 mmol) a una solución enfriada con hielo de tiofeno (7,77 ml, 97,56 mmol) y 3,3-dimetiltetrahydrofurano-2,5-diona (2,50 g, 19,5 mmol) en DCM (60 ml) a 0 °C. Dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente lentamente. Después de 16 horas, enfriar la mezcla de reacción a 0 °C en un baño de hielo. Inactivar con solución de HCl acuoso 2 N. Extraer con DCM. Combinar todas las capas orgánicas, lavar con agua y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar el compuesto del título (4,15 g, 19,5 mmol) que se usa sin purificación adicional. EN/EM (m/z): 214 (M-H).

Preparación 49

5,5-Dimetil-3-(2-tienil)-1,4-dihidropiridazin-6-ona

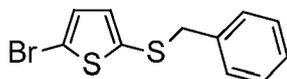


- 35 Añadir hidrazina (15 ml, 468 mmol) a una solución de ácido 2,2-dimetil-4-oxo-4-(2-tienil)butanoico en bruto (4,15 g, 19,5 mmol) en IPA (60 ml). Calentar la mezcla a 110 °C durante 17 horas y enfriar a temperatura ambiente. Retirar los disolventes a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel

de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 100 %/hexanos para dar el compuesto del título (0,65 g, 16 %): RMN ¹H (400 MHz, d₆-DMSO) δ 10,8 (s, 1H), 7,61 (dd, 1H), 7,46 (dd, 1H), 7,11 (dd, 1H), 2,86 (s, 2H), 1,09 (s, 6H).

Preparación 49a

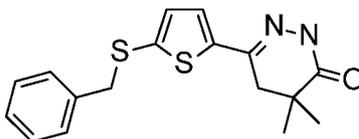
2-Bencilsulfanil-5-bromo-tiofeno



5 Añadir N-bromosuccinimida (232,6 g, 1,30 mol) en una porción a una solución de 2-bencilsulfaniltiofeno (321 g, 1,48 mol) en DCM (1,9 l) a 0 °C. Retirar el baño de refrigeración y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Filtrar la mezcla y enjuagar el sólido con MTBE (2 x 50 ml). Concentrar el filtrado al vacío. Suspender el residuo en MTBE (1 l) durante 30 minutos. Filtrar el sólido y enjuagar con MTBE (2 x 100 ml). Lavar el filtrado con hielo/agua (200 ml) y salmuera (200 ml). Secar la fase orgánica (MgSO₄), filtrar y concentrar al vacío para dar el compuesto del título (390 g, 99 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,3-7,2 (3H, m), 7,2-7,1 (2H, m), 6,86 (1H, d, J = 3,9 Hz), 6,67 (1H, d, J = 3,9 Hz), 3,92 (2H, s).

Preparación 49b

6-[5-(Bencilsulfanil)tiofeno-2-il]-4,4-dimetil-4,5-dihidropiridazin-3(2H)-ona

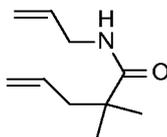


15 Añadir cloruro de isopropilmagnesio (44 ml, 88,3 mmol, 2,0 M en THF) gota a gota a una solución de 2-bencilsulfanil-5-bromo-tiofeno (22,9 g, 80,3 mmol) en THF (230 ml) a temperatura ambiente y agitar durante 30 minutos. Añadir la solución mediante una cánula a una solución de 2,2-dimetilanhídrido succínico (11,5 g, 88,3 mmol) en THF (115 ml) a -78 °C. Agitar a -78 °C durante 15 minutos y dejar que la mezcla se caliente gradualmente a temperatura ambiente. Retirar el baño de refrigeración y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Añadir MTBE (200 ml) y lavar con HCl 1 N (100 ml). Separar las dos fases y extraer la fase acuosa con MTBE (2 x 50 ml). Secar los extractos orgánicos combinados (MgSO₄), filtrar y concentrar al vacío hasta dar un sólido de color pardo. Suspender el sólido en una mezcla 4:1 de hexano/MTBE, triturar y filtrar el sólido. Lavar el sólido de color gris con hexano, secar y recoger para obtener el ácido 4-(5-bencilsulfanil-2-tienil)-2,2-dimetil-4-oxo-butanoico intermedio (18,7 g, 70 %). EN/EM (m/z): 335 (M-H).

20 Disolver ácido 4-(5-bencilsulfanil-2-tienil)-2,2-dimetil-4-oxo-butanoico (18,7 g, 55,9 mmol) en 2-propanol (187 ml) y añadir monohidrato de hidrazina (4,15 ml, 83,9 mmol). Agitar la mezcla a 80 °C durante una noche. Dejar que la mezcla se caliente a temperatura ambiente y evaporar el disolvente a sequedad. Suspender el residuo de color amarillo en MTBE. Filtrar el sólido de color amarillo brillante, lavar con MTBE y secar para dar el compuesto del título (16 g, 87 %). EN/EM (m/z): 331 (M-H).

Preparación 50

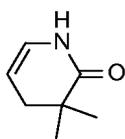
N-Alil-2,2-dimetil-pent-4-enamida



35 Añadir DIPEA (4,08 ml, 23,4 mmol) a una solución de ácido 2,2-dimetilpent-4-enoico (2,00 g, 15,6 mmol), prop-2-en-1-amina (1,76 ml, 23,4 mmol), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (4,49 g, 23,4 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (12 % de agua, 3,16 g, 23,4 mmol) en DCM (150 ml). Después de 5 horas, añadir EtOAc. Extraer con solución de HCl acuosa 1 N y salmuera. Secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (2,20 g, 90 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,90-5,67 (m, 3H), 5,20-5,01 (m, 4H), 3,88 (t, 2H), 2,29 (d, 2H), 1,19 (s, 6H).

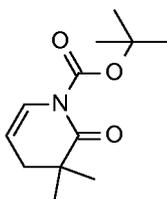
Preparación 51

3,3-Dimetil-1,4-dihidropiridin-2-ona



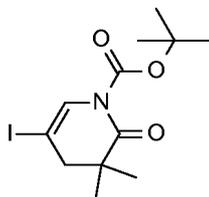
- 5 Añadir (1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(fenilmetil-eno)(triciclohexilfosfina)rutenio (catalizador de Grubbs, 2^a generación, 0,51 g, 0,60 mmol) a una solución de N-alil-2,2-dimetil-pent-4-enamida (2,00 g, 12,0 mmol) en tolueno (50 ml). Desgasificar la mezcla de reacción burbujeando con nitrógeno durante 10 min. Calentar la mezcla a 105 °C durante 5 horas y enfriar a temperatura ambiente. Concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (1,05 g, 70 %). EN/EM (m/z): 126 (M-H).

Preparación 52

3,3-Dimetil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo

- 10 Añadir DMAP (0,10 g, 0,84 mmol) y dicarbonato de di-*tert*-butilo (3,85 ml, 16,8 mmol) a una solución de 3,3-dimetil-1,4-dihidropiridin-2-ona (1,05 g, 8,39 mmol) en ACN (40 ml). Después de 1 hora, retirar los disolventes a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 25 %/hexanos para dar el compuesto del título (1,80 g, 95 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,78-6,70 (m, 1H), 5,18-5,09 (m, 1H), 2,20-2,15 (m, 2H), 1,53 (s, 9H), 1,22 (s, 6H).

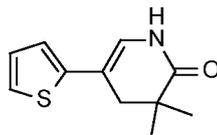
Preparación 53

5-Yodo-3,3-dimetil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo

- 20 Añadir N-yodosuccinimida (1,45 g, 6,46 mmol) a una solución de 3,3-dimetil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo (0,97 g, 4,31 mmol) en dimetilformamida (21,5 ml). Después de 17 horas, inactivar la reacción con solución de tiosulfato sódico acuosa saturada y agua. Extraer con éter. Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua y salmuera. Secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (0,95 g, 63 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,20-7,17 (m, 1H), 2,61 (d, 2H), 1,55 (s, 9H), 1,27 (s, 6H).

Preparación 54

3,3-Dimetil-5-(tiofen-2-il)-3,4-dihidropiridin-2(1H)-ona

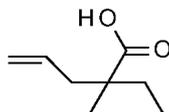


- 30 Añadir solución de bromuro de 2-tienilcinc 0,5 M en THF (10,8 ml, 5,4 mmol) a una solución de 5-yodo-3,3-dimetil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo (950 mg, 2,71 mmol) y [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (N), complejar con DCM (221 mg, 0,27 mmol) en THF (20 ml). Desgasificar la mezcla de reacción burbujeando con nitrógeno durante 10 minutos. Calentar la mezcla a 60 °C durante 17 horas y enfriar a temperatura ambiente. Inactivar con solución de HCl acuosa 2 N y agitar vigorosamente. Diluir con EtOAc. Separar la capa orgánica y lavar con solución de HCl acuosa 1 N, agua y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de

silíce, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (450 mg, 80 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,41 (s a, 1H), 7,12 (dd, 1H), 6,99 (dd, 1H), 6,91 (dd, 1H), 6,59 (d, 1H), 2,60 (d, 2H), 1,28 (s, 6H).

Preparación 55

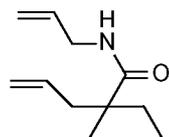
5 Ácido 2-etil-2-metilpent-4-enoico racémico



Añadir solución de *n*-butil-litio 2,5 M en hexanos (28,8 ml, 72,0 mmol) a una solución enfriada con hielo seco/acetona de diisopropilamina (10,56 ml, 75 mmol) en THF (100 ml) a -78°C . Después de 15 min, calentar la mezcla de reacción a 0°C en un baño de hielo. Después de 30 min, añadir ácido 2-metilbutanoico (3,28 ml, 30 mmol). Después de 15 min, retirar el baño de refrigeración y calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Después de 1 hora, enfriar la mezcla de reacción a 0°C en un baño de hielo. Añadir yoduro de alilo (3,01 ml, 33 mmol) y hexametilfosforamida (3,00 ml, 17,2 mmol). Dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente lentamente durante una noche. Después de 16 horas, inactivar la reacción con solución de cloruro de amonio acuosa saturada. Retirar la mayoría de los disolventes a presión reducida. Disolver el residuo en EtOAc, extraer con solución de HCl acuosa 1 N, agua y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar el producto del título (6,09 g, 30 mmol) que se usa sin purificación adicional: RMN ^1H (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 12,10 (s a, 1H), 5,78-5,64 (m, 1H), 5,10-5,00 (m, 2H), 2,33-2,08 (m, 2H), 1,60-1,33 (m, 2H), 1,01 (s, 3H), 0,80 (t, 3H).

Preparación 56

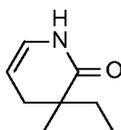
N-Alil-2-etil-2-metil-pent-4-enamida racémica



Añadir clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (8,63 g, 45,0 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (12 % de agua, 6,08 g, 45,0 mmol) a una solución de ácido 2-etil-2-metilpent-4-enoico racémico en bruto (6,09 g, 30 mmol) en DCM (200 ml). Añadir prop-2-en-1-amina (3,38 ml, 45,0 mmol) y DIPEA (7,85 ml, 45,0 mmol). Después de 4 horas, añadir más DCM. Extraer con solución de HCl acuosa 1 N y salmuera. Secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (2,20 g, 40 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,93 (s a, 1H), 5,85-5,59 (m, 2H), 5,17-4,94 (m, 4H), 3,86-3,80 (m, 2H), 2,37 (dd, 1H), 2,09 (dd, 1H), 1,73-1,59 (m, 1H), 1,45-1,34 (m, 1H), 1,08 (s, 3H), 0,80 (t, 3H).

Preparación 57

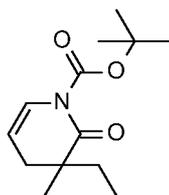
30 3-Etil-3-metil-1,4-dihidropiridin-2-ona racémica



Añadir (1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(fenilmetil-eno)(triciclohexilfosfina)rutenio (catalizador de Grubbs, 2ª generación, 0,47 g, 0,55 mmol) a una solución de N,4-dialiltetrahidropiran-4-carboxamida (2,00 g, 11,0 mmol) en tolueno (60 ml). Desgasificar la mezcla de reacción burbujeando con nitrógeno durante 5 minutos. Calentar la mezcla a 100°C durante 5 horas y enfriar a temperatura ambiente. Concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (1,10 g, 72 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,71 (s a, 1H), 6,10-5,98 (m, 1H), 5,07-5,00 (m, 1H), 2,31-2,20 (m, 1H), 2,16-2,07 (m, 1H), 1,70-1,52 (m, 2H), 1,14 (s, 3H), 0,90 (t, 3H).

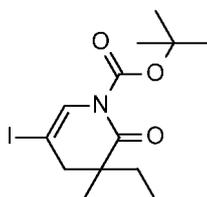
Preparación 58

40 3-Etil-3-metil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo racémico



- 5 Añadir DMAP (100 mg, 0,79 mmol) y dicarbonato de di-*tert*-butilo (3,63 ml, 15,8 mmol) a una solución de 3-etil-3-metil-1,4-dihidropiridin-2-ona (1,10 g, 7,90 mmol) en ACN (40 ml). Después de 2 horas, retirar los disolventes a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (2,00 g, 95 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,76-6,69 (m, 1H), 5,14-5,06 (m, 1H), 2,24-2,18 (m, 2H), 1,82-1,68 (m, 2H), 1,54 (s, 9H), 1,18 (s, 3H), 0,89 (t, 3H).

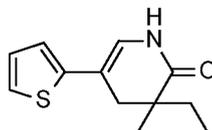
Preparación 59

3-Etil-5-yodo-3-metil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo racémico

- 10 Añadir N-yodosuccinimida (1,52 g, 6,77 mmol) a una solución de 3-etil-3-metil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo (1,20 g, 4,51 mmol) en dimetilformamida (23 ml). Después de 17 horas, inactivar la reacción con solución de tiosulfato sódico acuosa saturada y agua. Extraer cuatro veces con éter. Combinar todos los extractos orgánicos y lavar con agua y salmuera. Secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 20 %/hexanos para dar el compuesto del título (1,15 g, 70 %). EN/EM (m/z): 366 (M-H).

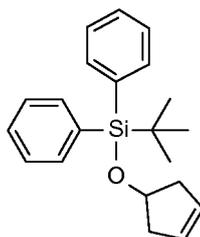
Preparación 60

3-Etil-3-metil-5-(2-tienil)-1,4-dihidropiridin-2-ona racémica



- 20 Añadir solución de bromuro de 2-tienilcinc 0,5 M en THF (4,38 ml, 2,19 mmol) a una solución de 3-etil-5-yodo-3-metil-2-oxo-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo (400 mg, 1,10 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II), complejar con DCM (89 mg, 0,11 mmol) en THF (11 ml). Desgasificar la mezcla de reacción burbujeando con nitrógeno durante 10 minutos. Calentar la mezcla a 60 °C durante 18 horas y enfriar a temperatura ambiente. Inactivar con solución de HCl acuosa 2 N y agitar vigorosamente. Diluir con EtOAc. Separar la capa orgánica y lavar con solución de HCl acuosa 1 N, agua y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc de 0 a 50 %/hexanos para dar el compuesto del título (180 mg, 74 %). EN/EM (m/z): 222 (M-H).

Preparación 61

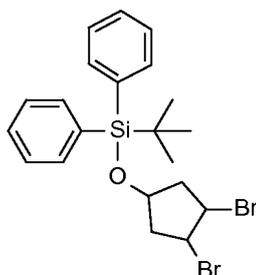
tert-Butil-ciclopent-3-en-1-iloxi-difenil-silano

- 30 Añadir *tert*-butilclorodifenilsilano (36,66 g, 133,38 mmol) a 3-ciclopenten-1-ol (10,2 g, 121,26 mmol) y 1H-imidazol (18,16 g, 266,77 mmol) en DMF seca (100 ml) gota a gota a -20 °C. Después de la compleción de la adición, dejar

- que la temperatura de reacción se caliente gradualmente a temperatura ambiente y agitar en una atmósfera de nitrógeno durante una noche. Añadir agua, cloruro de amonio y EtOAc a la mezcla de reacción y agitar la mezcla durante 1 hora. Separar la capa orgánica y lavar con cloruro de amonio (5 x) hasta que pH es ácido, agua (2 x) y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar el compuesto del título (40,22 g, 93 %). EN/EM (m/z): 405,2 (M+2 MeCN+H).

Preparación 62

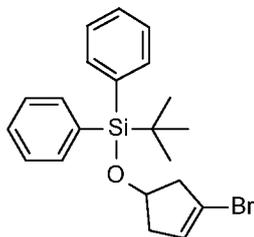
racémico, trans, *tert*-Butil-(3,4-dibromociclopentoxi)-difenil-silano



- Añadir una solución de bromo (22,23 g, 7,15 ml, 139,10 mmol) en tetracloruro de carbono (10 ml) gota a gota durante 20 minutos a una solución agitada de *tert*-butil-ciclopent-3-en-1-iloxi-difenil-silano (40,2 g, 115,92 mmol) en tetracloruro de carbono (200 ml) y etanol (0,1 ml) a -20 °C. Continuar agitando en un baño de enfriamiento durante otra hora. Verter la mezcla de reacción en bicarbonato sódico saturado. Separar la capa orgánica. Lavar la capa orgánica, extraer con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar el compuesto del título (55,19 g, 106,41 mmol, 93 %). CG-EM 425 (M-56).

15 Preparación 63

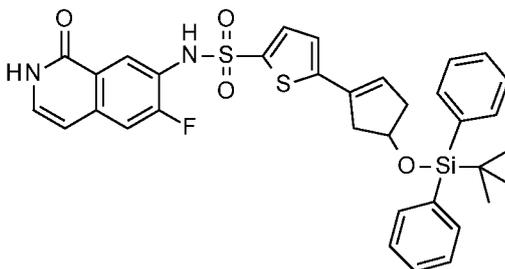
(3-Bromociclopent-3-en-1-ilo)oxi-*tert*-butil-difenil-silano racémico



- Preparar una solución madre de trans, *tert*-butil-(3,4-dibromociclopentoxi)-difenil-silano racémico (50,44 g, 104,58 mmol) en THF seco (500 ml) y dividir en dos porciones. Añadir amida sódica sólida (5,2 g, 130,5 mmol) y *tert*-butóxido sódico sólido (18 g, 188 mmol). Agitar las mezclas de color crema resultantes de cada recipiente a temperatura ambiente durante 29 horas. CG-EM muestra producto/material de partida 85:15 en el matraz uno y compleción en el matraz dos. Añadir 0,5 equivalentes adicionales de amida sódica al matraz uno y dejar agitar durante otras 24 horas. Inactivar el matraz dos con cloruro de amonio saturado, extraer con éter (3 x). Combinar los extractos orgánicos y lavar con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un aceite de color pardo. Completar el mismo tratamiento para cada reacción. Combinar ambas porciones y purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con hexano: DCM al 5 % en hexano con un gradiente de 20-50 % para dar el compuesto del título (18,45 g, 43,95 %). CG-EM (M-56) 345,1.

Preparación 64

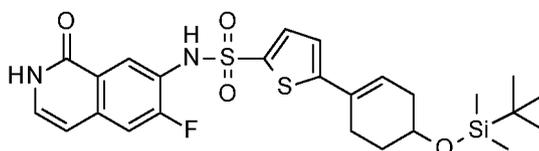
- 5-[4-[*tert*-Butil(difenil)silil]oxi]ciclopenten-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica



Añadir (3-bromociclopent-3-en-1-il)oxi-*tert*-butil-difenil-silano racémico (2,71 g, 6,75 mmol), bis(pinocolato)diboro (5,14 g, 20,25 mmol), cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio (II) (330,79 mg, 0,405 mmol), acetato potásico (4,64 g, 47,26 mmol) a 1,4-dioxano (60 ml). Calentar la mezcla de reacción a 100 °C durante 2 horas. Dejar que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente. Añadir agua y extraer con EtOAc. Secar la capa orgánica sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar el producto en bruto por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con DCM:MeOH (90:10) para dar el boronato intermedio. Combinar 5-bromo-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (2,1 g, 5,21 mmol), *tert*-butil-difenil-[3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)ciclopent-3-en-1-il]oxi-silano (3,50 g, 7,81 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (481,43 mg, 0,416 mmol) y fosfato potásico, tribásico, N-hidrato (3,57 g, 16,82 mmol) con 1,4-dioxano (10 ml) y agua (5 ml) en un vial para microondas. Colocar el vial en un iniciador Biotage y calentar a 140 °C durante 20 minutos. Añadir agua y después HCl 1 N para hacer ácida la solución. Extraer la mezcla con EtOAc (3 x). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar el material en bruto por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con DCM:MeOH (90:10) para dar el compuesto del título (210 mg, 7 %). EN/EM (m/z): 643,0 (M-H).

15 Preparación 65

5-(4-[[*tert*-Butil(dimetil)silil]oxi]ciclohex-1-en-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica



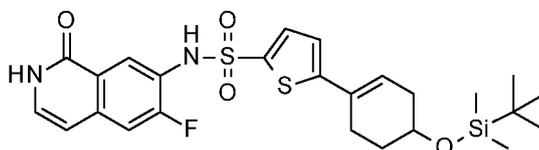
Combinar 5-bromo-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (0,6 g, 1,49 mmol), *tert*-butil-dimetil-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)ciclohex-3-en-1-il]oxi-silano (1,01 g, 2,98 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0,138 g, 0,119 mmol) y fosfato potásico, tribásico, N-hidrato (1,02 g, 4,81 mmol) con 1,4-dioxano (8 ml) y agua (4 ml) en un vial para microondas. Colocar el vial en un iniciador Biotage y calentar a 140 °C durante 20 minutos. Añadir agua y después ácido clorhídrico 1 N para hacer ácida la solución. Extraer la mezcla con EtOAc (3 x). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar una grasa de color pardo oscuro. Añadir DCM a la grasa. Después de unos pocos minutos, un sólido precipita en la solución. Filtrar el sólido para dar el compuesto del título (0,513 g, 64,5 %). EN/EM (m/z): 535,2 (M-H).

Preparación 66

5-(4-[[*tert*-Butil(dimetil)silil]oxi]ciclohex-1-en-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Preparación 67

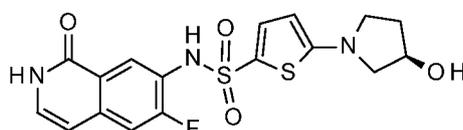
5-(4-1[[*tert*-Butil(dimetil)silil]oxi]ciclohex-1-en-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



Comenzando con 5-(4-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]ciclohex-1-en-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica (0,575 g, 1,08 mmol), separar los enantiómeros con cromatografía quiral usando Chiralpak AD-H, columna de 21x250 mm eluyendo con 30 % de IPA:70 % de CO₂ a un caudal de 70 g/min para dar la Preparación 66, Isómero 1 (0,222 g, 38 %, >99 % de ee), EN/EM (m/z): 535,0 (M+H) y Preparación 67, Isómero 2 (0,216 g, 38 %, 99 % de ee), EN/EM (m/z): 535,0 (M-H).

40 Ejemplo 1

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida



Combinar 5-bromo-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (0,59 g, 1,47 mmol), (R)-3-pirrolidinol (0,265 g, 3,04 mmol), bromuro de cobre(I) (0,052 g, 0,36 mmol), hidroxiprolina (0,10 g, 0,8 mmol) y carbonato de cesio (1,03 g, 3,16 mmol) con DMSO (8 ml) en un vial cerrado herméticamente y calentar la mezcla resultante durante una noche a 100 °C. Diluir la mezcla de reacción con agua y ajustar el pH a aproximadamente 5. Extraer la mezcla acuosa con EtOAc y seguido de DCM que contiene una pequeña cantidad de MeOH. Retirar por decantación el agua de todo sólido que contenga producto y recoger los sólidos en DCM/MeOH 50/50. Combinar y concentrar todas las fracciones orgánicas a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0-10 % de MeOH/DCM. Concentrar el material apropiado a partir de EtOAc/hexanos y secar para dar el compuesto del título (0,16 g, 27 %) en forma de un sólido de color castaño. EN/EM (m/z): 410 (M-H).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento descrito para el Ejemplo 1.

Tabla 4

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
2	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[3-hidroxipiperidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida racémica		424
3	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3S)-3-hidroxipiperidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida		424
4	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxipiperidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida		424
5	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)tiofeno-2-sulfonamida		424
6	N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[4-hidroxi-4-(trifluorometil)piperidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida		492
7	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[3-hidroxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida racémica		410
8	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3S)-3-hidroxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida		410
9	cis meso-5-(3,5-Dihidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		440,0
10	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[4-hidroxi-3,3-dimetilpirrolidin-1-il] tiofeno-2-sulfonamida racémica		438,2

(continuación)

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
11	trans N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[3-hidroxi-4-metoxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida racémica		440,0
12	trans N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[3-hidroxi-4-metoxipirrolidin-1-il] tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1		440,1
13	trans N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[3-hidroxi-4-metoxi pirrolidin-1-il] tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2		440,1
14	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(4S)-4-hidroxi-3,3-dimetilpirrolidin-1-il] tiofeno-2-sulfonamida		438,1
15	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(4R)-4-hidroxi-3,3-dimetilpirrolidin-1-il] tiofeno-2-sulfonamida		438,2
16	trans 5-[3,4-Dihidroxipirrolidin-1-il]-n-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica		425,9
17	5-[(3S,4S)-3,4-Dihidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		426,0
18	5-[(3S,4S)-3-(Dimetilamino)-4-hidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il) tiofeno-2-sulfonamida		453,0
19	5-[(3R,4R)-3,4-Dihidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		426,0
20	trans 5-[3,4-Dihidroxipiperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica		440

(continuación)

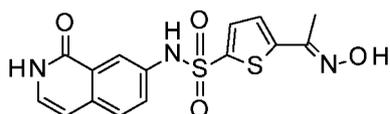
N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
21	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3S,4S)-3-hidroxi-4-(morfolin-4-il)pirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida		495

Preparación alternativa, Ejemplo 1

5 Añadir (R)-3-pirrolidinol (23,5 g, 269,9 mmol) y DIPEA (126 ml; 719,8 mmol) a una solución de 5-bromo-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (70 g, 180 mmol, 88 % de pureza) en piridina (430 ml) y calentar la mezcla resultante a 105 °C (temperatura interna) durante 5 horas. Concentrar la mezcla a alto vacío a 40 °C. Purificar el residuo a través de una capa de gel de sílice eluyendo con acetona/hexano 1:1 hasta 100 % de acetona. Suspender el material obtenido en CH₂Cl₂ (200 ml) durante 30 minutos. Filtrar el sólido precipitado, lavar con CH₂Cl₂ (2 x 100 ml), secar y recoger para dar el compuesto del título (32 g, 43 %) en forma de un sólido de color beige. EN/EM (m/z): 410 (M-H).

Ejemplo 22

10 5-[(1E)-N-Hidroxietanimidoil]-N-(1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



15 Combinar 5-acetil-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (0,5 g, 1,4 mmol) con clorhidrato de hidroxilamina (0,21 g, 3,0 mmol) en etanol (20 ml, 343,5 mmol) y calentar la mezcla durante una noche a 80 °C en una atmósfera de nitrógeno. Concentrar la mezcla de reacción a presión reducida para dar un residuo. Diluir el residuo con agua, ajustar el pH a aproximadamente 5 y extraer la mezcla con EtOAc. Secar los extractos combinados sobre Na₂SO₄ y concentrar la solución a presión reducida hasta dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0-10 % de MeOH/DCM. Concentrar las fracciones de elución que están predominantemente enriquecidas en el isómero de oxima (isómero E). Triturar el material en éter dietílico, recoger el precipitado y secar para dar el compuesto del título (0,127 g, 24 %, mezcla 9:1 de E/Z). CL/EM (m/z): 364 (M-H).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento del Ejemplo 22 usando la cetona apropiada.

Tabla 5

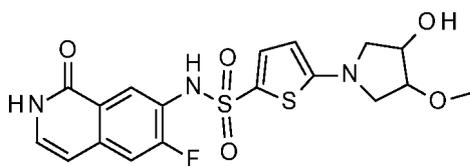
N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
23	5-[(1E)-N-Hidroxietanimidoil]-N-(1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		394
24	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(1E)-N-hidroxi-2-metoxietanimidoil]tiofeno-2-sulfonamida		410 (M-H)

Ejemplo 25

25 cis N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[3-hidroxi-4-metoxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Ejemplo 26

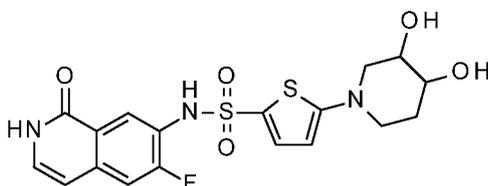
cis N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[3-hidroxi-4-metoxipirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



Preparar los Ejemplos 25 y 26 esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 excepto por que se usa carbonato potásico en lugar de carbonato de cesio y que el pH se ajusta a 4 en lugar de pH 5. Purificar el material en bruto y después volver a purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (H₂O con TFA al 10 %: ACN con TFA al 10 %), gradiente: ACN al 15 % con TFA al 10 % isocrático durante 3 minutos, 15-30 % durante 5 minutos para dar una mezcla de isómeros cis (66 mg, 0,15 mmol). Separar los enantiómeros por cromatografía quiral como se describe mediante los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros diferentes: Chiralpak IA, 21 x 250 mm; Punto de ajuste de BPR: 10³ kPa. Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo 25, Isómero 1 (0,027 g, 4 %, T_r = 3,18 min; >99 % de ee), EM (m/z): 440 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 26, Isómero 2 (0,023 g, 3 %, T_r = 3,83 min; 97,5 % de ee), EM (m/z): 440 (M-H).

Ejemplo 27

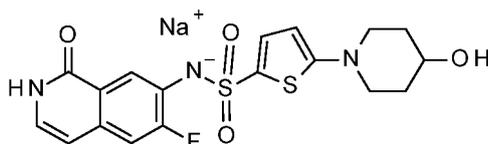
cis-5-[3,4-Dihidroxipiperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica



Combinar 5-fluoro-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (100 mg, 0,29 mmol), clorhidrato de cis-piperidina-3,4-diol (mezcla de enantiómeros 53,9 mg, 0,35 mmol), dimetilformamida (0,3 M, 1 ml) y diisopropilamina (200 μl) y calentar en un vial cerrado herméticamente a 100 °C durante 18 horas. Enfriar a temperatura ambiente y evaporar. Purificar por cromatografía sobre gel de sílice con un gradiente de 1-10 % de MeOH/DCM para dar el compuesto del título como una mezcla de enantiómeros cis (83,5 mg, 65 %). EN/EM (m/z): 440 (M+1).

Ejemplo 28

(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)[{5-(4-hidroxipiperidin-1-il)tiofen-2-il]sulfonil}azanida sódica



Combinar N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)tiofeno-2-sulfonamida (Ejemplo 5) (1 g, 2,4 mmol), 2-propanol (10 ml, 131 mmol) y solución 1 N de hidróxido sódico acuoso (2,4 ml, 2,4 mmol). Calentar la mezcla para disolver todos los sólidos y filtrar en caliente a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm. Calentar para disolver cualquier precipitado resultante, y después agitar la mezcla a temperatura ambiente para permitir la cristalización. Filtrar el sólido, lavar con 2-propanol y secar al vacío a 50 °C para dar el compuesto del título (920 mg, 2,1 mmol). EN/EM (m/z): 424 (M+H para el ácido libre).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento para el Ejemplo 28.

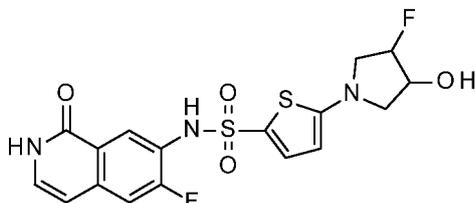
30

Tabla 6

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z)
29	(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)[{5-[(3R)-3-hidroxipirrolidin-1-il]tiofen-2-il]sulfonil}azanida sódica		410

Ejemplo 30

cis 5-(3-Fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica



- 5 Añadir TFA (6 ml, 79 mmol) a una solución de (3R,4S)-3-fluoro-4-hidroxi-pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (1,0 g, 4,87 mmol) en DCM (12 ml). Agitar durante 1 hora. Concentrar a presión reducida y secar durante una noche a alto vacío. Combinar con 5-bromo-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (1,0 g, 2,48 mmol), bromuro de cobre (0,11 g, 0,74 mmol) hidroxiprolina (0,2 g, 1,5 mmol) y carbonato potásico (1,37 g, 9,92 mmol) en DMSO (12 ml). Someter a microondas durante 2 horas a 110 °C. Purificar el aceite a través de cromatografía de fase inversa. H₂O con ácido fórmico al 0,1 %, isocrático al 5 % durante 5 min, después ACN al 5-50 % con ácido fórmico al 0,1 %. Concentrar a presión reducida hasta dar un aceite para dar el compuesto del título (244 mg, 23,0 %).
- 10 CL/EM m/e 428 [M+H]⁺

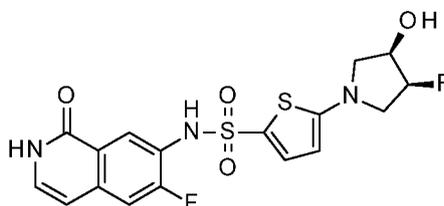
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por los procedimientos del Ejemplo 30.

Tabla 7

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
31	trans 5-(3-Fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica		428
32	cis meso 5-[(3R,4S)-3,4-Dihidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		426

Ejemplo 33

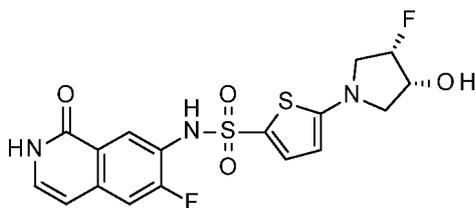
5-[(3S,4R)-3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



15

Ejemplo 34

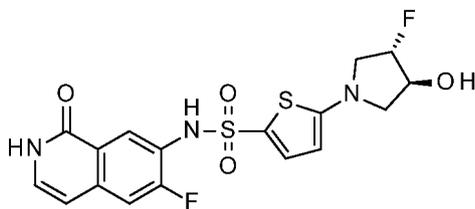
5-[(3R,4S)-3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



Disolver cis 5-(3-fluoro-4-hidroxi-pirrolidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica (244 mg, 0,57 mmol) en 2,5 ml de MeOH y 0,5 ml de DCM y unas gotas de isopropilamina y purificar por cromatografía quiral usando los siguientes parámetros - Columna: Chiralpak AD-H, 150 x 21,2 mm; Caudal: 70 ml/min; Detección: 320 nm; Fase móvil: 40 % de MeOH/60 % de CO₂; Temperatura de columna: 35 °C; Punto de ajuste de BPR: 100 bares; Temperatura de BPR: 40 °C. Recoger el primer pico de elución como el Ejemplo de compuesto del título 33 (75 mg, 30,8 %, T_r = 2,20 min; 96,8 % de ee), EN/EM (m/z): 428 (M-H). Recoger el segundo pico de elución como el Ejemplo de compuesto del título 34 (71 mg, 29,2 %, T_r = 3,31 min, 99 % de ee), EN/EM (m/z): 428 (M-H).

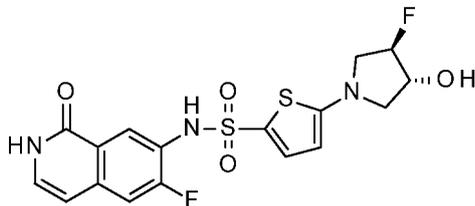
10 Ejemplo 35

5-[(3S,4S)-3-Fluoro-4-hidroxi-pirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



Ejemplo 36

5-[(3R,4R)-3-Fluoro-4-hidroxi-pirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida

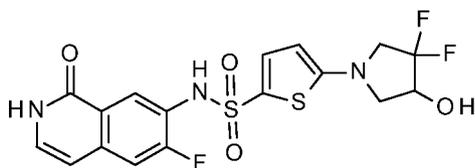


15 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros: Columna: Chiralpak AD-H, 21,2 x 250 mm; Detección: 225 nm; Obtener el primer pico de elución como el compuesto del título Ejemplo 35, (46 mg; T_r = 1,58 min; 99 % de ee), EN/EM (m/z): 428 (M-H). Repetir la purificación quiral con (293 mg, 0,69 mmol) para obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 36 (129 mg, T_r = 2,9 min; 96,8 % de ee), EN/EM (m/z): 428 (M-H).

20

Ejemplo 37

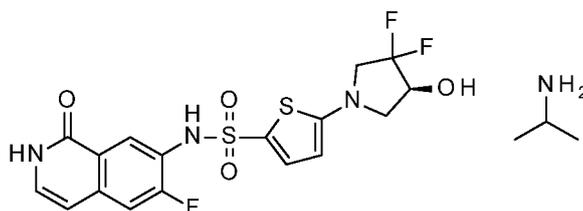
5-(3,3-Difluoro-4-hidroxi-pirrolidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica



25 Calentar una solución de 5-fluoro-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (2,50 g, 7,30 mmol) y 4,4-difluoropirrolidin-3-ol (1,90 g, 15,4 mmol) en piridina (50 ml) a 110 °C durante 40 horas y enfriar a temperatura ambiente. Retirar los disolventes a presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía de fase inversa, fase móvil A: TFA al 0,1 % en agua, fase móvil B: TFA al 0,1 % en ACN. Eluir con 10 a 45 % de B en A. Purificar adicionalmente el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 2,5 a 7,5 % de MeOH/DCM para dar el compuesto del título (1,70 g, 52 %). EN/EM m (m/z): 446 (M-H).

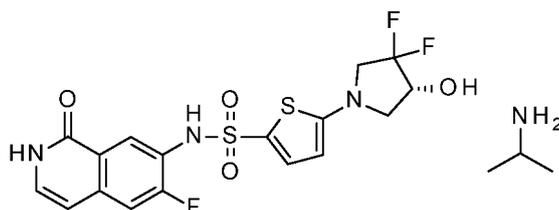
30 Ejemplo 38

5-[(4S)-3,3-Difluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida; propan-2-amina



Ejemplo 39

5 5-[(4R)-3,3-Difluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida propan-2-amina



10 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica (Ejemplo 37) como se describe en los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros: Columna: Lux Amylose-2, 21,2 x 250 mm; Detección: 225 nm; Fase móvil: 30 % de MeOH (0,2 % de IPA)/70 % de CO₂. Obtener el primer pico de elución como el compuesto del título Ejemplo 38 (54 mg, T_r = 3,22 min; 99 % de ee), EN/EM (m/z): 446 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el compuesto del título Ejemplo 39 (48 mg, T_r = 4,43 min; 99 % de ee), EN/EM (m/z): 446 (M-H).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se describe para los Ejemplos 38 y 39.

Tabla 8

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
40*	5-[(4S)-3,3-difluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		446
41*	5-[(4R)-3,3-difluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		446

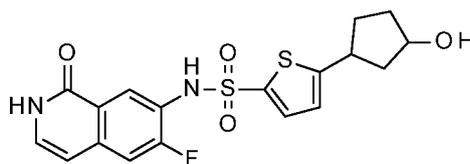
*Disolver los compuestos ópticamente puros en DCM/IPA 4:1 y extraer con solución de HCl acuosa 0,1 N y salmuera, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar a presión reducida para dar los ejemplos en lo que antecede.

15 Ejemplo 42

trans N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(3-hidroxiciclopentil)tiofeno-2-sulfonamida racémica

Ejemplo 43

cis N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(3-hidroxiciclopentil)tiofeno-2-sulfonamida racémica



- Añadir hidróxido de paladio (20 % sobre carbono, 0,83 g) a un recipiente de reacción y purgar el recipiente con nitrógeno. Humectar el catalizador con etanol (25 ml), después añadir una solución de 5-(3-benciloxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (0,644 g, 1,29 mmol) en etanol (25 ml) al catalizador.
- 5 Agitar la reacción en un agitador Parr a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno (30 psig) durante 18 horas. Añadir más catalizador (0,844 g) y agitar la reacción durante 24 horas bajo atmósfera de hidrógeno (30 psig). Añadir catalizador adicional (1,23 g) y agitar la reacción durante 24 horas bajo atmósfera de hidrógeno (30 psig). Filtrar la suspensión y concentrar a presión reducida para dar un aceite transparente. Purificar el aceite a través de purificación de fase inversa eluyendo con columna de CL: Waters Xbridge C₁₈ 30 x 75 mm 5 µm; A = NH₄HCO₃ 10 mM en 5 % de MeOH/H₂O, B = Gradiente de compuesto ACN: 6 % de B isocrático durante 4 min, 6-13,4 % de B en 3 min, 13,4-30 % de B en 1 min; Temp de columna: ambiente; Caudal: 85 ml/min. Aislar el primer pico de elución como el Ejemplo 42 (40 mg, 7,6 %, T_r = 6,63 min) CL/EM (m/z): 409 (M-H). Aislar el segundo pico de elución como el Ejemplo 43, (120 mg, 22,9 %, T_r = 7,30 min). CL/EM (m/z): 409 (M-H).

Ejemplo de preparación alternativa 42

- 15 Preparación alternativa, Ejemplo 43

- Añadir tribromuro de boro (1 M en heptanos, 40 ml) gota a gota a una solución a 0 °C de 5-(3-benciloxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (20 g, 40,1 mmol) en DCM (600 ml). Agitar la reacción a temperatura ambiente hasta que la CL/EM (muestra en MeOH) muestra que el material de partida se ha consumido (~ 3 h). Enfriar la reacción a 0 °C e inactivar la reacción gota a gota con MeOH (200 ml). Concentrar la reacción a presión reducida para dar un aceite espeso de color rojo. Purificar el aceite a través de purificación de fase inversa eluyendo con 4 % de (ácido fórmico al 0,1 % en ACN)/ 96 % (ácido fórmico al 0,1 % en agua) durante 5 minutos, después aumentar las cantidades de ACN desde ACN al 4-55 % durante 30 minutos; para dar el primer pico de elución como isómeros trans racémicos (1,85 g, 11,3 %; CL/EM (m/z): 409 (M+H) y el segundo pico de elución como isómeros cis racémicos (2,39 g, 14,6 %), CL/EM (m/z): 409 (M+H)).

- 25 Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por los procedimientos de los ejemplos de preparación alternativa 42 y 43.

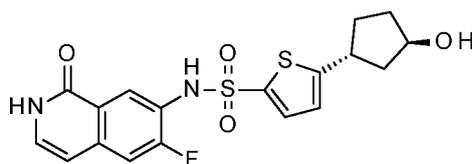
Tabla 9

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
44*	trans 5(3,3-Difluoro-4-hidroxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica		445
45*	cis 5(3,3-Difluoro-4-hidroxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica		445

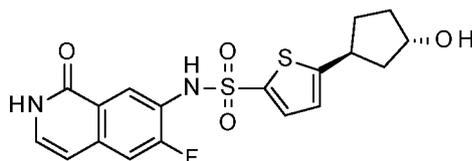
*Purificar el aceite a través de cromatografía de fase inversa eluyendo con solución de bicarbonato de amonio 10 mM, isocrática al 5 % durante 10 minutos, después ACN al 5-30 % durante 28 min y ACN al 30 % durante 13 minutos para dar el primer pico de elución como el Ejemplo 44 y el segundo pico de elución como el Ejemplo 45.

Ejemplo 46

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(1R,3R)-3-hidroxiciclopentil]tiofeno-2-sulfonamida

**Ejemplo 47**

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(1S,3S)-3-hidroxiciclopentil]tiofeno-2-sulfonamida



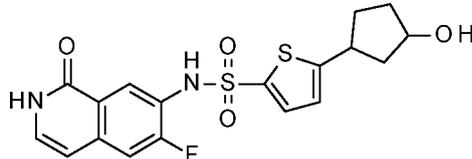
- 5 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros: Columna: Chiralpak AD-H, 21 x 250 mm; Detección: 225 nm; Fase móvil: 35 % de MeOH/65 % de CO₂; Punto de ajuste de BPR de columna: 10³ kPa; Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo de compuesto del título 46 (14 mg, 35 %, T_r = 2,45 min; 99 % de ee), EN/EM (m/z): 409 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo de compuesto del título 47 (14 mg, 35 %, T_r = 2,81 min; 95,9 % de ee), EN/EM (m/z): 409 (M-H).

Ejemplo 48

cis N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(3-bidroxiciclopentil)tiofeno-2-sulfonamida Isómero 1

Ejemplo 49

cis N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(3-hidroxiciclopentil)tiofeno-2-sulfonamida Isómero 2



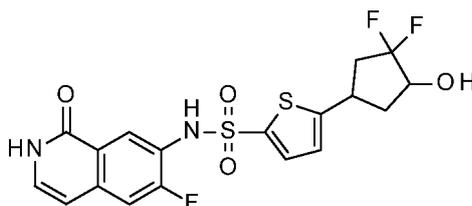
- 15 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 32 y 33 usando los siguientes parámetros: No se usa isopropilamina alguna en la disolución, Columna: Chiralpak AD-H, 21 x 250 mm; Detección: 225 nm; Fase móvil: 35 % de MeOH/65 % de CO₂; Punto de ajuste de BPR: 10³ kPa; BPR. Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo 48, isómero 1 (45 mg, 38 %, T_r = 2,22 min; 99,2 % de ee), EN/EM (m/z): 409 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 49, isómero 2 (40 mg, 33 %, T_r = 2,61 min; 97,6 % de ee), EN/EM (m/z): 409 (M-H).

Ejemplo 50

trans 5-(3,3-Difluoro-4-hidroxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Ejemplo 51

trans 5-(3,3-Difluoro-4-hidroxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



- 30 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros: No se usa isopropilamina alguna en la disolución, Columna: Chiralpak AD-H, 20 x 150 mm; Detección: 225 nm; Fase móvil: 35 % de IPA/65 % de CO₂; Punto de ajuste de BPR: 10³ kPa; Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo 50, Isómero 1(32 mg, 30 %, T_r = 2,06 min; 99 % de ee), EN/EM (m/z): 445 (M-H).

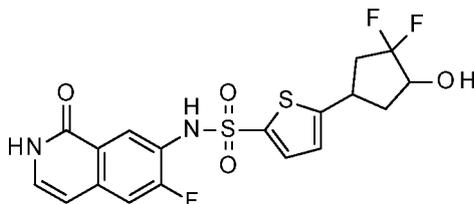
Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 51, Isómero 2 (44 mg, 41 %, $T_r = 2,42$ min; 98,7 % de ee), EN/EM (m/z): 445 (M-H).

Ejemplo 52

cis, 5-(3,3-Difluoro-4-hidroxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

5 Ejemplo 53

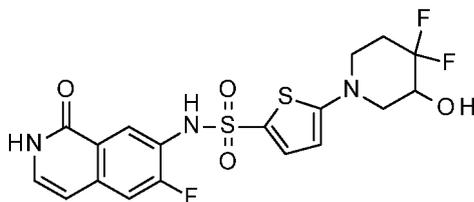
cis, 5-(3,3-Difluoro-4-hidroxiciclopentil)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



10 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros: Columna: Chiralpak AD-H, 21 x 250 mm; Detección: 225 nm; Fase móvil: 35 % de IPA/65 % de CO₂. Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo 52, Isómero 1 (119 mg, 40 %, $T_r = 2,23$ min; 99 % de ee), EN/EM (m/z): 445 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 53, Isómero 2 (119 mg, 40 %, $T_r = 2,80$ min, 97,6 % de ee), EN/EM (m/z): 445 (M-H).

Ejemplo 54

5-(4,4-Difluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica



15 Añadir 4,4-difluoropiperidin-3-ol racémico (1,0 g, 7,4 mmol) a una solución de 5-fluoro-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (1,4 g, 4,1 mmol) en piridina (10 ml). Calentar a 100 °C durante 20 horas y enfriar a temperatura ambiente. Diluir la mezcla con agua y acidificar con HCl acuoso concentrado. Extraer con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 10-45 % de ACN con TFA al 0,1 %:H₂O con TFA al 0,1 % durante 20 minutos, después mantener a 45 % durante 10 minutos. Subsiguientemente, purificar por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con MeOH: DCM (4:6) para dar el compuesto del título (0,75 g, 40 %). EN/EM (m/z): 460 (M-H).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento del Ejemplo 54.

25 Tabla 10

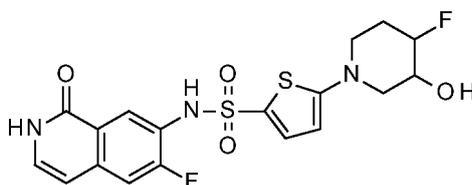
N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
55	racémico, trans-5-(4-Fluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		442

(continuación)

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
56	5-(3,3-Difluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-n-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica		460

Ejemplo 57

racémico, cis-5-(4-Fluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



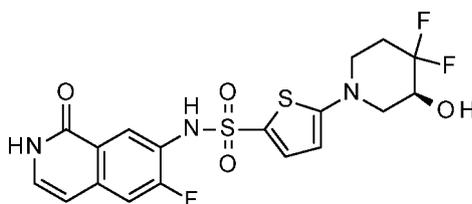
5

10

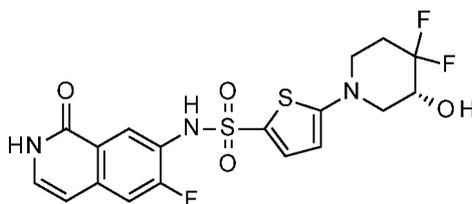
Disolver clorhidrato de cis-4-fluoropiperidin-3-ol racémico (1,6 g, 10 mmol) en MeOH, cargar sobre una columna SCX y eluir con NH_3 7 N/MeOH y concentrar para dar cis-4-fluoropiperidin-3-ol racémico (1,2 g, 10 mmol). Añadir cis-4-fluoropiperidin-3-ol (0,84 g, 7,0 mmol) a una solución de 5-fluoro-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica (1,2 g, 3,5 mmol) en piridina (10 ml). Calentar la mezcla a 100 °C durante 16 horas y concentrar a presión reducida. Disolver el residuo en EtOAc, acidificar con HCl acuoso concentrado y extraer con EtOAc. Lavar las capas orgánicas combinadas con agua y salmuera, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 10 % de MeOH / DCM para dar el compuesto del título (1,0 g, 65 %). EN/EM (m/z): 442 (M-H).

Ejemplo 58

15 5-[(3S)-(4,4-Difluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida

**Ejemplo 59**

5-[(3R)-(4,4-Difluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



20 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 32 y 33 usando los siguientes parámetros: No se usa isopropilamina alguna en la disolución, Columna: Chiralpak AD-H, 150 x 20 mm; Detección: 225 nm; Fase móvil: 40 % de IPA/ CO_2 ; Temperatura de columna: 40 °C; Punto de ajuste de BPR: 10³ kPa; Temperatura de BPR: 35 °C. Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo 58 (0,35 g, 42 %, T_r = 2,39 min, 98 % de ee), EN/EM (m/z): 460 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 59 (0,34 g, 38 %, T_r = 2,92 min, 98,8 % de ee), EN/EM (m/z): 460 (M-H).

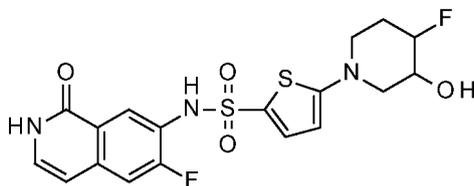
25

Ejemplo 60

trans-5-(4-Fluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Ejemplo 61

trans-5-(4-Fluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



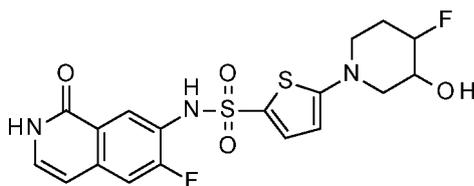
- 5 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 32 y 33 usando los siguientes parámetros: Columna: Chiralpak AD-H, 21 x 250 mm; Detección: 225 nm; Fase móvil: 40 % de IPA/CO₂; Punto de ajuste de BPR: 10³ kPa. Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo 60, Isómero 1 (0,26 g, 32 %, Tr = 2,57 min, 99 % de ee), EN/EM (m/z): 442 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 61, Isómero 2 (0,31 g, 39 %, Tr = 3,17 min, 97 % de ee), EN/EM (m/z): 442 (M-H).

10 Ejemplo 62

cis-5-(4-Fluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Ejemplo 63

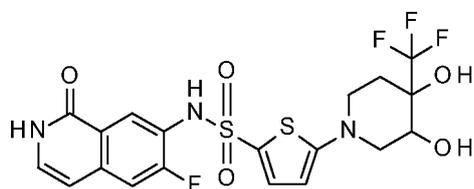
cis-5-(4-Fluoro-3-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



- 15 Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros: Disolver en MeOH, Columna: Chiralpak AD-H, 5 x 150 mm; Detección: 300 nm; Fase móvil: 35 % de EtOH/CO₂; Temperatura de columna: 40 °C; Punto de ajuste de BPR: 10³ kPa. Obtener el primer pico de elución como el Ejemplo 62, isómero 1 (0,44 g, 45 %, Tr = 4,52 min, >98 % de ee), EN/EM (m/z): 442 (M-H). Obtener el segundo pico de elución como el Ejemplo 63, isómero 2 (0,44 g, 46 %, Tr = 5,29 min, >94 % de ee), EN/EM (m/z): 442
- 20

Ejemplo 64

racémico, 5-[3,4-Dihidroxi-4-(trifluorometil)piperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Diastereómero 1



- 25 Combinar carbonato potásico (298,6 mg, 2,16 mmol) con 4-(trifluorometil)piperidina-3,4-diol, Diastereómero 1 (0,2 g, 1,08 mmol) y DMSO (12 ml). Añadir bromuro de cobre(I) (61,98 mg, 0,43 mmol) hidroxiprolina (120,4 mg, 0,43 mmol) y 5-bromo-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (435 mg, 1,08 mmol). Sustituir la atmósfera con N₂ y calentar a 100 °C durante 16 horas. Retirar la mayoría del DMSO por destilación usando alto vacío. Añadir NH₄Cl acuoso saturado (0,25 ml) y diluir con MeOH (20 ml). Filtrar y concentrar hasta dar un aceite.
- 30 Purificar el residuo por HPLC de fase inversa de bajo pH usando una columna de 30x75 mm empaquetada C18 AXIA, con fase móvil A: TFA al 0,10 % en agua, y fase móvil B: TFA al 0,10 % en ACN. Eluir con 5 % a 42 % de B en A para dar el compuesto del título (187 mg, 34 %). EN/EM (m/z): 508 (M-H).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento del Ejemplo 64.

Tabla 11

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
65*	5-[3,4-Dihidroxi-4-(trifluorometil) piperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica, Diastereómero 2		508

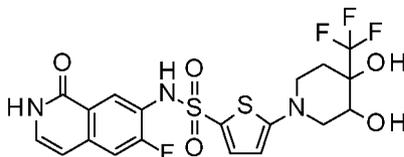
*El material se purifica adicionalmente por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con CHCl₃/MeOH 90/10.

Ejemplo 66

5-[3,4-Dihidroxi-4-(trifluorometil)piperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

5 **Ejemplo 67**

5-[3,4-Dihidroxi-4-(trifluorometil)piperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



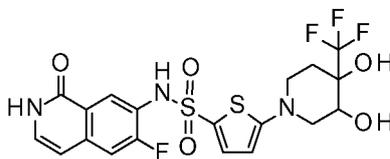
10 Separar los dos enantiómeros de 5-[3,4-dihidroxi-4-(trifluorometil)piperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica, Diastereómero 1 usando el procedimiento quiral de cromatografía como se describe en los Ejemplos 33 y 34 usando los siguientes parámetros: Chiralpak AD-H, columna de 20x150 mm. Recoger el primer pico de elución para dar el Ejemplo 66, Isómero 1 (47 mg, 26 %, >99 % de ee) EN/EM (m/z): 508 (M+H) y Ejemplo 67, Isómero 2 (49 mg, 27 %, >99 % de ee) EN/EM (m/z): 508 (M-H).

Ejemplo 68

15 5-[3,4-Dihidroxi-4-(trifluorometil)piperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Ejemplo 69

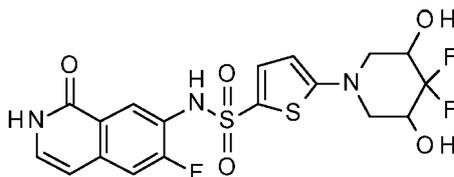
5-[3,4-Dihidroxi-4-(trifluorometil)piperidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



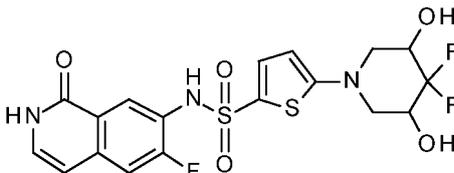
20 Separar los dos enantiómeros de la 5-[3,4-dihidroxi-4-(trifluorometil)-1-piperidil]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica Diastereómero 2 (23 mg) por cromatografía quiral usando Chiralpak AD-H, columna de 20x150 mm, eluyendo con 40 % de MeOH/CO₂, a un caudal de 70 ml/min, para dar el Ejemplo 68, Isómero 1 (8,8 mg, 38 %, >99 % de ee) EN/EM (m/z): 508 (M+H) y Ejemplo 69, Isómero 2 (9,3 mg, 40 %, >99 % de ee) EN/EM (m/z): 508 (M-H).

Ejemplo 70

Cis, meso, 5-(4,4-Difluoro-3,5-dihidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Diastereómero 1

**Ejemplo 71**

racémico, trans, 5-(4,4-Difluoro-3,5-dihidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Diastereómero 2



5

10

15

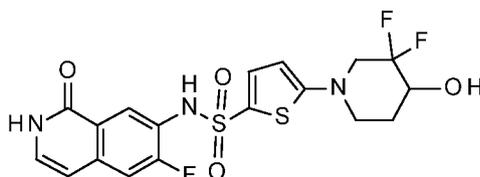
Añadir DCM (3 ml) y TFA (3 ml) a una mezcla 3:1 de 4,4-difluoro-3,5-dihidroxi-piperidina-1-carboxilato de cis, meso-*tert*-butilo y 4,4-difluoro-3,5-dihidroxi-piperidina-1-carboxilato de trans-*tert*-butilo racémico (0,42 g, 1,66 mmol). Después de 2 horas, retirar los disolventes a presión reducida. Añadir 5-fluoro-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (0,15 g, 0,44 mmol), DIPEA (3 ml) y piridina (6 ml). Calentar la mezcla a 100 °C durante 24 horas y enfriar a temperatura ambiente. Retirar los disolventes a presión reducida. Cargar sobre una columna SCX. Eluir con MeOH y concentrar el filtrado. Separar los dos diastereómeros por HPLC de fase inversa de alto pH usando una columna de 30x75 mm C18 OBD, con fase móvil A: solución de bicarbonato de amonio acuosa 10 mM con 5 % de MeOH, fase móvil B: ACN. Eluir con 2 % a 12 % de B en A, caudal 85 ml/minutos, para dar el Ejemplo 70, Diastereómero 1, (40 mg, 19 %), EN/EM (m/z): 476 (M+H); y Ejemplo 71, Diastereómero 2, (20 mg, 10 %), EN/EM (m/z): 476 (M-H).

Ejemplo 72

5-(3,3-Difluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-n-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Ejemplo 73

5-(3,3-Difluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-n-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2

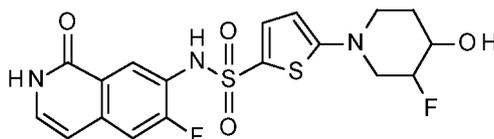


20

Resolver los enantiómeros a partir de la mezcla racémica como se describe en el Ejemplo 66 y 67 para dar el Ejemplo 72, Isómero 1 (40 mg, 27 %, >99 % de ee), EN/EM (m/z): 460 (M+H); y Ejemplo 73, Isómero 2 (40 mg, 27 %, >99 % de ee), EN/EM (m/z): 460 (M-H).

Ejemplo 74

25 racémico, trans 5-(3-Fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



30

Añadir TFA (3 ml) a una solución de 3-fluoro-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato de trans-*tert*-butilo racémico (288 mg, 1,31 mmol) en DCM (3 ml). Después de 2 horas, retirar los disolventes a presión reducida. Añadir 5-fluoro-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (180 mg, 0,53 mmol) y piridina (5 ml). Añadir DIPEA (0,50 ml, 2,87 mmol). Calentar la mezcla a 100 °C durante 18 horas y enfriar a temperatura ambiente. Retirar los disolventes a presión reducida. Disolver el residuo en DCM/IPA 4:1, extraer con solución de HCl acuosa 1 N y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0 a 10 % de MeOH/DCM para dar el compuesto del título (145 mg, 62 %). EN/EM (m/z): 442 (M-H).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento del Ejemplo 74.

Tabla 12

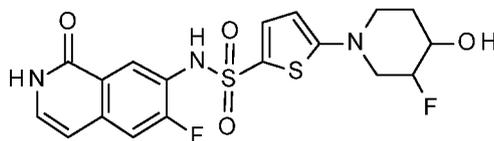
N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
75	racémico, cis 5-(3-fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida		442

Ejemplo 76

trans 5-(3-Fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

5 **Ejemplo 77**

trans 5-(3-Fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



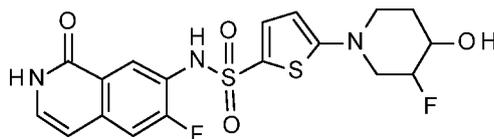
10 Separar los dos enantiómeros de trans 5-(3-fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica como se describe en el Ejemplo 66 y 67 para dar el Ejemplo 76, Isómero 1 (50 mg, 22 %, 99,4 % de ee), EN/EM (m/z): 442 (M+H); y Ejemplo 77, Isómero 2 (50 mg, 22 %, 98,9 % de ee), EN/EM (m/z): 442 (M-H).

Ejemplo 78

cis 5-(3-Fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1

Ejemplo 79

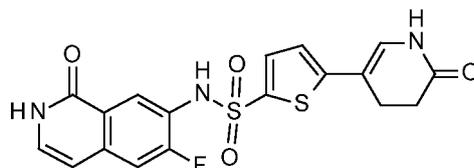
15 cis 5-(3-Fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



20 Separar los dos enantiómeros de cis 5-(3-fluoro-4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica (175 mg, 0,40 mmol) por cromatografía quiral usando Chiralpak OJ-H, columna de 21x250 mm, eluyendo con 25 % de MeOH/CO₂, a un caudal de 70 g/min, para dar el Ejemplo 78, Isómero 1 (30 mg, 17 %, 97,5 % de ee), EN/EM (m/z): 442 (M+H); y Ejemplo 79, Isómero 2 (50 mg, 29 %, 99,3 % de ee), EN/EM (m/z): 442 (M-H).

Ejemplo 80

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-il)tiofeno-2-sulfonamida

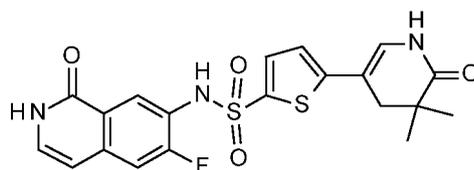


25 Calentar una mezcla de 5-bromo-N-(1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida (1,00 g, 2,48 mmol), 2-oxo-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3,4-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *tert*-butilo (1,12 g, 3,47 mmol), tetraquis(trifenil-fosfina)paladio (0) (148 mg, 0,124 mmol) en dioxano (40 ml) y agua (10 ml) a 100 °C. Después de 24 horas, enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Retirar los disolventes a presión

5 reducida. Disolver el residuo en DCM/IPA 4:1, extraer con solución de HCl acuosa 1 N y salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar por cromatografía de fase inversa, fase móvil A: TFA al 0,1 % en agua, fase móvil B: TFA al 0,1 % en ACN. Eluir con 10 a 50 % de B en A. Purificar adicionalmente por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0 a 10 % de MeOH/DCM, para dar el compuesto del título (180 mg, 17 %). EN/EM (m/z): 420 (M-H).

Ejemplo 81

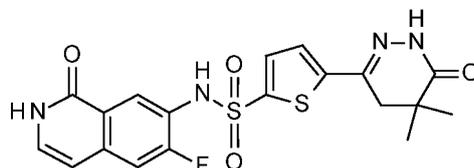
5-(5,5-Dimetil-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



10 Añadir ácido clorosulfúrico (0,430 ml, 6,51 mmol) a una solución enfriada con hielo de 3,3-dimetil-5-(tiofen-2-il)-3,4-dihidropiridin-2(1H)-ona (450 mg, 2,17 mmol) en DCM (60 ml) a 0 °C. Después de 15 minutos, retirar el baño de refrigeración y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, verter la mezcla de reacción en salmuera enfriada con hielo. Extraer con DCM (4x). Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Enfriar el residuo en un baño de hielo a 0 °C. Añadir 7-amino-6-fluoro-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona (194 mg, 1,09 mmol) y piridina (5 ml). Retirar el
15 baño de refrigeración después de la adición y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de 16 horas, añadir solución de HCl acuosa 5 N a pH = 1. Extraer con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con solución de HCl acuosa 1 N y salmuera. Secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0 a 10 % de MeOH/DCM para dar el compuesto del título (280 mg, 57 %). EN/EM (m/z): 448 (M-H).

20 Ejemplo 82

5-(5,5-Dimetil-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridazin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida



25 Añadir pentacloruro de fósforo (200 mg, 0,96 mmol) a ácido clorosulfúrico enfriado con hielo (0,16 ml, 2,4 mmol) a 0 °C. Después de 15 min, añadir 5,5-dimetil-3-(2-tienil)-1,4-dihidropiridazin-6-ona (200 mg, 0,96 mmol). Retirar el baño de refrigeración y dejar que la mezcla de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de 4 horas, verter la mezcla de reacción en salmuera enfriada con hielo. Extraer con EtOAc. Combinar las capas orgánicas, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a presión reducida para dar un residuo. Añadir 7-amino-6-fluoro-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona (137 mg, 0,77 mmol) y piridina (5 ml) al residuo. Después de 17 horas, retirar los disolventes a presión reducida. Cargar sobre una columna SCX. Eluir con MeOH y concentrar el filtrado. Purificar el
30 residuo por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con 0 a 10 % de MeOH/DCM. Concentrar las fracciones que contienen el producto a presión reducida. Purificar adicionalmente por cromatografía de fase inversa, fase móvil A: TFA al 0,1 % en agua, fase móvil B: TFA al 0,1 % en ACN. Eluir con 10 a 45 % de B en A, para dar el compuesto del título (20 mg, 6 %). EN/EM (m/z): 449 (M-H).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento del Ejemplo 82.

35

Tabla 13

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
83	5-(5-Etil-5-metil-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica		462

Ejemplo de preparación alternativa 82

5 Añadir en porciones 1,3-dicloro-5,5-dimetilhidantoína (17 g, 86 mmol) a una suspensión de 6-[5-(bencilsulfanil)tiofeno-2-il]-4,4-dimetil-4,5-dihidropiridazin-3(2H)-ona (19 g, 57 mmol) en ACN (290 ml), ácido acético (9,5 ml) y agua (19 ml) a 0 °C manteniendo la temperatura interna <25 °C durante la adición. Añadir MTBE (200 ml) a la mezcla de reacción y filtrar el sólido de color blanco, lavar con MTBE, secar y recoger para dar un compuesto intermedio, cloruro de 5-(5,5-dimetil-6-oxo-1,4-dihidropiridazin-3-il)tiofeno-2-sulfonilo. Concentrar el filtrado a sequedad, disolver en DCM y lavar con NaHCO₃ saturado ac. hasta un pH final de la fase acuosa > 5. Secar la fase orgánica (MgSO₄), filtrar y concentrar al vacío hasta dar un sólido de color amarillo. Suspende ambos sólidos en MTBE y triturar. Filtrar el sólido de color blanco, lavar con MTBE, secar y recoger para dar el compuesto cloruro de 5-(5,5-dimetil-6-oxo-1,4-dihidropiridazin-3-il)tiofeno-2-sulfonilo con 86 % de pureza (13,1 g, 64 %). EN/EM (m/z): 305 (M-H).

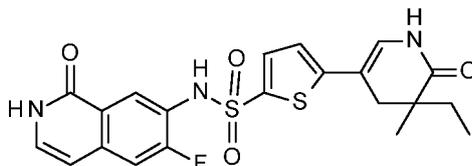
15 Añadir cloruro de 5-(5,5-dimetil-6-oxo-1,4-dihidropiridazin-3-il)tiofeno-2-sulfonilo (13,1 g, 36,7 mmol) en porciones a 0 °C a una solución de 7-amino-6-fluoro-1,2-dihidroisoquinolin-1-ona (5,89 g, 33 mmol) en piridina (79 ml). Agitar a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Concentrar a sequedad. Sonicar el residuo con DCM (100 ml) hasta que se forma una suspensión de color naranja. Filtrar el sólido, lavar con DCM y MTBE, y secar para dar el compuesto del título (14 g, 80 %). EN/EM (m/z): 449 (M-H).

Ejemplo 84

5-(5-Etil-5-metil-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiophe2ne-2-sulfonamida, Isómero 1

20 Ejemplo 85

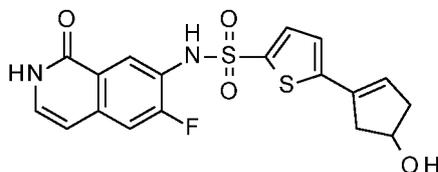
5-(5-Etil-5-metil-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2



25 Separar los dos enantiómeros de 5-(5-etil-5-metil-6-oxo-1,4-dihidropiridin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiophe2ne-2-sulfonamida racémica (190 mg, 0,412 mmol) por cromatografía quiral usando Chiralpak AD-H, columna de 21,2 x 150 mm, eluyendo con 40 % de MeOH/CO₂, a un caudal de 70 g/min, para dar el Ejemplo 82, Isómero 1 (85 mg, 45 %, >99 % de ee), EN/EM (m/z): 462 (M+H); y Ejemplo 83, Isómero 2 (85 mg, 45 %, >99 % de ee), EN/EM (m/z): 462 (M-H).

Ejemplo 86

30 N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-bidroxiciclopent-1-en-1-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica



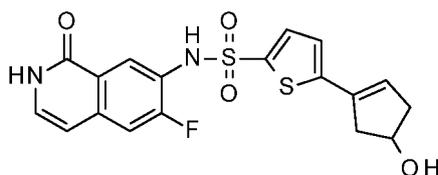
35 Añadir fluoruro de tetra-n-butilamonio (1 M en THF, 8 ml) a 5-[4-[*tert*-butil(dimetil)silil]oxociclohexen-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiophe2ne-2-sulfonamida (0,135 g, 0,252 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Añadir cloruro de amonio saturado, después extraer con EtOAc, secar sobre sulfato sódico, y concentrar a presión reducida. Purificar el material en bruto por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con DCM:MeOH (95:5) para dar una grasa incolora. Añadir DCM al aceite y filtrar el sólido resultante para dar el compuesto racémico del título (110 mg, 81 %). EN/EM (m/z): 407,1 (M-H).

Ejemplo 87

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxiciclopent-1-en-1-il)tiophe2ne-2-sulfonamida, Isómero 1

40 Ejemplo 88

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxiciclopent-1-en-1-il)tiophe2ne-2-sulfonamida, Isómero 2



5 Separar N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxiciclopent-1-en-1-il)tiofeno-2-sulfonamida racémica con cromatografía quiral usando Lux 5u Cellulose-2, columna de 21x250 mm eluyendo con 40 % de etanol:60 % de CO₂ a un caudal de 70 g/min, con detección a 225 nm para dar el Ejemplo 87, Isómero 1 (22 mg, 16,6 %, >99 % de ee), EN/EM (m/z): 407,1 (M+H) y Ejemplo 88, Isómero 2 (25 mg, 19 %, >99 % de ee), EN/EM (m/z): 407,1 (M-H).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de los Ejemplos 87 y 88.

Tabla 14

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	EN/EM (m/z) (M+1)
89	racémico, N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxiciclohex-1-en-1-il)tiofeno-2-sulfonamida		421,0
90	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxiciclohex-1-en-1-il) tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 2		421,0
91	N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-(4-hidroxiciclohex-1-en-1-il) tiofeno-2-sulfonamida, Isómero 1		421,0

10 El cáncer es reconocido cada vez más como una colección heterogénea de enfermedades cuyo principio y progresión son inducidos por la función aberrante de uno o más genes que regulan la reparación del ADN, estabilidad del genoma, proliferación celular, muerte celular, adhesión, angiogénesis, invasión y metástasis en microentornos tisulares y celulares. La función variante o aberrante de los genes "cancerosos" puede resultar del polimorfismo de ADN de aparición natural, cambios en el número de copias del genoma (a través de amplificación, 15 delección, pérdida de cromosomas, o duplicación), cambios en la estructura de genes y cromosomas (a través de translocación cromosómica, inversión, u otra transposición que conduce a una expresión génica desregulada), y mutaciones puntuales. Pueden inducirse neoplasias cancerosas por una función génica aberrante, y mantenerse por la misma función génica aberrante, o mantenimiento y avance exacerbados por funciones génicas aberrantes 20 adicionales.

Más allá de las aberraciones cromosómicas genéticas mencionadas anteriormente, cada uno de los cánceres puede también incluir modificaciones epigenéticas del genoma, incluyendo metilación de ADN, sellado genómico, y modificación de histona por acetilación, metilación o fosforilación. Una modificación epigenética puede desempeñar un papel en la inducción y/o mantenimiento del tumor maligno.

25 Se han compilado extensos catálogos de las aberraciones citogenéticas en el cáncer humano, y estos se mantienen y actualizan regularmente en línea (véase la base de datos The Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer en la página web del US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP): <http://cgap.nci.nih.gov>). La base de datos incluye aberraciones cromosómicas para al menos algunos de los tumores malignos de la presente invención. The Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project mantiene un "censo de genes cancerosos" detallado en línea de todos los genes humanos que se han relacionado causalmente con la tumorigénesis (véase <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census>) así como la base de datos COSMIC (Catalogue de Somatic Mutations in Cancer) de mutaciones somáticas en cáncer humano (véase <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). Una fuente adicional que contiene información abundante acerca de los cambios citogenéticos vinculados causalmente a diversos cánceres es el Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/Anomliste.html#MDS>). Estas bases de datos también incluyen aberraciones cromosómicas para al menos algunos de los tumores malignos de la presente 30

invención.

Se conocen y se usan rutinariamente el diagnóstico de tumores malignos cancerosos mediante biopsia, inmunofenotipado y otras pruebas. Además de las tecnologías de bandeado cromosómico de alta resolución y de obtención de imágenes cromosómicas avanzadas, las aberraciones cromosómicas en casos sospechosos de cáncer pueden determinarse a través de análisis citogénético tal como fluorescencia en hibridación *in situ* (FISH), cariotipado, cariotipado espectral (SKY), FISH múltiple (M-FISH), hibridación genómica comparativa (CGH), matrices de polimorfismo de nucleótido único (chips SNP) y otras pruebas diagnósticas y de análisis conocidas y usadas por los expertos en la materia.

Los antifolatos interfieren con la acción de folatos a través de la inhibición de una o más enzimas designadas como objetivo dentro del ciclo metabólico del ácido fólico y eliminan las células de los precursores de ADN requeridas para proliferar. Las células cancerosas tienen un crecimiento rápido y presentan, por lo tanto, una demanda elevada de precursores de ADN, haciéndolas particularmente susceptibles a los efectos de antifolatos. Aunque actuando a través de la inhibición selectiva de AICARFT en el ciclo metabólico del ácido fólico, se anticipa que los compuestos de Fórmula I son activos frente a los mismos cánceres y cánceres similares a los antifolatos conocidos, incluyendo metotrexato, ralitrexed, pralatrexato, pemetrexed, así como 5-fluorouracilo. Los cánceres frente a los cuales se anticipa que los compuestos de Fórmula I son activos incluyen: glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (incluyendo mesotelioma), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, osteosarcoma, linfoma no Hodgkin (incluyendo linfoma de linfocitos T), sarcoma fibroblástico, leucemia mielógena crónica o leucemia linfocítica aguda (ALL; incluyendo T-ALL, leucemia linfoblástica y monocítica)

Los siguientes estudios *in vitro* e *in vivo* muestran la actividad inhibidora y eficacia de los compuestos ilustrados de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la inhibición de AICARFT, selectividad para la inhibición de AICARFT, y actividad antitumoral *in vivo*. Estos ensayos son generalmente reconocidos por los expertos en la materia como indicativos de actividad quimioterapéutica clínica humana. Los ensayos que ponen de manifiesto actividad inhibidora de AICARFT y eficacia pueden realizarse sustancialmente como sigue o por ensayos similares dando datos similares.

Ensayos

Ensayo antiproliferativo *in vitro* Clonación y purificación de enzimas

ADNc de AICARFT humana (número de registro NCBI: NM_004044.6) se adquiere de Openbiosystem Co. (n.º de cat MHS1011-62310, ID de clon: 4300570, registro: BC008879). La secuencia de nucleótidos que codifica AICARFT humana de longitud completa se inserta en el vector de pET21d (Novagen) con una etiqueta HIS N-terminal. BL21(DE3) bacteriano (Novagen) se usa como un hospedador de expresión, y la inducción de la expresión de proteína se realiza en 2 x medio de TY con IPTG 1 mM a 18 °C durante una noche. Los sedimentos celulares se almacenan a -80 °C para la purificación de proteína subsiguiente. La purificación de proteína se lleva a cabo a 4 °C. Los sedimentos celulares congelados se lisan por incubación con agitación en 50 ml de tampón de lisis frío (Tris 50 mM-HCl, pH 7,5, NaCl 300 mM, 10 % de glicerol, 0,1 % de Triton X-100, 0,5 mg/ml de lisozima, 5U/ml de benzonasa, DTT 1 mM, imidazol 10 mM, e inhibidor de proteasa libre de EDTA completo de Roche) por litro de sedimento celular y sonicación. Los lisatos celulares se clarifican por centrifugación en un rotor Bechman JA-18 durante 45 min a 16.500 rpm. El sobrenadante se incuba con resina de Ni-NTA agarosa (Qiagen) durante 3 horas, seguido de un lavado de lote inicial con 10 volúmenes de resina de tampón A (Tris 50 mM-HCl, pH 7,5, NaCl 300 mM, 10 % de glicerol, DTT 1 mM, imidazol 10 mM) que contiene Triton X-100 al 0,1 %. La resina se empaqueta después sobre una columna y se lava con tampón A. La proteína AICARFT etiquetada con HIS se eluye con gradiente de imidazol 10-500 mM en tampón A. Las fracciones reunidas que contienen HIS-AICARFT se concentran, se cargan sobre una columna HiLoad 26/600 Superdex 200 (GE Healthcare Biosciences), y eluyendo con tampón de almacenamiento (Tris 50 mM-HCl, pH7,5, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, glicerol al 10 %). Las fracciones que contienen HIS-AICARFT se reúnen y la concentración de proteínas se determina por el ensayo de Bradford usando BSA como patrón. Se toman alícuotas de la proteína y se almacena a -80 °C.

Síntesis de sustrato de tetrahidrofolato

Uno de los sustratos de la reacción enzimática, 10-formiltetrahidrofolato (10-F-THFA), presenta una estabilidad química limitada y, por lo tanto, se sintetiza el mismo día que se realiza el ensayo de enzimas ATIC. La ruta de síntesis general se describe en P. Rowe, *Methods Enzymol.*, 18, 733-735, (1971) y J. Rabinowitz, *Methods Enzymol.*, 6, 814-815, (1963). La primera etapa en esta síntesis es la conversión de ácido fólico (Sigma CAS 1492-18-8) en ácido 5,10-meteniltetrahidrofólico (5,10-M-THFA). Esta conversión típicamente tiene lugar el día antes de realizar el ensayo de enzimas, pero puede realizarse hasta 1 semana antes y almacenarse a temperatura ambiente. Se añade β-mercaptoetanol (2 ml) a ácido fólico (81,6 mg), y se añade HCl concentrado al 37 % (80 µl). Esta reacción se incuba un mínimo de 3 horas a temperatura ambiente, con mezclado ocasional. El color cambia visualmente de transparente a amarillo, y la conversión completa de ácido fólico en 5,10-M-THFA se monitoriza por análisis espectral usando una cubeta de cuarzo. La absorción UV cambiará de 266 nm a 356 nm durante esta etapa.

5 Esto da como resultado una solución 80 mM de 5,10-M-THFA. En la mañana del ensayo, se diluye 5,10-M-THFA 80 mM hasta 1,6 mM en bicarbonato de amonio 40 µM (recién preparado ese día). Esta reacción se incuba durante 3-5 horas a temperatura ambiente. El color cambia visualmente de amarillo a transparente, y la conversión de 5,10-M-THFA en 10-F-THFA se monitoriza por análisis espectral usando una cubeta de cuarzo. La absorción UV cambiará de 356 nm a 258 nm durante esta etapa. Esto da como resultado una solución 1,6 mM de 10-F-THFA. Los compuestos de prueba se preparan en DMSO para fabricar una solución madre 10 mM. La solución madre se diluye en serie 3 veces en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones finales de compuesto que varían de 100 µM a 5 nM. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 5 %.

Procedimiento de ensayo de enzimas

10 A cada pocillo de una placa de ensayo de polipropileno de 384 pocillos (NUNC 264573), se añaden 1 µl de DMSO (pocillos de control) o compuesto en DMSO y 9 µl de ZMP 55,56 µM (Sigma-Aldrich CAS 3031-94-5) en agua. Después, se añaden 10 µl de 10-F-THFA 200 µM y enzima ATIC 6 nM en bicarbonato de amonio 40 µM. La enzima se omite en los pocillos usados para definir el 100 % de inhibición. Las condiciones finales de ensayo son ZMP 25 µM, 10-F-THFA 100 µM, enzima ATIC 3 nM y bicarbonato de amonio 20 µM. El ensayo se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se añaden 40 µl de ACN para detener la reacción.

15 La inhibición del ensayo bioquímico de AICARFT se determina por un procedimiento de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) monitorizando la señal de IMP y ZMP. El procedimiento utilizó un sistema de cromatografía Agilent RapidFire 300 y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo AB Sciex 6500™ con software Analyst® 2.1. Las muestras bioquímicas se cargan sobre una columna de guardia de intercambio de aniones débiles polimérica de empaquetamiento personalizado usando un tiempo de muestreo de 0,6 segundos (aproximadamente 30 µl) y tampón de carga de acetato amónico 1 mM en ACN al 10 % fluyendo a 1,25 ml/minuto. Las muestras se lavan durante 1 segundo, y después se eluyen durante 2 segundos usando una mezcla 60:40 de acetato amónico 20 mM, pH 10 y ACN con un caudal total de 1,25 ml/minuto. A continuación de la elución, la columna se vuelve a equilibrar durante 3000 ms con el tampón de carga antes de comenzar la siguiente inyección. Este sistema tiene un tiempo de ciclo total de aproximadamente 9 segundos/muestra.

20 El espectrómetro de masas se opera en el modo de monitorización de reacción múltiple TurbolonSpray® de iones negativos con una temperatura de fuente de 750 °C. Los iones de fragmento y precursor para cada analito son: IMP (347→79) y ZMP (337→79). Las áreas de pico para IMP y ZMP se determinan usando AB Sciex MultiQuant™ versión 2.1. El área de pico de IMP dividida por la suma de las áreas de pico de IMP y ZMP se usa para estimar la conversión porcentual de la reacción. La conversión porcentual se ajusta a una ecuación logística de 4 parámetros usando ACTIVITYBASE 4.0 para determinar los valores de CI₅₀. Los valores específicos de actividad representativos de los compuestos ilustrados probados en este ensayo se proporcionan en la Tabla 15.

Tabla 15 Ensayo de enzimas

Ejemplo n.º	CI ₅₀ (nM)
1	15,0 (± 10,9, n = 9)
8	13,8 (± 7,0, n = 4)
33	7,75 (± 1,15, n = 3)
41	10,6 (±3,1, n = 4)
46	29,1 (± 28,8, n = 6)
81	<5,08
84	<5,08
Media ± SEM; SEM = error típico de la media	

35 Los datos en la Tabla 15 muestran que los compuestos de los Ejemplos 1, 8, 33, 41,46, 81 y 84 inhiben AICARFT en este ensayo.

Medio bajo en folato

40 Complementar 500 ml de medio RPMI libre de folato de Gibco (Gibco n.º 27016-021) con Hepes 1 M (5 ml), piruvato de Na 100 mM (5 ml) y 0,5 g/ml de glucosa (2,5 ml) para coincidir con un medio RPMI de ATCC alto en folato (ATCC n.º 30-2001). Para preparar un medio completo, medios de RPMI tanto regular como libre de folato se complementan con FBS al 10 %. La adición de FBS a un medio libre de folato añade niveles bajos de folato y se considera ahora que es medio bajo en folato.

Detección por EM de ZMP en células NCI H460 cultivadas con medio bajo en folato

45 Cultivar células NCI-H460 en medio RPMI alto en folato completo (ATCC n.º 30-2001) hasta que la confluencia celular alcanza ~ 80 %. Lavar células con PBS, tripsinizar, resuspender células en medio RPMI bajo en folato completo (Gibco n.º 27016-021) y realizar un recuento celular. Transferir 1,25 x 10⁶ células a un matraz T225 que

- contiene medio RPMI bajo en folato completo (40 ml). Cultivar durante siete días. Dividir las células de nuevo con medio bajo en folato completo si la confluencia sobrepasa un 80 %. Lavar células con PBS, tripsinizar, resuspender células en medio RPMI bajo en folato completo, y realizar un recuento celular. Tomar 10 alícuotas x 10⁶ células en medio bajo en folato completo (1 ml) + DMSO al 5 % por criovial. Usar un aparato de congelación de células para congelar las células de forma lenta y controlada en un congelador a -80 °C. El día siguiente, transferir las células a nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo. Descongelar las células congeladas de un criovial en un baño de agua a 37 °C, lavar las células una vez con medio de ensayo bajo en folato: medio 1640 de RPMI libre de folato (Gibco, n.º 27016-021), Glucosa (Sigma, n.º G5767), Hepes (Hyclone, n.º SH30237.01), Piruvato de Na (Hyclone, n.º Sh30239.01), FBS al 10 % (Hyclone, n.º SH30070.03). Ajustar la concentración de células a 250.000 células/ml con el medio, sembrar las células en placa mediante la adición de 100 µl/pocillo (25.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos de Biocoat poli-D-lisina (BD, n.º 35-4640), e incubar a 37 °C durante una noche con 5 % de CO₂. Tratar células con compuesto, 20 µl/pocillo, diluido en un medio que contiene DMSO al 3 %. Incubar a 37 °C durante 16 horas con 5 % de CO₂, después retirar el medio y añadir 1 x tampón de lisis SureFire (50 µl) (PerkinElem, componente de kit SureFire®) a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 10 min con agitación suave.
- Los efectos celulares de la inhibición de AICARFT sobre las concentraciones de ZMP, 2'-deoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) y W¹-(β-D-ribofuranosil)-5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAr) se determinan por CL-EM. Se retira el medio de las células cultivadas en una placa de 96 pocillos y estas se lisan en tampón de lisis SureFire® de AlphaScreen®. Las curvas patrón que contienen ZMP, dUMP y AICAr a concentraciones de 5-10.000 ng/ml se preparan en acetato amónico 40 mM, pH 4. Se combinan alícuotas (40 µl) de cada patrón o muestra en una placa de 96 pocillos profunda con 160 µl de solución patrón interna que contiene ¹³C₅-ZMP (síntesis personalizada) y ¹³C₅-AICAr (síntesis personalizada) a 100 ng/ml en acetato amónico 40 mM, pH 4. Un manipulador de líquidos Beckman Biomek FX se usa para añadir 400 µl de DCM a cada muestra. Las muestras se sellan, se someten a vórtex durante 5 minutos, y se colocan en el refrigerador durante al menos 30 minutos. Las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 4.000 rpm y 4 °C usando una centrífuga Eppendorf 5810R, y el manipulador de líquidos Biomek se usa para transferir 75 µl de la capa acuosa a una placa de 96 pocillos limpia. Las placas se sellan antes del análisis.
- El procedimiento de CL-EM utiliza un sistema de HPLC Shimadzu Prominence 20A conectado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo AB Sciex 6500™ o un AB Sciex 5500™ ejecutando un software Analyst® 2.1. Las muestras extraídas se separan usando una columna de guardia Javelin de Thermo Hypercarb™ (2,1 x 20 mm, 5 µm) con un volumen de inyección de 15 µl y un caudal de 1 ml/minuto. Fase móvil A es una mezcla 95:5 de formiato amónico 50 mM, pH 4 y ACN. La fase móvil B es una mezcla 70:30 de ACN y MeOH con adición de ácido fórmico al 0,3 % y solución de hidróxido de amonio concentrado al 2 % (v/v). El gradiente es como sigue: 0 minutos, 0 % de B; 0,25 minutos, 0 % de B; 2,00 minutos, 30 % de B; 2,01 minutos, 95 % de B; 3,50 minutos, 95 % de B; 3,51 minutos, 0 % de B, 5,00 minutos, parada.
- El espectrómetro de masas se opera en el modo de monitorización de reacción múltiple TurbolonSpray® de iones positivos con una temperatura de fuente de 700 °C. Los iones de fragmento y precursor para cada analito son: ZMP (339→110), ¹³C₅-ZMP (344→110), dUMP (309→81), AICAr (259→127) y ¹³C₅-AICAr (264→127). Las curvas de calibración se construyen al representar las concentraciones de analito frente a las relaciones de área de pico patrón interna/de analito y realizar un ajuste lineal de los datos usando una ponderación de 1/concentración con el software AB Sciex MultiQuant™ 2.1. Las concentraciones de ZMP se calculan retrospectivamente se ajustan a una ecuación logística de 4 parámetros usando ACTIVITYBASE 4.0 para determinar los valores de CI₅₀. Los valores específicos de actividad representativos de los compuestos ilustrados probados en este ensayo se proporcionan en la Tabla 16.

Tabla 16 Ensayo de medio bajo en folato

Ejemplo n.º	CI ₅₀ (nM)
1	22,0 (±9,9, n = 7)
8	25,0 (+ 22,1, n = 3)
33	7,93 (± 5,24, n = 7)
41	42,2 (±18,8, n = 5)
46	39,6 (633,1, n = 6)
81	10,2 (± 8,6, n = 4)
84	10,1 (±7,3, n = 5)
Media ± SEM; SEM = error típico de la media	

Los datos en la Tabla 16 muestran que, aunque la presencia de niveles bajos de folato en el medio modula en cierta medida, los compuestos de los Ejemplos 1, 8, 33, 41, 46, 81 y 84 siguen inhibiendo AICARFT en este ensayo.

45 Ensayo de proliferación *in vitro*

La actividad anti-proliferativa *in vitro* de los Ejemplos 1 y 41 se determina por ensayos de recuento del número de células frente a un panel de líneas celulares de glándula suprarrenal, ganglios autónomos, vías biliares, ALL de

5 sangre, AML de sangre, CML de sangre, linfoma Hodgkin de sangre, linfoma de sangre, mieloma múltiple de sangre, NHL de sangre, RAEB de sangre, hueso, ER+ de mama, fibroblasto de mama, fibroblasto mixto de mama, HER2 de mama, normal de mama, triple negativo de mama, cuello uterino, CNS, endometrio, ojo, fibroblasto normal, ns de riñón, renal de riñón, intestino grueso, hígado, normal de hígado, adenocarcinoma de pulmón, ns de pulmón, NSCLC de pulmón, NSCLC mezcladas de pulmón, SCLC de pulmón, escamosa de pulmón, melanoma, normal de melanoma, adenocarcinoma de esófago, ns de esófago, escamosa de esófago, ovario, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma ductal de páncreas, ns de páncreas, mesotelioma de pleura, adenocarcinoma de próstata, célula pequeña de próstata, glándula salival, intestino delgado, tejido blando, estómago, testículos, tiroides, escamosa de tiroides, normal de células endoteliales de la vena umbilical, escamosa de las vías aerodigestivas superiores, ns de vías urinarias, carcinoma de células transicionales de las vías urinarias, y de origen de escamosas de vulva obtenidas de los bancos de células ATCC, CASTCC, CLS, DSMZ, ECACC, HSRRB, ICLC, JCRB, NCI, Riken y SNU. Las células se cultivan usando las condiciones de cultivo recomendadas por los bancos de células en la fecha de la adquisición de las muestras. Preparar medio completo añadiendo un suero de caballo apropiado (de Invitrogen, n.º de catálogo 16050130) o FBS (de Invitrogen, n.º de catálogo 10099-141 o Hyclone, n.º de catálogo CH30160.03) y aditivos.

10 Para las líneas celulares unidas, retirar y descartar el medio de cultivo usando una bomba de vacío. Enjuagar brevemente la capa de células con solución de Tripsina al 0,25 % (p/v)-EDTA al 0,038 % (p/v) para retirar todas las trazas de suero que contiene inhibidor de tripsina. Añadir 3,0 ml de solución de Tripsina-EDTA al matraz y observar las células bajo un microscopio invertido hasta que se dispersa la capa de células. Añadir 8,0 ml de medio de crecimiento completo y aspirar las células mediante pipeteado suave.

15 Para las líneas celulares en suspensión, transferir la suspensión de células a un tubo de centrifuga y centrifugar a 800-1000 rpm durante 3-5 minutos. Descartar el sobrenadante usando una bomba de vacío. Añadir el volumen apropiado de medio completo. Suspender el sedimento celular pipeteando suavemente. Contar los números de células y ajustar células a la densidad de siembra apropiada. Añadir 100 µl (para las células que se probarán durante 48, 96 y 120 horas) o 200 µl (para las células que se probarán durante 144 horas) de suspensión de células a placas de fondo transparente de paredes de color blanco de 96 pocillos (de Corning, n.º de catálogo 3707 o 3610) de acuerdo con el esquema de placas planificado y colocar las placas en el incubador de CO₂ durante una noche.

20 Preparar soluciones madre 2 mM de DMSO de compuestos a probar en ensayo de proliferación. Determinar las concentraciones a probar y diluir los compuestos a 200 x la concentración final en medio bajo en folato. DMSO es el diluyente. Realizar una dilución 1:3 en serie de compuestos en diluyente. Añadir 0,5 o 1 µl/pocillo de compuestos diluidos a células en placa. La concentración final de los compuestos será 1 x. Incubar las placas a 37 °C durante aproximadamente 2 tiempos de duplicación según se determina para cada línea celular. Observar la morfología celular bajo un microscopio invertido. Equilibrar la placa y su contenido a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Añadir 100 µl de reactivo CellTiter-Glo (Promega, n.º de cat. G7571) a la placa de ensayo. Mezclar el contenido durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. Dejar que la placa se incube a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente. Pegar el fondo transparente con sello posterior de color blanco y registrar la luminiscencia con Flexstation3 (Molecular Devices). Los ajustes deberían ser: Luminiscencia, tiempo de integración 500 ms. Determinar el % de inhibición para cada muestra (véase la Tabla 17).

40 Tabla 17: Ensayo de proliferación

Histología	Número de líneas celulares					
	Ejemplo 1			Ejemplo 41		
	Recuento total	CI ₅₀ Rel ≤ 2,50 µM y % de inh ≥ 50	CI ₅₀ Rel > 2,50 µM o % de inh < 50	Recuento total	CI ₅₀ Rel ≤ 2,50 µM y % de inh ≥ 50	CI ₅₀ Rel > 2,50 µM o % de inh < 50
Glándula_Suprarrenal	2		2	2		2
Ganglios_Autónomos	7	2	5	7	1	6
Vías_biliares	3	1	2	3	1	2
ALL_de sangre	14	10	4	14	7	7
AML_de sangre	9	5	4	9	3	6
CML_de sangre	3	3		3	3	
Linfoma_Hodgkin_de sangre	1		1	1		1
Linfoma_de sangre	2	2		2	2	
Mieloma_múltiple_de sangre	6	2	4	6	2	4
NHL_de sangre	19	11	8	19	10	9
RAEB_de sangre	1	1		1	1	
Hueso	12		12	10		10

(continuación)

Histología	Número de líneas celulares					
	Ejemplo 1			Ejemplo 41		
	Recuento total	CI ₅₀ Rel ≤ 2,50 µM y % de inh ≥ 50	CI ₅₀ Rel > 2,50 µM o % de inh < 50	Recuento total	CI ₅₀ Rel ≤ 2,50 µM y % de inh ≥ 50	CI ₅₀ Rel > 2,50 µM o % de inh < 50
ER_positivo_de mama	6	1	5	5		5
Fibroblasto_de mama	1		1	1		1
Fibroblasto_mixto_de mama	1		1	1		1
HER2_de mama	12	4	8	12	2	10
Normal_de mama	1		1	1		1
TNBC_de mama	17	5	12	16	4	12
Cuello uterino	8	1	7	8	1	7
CNS	16	5	11	16	4	12
Endometrio	6		6	6		6
Ojo	1		1	1		1
Normal_de fibroblasto	1	1		1		1
NS_de riñón	8	3	5	8	2	6
Renal_de riñón	13	5	8	13	4	9
Intestino_grosso	28	11	17	28	10	18
Hígado	30	6	24	30	4	26
Normal_de hígado	2		2	2		2
Adenocarcinoma_de pulmón	49	10	39	49	8	41
NS_de pulmón	2		2	2		2
NSCLC_de pulmón	5		5	5		5
NSCLC_mixto_de pulmón	2	1	1	2	1	1
SCLC_de pulmón	28	5	23	28	3	25
Escamosa_de pulmón	9	2	7	9	1	8
Melanoma	33	6	27	33	6	27
Normal_de melanoma	1		1	1		1
Adenocarcinoma_de esófago	2		2	2		2
NS_de esófago	2		2	2		2
Escamosa_de esófago	15	11	4	15	10	5
Ovario	10	4	6	10	4	6
Adenocarcinoma_de páncreas	7	1	6	7		7
Carcinoma_Ductal_de páncreas	5	2	3	5	3	2
NS_de páncreas	3	1	2	3		3
Mesotelioma_de pleura	4		4	4		4
Adenocarcinoma_de próstata	5		5	5		5
Célula_Pequeña_de próstata	1		1	1		1
Glándula_salival	2		2	2		2
Intestino_delgado	1	1		1	1	
Tejido_blando	8	1	7	8	2	6
Estómago	30	9	21	30	5	25
Testículos	1	1		1		1
Tiroides	2		2	2		2
Escamosa_de tiroides	1		1	1		1
Normal_de célula_endotelial_de la vena_umbilical	1		1	1		1

(continuación)

Histología	Número de líneas celulares					
	Ejemplo 1			Ejemplo 41		
	Recuento total	CI ₅₀ Rel ≤ 2,50 µM y % de inh ≥ 50	CI ₅₀ Rel > 2,50 µM o % de inh < 50	Recuento total	CI ₅₀ Rel ≤ 2,50 µM y % de inh ≥ 50	CI ₅₀ Rel > 2,50 µM o % de inh < 50
Escamosa de las vías aerodigestivas superiores	12	4	8	12	1	11
NS de vías urinarias	2	2		2		2
Carcinoma de Células Transicionales de las Vías Urinarias	7	3	4	7	3	4
Escamosa de Vulva	2		2	2		2
Total	482	143	339	478	109	369

Los datos en la Tabla 17 muestran que los compuestos de los Ejemplos 1 y 41 probados en este ensayo inhiben la proliferación de células cancerosas en condiciones de medio convencionales. Como datos representativos de este ensayo, Ejemplo 1 y Ejemplo 41 en una de las 49 líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón evaluadas mostraron una CI₅₀ de 0,61 µM y 1,88 µM respectivamente para INCI-H460 de cáncer de pulmón de células grandes y en una de las 28 líneas celulares de intestino grueso mostraron una CI₅₀ de 8,1 µM y 10,8 µM respectivamente para el carcinoma colorrectal HCT-116, en condiciones de medio convencionales.

Ensayo de proliferación *in vitro* bajo en folato

La actividad anti-proliferativa *in vitro* del Ejemplo 1 se determina mediante ensayos de recuento del número de células frente a un panel de 46 líneas celulares de cáncer de pulmón, colorrectal, gástrico, pancreático, hígado, pecho, cerebro, melanoma, pancreático, fibrosarcoma, riñón, leucemia de linfocitos T, leucemia linfoblástica, monocítica y origen de CML obtenidas de bancos de células ATCC, DSMZ, JCRB y Riken. Transferir células que se están cultivando en medio RPMI alto en folato (ATCC n.º 30-2001) + FBS al 10 % (Hyclone n.º SH30070.03) a un medio RPMI bajo en folato y privar de folato durante 7 días. Lavar células que se han cultivado en medio alto en folato con PBS, tripsinizar, y resuspender en medio bajo en folato. Cultivar células en medio bajo en folato durante 7 días, asegurando que los matraces de cultivo de tejidos se siembran a una densidad que no supere un 80 % de confluencia después de 7 días. Lavar las células en PBS, tripsinizar, y resuspender en medio bajo en folato y contar las células. Sembrar una placa de poli D lisina de 96 pocillos (Corning n.º 354640) a 3000 células/pocillo en 100 µl de medio bajo en folato. Dejar que las células se unan durante una noche. Preparar soluciones madre 10 mM de DMSO de compuestos a probar en ensayo de proliferación. Determinar las concentraciones a probar y diluir compuestos a 2 x la concentración final en medio bajo en folato. Calcular el % de DMSO de esta solución y usar este valor como diluyente. Realizar una dilución 1:2 o 1:3 en serie de compuestos en diluyente. Añadir 100 µl/pocillo de compuestos diluidos a células en placa. La concentración final de los compuestos será 1 x. Garantizar que el % final de DMSO no supera el 0,5 %. Los controles de referencia de señal máximo y mínimo se reservan para las columnas n.º 1 (estaurosporina 2 µM) y la columna n.º 12 (DMSO a una concentración de diluyente 100%). Dosificar las células con los compuestos de interés durante 7 días. Para medir los resultados de proliferación, añadir 1/10 de volumen de reactivo de viabilidad celular Alamar Blue (Invitrogen DAL-1100) a cada pocillo. Devolver la placa al incubador de cultivo de tejidos y dejar que la reacción avance durante aproximadamente 1,5-4 horas. Leer las placas en el lector de placas Envision (Perkin Elmer), u otro lector de placas fluorescentes, con excitación a 570 nm y emisión a 585 nm. Determinar el % de inhibición para cada muestra (véase la Tabla 18).

Tabla 18: Actividad anticancerígena *in vitro* del Ejemplo 1 en medio bajo en folato

Líneas celulares de cáncer	Número de líneas celulares	Número de líneas celulares	
		>50 % de inhibición CI ₅₀ relativa < 20 nM	< 50 % de inhibición CI ₅₀ relativa > 20 nM
Pulmón	21	14	7
Gastrointestinal	6	4	2
Pancreático	4	2	2
Melanoma	3	1	2
Cerebro	3	2	1
Mama	3	0	3
Otros	9	4	5
Total	49	27	22

Los datos en la Tabla 18 muestran que el Ejemplo 1, el compuesto ilustrado probado en este ensayo, inhibe la proliferación de células cancerosas en condiciones de medio con niveles de folato similares al plasma humano. Como datos representativos de este ensayo, el Ejemplo 1 en una de las 21 líneas celulares de pulmón puso de manifiesto una CI_{50} de 20 nM para NCI-H460 de cáncer de pulmón de células grandes, y en una de las 6 líneas celulares gastrointestinales pusieron de manifiesto una CI_{50} de 3 nM para, el carcinoma colorrectal HCT-116, en medio bajo en folato.

Eficacia antitumoral en modelo de xenoinjerto de ratón de carcinoma humano

La actividad anticancerígena *in vivo* del Ejemplo 1 se estudia en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano HCT-116 y modelo de tumor de xenoinjerto de ratón de carcinoma de pulmón humano NCI-H460, que se predice que es sensible basándose en los datos de ensayo proliferativo *in vitro* descritos anteriormente. Se realizan estudios *in vivo* usando ratones lampiños atómicos hembra (Harlan) con un peso corporal de 23-28 g en la primera medición. Tras la recepción y de principio a fin del estudio, los animales se alojan, 5 animales por jaula, en unas jaulas de fondo sólido apropiadamente dimensionadas con lecho de contacto. La sala con los animales se mantiene en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales se aclimatan durante 14 días antes de la implantación de las células NCI-H460 o HCT-116 con una dieta baja en folato (Teklad 130451) a voluntad y se proporciona a voluntad agua corriente esterilizada en autoclave. Las líneas celulares de HCT-116 y NCI-H460 se obtienen de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se cultiva siguiendo las instrucciones de la ATCC. Las células usadas para la implantación se recogen durante el crecimiento de fase logarítmica y se suspenden en medio libre de suero. Las células suspendidas se diluyen después 1:1 con matriz de BD Matrigel (ref. 354234). Las células se inyectan en el costado derecho con $5,0E+06$ células (0,2 ml de suspensión de células/Matrigel). Los tumores se monitorizan comenzando el día 8 después del implante. Los animales se redistribuyen en grupos con 5-6 animales por grupo utilizando un software de aleatorización patentado cuando el volumen tumoral promedio alcanza 200 mm^3 . Los grupos 1-12 se mantienen con una dieta baja en folato (Teklad 130451) y la administración de ácido fólico (Sigma F8798 n.º de lote SLBH0909V) a unas dosis enumeradas en la Tabla 19 comenzó 28 horas antes del inicio de la dosis y 4 horas antes de cada dosis. El ácido fólico se formula semanalmente en PBS y se dosifica a través de sonda oral a 0,2 ml. Los grupos 13-16 se colocan con comida convencional (Teklad 2920X) a aleatorización. El compuesto se formula semanalmente en 20 % de HPBCD en tampón de fosfato pH 8 con la adición de un equivalente molar de NaOH. El compuesto formulado se administra a las dosis y programas indicados en la Tabla 19 por sonda oral (0,2 ml). El vehículo se administra también cada día como el brazo de control del estudio. El volumen tumoral y el peso corporal se miden 2 x a la semana. El volumen tumoral se determina por mediciones de calibrador mm) y usando la fórmula para una esfera elipsoide: volumen tumoral (mm^3) = longitud x anchura²/ 2, en la que longitud y anchura se refieren a las dimensiones perpendiculares mayor y menor recogidas en cada medición. El comportamiento de los animales y la salud de los animales se monitorizan diariamente durante el periodo de dosificación. El estudio se termina después de la última dosis indicada en la Tabla 19.

El análisis estadístico de los datos de volumen tumoral comienza con una transformación de datos a una escala logarítmica para igualar la varianza a través del tiempo y los grupos de tratamiento. Los datos de volumen logarítmico se analizan con un análisis de medidas repetidas de dos vías de la varianza por tiempo y tratamiento usando los procedimientos MIXED en software SAS (Versión 9.3). El modelo de correlación para las medidas repetidas es Spatial Power. Los grupos tratados se comparan con el grupo de control en cada punto en el tiempo. El procedimiento MIXED se usa también por separado para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y los errores típicos en cada punto en el tiempo. Ambos análisis dan cuenta de la autocorrelación dentro de cada animal y la pérdida de datos que tiene lugar cuando los animales con tumores grandes se retiran pronto del estudio. Las medias ajustadas y los errores típicos se representan para cada grupo de tratamiento frente al tiempo. El análisis que compara los grupos tratados con los grupos de control en cada punto en el tiempo usa el log 10 del volumen tumoral y produce los valores p. Para la significación estadística de los valores p mostrados, "*" = se usa $P < 0,05$, Delta T/C, % de cálculo. Ecuaciones: T = volumen tumoral final en grupo tratado; T0 = volumen tumoral basal en grupo tratado (se supone que es igual que C0); C = volumen tumoral final en el grupo de control; C0 = volumen tumoral basal en el grupo de control (se supone que es igual que T0); Delta T/C, % = $100 * (T - T0) / (C - C0)$

Ensayo de inhibición objetivo *in vivo* (IVTI) de AICARFT

Los efectos *in vivo* de la inhibición de AICARFT sobre las concentraciones de analitos relacionados con la ruta se determinan por análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) de xenoinjertos de tumor. Las muestras de xenoinjerto de tumor sobre hielo seco se pesan en una balanza analítica, se transfieren a un tubo Eppendorf Safe-Lock Tube™ de 2 ml, y se colocan sobre hielo seco. Una solución patrón interna que contiene 13C5-ZMP (1000 ng/ml), 13C5-AICAr (500 ng/ml), ácido ascórbico (0,1 %), y ácido fórmico (0,1 %) en MeOH/DCM (80:20) se prepara y se almacena a 20 °C. Por cada mg de tejido en el tubo de muestra, se añaden 10 µl de solución patrón interna. Las curvas patrón que contienen ZMP, dUMP, AICAr a concentraciones de 7,6-50.000 ng/ml se preparan por separado en la solución patrón interna.

Una perla de acero de 5 mm (Qiagen) se añade a cada tubo de muestra y los tubos se colocan sobre hielo húmedo durante 15 minutos. Las muestras se homogeneizan en un aparato TissueLyser II de Qiagen durante 5 minutos a 15 Hz, y después se centrifugan en una microcentrífuga Eppendorf 5430R durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4 °C.

Se retiran alícuotas de cada sobrenadante (200 µl) y se colocan en una placa de 96 pocillos profunda. También se colocan alícuotas (200 µl) de cada solución de curva patrón en una placa de 96 pocillos profunda. Un manipulador de líquidos Beckman Biomek FX añadió DCM (600 µl) y solución de ácido ascórbico al 0,1 % (200 µl) a cada pocillo. La placa se sella, se somete a vórtex durante 5 minutos y se centrifuga durante 5 minutos a 4.000 rpm y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810R. Se transfieren alícuotas (75 µl) de la capa superior a una placa de 96 pocillos limpia, y se añaden 75 µl adicionales de acetato amónico 40 mM, pH 4 a cada pocillo. Las placas se sellan antes del análisis. El procedimiento de CL-EM utilizó un sistema de HPLC Shimadzu Prominence 20A conectado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo AB Sciex 6500™ o un AB Sciex 5500™ ejecutando un software Analyst®. Las muestras extraídas se separan usando dos columnas de guardia Javelin de Thermo Hypercarb™ (2,1 x 20 mm, 5 µm) conectadas en serie con un volumen de inyección de 15 µl y un caudal de 0,75 ml/minuto. Fase móvil A es una mezcla 95:5 de formiato amónico 50 mM, pH 4 y ACN. La fase móvil B es una mezcla 70:30 de ACN y MeOH con adición de ácido fórmico al 0,3 % y solución de hidróxido de amonio concentrado al 2 % (v/v). El gradiente es como sigue: 0 minutos, 0 % de B; 0,25 minutos, 0 % de B; 4,00 minutos, 30 % de B; 4,01 minutos, 95 % de B; 5,50 minutos, 95 % de B, 3,51 minutos, 0 % de B, 7,50 minutos, parada. El espectrómetro de masas se opera en el modo de monitorización de reacción múltiple Turbolon-Spray® de iones positivos con una temperatura de fuente de 700 °C. Los iones de fragmento y precursor para cada analito son: ZMP (339→110), 13C5-ZMP (344→110), dUMP (309→81), AICAr (259→127) y 13C5-AICAr (264→127). Las curvas de calibración se construyen al representar las concentraciones de analito frente a las relaciones de área de pico patrón interna/de analito y realizar un ajuste lineal de los datos usando una ponderación de 1/concentración con el software AB Sciex MultiQuant™ 2.1. 13C5-ZMP se usa como patrón interno para ZMP y dUMP. 13C5-AICAr se usa como patrón interno para AICAr.

Ensayo de inhibición objetivo *in vivo* (IVTI) de AICARFT en plasma de ratón y perro

Los efectos *in vivo* de la inhibición de AICARFT sobre la concentración en circulación de AICAr se determina por cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM). Las curvas patrón que contienen AICAr a concentraciones de 1 ng/ml - 2000 ng/ml se preparan en acetato amónico 40 mM, pH 4. Muestras de plasma (75 µl) o patrones (75 µl) se combinan con 300 µl de una solución patrón interna que contiene 13C5-AICAr (20 ng/ml) y ácido fórmico (1 %) en ACN. Las muestras se mezclan con vórtex durante 5 minutos y se hacen pasar a través de una placa de SPE de eliminación de fosfolípidos de 96 pocillos Phenomenex Phree. Los eluyentes se recogen en una placa de 96 pocillos y se secan bajo atmósfera de nitrógeno calentado a 50 °C. Cada muestra se reconstituye en 50 µl de acetato amónico 40 mM, pH 4. Las placas se sellan y se someten a vórtex durante 5 minutos antes del análisis. El procedimiento de CL-EM utilizó un sistema de HPLC Shimadzu Prominence 20A conectado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo AB Sciex 6500™ o un AB Sciex 5500™ ejecutando un software Analyst®. Las muestras extraídas se separan usando dos columnas de guardia Javelin de Thermo Hypercarb™ (2,1 x 20 mm, 5 µm) conectadas en serie con un volumen de inyección de 15 µl y un caudal de 1 ml/minuto. Fase móvil A es una mezcla 95:5 de formiato amónico 50 mM, pH 4 y ACN. La fase móvil B es una mezcla 70:30 de ACN y MeOH con adición de ácido fórmico al 0,3 % y solución de hidróxido de amonio concentrado al 2 % (v/v). Para las muestras de plasma de ratón, se usa el siguiente gradiente: 0 minutos, 0 % de B; 0,25 minutos, 0 % de B; 2,00 minutos, 25 % de B; 2,01 minutos, 95 % de B; 3,50 minutos, 95 % de B; 3,51 minutos, 0 % de B; 4,50 minutos, parada. Para las muestras de plasma de perro, se usa el siguiente gradiente para retirar las interferencias endógenas: 0 minutos, 0 % de B; 0,25 minutos, 0 % de B; 5,99 minutos, 20 % de B; 6,00 minutos, 95 % de B; 8,00 minutos, 95 % de B; 8,01 minutos, 0 % de B; 10,00 minutos, parada. El espectrómetro de masas se opera en el modo de monitorización de reacción múltiple TurbolonSpray® de iones positivos con una temperatura de fuente de 700 °C. Los iones de fragmento y precursor para cada analito son: AICAr (259→127) y 13C5-AICAr (264→127). Las curvas de calibración se construyen al representar las concentraciones de analito frente a las relaciones de área de pico patrón interna/de analito y realizar un ajuste lineal de los datos usando una ponderación de 1/concentración con el software AB Sciex MultiQuant™ 2.1.

Tabla 19: Actividad antitumoral en modelo de tumor de xenoinjerto de ratón e IVTI

Grupo	Células	Dosis de ácido fólico	Ejemplo n.º	Dosis de compuesto	Día	% de T/C	ZMP en tumor medio, µM	AICAr en plasma medio, nM
13	NCI-H460		Vehículo		20		0,1	8,4
14	NCI-H460		1	10 mg/kg QD x 13, vía oral	20	113	3,7	368
15	NCI-H460		1	30 mg/kg QD x 13, vía oral	20	42*	66	1400
5	HCT-116	0,75 mg/kg (QD x 15, vía oral)	Vehículo		23		0,2	1,5
6	HCT-116	0,75 mg/kg (QD x 15, vía oral)	1	10 mg/kg QD x 14, vía oral	23	65*	20	88
7	HCT-116	0,75 mg/kg (QD x 15, vía oral)	1	30 mg/kg QD x 14, vía oral	23	57*	35	181
13	HCT-116		Vehículo		23		0,2	1,5

(continuación)

Grupo	Células	Dosis de ácido fólico	Ejemplo n.º	Dosis de compuesto	Día	% de T/C	ZMP en tumor medio, µM	AICAr en plasma medio, nM
14	HCT-116		1	10 mg/kg QD x 14, vía oral	23	112	7,0	44
15	HCT-116		1	30 mg/kg QD x 14, vía oral	23	49	26	154

Como se proporciona en la Tabla 19 en lo que antecede, el compuesto ilustrado del Ejemplo 1 probado en este ensayo muestra una actividad anticancerígena *in vivo* sobre los tumores de xenoinjerto de HCT-116 y NCI-H460 cuando se administra cada día de manera continua durante 2 semanas. Esta actividad es consistente con la actividad *in vitro* observada con las líneas celulares de cáncer HCT-116 y NCI-H460. El ratón tiene unos niveles de folato en suero significativamente más altos que los seres humanos (CP Leamon y col. (2008) JPET 327: 918-925) y puede subestimar la actividad observada en seres humanos basándose en la dependencia de la CI₅₀ anti-proliferativa sobre los niveles de folato en el cultivo de tejidos. La actividad observada de inhibición del crecimiento tumoral está asociada con aumentos en ZMP en tumor y AICAr en plasma. Los datos en la Tabla 19 también soportan el uso de AICAr en plasma como una bioetiqueta para la inhibición de AICARFT.

Respuesta farmacodinámica en perros Beagle

La respuesta farmacodinámica (FD) al Ejemplo 1, el Ejemplo 33 y el Ejemplo 41 se evalúan en la especie no clínica más pertinente en estudios de dosis ascendente única en perros Beagle. Los perros Beagle, los primates no humanos y el ser humano son especies bajas en folato en suero, mientras que los roedores son altos en folato en suero (CP Leamon y col. (2008) JPET 327:918-925). La respuesta farmacodinámica en perros tratados con un inhibidor de AICARFT será más representativa de la respuesta farmacodinámica esperada en pacientes tratados con un inhibidor de AICARFT.

Para mostrar el compromiso objetivo en pares de perros Beagle tratados anteriormente "normales", es decir que no portan tumores, se tratan con un inhibidor de AICARFT por administración mediante sonda oral; cada experimento incluyó dos pares de un perro macho y uno hembra que se tratan en ocasiones alternas - cada par de perros recibió dos tratamientos con una separación de al menos siete días.

A continuación del tratamiento, se toman muestras de plasma a unos intervalos cronometrados para la medición de la respuesta farmacodinámica como se muestra mediante concentraciones aumentadas de AICAr en plasma. Los animales se devuelven a la colonia para su reutilización después de la compleción del experimento.

25

Tabla 20 Aumento de AICAr en plasma en perros Beagle

Ejemplo n.º	Dosis	Tiempo de recogida post dosis	AICAr en plasma medio nM
1	10 mg/kg QD, vía oral	8	138
1	30 mg/kg QD, vía oral	8	254
1	100 mg/kg QD, vía oral	8	652
1	300 mg/kg QD, vía oral	8	931
	Vehículo, vía oral	0	18
33	10 mg/kg QD, vía oral	8	98
33	30 mg/kg QD, vía oral	8	213
33	100 mg/kg QD, vía oral	8	726
33	300 mg/kg QD, vía oral	8	1150
	Vehículo, vía oral	0	12
41	10 mg/kg QD, vía oral	8	158
41	30 mg/kg QD, vía oral	8	362
41	100 mg/kg QD, vía oral	8	1534
41	300 mg/kg QD, vía oral	8	1373

Como se proporciona en la Tabla 20, el compuesto del Ejemplo 1, el Ejemplo 41 y el Ejemplo 33 probados en este ensayo muestran la inhibición *in vivo* de AICARFT en perros. Esta actividad en perros es consistente con la actividad *in vivo* de estos compuestos observados en las evaluaciones de xenoinjerto de ratón de HCT-116 y NCI-H460, anteriormente.

30

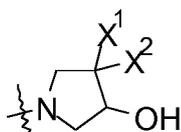
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:

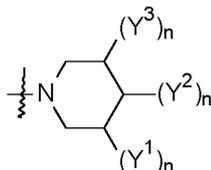


en la que:

5 R¹ se selecciona entre el grupo:

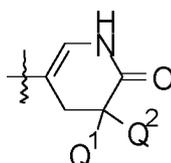


en la que cada uno de X¹ y X² se selecciona independientemente entre hidrógeno, flúor o -CH₃; o uno de X¹ y X² se selecciona entre -OH, -OCH₃, -N(CH₃)₂ o morfolin-4-ilo y el otro es hidrógeno;

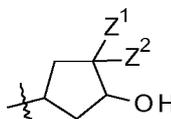


10 en la que cada n se selecciona independientemente entre 0, 1 o 2; Y¹, Y² e Y³ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, -OH, fluoro, -NH₂ o -CF₃; con la condición de que no todos sean hidrógeno; y con la condición de que no todas las n sean simultáneamente 0; y con la condición adicional de que solo una n pueda ser 2; y cuando una n es 2, cada uno de Y¹, Y² e Y³ se seleccionan independientemente entre flúor, -OH o -CF₃;

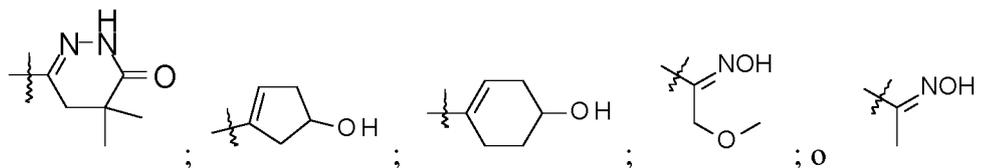
15



en la que Q¹ y Q² se seleccionan independientemente entre hidrógeno, -CH₃ o -CH₂CH₃;



en la que cada uno de Z¹ y Z² se selecciona independientemente entre hidrógeno o flúor;

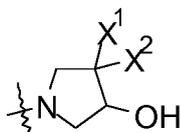


20

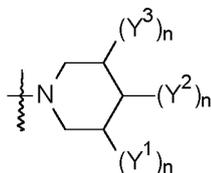
R² es hidrógeno o flúor;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que:

R¹ se selecciona entre el grupo:

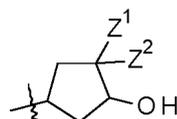


en la que cada uno de X^1 y X^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, flúor o $-CH_3$; o uno de X^1 y X^2 se selecciona entre $-OH$, $-OCH_3$, $-N(CH_3)_2$ o morfolin-4-ilo y el otro es hidrógeno;

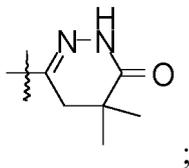


5 en la que cada n se selecciona independientemente entre 0, 1 o 2;
 Y^1 , Y^2 e Y^3 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, $-OH$, fluoro, $-NH_2$ o $-CF_3$; con la condición de que no todos sean hidrógeno; y
 con la condición de que no todas las n sean simultáneamente 0; y con la condición adicional de que solo una n pueda ser 2; y cuando una n es 2, cada uno de Y^1 , Y^2 e Y^3 se seleccionan independientemente entre flúor, $-OH$ o $-CF_3$;

10



en la que cada uno de Z^1 y Z^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno o flúor;

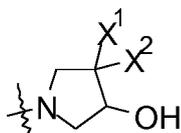


15

R^2 es hidrógeno o flúor;
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

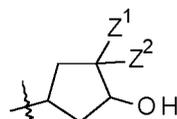
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que:

R^1 se selecciona entre el grupo:

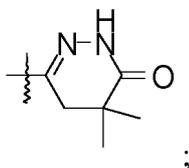


en la que cada uno de X^1 y X^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno, flúor o $-CH_3$;

20



en la que cada uno de Z^1 y Z^2 se selecciona independientemente entre hidrógeno o flúor;



R^2 es flúor;
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 en el que el compuesto es:

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxi-pirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

5 N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3S)-3-hidroxi-pirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

5-[(3S,4R)-3-Fluoro-4-hidroxi-pirrolidin-1-il]-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

10 5-(3,3-Difluoro-(4R)-4-hidroxi-pirrolidin-1-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

5-(5,5-Dimetil-6-oxo-1,4-dihidropiridazin-3-il)-N-(6-fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; o

N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(1R,3R)-3-hidroxiciclopentil]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4 en el que el compuesto es:

15 N-(6-Fluoro-1-oxo-1,2-dihidroisoquinolin-7-il)-5-[(3R)-3-hidroxi-pirrolidin-1-il]tiofeno-2-sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 7. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

8. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer que es glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, osteosarcoma, linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos T, sarcoma fibroblástico, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica aguda, T-ALL, leucemia linfoblástica o monocítica.

25 9. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer que es cáncer de mama triple negativo, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer colorrectal, linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos T, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica aguda, T-ALL, leucemia linfoblástica o monocítica.

30