COMPUESTOS NUCLEÓSIDOS 5’-SUSTITUIDOS

La presente invención se refiere a compuestos nucleósidos 5'-sustituidos novedosos que inhiben la actividad de la proteína arginina metiltransferasa 5 (PRMT5), composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y métodos de uso de los compuestos para tratar trastornos fisiológicos, más particularmente para el tratamiento de cáncer.

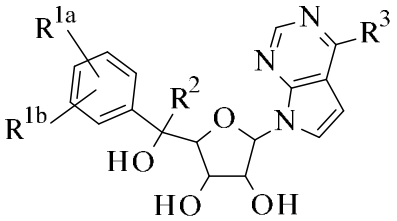
Las proteína arginina metiltransferasas (PRMTs) son una familia de enzimas que pueden añadir uno o dos grupos metilo a los átomos de nitrógeno en la guanidina de residuos de arginina en proteínas histonas y no histonas. Las abundantes modificaciones epigenéticas provocadas por PRMTs permiten la regulación de una amplia variedad de funciones celulares, que incluyen, por ejemplo, el metabolismo del ARN, la regulación transcripcional, la transducción de señales, el desarrollo embrionario y la reparación de ADN dañado. La sobreexpresión de diferentes PRMTs se ha asociado frecuentemente con muchos tipos de cáncer humanos. Recientemente, la evidencia en aumento sugiere que PRMT5, un miembro importante de la familia PRMT, es una posible oncoproteína y está implicada en la tumorigénesis. PRMT5 se sobreexpresa en varios tumores, tiene como sustratos a oncogenes importantes y genes de supervivencia del cáncer y regula el splicing alternativo y la maduración del ARN, un mecanismo que es central para la expresión de proteínas. Además, se demostró que el linfoma de células del manto es exquisitamente sensible a la inhibición de PRMTs.

Los inhibidores potenciales de PRMTs ya son conocidos en la literatura. Véase, por ejemplo, WO2011/079236, WO2014/100764, WO2014/100716, WO2014/100695, WO2014/100730, WO2014/100734 Y WO2014/100719. Además, ciertos nucleósidos 5'-sustituidos son conocidos en la literatura. Véase, por ejemplo, WO2001/27114 y WO2013/009735.

Hay una necesidad de nuevos tratamientos contra el cáncer. En particular, existe una necesidad de nuevos tratamientos contra el cáncer para glioblastomas, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cánceres de pulmón, leucemias, y linfomas. Sigue habiendo una necesidad de proporcionar inhibidores de PRMT5 alternativos útiles en el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, tales compuestos tienen propiedades que permiten la posología óptima requerida para la inhibición máxima de crecimiento de células tumorales al tiempo que tienen una tolerabilidad aceptable para el paciente. Preferiblemente, tales compuestos también serían biodisponibles por vía oral.

La presente invención proporciona ciertos compuestos nuevos de nucleósidos 5'-sustituidos que son inhibidores de PRMT5 y pueden tener utilidad clínica como agente único o en combinación con otros agentes contra el cáncer para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y en particular glioblastomas, melanoma, sarcomas, cáncer gástrico, cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemias, que incluyen leucemia mieloide aguda y los linfomas.

La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



donde:

R^{1a} es hidrógeno, C_1-C_2 alquilo, trifluorometil, ciano, cloro o flúor;

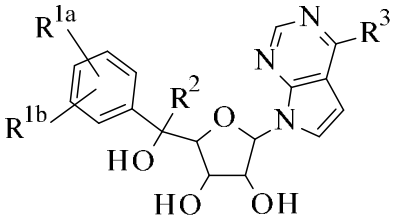
R^{1b} es hidrógeno, cloro o flúor;

R^2 es hidrógeno o C_1-C_3 alquilo; y

R^3 es hidrógeno, metilo o amino;

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



donde:

R^{1a} es hidrógeno, C_1-C_2 alquilo, C_3-C_6 cicloalcoxi, trifluorometil, ciano, cloro o flúor;

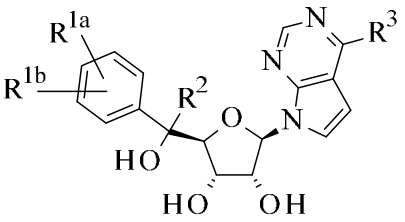
R^{1b} es hidrógeno, cloro o flúor;

R^2 es hidrógeno o C_1-C_3 alquilo; y

R^3 es hidrógeno, metilo o amino;

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de la fórmula:



donde:

R^{1a} es hidrógeno, C_1-C_2 alquilo, trifluorometil, ciano, cloro o flúor;

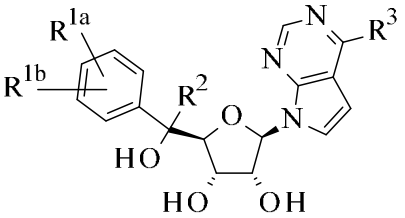
R^{1b} es hidrógeno, cloro o flúor;

R^2 es hidrógeno o C_1-C_3 alquil; y

R^3 es hidrógeno, metilo o amino;

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de la fórmula:



donde:

R^{1a} es hidrógeno, C_1-C_2 alquilo, C_3-C_6 cicloalcoxi, trifluorometil, ciano, cloro o fluoro;

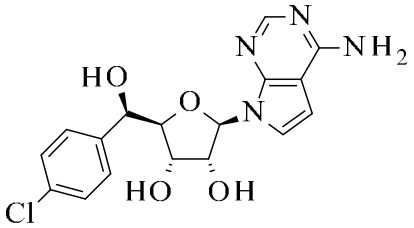
R^{1b} es hidrógeno, cloro o fluoro;

R^2 es hidrógeno o C_1-C_3 alquilo; y

R^3 es hidrógeno, metilo o amino;

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

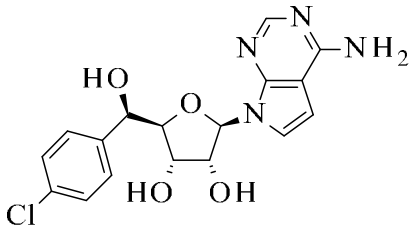
La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de la fórmula:



,

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

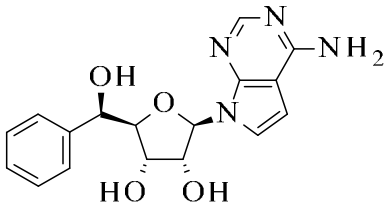
La presente invención también proporciona un compuesto de la fórmula:



,

el cual es cristalino y se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (radiación del Cu, λ = 1,54060 Å) que comprende un pico a 25,1º en combinación con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste en 17,1º, 13,6º, 20,5º, 24,0º, y 14,5º (2θ**+/-** 0,2°).

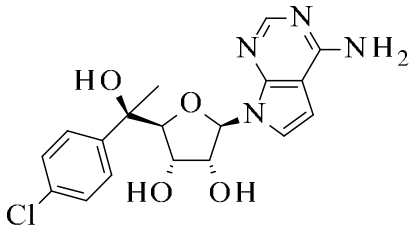
La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de la fórmula:



,

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

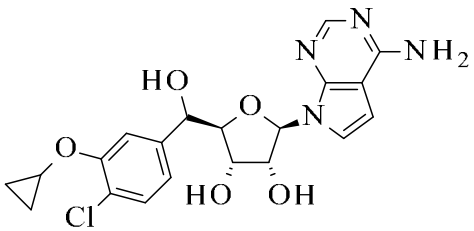
La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de la fórmula:



,

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

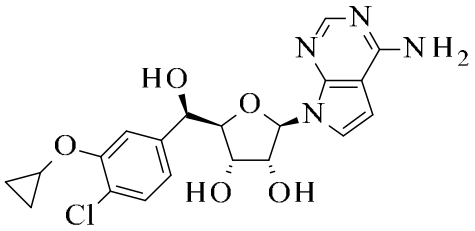
La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de la fórmula:



,

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de la fórmula:



,

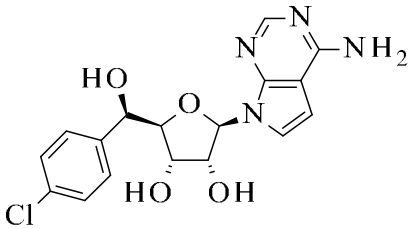
o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico, con un excipiente, vehículo o diluyente aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención proporciona un método para tratar el cáncer, en particular glioblastomas, melanoma, sarcomas, cáncer gástrico, cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemias, que incluyen leucemia mieloide aguda, y linfomas en un paciente que requiere un tratamiento tal que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

Esta invención también proporciona un compuesto de la presente invención o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico para uso en terapia. Adicionalmente, esta invención proporciona un compuesto de la presente invención o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico en el tratamiento del cáncer, en particular glioblastomas, melanoma, sarcomas, cáncer gástrico, cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, que incluye leucemias leucemia mieloide aguda, y linfomas. Además, esta invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención o una de sus sales aceptable para uso farmacéutico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en particular glioblastomas, melanoma, sarcomas, cáncer gástrico, cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemias, que incluye leucemia mieloide aguda y los linfomas.

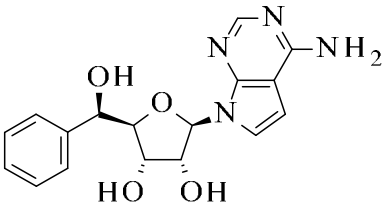
En particular, el compuesto es



,

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

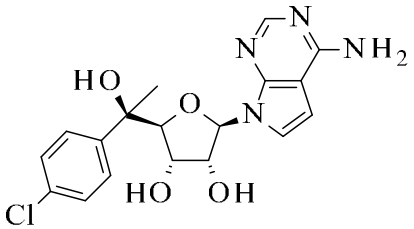
En particular el compuesto es



,

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

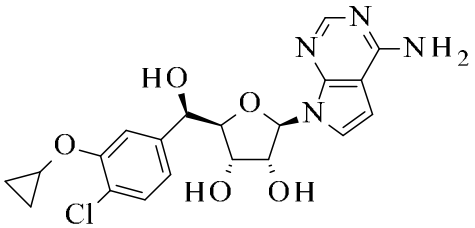
En particular el compuesto es



,

o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

En particular el compuesto es



o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico.

Según se usa aquí, “tratar”, “que trata” o “tratamiento” se refiere a contener, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Tal como se utiliza aquí, el término “paciente” se refiere a un animal de sangre caliente tal como un mamífero, en particular un ser humano, que está afectado de una enfermedad, trastorno o condición particular.

Los siguientes párrafos describen clases preferidas de la presente invención.

a) R^{1a} es hidrógeno, cloro o ciclopropoxi;

b) R^{1b} es hidrógeno o cloro;

c) R^2 es hidrógeno o metilo;

d) R^3 es amino;

e) R^{1a} es cloro, R^{1b} es hidrógeno, y R^2 es hidrógeno;

f) R^{1a} es cloro, R^{1b} es hidrógeno y R^2 es metilo;

g) R^{1a} es hidrógeno, R^{1b} es hidrógeno, y R^2 es hidrógeno;

h) R^{1a} es ciclopropoxi, R^{1b} es cloro, y R^2 es hidrógeno;

i) R^{1a} es cloro, R^{1b} es hidrógeno, y R^3 es amino;

j) R^{1a} es hidrógeno, R^{1b} es hidrógeno, y R^3 es amino;

k) R^{1a} es ciclopropoxi, R^{1b} es cloro, y R^3 es amino;

l) R^2 es hidrógeno y R^3 es amino;

m) R^2 es metilo y R^3 es amino;

n) R^{1a} es cloro, R^{1b} es hidrógeno, R^2 es hidrógeno, y R^3 es amino;

o) R^{1a} es hidrógeno, R^{1b} es hidrógeno, R^2 es hidrógeno, y R^3 es amino;

p) R^{1a} es cloro, R^{1b} es hidrógeno, R^2 es metilo, y R^3 es amino; y

q) R^{1a} es ciclopropoxi, R^{1b} es cloro, R^2 es hidrógeno, y R^3 es amino.

Será entendido por el lector experto que los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales. Los compuestos de la presente invención contienen heteroátomos básicos, específicamente una amina, y por consiguiente, reaccionan con alguno de una serie de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales ácidas de adición aceptables para uso farmacéutico. Tales sales ácidas de adición aceptables para uso farmacéutico y la metodología común para su preparación son bien conocidas en la técnica. *Véase, por ejemplo,* P. Stahl, *et al,* HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008); S. M. Berge, *et al*., “Pharmaceutical Salts,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, enero 1977.

Los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos, se pueden preparar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los Esquemas, Preparaciones, y los Ejemplos de abajo. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas pueden combinarse de diferentes maneras, o junto con pasos de los esquemas, para preparar compuestos o

sales de la presente invención. Los productos de cada etapa en los esquemas siguientes pueden ser recuperados por métodos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, y cristalización.

Algunos intermediarios o compuestos de la presente invención pueden tener uno o más centros quirales o estereogénicos. La presente invención contempla la totalidad de los estereoisómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos que incluyen los racematos. Se prefiere que los compuestos de la presente invención que contienen al menos un centro quiral existan como enantiómeros individuales o diastereómeros. El enantiómero o diastereómero individual puede prepararse comenzando con reactivos quirales (como se ilustra en el Esquema I a continuación) o mediante técnicas sintéticas estereoselectivas o estereoespecíficas (como se ilustra en el Esquema II a continuación). Alternativamente, el enantiómero o diastereómero individual se puede aislar de mezclas por técnicas de cromatografía quiral estándar o cristalización.

Además, ciertos intermedios descritos en los siguientes esquemas pueden contener uno o más grupos protectores de nitrógeno o de oxígeno. El grupo protector variable puede ser igual o diferente en cada caso dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por el experto en la materia y se describen en la literatura (Véase, por ejemplo, "*Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*", cuarta edición, por Peter GM Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley y Sons, Inc. 2007).

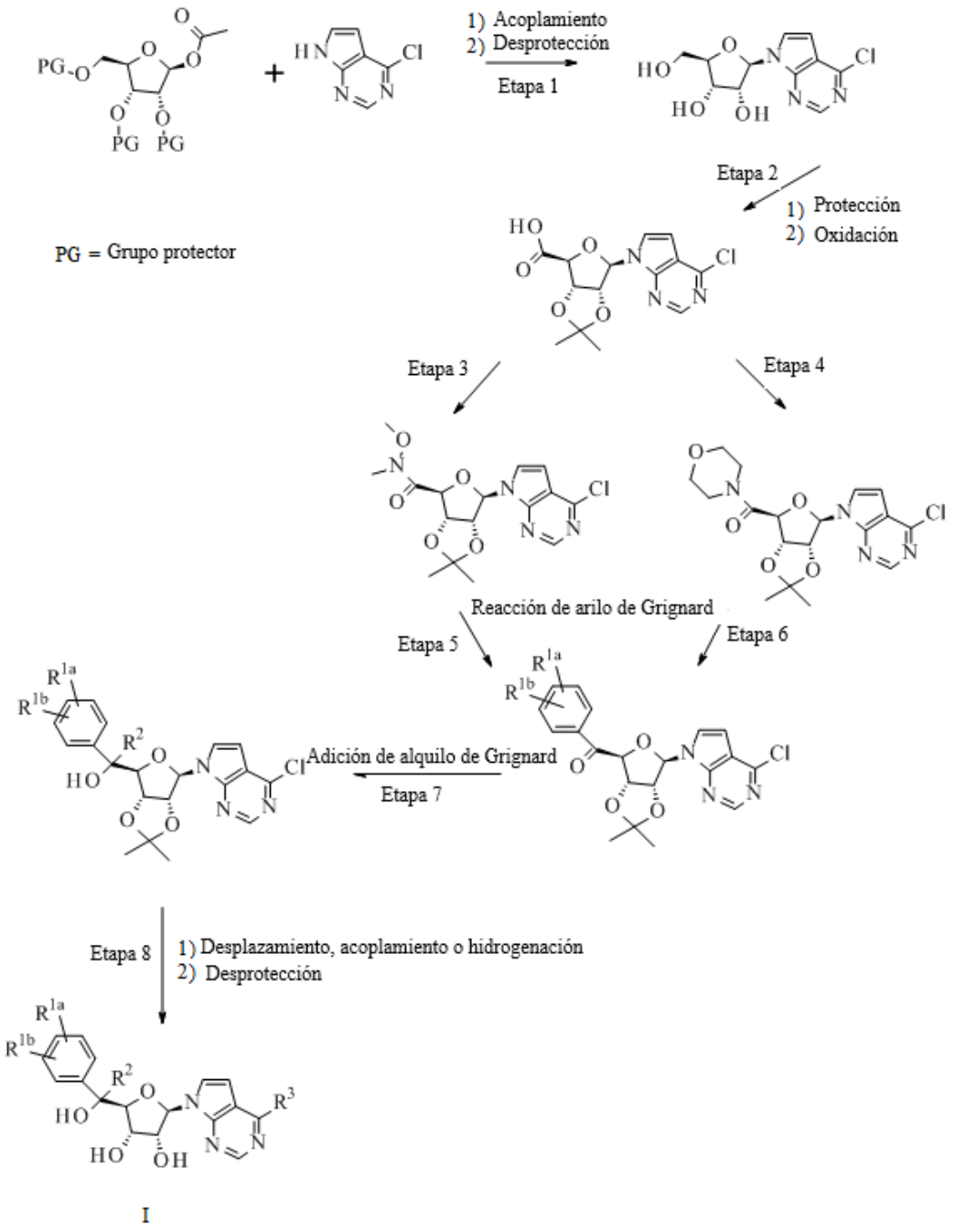
Ciertas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "A375" se refiere a una línea celular de tumor de melanoma humano y derivados; "ACN" se refiere a acetonitrilo; "ATCC" se refiere a la American Type Culture Collection; "BID" se refiere a la dosificación dos veces al día; "cat. #" se refiere al número de catálogo; "CDI" se refiere a 1,1'-carbonildiimidazol; "CDKN1A" se refiere a inhibidor 1 de quinasa dependiente de ciclina, p21, $p21^{Cip1}$, o $p21^{Waf1}$; "CPD" se refiere al valor de las muestras tratadas con el compuesto; "$[Cp^*IrCl_2]_2$" se refiere a dicloro (pentametilciclo-pentadienilo) iridio (III) dímero; "CPM" se refiere a cuentas por minuto; "CT" se refiere a umbral cíclico; "DCC" se refiere a N,N'-diciclohexilcarbodiimida; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIAD" se refiere a azodicarboxilato de diisopropilo; "DIC" se refiere a N,N'-diisopropilcarbodiimida; "DIPEA" se refiere a N,N-diisopropiletilamina; "DLBLC" se refiere al linfoma difuso de células B grandes; "DMEM" se refiere a medio (cultivo de tejidos) de Dulbecco

modificado de Eagle; “DMSO” se refiere a dimetilsulfóxido; “ADN” se refiere a ácido desoxirribonucleico; “ADNasa” se refiere a una desoxirribonucleasa; “ADNc” se refiere a ADN complementario; “dNTP” se refiere a desoxinucleótido trifosfato; “DTT” se refiere a ditiotreitol; “EDCI” se refiere a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato; “EDTA” se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; “EGTA” se refiere a ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N’,N’*-tetraacético; “EtOAc” se refiere a acetato de etilo; “EtOH” se refiere a etanol o alcohol etílico; “FBS” se refiere a suero bovino fetal; “GAPDH” se refiere a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; “GC” se refiere a cromatografía de gases; “^{3}H-SAM” se refiere a S-[metil-^{3}H]-adenosil-L-metionina; “HAT” se refiere a la hipoxantina-aminopterina-timidina; “HATU” se refiere a [dimetilamino (triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)metilideno]-dimetilazanio hexafluorofosfato; “HBTU” se refiere a O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N’,N’-tetrametiluronio hexafluorofosfato; “HOBt” se refiere a hidroxibenzotriazol; “HEC” se refiere a hidroxietilcelulosa; “HEPES” se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico; “h” se refiere a hora u horas; “HOAt” se refiere a 1-hidroxi-7-azabenzotriazol; “IC_{50}” se refiere a la concentración de un agente que produce el 50 % de la respuesta inhibidora máxima posible para ese agente; “IVTI” se refiere a la inhibición de la diana *in vivo*; “KLH” se refiere a hemocianina de lapa de ojo de cerradura; “Solución de tri-sec-butilborohidruro de litio” se refiere a tri (sec-butil) borohidruro de litio; “MDM4” se refiere al ratón doble minuto 4; “MeOH” se refiere a metanol; “MEP50” se refiere a metilosoma proteína 50; “min” se refiere a minuto o minutos; “MTBE” se refiere a metil t-butil éter; “OD” se refiere a densidad óptica; “o.d.” se refiere a diámetro exterior; “PAGE” se refiere a electroforesis en gel de poliacrilamida; “PBS” se refiere a la solución salina amortiguada con fosfato; “PCR” se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa; “PEG” se refiere a polietilenglicol; “PNPP” se refiere a fosfato de 4-nitrofenilo; “PO” se refiere a *per os* o por vía oral; “ppm” se refiere a partes por millón; “PRMT5” se refiere a la proteína arginina metil transferasa 5; “PyBOP” se refiere a (benzotriazol-1-il-oxitrispirrolidinofosfonio hexafluorofosfato); “psig” se refiere a libra de fuerza por pulgada cuadrada; “PTFE” se refiere a politetrafluoroetileno; “PyBROP” se refiere a bromo-trispirrolidinofosfonio hexafluorofosfato; “QD” se refiere a *quaque die* o la administración una vez al día; “qPCR” se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; “ARN” se refiere al ácido ribonucleico; “RPMI” se refiere a Roswell Park Memorial Institute; “(R,R)-Ts-DENEB™” se refiere a N-[(1R,2R)-1,2-difenil-2-(2-(4-metilbenciloxi)etilamino)etil]-4-metilbenceno sulfonamida-(cloro)rutenio(II); “(R,R)-Ts-DEPEN” se refiere a (1R,2R)-(-)-N-(4-toluenosulfonil)-1,2-difeniletilendiamina; “RT” se refiere a la transcriptasa inversa;

“SAH” se refiere a S-adenosil-homocisteína; “SAM” se refiere a S-adenosil-metionina; “(S)-CBS catalizador” se refiere a (S) catalizador-Corey-Bakshi-Shibata o (S)-1-butil-3,3-difenilhexahidropirrolo[1,2-c] [1,3,2]oxazaborol; “sf9” se refiere a células de insectos *Spodoptera frugiperda* derivadas en forma clonal; “SmD1” se refiere a ribonucleoproteína nuclear pequeña D1; “SPA” se refiere al ensayo de proximidad de centelleo; “SS” se refiere a acero inoxidable; “SWFI” se refiere a agua estéril para inyección; “TEA” se refiere a trietilamina; “Tris” y “TRIZMA®” se refieren a 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol o tris(hidroximetil)aminometano; “TBS” se refiere a solución salina amortiguada con Tris; “TEMPO” se refiere a 2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxilo; “THF” se refiere a tetrahidrofurano, “TAME” se refiere a clorhidrato de éster de N-alfa-p-tosil-L-arginina; “TPCK” se refiere a tosilfenilalanilclorometano; “En peso” se refiere al peso; “YSI” se refiere a silicato de itrio, y “*” se refiere a la operación matemática de la multiplicación.

En los siguientes Esquemas, todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, se definen como anteriormente. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para una persona del oficio de nivel medio. Otros pueden realizarse por técnicas estándar de química orgánica y heterocíclica o por los procedimientos descritos en las Preparaciones y Ejemplos que siguen, que incluye los procedimientos novedosos en el presente documento.

Esquema 1



El esquema 1 representa la formación de compuestos de Fórmula I. “PG” es un grupo protector desarrollado por grupos hidroxilo. Tales grupos protectores son bien conocidos y apreciados en la técnica.

Una ribofuranosa 1-acetilada tris-protegida, se acopla con 4-cloro-7H-pirrolo(2,3-d) pirimidina en el nitrógeno pirrólico en el Esquema 1, Etapa 1, subetapa 1 para dar el

producto protegido del Etapa 1. Trimetilsilil trifluorometanosulfonato combinado con ácido etanimidico, N-(trimetilsilil)-, trimetilsilil éster se puede utilizar como un agente de activación para acoplar la pirimidina 4-cloro-7H-pirrolo (2,3-d) a la ribofuranosa protegida usando un solvente tal como ACN. En un procedimiento de un recipiente en 2 pasos, los grupos hidroxilo se desprotegen en condiciones básicas usando una base inorgánica tal como metóxido de sodio en MeOH, y las sustituciones de 2,3-hidroxi del esqueleto de ribosa luego son protegidas selectivamente como un cetal usando 2,2-dimetoxipropano con ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato como un agente de activación en un solvente tal como acetona para dar el producto del Esquema 1, Etapa 1, subetapa 2 seguido por el producto del Etapa 2, subetapa 1. El 5'alcohol se oxida a ácido carboxílico usando yodobenceno diacetato y un catalizador tal como TEMPO en un solvente tal como ACN a una temperatura de 0 °C a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h para dar el producto de ácido carboxílico cetal del Esquema 1, Etapa 2, subetapa 2. El producto amida de Weinreb del Esquema 1, Etapa 3 se puede preparar con N, O-dimetilhidroxilamina clorhidrato en un solvente adecuado, tal como EtOAc, usando un agente de acoplamiento de péptidos tal como 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrifosforinano-2,4,6-trióxido. Una amida alternativa, como una amida de morfolina, puede prepararse con el producto de ácido carboxílico del Esquema 1, Etapa 2 y una amina nucleófila adecuadas tal como morfolina en un solvente tal como DCM utilizando un reactivo de acoplamiento tal como CDI. Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que hay una serie de métodos y reactivos para la formación de amidas resultantes de la reacción de ácidos carboxílicos y aminas. Por ejemplo, la reacción de una amina adecuada con el producto de ácido carboxílico del Esquema 1, Etapa 2 en presencia de un reactivo de acoplamiento con o sin una base orgánica tal como DIPEA o trietilamina puede proporcionar un compuesto del Esquema 1, Etapa 3 o Esquema 1, Etapa 4. Los reactivos de acoplamiento incluyen carbodiimidas, tales como DCC, DIC, y EDCI o un carbonildiimidazol tal como CDI. Se pueden utilizar amidas de acoplamiento aditivas, tales como HOBt y HOAt también para mejorar la reacción. Además, podrían utilizarse sales de uronio o de fosfonio de aniones no nucleófilos, tales como HBTU, HATU, PyBOP y PyBrOP en lugar de los reactivos de acoplamiento más tradicionales.

El producto amida de Weinreb del Esquema 1, Etapa 3 o el producto de morfolino amida del Esquema 1, Etapa 4 se puede tratar con un reactivo de Grignard para formar los productos del Esquema 1, Etapa 5 y el Esquema 1, Etapa 6, respectivamente. Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que un reactivo de Grignard adecuado

puede hacerse reaccionar con la amida o un reactivo de Grignard puede generarse *in situ* a partir de un reactivo de Grignard comercial tal como complejo de cloruro de isopropil-cloruro de litio con el compuesto de benceno bromo- o yodo-sustituido adecuado para dar los productos del Esquema 1, Etapa 5 y el Esquema 1, Etapa 6. O bien, alternativamente, el reactivo de Grignard puede generarse *in situ* con el compuesto de benceno bromo- o cloro- sustituido adecuado con virutas de magnesio y yodo para dar los productos del Esquema 1, Etapa 5.

El producto cetona del Esquema 1, Etapa 5 y el Esquema 1, Etapa 6 se puede hacer reaccionar en una segunda reacción de Grignard para dar el producto hidroxi del Esquema 1, Etapa 7, donde R^2 no es hidrogeno y R^2 es como se definió previamente. El producto del Esquema 1, Etapa 5 o el Esquema 1, Etapa 6 es tratado con reactivo alquilo de Grignard adecuado en un solvente tal como THF a una temperatura de aproximadamente 0 °C y tras la inactivación con HCl 1 *N* o cloruro de amonio acuoso da el producto del Esquema 1, Etapa 7.

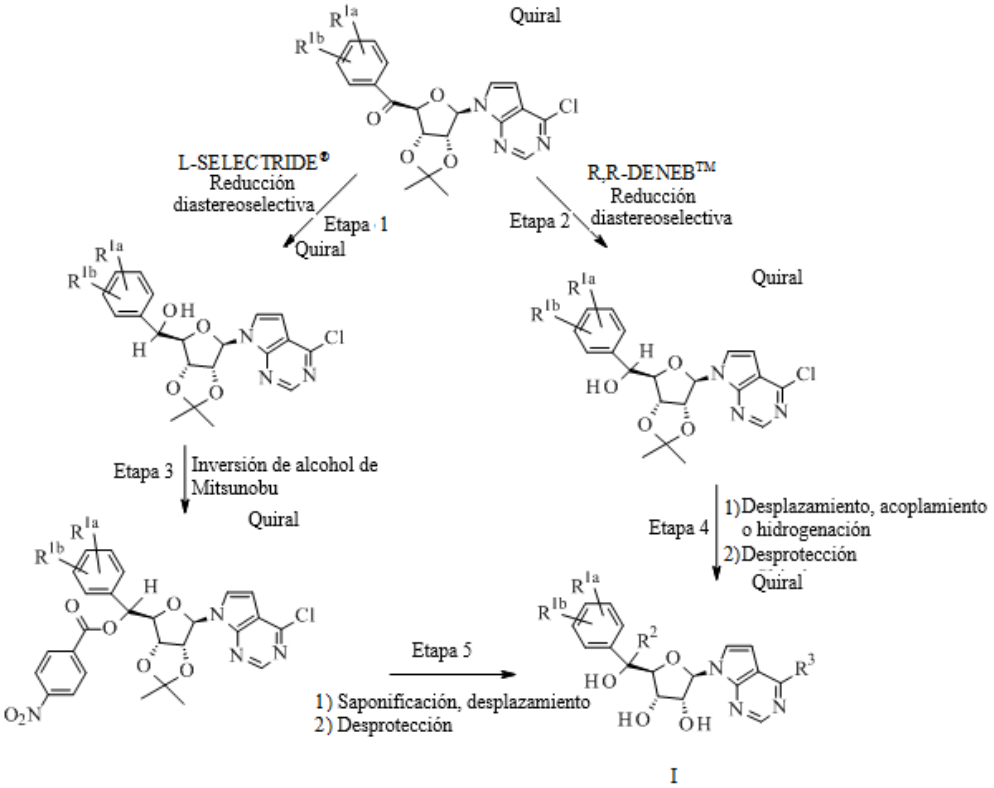
En el Esquema 1, Etapa 8, subetapa 1, el desplazamiento, para los productos de la Fórmula 1 donde $R^3 = NH_2$, un desplazamiento del 4-cloro de la pirrolo pirimidina a una amina se puede lograr con NH_3 7 *N* como NH_3 en MeOH. La reacción puede llevarse a cabo en un recipiente sellado y con calentamiento en un horno de microondas a aproximadamente 100 ºC. Alternativamente, el hidróxido de amonio acuoso (alrededor de 28-30 % en peso en agua) se puede utilizar para desplazar el cloruro en un recipiente sellado con calentamiento a aproximadamente 80 a 110 °C durante aproximadamente 8-24 horas.

En el Esquema 1, Etapa 8, subetapa 1, acoplamiento, para $R^3 = CH_3$, el 4-cloro de la pirrolo pirimidina se puede convertir a metilo bajo condiciones de acoplamiento con Pd utilizando una fuente de paladio tal como tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) con $Al(CH_3)_3$ en un solvente tal como THF o 1,4-dioxano bajo una atmósfera inerte a una temperatura de aproximadamente 70-80 °C.

En el Esquema 1, Etapa 8, subetapa 1, hidrogenación, para R^3 = H, el 4-cloro de la pirrolopirimidina se puede eliminar bajo condiciones de hidrogenación. La hidrogenación de tales compuestos es bien conocida y apreciada en la técnica.

En el Esquema 1, Etapa 8, subetapa 2, el cetal protegido se puede desproteger bajo condiciones ácidas tales como TFA en agua o HCl, tal como 4 *N* en dioxano y MeOH o 4,99 *M* en 2-propanol y agua para dar compuestos de Fórmula I. la desprotección de tales compuestos es bien conocida y apreciada en la técnica.

Esquema 2



Alternativamente en el Esquema 2, el producto cetona del Esquema 1, Etapa 5 o el Etapa 6, para R^2=H, se puede reducir de una manera diastereo controlada usando agentes reductores quirales o aquirales para obtener un producto hidroxi enriquecido en un diastereómero. Como un ejemplo, la reducción de cetona con una solución de tri-sec-butilborohidruro de litio (L-SELECTRIDE®) en un solvente tal como THF a una temperatura de aproximadamente -78 °C da el producto hidroxilo del Esquema 2, Etapa 1 como un producto enriquecido diastereoméricamente o principal. Alternativamente en el Esquema 2, Etapa 2, los catalizadores de reducción quiral pueden producir selectivamente el producto hidroxilo como un diastereómero enriquecido o principal con estereoconfiguración hidroxilo opuesta a la que se produce con las condiciones de la solución de tri-sec-butilborohidruro de litio. Ejemplos de dichos catalizadores quirales que se pueden utilizar incluyen (S)-CBS-catalizador con complejo de borano-THF en un solvente tal como THF a una temperatura de aproximadamente -15 °C, o, alternativamente, con un catalizador de complejo de rutenio (II) oxo-ligado tal como (R,R)-Ts-DENEB™ con complejo de ácido fórmico/trietilamina a aproximadamente temperatura ambiente, o, alternativamente, con un complejo de iridio (III) en una mezcla solvente tal como el sistema de dos fases agua/DCM a aproximadamente temperatura

ambiente. Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que el complejo de iridio (III) adecuado se puede se puede generar *in situ* a partir de $[Cp^*IrCl_2]_2$ y (R,R)-Ts-DEPEN comerciales para dar los productos del Esquema 2, Etapa 2.

Los diastereómeros principales o enriquecidos a partir del producto del Esquema 2, Etapa 2 que utilizan los catalizadores de reducción quirales anteriores, el (S)-CBS o (R, R)-DENEB™ o iridio (III), se encontró que en general son de la diastereo configuración del centro hidroxilo formado en los ejemplos descritos en esta invención.

Un método sintético alternativo para producir los compuestos de la presente invención utiliza una reacción de Mitsunobu (Esquema 2, Etapa 3) que implica que un nucleófilo ácido, tal como 4-nitrobenzoico reaccione con el alcohol para formar un éster. Las reacciones de Mitsunobu son bien conocidas en la técnica e implican la conversión de un alcohol en un éster usando un ácido tal como ácido 4-nitrobenzoico, trifenilfosfina y un azodicarboxilato tal como azodicarboxilato de dietilo (DEAD) o azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) en un solvente aprótico polar tal como THF a una temperatura de aproximadamente 0 °C a temperatura ambiente. Durante la activación de alcohol Mitsunobu y el desplazamiento con el nucleófilo, el estereocentro del alcohol se somete a una inversión de la estereoquímica. Por este método utilizando la reacción de Mitsunobu, los diastereómeros enriquecidos producidos a partir de la reducción de la solución tri-sec-butilborohidruro de litio en el Esquema 2, Etapa 1, se pueden convertir en productos con la estereoconfiguración de alcohol enriquecido para el mismo diastereómero principal que el producido con el (S)-CBS o (R,R)-Ts-DENEB™ o catalizadores de complejo de iridio (III) en el Esquema 2, Etapa 2.

En el Esquema 2, Etapa 5, subetapa 1, para los productos de la Fórmula I en la que $R^3 = NH_2$, el éster puede luego saponificarse al alcohol y el 4-cloro de la pirrolo pirimidina desplazarse con una amina en una reacción de una recipiente de la misma manera que se discutió para el Esquema 1, Etapa 8. En el Esquema 2, Etapa 5, subetapa 2, el cetal protegido se puede desproteger en condiciones ácidas como se ha discutido en el Esquema 1, Etapa 8, sub-etapa 2 para dar compuestos de Fórmula I.

En el Esquema 2, Etapa 4, el producto del Esquema 2, Etapa 2 para $R^3 = NH_2$, CH_3 o H puede llevarse a cabo como se describe en el Esquema 1, Etapa 8, subetapa 1, o, alternativamente, se pueden usar hidróxido de amonio acuoso (aproximadamente 28- 30 % en peso de agua) y dioxano para desplazar el cloruro usando química de flujo continuo con calentamiento a aproximadamente 200 °C y una velocidad de flujo de 10 ml/min (30 min tiempo de residencia) o, de forma alternativa, a aproximadamente 200 ºC y un caudal de 0,251 ml/min (30 min. de tiempo de residencia). En el Esquema 2,

Etapa 4, subetapa 2, el cetal protegido se puede desproteger como se ha discutido en el Esquema 1, Etapa 8, la subetapa 2, o, alternativamente, el cetal protegido se puede desproteger con HCl acuoso (alrededor de 6 *N* en agua) en una mezcla EtOH/MeOH/EtOAc usando química de flujo continuo con calentamiento a aproximadamente 55 °C y una velocidad de flujo de 1,5 ml/min (tiempo de residencia 20 min) o con HCl acuoso (aproximadamente 4 *N* en agua) en EtOH a aproximadamente 82 °C y un caudal de 0,288 ml/min (10 min. de tiempo de residencia) para dar compuestos de Fórmula I.

Una persona del oficio de nivel medio se dará cuenta de que en general los espectros de ^{1}H RMN de los compuestos ejemplificados se pueden utilizar para determinar la identidad, así como el grado de enriquecimiento diastereomérico o la pureza de los diastereómeros individuales producidos.

En un paso opcional, puede formarse una sal aceptable para uso farmacéutico de un compuesto de Fórmula I por reacción de una base libre adecuada de la Fórmula I con un ácido aceptable para uso farmacéutico adecuado en un solvente adecuado bajo condiciones estándar. La formación de dichas sales es bien conocida y apreciada en la técnica.

Los compuestos de la presente invención se preparan como se ilustra en los Ejemplos a continuación. Las siguientes Preparaciones y Ejemplos ilustran adicionalmente la invención y representan la síntesis típica del compuesto de la invención. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles o pueden sintetizarse fácilmente por una persona del oficio de nivel medio. Debe entenderse que las preparaciones y ejemplos se exponen a modo de ilustración y no de limitación, y que pueden ser realizadas varias modificaciones por una persona del oficio de nivel medio.

Las configuraciones diastereoméricas del compuesto de la invención se pueden determinar por técnicas estándar tales como análisis de rayos X, ^{1}H-RMN, y correlación con el tiempo de retención en HPLC quiral.

La LC-ES/MS se realizó en un sistema de cromatografía líquida Agilent® HP1100. Las mediciones de espectrometría de masas por electrospray (adquiridas en modo positivo y/o negativo) se llevan a cabo en un espectrómetro de masas de cuadrupolo con detector selectivo de masas conectado en interfaz con el HP1100 HPLC. Condiciones de LC-MS (pH bajo): Columna: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,1 x 50 mm 3,0 µm; gradiente: 5-100 % de B en 3 min, luego 100 % de B durante 0,75 min.; temperatura de la columna: 50 °C +/- 10 °C; velocidad de flujo: 1,2 ml/min; solvente A: agua desionizada con 0,1 % HCOOH; Disolvente B: ACN con ácido fórmico al 0,1 %;

longitud de onda 214 nm. Condiciones alternativas de LC-MS (pH alto): columna: columnas XTERRA® MS C18 2,1 x 50 mm, 3,5 µm; gradiente: 5 % de solvente A durante 0,25 min, gradiente de 5 % a 100 % de solvente B en 3 min y 100 % de solvente B durante 0,5 min o 10 % a 100 % de solvente B en 3 minutos y 100 % de solvente B durante 0,75 min; temperatura de la columna: 50 °C +/- 10 °C; velocidad de flujo: 1,2 ml/min; solvente A: NH_4HCO_3 10 mM pH ~ 9-10; Disolvente B: ACN; longitud de onda: 214 nm.

Los espectros de RMN se realizan en un Espectrómetro de RMN Bruker AVIII HD 400 MHz, obtenido como soluciones de $CDCl_3$ o $(CD_3)_2SO$ reportados en ppm (desplazamiento químico δ) utilizando solvente residual, [$CDCl_3$, 7,26 ppm; $(CD_3)_2SO$, 2,05 ppm] como estándar de referencia. Cuando se informan multiplicidades de los picos, se pueden usar las siguientes abreviaturas: s (singlete), t (triplete), q (cuarteto), m (multiplete), br-s o bs (singlete ancho), dd (doblete de dobletes), dt (doblete de tripletes), y TD (triplete de dobletes). Las constantes de acoplamiento (J), cuando se informan, se reportan en hercios (Hz).

Preparación 1

[(2R,3R,4R,5R)-3,4-Dibenzoiloxi-5-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)tetrahidrofuran-2-il]metil benzoato

Suspender 4-cloro-7H-pirrolo(2,3-d)pirimidina (55,3 g, 0,36 mol) en ACN (1,8 l) y agitar a temperatura ambiente. Añadir ácido etanimídico, N-(trimetilsilil)-, éster de trimetilsililo (110,8 ml, 0,45 mol) por goteo y agitar la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente bajo N_2. Añadir trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (1,0 l, 0,54 mol) por goteo seguido de la adición en porciones de [(2R,3R,4R,5S)-5-acetoxi-3,4-dibenzoiloxi-tetrahidrofurano-2-il]metil benzoato (272,4 g, 0,54 mol). Calentar la mezcla durante 4 horas a 85 °C (interna). Enfriar la mezcla a 40 °C (interna) y añadir en porciones [(2R,3R,4R,5S)-5-acetoxi-3,4-dibenzoiloxi-tetrahidrofurano-2-il] metil benzoato adicional (45,40 g, 90,0 mmol) a la mezcla. Calentar la mezcla de reacción durante 2 horas a 85 °C (interna). Agitar la mezcla durante otras 18 h bajo N_2 a temperatura ambiente. Añadir agua (500 ml) y EtOAc (500 ml) a la reacción. Separar la capa orgánica resultante. Extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 250 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con $NaHCO_3$ acuoso saturado (500 ml) y cloruro de sodio acuoso saturado (500 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y eliminar los solventes a presión reducida. Purificar mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de EtOAc/hexanos al 10-30 % para obtener el compuesto

del título (98,0 g, 41 % de rendimiento) como un aceite incoloro. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 598,0/600,0 $[M+H]^+$.

Preparación 2

[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]metanol

Suspender [(2R,3R,4R,5R)-3,4-dibenzoiloxi-5-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)tetrahidrofuran-2-il] metil benzoato (80,5 g, 134,61 mmol) en MeOH (805 ml) y tratar con una solución de metóxido de sodio 0,5 *M* en MeOH (53,8 ml, 26,92 mmol) a temperatura ambiente durante 3 h. Enfriar a 0 °C y tratar la mezcla con resina DOWEX® 50WX2 (hasta pH <5). Filtrar y concentrar *in vacuo* para obtener un residuo. Triturar a partir de MTBE (100 ml). Decantar la mezcla y secar el residuo resultante para obtener un sólido blanco. Suspender el sólido en acetona (1100 ml) y añadir 2,2-dimetoxipropano (41,5 ml, 336,5 mmol) y ácido p-toluenosulfónico monohidrato (25,6 g, 134,6 mmol) a la mezcla. Agitar la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente. Eliminar hasta ~ 1/3 del solvente a presión reducida y añadir DCM (250 ml) y agua (100 ml). Separar la capa orgánica y extraer la capa acuosa con DCM (2 x 100 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con $NaHCO_3$ acuoso saturado (150 ml; pH ~ 9) y cloruro de sodio acuoso saturado (100 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio. Filtrar y eliminar los solventes bajo presión reducida para obtener una mezcla en bruto. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con 30 % de EtOAc en DCM para obtener el compuesto del título (26,5 g, 60 % de rendimiento) como un aceite incoloro. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 326,0/328,0 $[M+H]^+$.

Preparación 3

Ácido (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxílico

Disolver [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]metanol (60,0 g, 184,2 mmol) en ACN (250 ml). Añadir agua (180 ml) y enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir yodobenceno diacetato (160 g, 496,8 mmol) en porciones a 0 °C seguido de la adición en porciones de TEMPO (14 g, 89,6 mmol). Agitar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Eliminar el solvente bajo presión reducida y disolver el residuo en bruto en EtOAc (300 ml). Añadir agua (100 ml) a 0 ºC y separar la capa orgánica resultante. Extraer la fase acuosa con EtOAc (3 × 100 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con una solución 10 %

acuosa de tiosulfato (2 × 100 ml) y agua (2 × 100 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y eliminar los solventes a presión reducida para obtener un sólido de color amarillo pálido. Mezclar el material bruto con hexanos (400 ml) y agitar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Filtrar el sólido resultante, lavar con hexanos (100 ml), y secar para obtener el compuesto del título (66,7 g, 89 % de pureza, 100 % bruto) como un sólido amarillo. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 340,00/342,00 $[M+H]^+$.

Preparación 4

(3aR,4R,6S, 6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofurano[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida

Disolver [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]metanol (45,0 g, 138,1 mmol) en ACN (175 ml). Añadir agua (133 ml) y enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir diacetato de yodobenceno (122,3 g, 379,7 mmol) en porciones a 0 °C seguido de la adición en porciones de TEMPO (10,5 g, 67,0 mmol). Agitar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Añadir agua (100 ml) y EtOAc (250 ml) a 0 °C y separar la capa orgánica resultante. Extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 100 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua (100 ml), 20 % p/v de solución acuosa de bisulfito de sodio (100 ml), y agua (100 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y eliminar los solventes a presión reducida para obtener un sólido marrón (53,0 g). Disolver este sólido en EtOAc (400 ml) a temperatura ambiente y añadir clorhidrato de N, O-dimetilhidroxilamina (18,8 g, 193,0 mmol) en porciones. Agitar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y añadir por goteo una solución 1,67 *M* de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrifosforinano-2,4,6-trióxido en EtOAc (176,3 ml, 294 mmol). Agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 días bajo N_2. Enfriar la mezcla de reacción a 0 °C y añadir agua (150 ml) y EtOAc (150 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 150 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua (200 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar, y concentrar para obtener una mezcla en crudo. Purificar por filtración a través de un conector de sílice eluyendo con un gradiente de 0-30 % EtOAc/DCM para obtener el compuesto del título como un sólido vítreo blanco (31,0 g, 60 % en dos etapas). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 383,0/385,0 $[M+H]^+$.

Preparación 5

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona

Suspender ácido (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxílico (63,7 g, 166 mmol) en DCM (320 ml) y agitar a 0 ºC. Añadir 1,1'-carbonildiimidazol (37,7 g, 232 mmol) en porciones y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 45 min. Añadir morfolina (21,7 g, 249 mmol) por goteo a la mezcla y agitar a temperatura ambiente durante 3 días. Diluir la mezcla de reacción con DCM y agua (150 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con DCM (3 × 100 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua (100 ml) y cloruro de sodio acuoso saturado (100 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y eliminar los solventes a presión reducida. Purificar mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 20-60 % de EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (34 g, 50 % de rendimiento) como una espuma marrón. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 409,00/411,00 $[M+H]^+$.

Preparación 6

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-fenil-metanona

Añadir por goteo una solución 3,0 *M* de bromuro de fenilmagnesio en éter dietílico (1,79 ml, 5,38 mmol) a una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (1,00 g, 2,45 mmol) en THF (15 ml) durante 2 min a 0 °C. Agitar a 0 °C durante 30 min, y añadir 1 *N* HCl acuoso (7,3 ml). Después de 3 min, extraer la capa acuosa con DCM. Separar las capas y evaporar la capa orgánica bajo presión reducida. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 35-75 % de una mezcla 10 % de MTBE/DCM en hexanos durante 25 min para obtener el compuesto del título (893 mg, rendimiento 91 %). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 400,0/402,0 $[M+H]^+$.

Preparación 7

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanona

Disolver (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida (30,0 g, 78,4 mmol) en THF (300 ml) y enfriar a -10 °C. Añadir una solución 1,0 *M* de bromuro de 4-clorofenilmagnesio en éter dietílico (157 ml, 157 mmol) por goteo y agitar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Enfriar a 0 °C e inactivar la mezcla de reacción mediante la adición de cloruro de amonio acuoso saturado (50 ml) y EtOAc (200 ml).

Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 100 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con agua (250 ml), y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y eliminar el filtrado orgánico bajo presión reducida para obtener una mezcla en bruto. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-15 % de EtOAc/DCM para obtener el compuesto del título como un sólido (30,1 g, rendimiento del 84 %) de color blanco. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 434,0/436,0 $[M+H]^+$.

Preparación alternativa 7

Disolver (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida (257,0 g, 617,7 mmol) en THF (2570 ml) y enfriar a -15 °C. Añadir una solución 1,0 *M* de bromuro de 4-clorofenilmagnesio en 2-metiltetrahidrofurano (1,050 ml, 1,050 mmol) por goteo y agitar la mezcla durante 1 hora a -15 °C. Inactivar la mezcla de reacción mediante la adición de cloruro de amonio acuoso saturado (1000 ml) y agua (500 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (2 × 500 ml). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y evaporar el filtrado a presión reducida para obtener un sólido blanco. Purificar por recristalización a partir de EtOH (5300 ml) para obtener el compuesto del título como un sólido (238,3 g, rendimiento 87 %) de color blanco. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 434,0/436,0 $[M+H]^+$.

Preparación 8

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metanona

Añadir por goteo 1-bromo-4- (trifluorometil) benceno (4,0 g, 18 mmol) a una solución 2,0 *M* de cloruro de isopropilmagnesio en THF (8 ml, 16 mmol) en THF adicional (10 ml) a temperatura ambiente. Agitar la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente. A esta mezcla, añadir una solución de (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida (3,4 g, 8,9 mmol) en THF (14 ml) por goteo a temperatura ambiente y agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Enfriar a 0 °C e inactivar la reacción con una solución de 10 % de ácido cítrico (100 ml). Añadir MTBE (200 ml) y agitar la mezcla durante 20 min. Separar las dos fases y extraer la capa acuosa con MTBE. Combinar los extractos orgánicos, lavar con cloruro de amonio acuoso saturado, agua y cloruro sódico acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y eliminar

los solventes a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-50 % EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (3,60 g, 87 % de rendimiento) como una espuma amarilla. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 468,00/470,00 $[M+H]^+$.

Preparación 9

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metanona

Disolver 1-cloro-3-yodobenceno (0,42 g, 1,7 mmol) en THF (5 ml) y enfriar a 0 °C. Añadir una solución 1,3 *M* en THF de complejo de cloruro de litio-cloruro de isopropilmagnesio (1,23 ml, 1,6 mmol) por goteo durante 10 min, y agitar a 0 °C durante 1 h. Añadir una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (0,5 g, 1,2 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C. Después de 1 h de agitación a 0 °C, inactivar la mezcla mediante la adición de HCl acuoso 1 *N* (2 ml). Diluir la mezcla resultante con EtOAc y lavar la capa orgánica con agua y cloruro sódico acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-25 % EtOAc/hexanos durante 20 min para obtener el compuesto del título (0,35 g, rendimiento 66 %). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 434,2/436,2 $[M+H]^+$.

Preparación 10

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanona

Disolver 4-cloro-2-fluoro-1-yodo-benceno (1,9 g, 7,5 mmol) en THF (50 ml), y enfriar a 0 °C. Añadir una solución 1,3 *M* de complejo de cloruro de litio-cloruro de isopropilmagnesio en THF (6,3 ml, 8,2 mmol), y agitar a 0 °C durante 1 h. Añadir una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (2,8 g, 6,8 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C. Después de 5 h de agitación a 0 °C, inactivar la mezcla mediante la adición de HCl acuoso 1 *N* (9,09 ml, 9,09 mmol). Diluir la mezcla resultante con EtOAc, y lavar la capa orgánica con agua y cloruro sódico acuoso saturado. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-50 % EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (1,57 g, 51 % de rendimiento).

ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 452,0/454,0/456 $[M+H]^+$.

Preparación 11

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-etilfenil)metanona

Añadir por goteo durante 10 min una solución 0,5 *M* de bromuro de 3-etilfenilmagnesio en THF (5,8 ml, 2,9 mmol) a una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (1,0 g, 2,5 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C. Agitar a 0 °C durante 30 min e inactivar mediante la adición de 1 *N* HCl acuoso (3,9 ml, 3,9 mmol). Diluir con agua, y extraer la capa acuosa con EtOAc. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato sódico, filtrar y evaporar el filtrado bajo presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-100 % EtOAc/hexanos durante 30 min para obtener el compuesto del título (0,98 g, 94 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 428/430 $[M+H]^+$.

Preparación 12

4-[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carbonil]benzonitrilo

Disolver 4-bromobenzonitrilo (1,36 g, 7,40 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C. Añadir una solución 1,3 *M* de complejo de cloruro litio-cloruro de isopropilmagnesio en THF (6,6 ml, 8,53 mmol) y agitar a 0 °C durante 2 hr. Canular esta mezcla en una solución de (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida (2,18 g, 5,68 mmol) en THF (14 ml) a 0 °C. Calentar a temperatura ambiente y agitar 2 h. Inactivar mediante la adición de HCl acuoso 1 *N* (9,09 ml) a 0 °C. Diluir la mezcla de reacción con EtOAc y agua. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo a través de cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 15- 30 % EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (1,49 g, 62 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 425,0/427,0 $[M+H]^+$.

Preparación 13

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-

tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-difluorofenil)metanona

Añadir 4-bromo-1,2-difluoro-benceno (2,21 g, 1,29 ml, 11,4 mmol) a una solución 2,0 *M* de cloruro de isopropilmagnesio en THF (6,05 ml, 12,1 mmol) a -15 °C y agitar durante 15 min. Calentar la mezcla de reacción y agitar a 0 °C durante 1 h. Añadir esta mezcla a una solución de (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida (1,25 g, 3,27 mmol) en THF (16,3 ml) a 0 °C. Después de 15 min, inactivar mediante la adición de HCl acuoso 1 *N* (5 ml). Diluir la mezcla de reacción con EtOAc (30 ml) y agitar vigorosamente la mezcla bifásica a temperatura ambiente durante 15 min. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc (2 × 40 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y evaporar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 4 % EtOAc/DCM para obtener el compuesto del título (1,12 g, 74 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 436, 438 $[M+H]^+$.

Preparación 14

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-diclorofenil)metanona

Añadir 1-bromo-3,4-diclorobenceno (1,04 g, 4,57 mmol) a una solución 2,0 M de complejo de cloruro de isopropilmagnesio-cloruro de litio en THF (1,2 ml, 2,4 ml) a -15 °C. Después de 15 min, calentar la mezcla a 0 °C y agitar durante 1 h. Añadir esta mezcla a una solución de (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida (0,50 g, 1,31 mmol) en THF (6,5 ml) a 0 °C y agitar durante 10 min. Inactivar con HCl acuoso 1 *N* (5 ml), y añadir EtOAc (30 ml). Agitar vigorosamente a temperatura ambiente durante 15 min. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc (2 × 40 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar y eliminar los solventes a presión reducida. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 10-20 % EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (1,49 g, 62 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 468/470 $[M+H]^+$.

Preparación 15

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-

tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(p-tolil)metanona

Añadir una solución 1,0 M de bromuro de p-tolilmagnesio en THF (2,4 ml, 2,4 mmol) por goteo a una solución en agitación de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (500 mg, 1,22 mmol) en THF (6,1 ml) a -15 °C. Después de 1 hora, inactivar con cloruro de amonio acuoso saturado (15 ml) y extraer con EtOAc (3 × 40 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo a través de cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 10-20 % EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (405,3 mg, 80 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 414/416 $[M+H]^+$.

Preparación 16

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-fluorofenil)metanona

Añadir una solución 1,0 *M* de bromuro de 4-fluorofenilmagnesio en THF (9,8 ml, 9,8 mmol) a una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (2,0 g, 4,90 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C. Agitar durante 15 min a 0 °C, a continuación a temperatura ambiente durante 1,5 hr. Enfriar la mezcla a 0 °C y añadir cloruro de amonio saturado (12 ml). Añadir EtOAc (25 ml) y agitar vigorosamente a temperatura ambiente durante 15 min. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc (2 × 25 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato sódico, filtrar, y evaporar el filtrado a presión reducida. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 2-10 % EtOAc/DCM para obtener el compuesto del título (1,76 g, 83 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 418/420 $[M+H]^+$.

Preparación 17

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(2-fluorofenil)metanona

Disolver 1-bromo-2-fluorobenceno (2,39 g, 7,88 mmol) en THF (15 ml) a 0 °C. Añadir una solución 1,3 *M* de complejo de cloruro de litio-cloruro de isopropilmagnesio en THF (9,1 ml, 11,8 mmol) y agitar a 0 °C durante 1,5 hr. Canular esta mezcla en una

solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (2,93 g, 7,17 mmol) en THF (30 ml) a 0 °C y agitar durante 45 min. Dejar que la mezcla se caliente a temperatura ambiente y agitar durante 2 horas. Enfriar la reacción a 0 °C e inactivar mediante la adición de HCl acuoso 1 *N* (11,5 ml). Diluir la mezcla de reacción con EtOAc y agua. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con NaHCO3 acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el material en bruto a través de cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 10-70 % MTBE/hexanos para obtener el compuesto del título (2,14 g, 71 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 418,0/420,0 $[M+H]^+$.

Preparación 18

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[2-(trifluorometil)fenil]metanona

Disolver 2-bromobenzotrifluoruro (2,97 g, 13,1 mmol) en THF (15 ml) a 0 °C. Añadir una solución 1,3 *M* de complejo de cloruro de litio-cloruro de isopropilmagnesio en THF (8,6 ml, 11,2 mmol) y agitar a 0 °C durante 1,5 hr. Calentar la mezcla a temperatura ambiente y agitar durante 30 min. Enfriar la mezcla de nuevo a 0 °C y canular esta mezcla en una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-morfolino-metanona (3,05 g, 7,46 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C y agitar durante 2,5 hr. Dejar que la mezcla alcance la temperatura ambiente y agitar durante 1 hora. Enfriar la mezcla a 0 °C y añadir HCl acuoso 1 *N* (14,9 ml). Diluir la mezcla con EtOAc y agua. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con NaHCO3 saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 25-50 % de MTBE/hexanos para obtener el compuesto del título (1,48 g, 42 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 468,0/470,0 $[M+H]^+$.

Preparación 19

[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-cloro-3-(ciclopropoxi)fenil]metanona

Agitar una mezcla de virutas de magnesio (4,97 g, 204 mmol) y yodo (920 mg, 3,63

mmol) en THF (150 ml) durante 10 min a temperatura ambiente. Añadir lentamente una solución de 4-bromo-1-cloro-2-(ciclopropoxi)benceno (46,0 g, 186 mmol) en THF (400 ml) por goteo y someter la mezcla a reflujo durante 30 min. Enfriar a 40 °C y añadir lentamente esta mezcla por goteo a una solución de (3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-N-metoxi-N,2,2-trimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carboxamida (35,0 g, 91,6 mmol) en THF (400 ml) durante 10 min. Agitar la mezcla resultante durante 30 min a temperatura ambiente. Enfriar a 0 °C e inactivar la mezcla de reacción mediante la adición de cloruro de amonio acuoso saturado (200 ml) y MTBE (200 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con MTBE (2 x 200 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con agua (150 ml), cloruro de sodio acuoso saturado (100 ml) y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener una mezcla en bruto. Purificar por trituración en MTBE (80 ml) y heptano (400 ml) para obtener el compuesto del título (48,8 g, 89,9 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 490,0/492,0 $[M+H]^+$. ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0,85-0,89 (m, 4H), 1,44 (s, 3H), 1,69 (s, 3H), 3,74-3,83 (m, 1H), 5,46-5,48 (m, 2H), 5,68 (dd, J = 2,2, 6,1 Hz, 1H), 6,39 (d, J = 0,6 Hz, 1H), 6,59 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,34-7,42 (m, 3H), 7,65 (d , J = 1,8 Hz, 1H), 8,45 (s, 1H).

Preparación 20

(1R)-1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(4-clorofenil)etanol

Disolver [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanona (15,9 g, 36,6 mmol) en THF (175 ml) y enfriar a 0 °C. Añadir una solución 3,4 *M* de bromuro de metilmagnesio en 2-metiltetrahidrofurano (21,53 ml, 73,3 mmol) por goteo y agitar la mezcla durante 2 horas a 0 °C. Inactivar la mezcla de reacción con cloruro de amonio acuoso saturado (50 ml) y después añadir EtOAc (250 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 100 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con agua (100 ml), y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un sólido vítreo blanco. Purificar mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente 10-15 % EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (11,5 g, 70 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 450,00/452,00 $[M+H]^+$.

Preparación 21

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(3,4-diclorofenil)etanol

Disolver [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-diclorofenil)metanona (0,50 g, 1,07 mmol) en THF (5,3 ml) y enfriar a 0 °C. Añadir lentamente una solución 3,0 *M* de bromuro de metilmagnesio en éter dietílico (0,53 ml, 1,60 mmol) y agitar a 0 °C durante 1 hr. Inactivar mediante la adición de cloruro de amonio saturado (20 ml). Diluir con EtOAc (40 ml) y separar las capas. Extraer la capa acuosa con EtOAc adicional (3x40 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado seguido de cloruro sódico acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 25-30 % MTBE/hexanos para obtener el compuesto del título (342 mg, rendimiento 66 %). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 484/486 $[M+H]^+$.

Preparación 22

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(2-fluorofenil)etanol

Disolver [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(2-fluorofenil)metanona (0,685 g, 1,64 mmol) en THF (20 ml) y enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir una solución 3 *M* de bromuro de metilmagnesio en éter dietílico (1,09 ml, 3,27 mmol) y agitar durante 2 horas a 0 °C. Detener la reacción mediante la adición de 1 *N* HCl acuoso (3,44 ml). Diluir la mezcla de reacción con EtOAc y agua. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con $NaHCO_3$ acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el material a través de cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 10 a 75 % de MTBE en hexanos para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,482 g, 68 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 434,0/436,0 $[M+H]^+$.

Preparación 23

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[2-(trifluorometil)fenil]etanol

Disolver [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[2-(trifluorometil)fenil]metanona (0,434 g,

0,928 mmol) en THF (12 ml) y enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir una solución 3,0 M de bromuro de metilmagnesio en éter dietílico (0,62 ml, 1,86 mmol) y agitar durante 30 min a 0 °C. Inactivar la reacción mediante la adición de 1 *N* HCl acuoso (1,95 ml). Diluir la mezcla de reacción con EtOAc y agua. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con $NaHCO_3$ acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10 a 50 % de MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,202 g, 45 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 484,0/486,0 $[M+H]^+$.

Preparación 24

1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[4-(trifluorometil)fenil]etanol

Disolver [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metanona (0,425 g, 0,908 mmol) en THF (10 ml) y enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir una solución 3,0 *M* de bromuro de metilmagnesio en éter dietílico (0,45 ml, 1,35 mmol) y agitar durante 1 hora a 0 °C. Inactivar la reacción mediante la adición de 1 *N* HCl acuoso (1,45 ml). Diluir la mezcla con EtOAc y agua. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con $NaHCO_3$ acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10 a 25 % de MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título como una mezcla de diastereómeros (0,348 g, 79 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 484,0/486,0 $[M+H]^+$.

Preparación 25

(S)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol

Añadir lentamente una solución de solución 1,0 *M* de litio tri-sec-butilborohidruro en THF (19 ml, 19 mmol) a una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanona (6,5 g, 15 mmol) en THF (200 ml) a -78 °C. Agitar la mezcla a -78 °C durante 4 horas en atmósfera de N_2 y luego inactivar con solución de cloruro de

amonio acuoso saturado (50 ml). Añadir EtOAc (200 ml) y separar la fase orgánica. Extraer la fase acuosa con EtOAc (3 × 70 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con agua (100 ml), y secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-30 % EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (4,55 g, 70 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 436,0/438,0 $[M+H]^+$.

Preparación 26

(R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol

Suspender [(3aR, 4R, 6S, 6aS) -4- (4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanona (4,77 g, 11,0 mmol) y (R,R)-Ts-DENEB™ (357 mg, 0,549 mmol) en complejo de ácido fórmico-trietilamina 5:2 (45 ml) Agitar la mezcla de 18 horas a temperatura ambiente, diluir la mezcla con agua (300 ml) y DCM (75 ml). Separar las capas y extraer la capa acuosa con DCM (3 × 75 ml). Combinar los extractos orgánicos y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 30-60 % de una mezcla 20 % de acetona/hexanos en hexanos, para obtener el compuesto del título, (3,50 g, 73 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 436,0/438,0/440,0 $[M+H]^+$.

Preparación alternativa 26

Agitar una mezcla de $[Cp^*IrCl_2]_2$ (8,41 g, 10,45 mmol) y (R,R)-Ts-DEPEN (7,899, 20,91 mmol) en 1,33/1 de agua/DCM (3972 ml) a 50 °C durante 45 min. Enfriar a temperatura ambiente y añadir formiato de amonio (509,7 g, 7840 mmol). Agitar la mezcla bifásica a temperatura ambiente durante 5 min y añadir [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanona (227,0 g, 522,7 mmol). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hr. Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con DCM (1000 ml). Combinar los extractos orgánicos y concentrar a presión reducida para obtener un sólido naranja. Purificar el residuo resultante por recristalización en EtOH (3400 ml) para obtener el compuesto del título, (199,5 g, 86 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 436,0/438,0/440,0 $[M+H]^+$.

Preparación 27

(R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-cloro-3-(ciclopropoxi)fenil]metanol

Agitar una mezcla de $[Cp^*IrCl_2]_2$ (1,58 g, 1,95 mmol) y (R,R)-Ts-DEPEN (1,43 g; 3,90 mmol) en 1/1 de agua/DCM (860 ml) a 40 °C durante 45 min. Enfriar a temperatura ambiente y añadir formiato de amonio (100 g, 1,462 mmol). Agitar la mezcla bifásica a temperatura ambiente durante 5 minutos y añadir por goteo una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-cloro-3-(ciclopropoxi)fenil]metanona (48,8 g, 97,4 mmol) en DCM (100 ml) durante 10 min. Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hr. Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con DCM (2 x 200 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua (200 ml). Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 5-10 % de EtOAc en DCM, para obtener el compuesto del título (35,3 g, 70 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 492,0/494,0 $[M+H]^+$. ^1H RMN (300 MHz, d_6-DMSO) δ 0,59-0,71 (m, 4H) 1,30 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 3,61-3,65 (m, 1H), 4.20 a 4.22 (m, 1H) , 4,68 (t, J = 4,9 Hz, 1H), 5.12 - 5.14 (m, 1H), 5,31-5,34 (m, 1H), 6,09 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 6,34-6,35 (m, 1H), 6,87-6,80 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 7,29 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 8,70 (s, 1H).

Preparación 28

[(R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-Cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metil] 4-nitrobenzoato

Agitar una mezcla de (S)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol, (10,3 g, 23,7 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (5,94 g, 35,5 mmol) y trifenilfosfina (9,32 g, 35,5 mmol) en THF (120 ml) a 0 °C en atmósfera de N_2. Añadir DIAD (7,19 g, 35,5 mmol) por goteo a la mezcla y agitar durante 6 horas a temperatura ambiente. Añadir ácido 4-nitrobenzoico adicional (1,98, 11,8 mmol), trifenilfosfina (3,11 g, 11,8 mmol) y DIAD (2,40 g, 11,8 mmol) a temperatura ambiente y agitar la mezcla durante 18 hr a temperatura ambiente bajo N_2. Enfriar la mezcla a 0 °C e inactivar con agua (100 ml). Añadir EtOAc (100 ml) y separar la capa orgánica resultante. Extraer la capa acuosa con EtOAc (3 x 75 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con agua (100 ml), y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener una mezcla en

bruto. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-15 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (10,1 g, 73 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 585,00/587,00 $[M+H]^+$.

Preparación 29

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metanol

Añadir una solución de solución de tri-sec-butilborohidruro de litio de 1,0 *M* en THF (93,5 ml, 93,5 mmol) lentamente a una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metanona (35,0 g, 74,8 mmol) en THF (525 ml) a -78 °C. Bajo una atmósfera de N_2, agitar la mezcla a -78 °C durante 30 min y después calentar a 0 °C. Inactivar con cloruro de amonio acuoso saturado. Añadir EtOAc y separar la fase orgánica. Extraer la capa acuosa dos veces con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos y lavar con agua y cloruro sódico acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-50 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (22,0 g, 55 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 470,00/472,00 $[M+H]^+$.

Preparación 30

Diastereómero del [[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metil] 4-nitrobenzoato

Disolver diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metanol (21,0 g, 44,7 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (14,9 g, 89,4 mmol) y trifenilfosfina (23,45 g, 89,4 mmol) en THF (315 ml) y agitar a 0 °C bajo N_2. Añadir DIAD (18,1 g, 89,4 mmol) por goteo a la mezcla y agitar durante 3 horas a temperatura ambiente. Añadir ácido 4-nitrobenzoico adicional (7,50 g, 44,7 mmol), trifenilfosfina (11,8 g, 44,7 mmol), y DIAD (9,1 g, 44,7 mmol) a temperatura ambiente y agitar la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente bajo N_2. Enfriar la mezcla a 0 °C, inactivar con agua (100 ml), y diluir con EtOAc (200 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 75 ml). Combinar los extractos

orgánicos y lavar con agua (100 ml) y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-50 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (18,5 g, 60 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 619,00/621,00 $[M+H]^+$.

Preparación 31

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metanol

Añadir lentamente una solución de solución de tri-sec-butilborohidruro de 1,0 *M* de litio en THF (1,05 ml, 1,05 mmol) a una solución de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metanona (0,35 g, 0,81 mmol) en THF (10,7 ml) a -78 °C. Agitar la mezcla a -78 °C durante 10 minutos bajo N_2 y luego añadir HCl acuoso 1 N (1,3 ml). Añadir EtOAc (50 ml), y lavar la capa orgánica con agua (10 ml) seguido de cloruro de sodio acuoso saturado (10 ml). Secar el extracto orgánico sobre sulfato de sodio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-30 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,22 g, 61 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 436,2/438,2 $[M+H]^+$.

Preparación 32

Diastereómero del [[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metil] 4-nitrobenzoato

Agitar diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metanol (0,100 g, 0,229 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (0,76 g, 0,46 mmol), y trifenilfosfina (0,12 g, 0,46 mmol) en THF (1 ml) a 0 °C en atmósfera de N_2. Añadir DIAD (0,95 g, 0,46 mmol) por goteo a la mezcla y agitar durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Añadir ácido 4-nitrobenzoico adicional (1,98 g, 11,8 mmol), trifenilfosfina (0,015 g, 0,057 mmol), y DIAD (0,012 g, 0,057 mmol) y agitar la mezcla durante 18 hr a temperatura ambiente bajo N_2. Enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir agua (10 ml), EtOAc (10 ml), y separar la capa orgánica resultante. Extraer la capa acuosa con EtOAc (2 × 10 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con agua (100 ml), y secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por

cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-15 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,11 g, 82 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 585,0/587,0 $[M+H]^+$.

Preparación 33

Diastereómero del 4-[[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-hidroxi-metil]benzonitrilo

Disolver 4-[(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-carbonil]benzonitrilo (1,33 g, 3,14 mmol) y una solución 1,0 *M* en tolueno de (S)-1-butil-3,3-difenilhexahidropirrolo[1,2-c] [1,3,2]oxazaborol (0,31 ml, 0,31 mmol) en THF (50 ml) y enfriar la mezcla a -15 °C. Añadir una solución complejo de borano-THF 1,0 *M* de en THF (2,07 ml, 2,07 mmol). Dejar que la reacción alcance la temperatura ambiente y agitar la reacción durante 17 hr. Enfriar la mezcla de reacción a 0 °C e inactivar mediante la adición de MeOH (5 ml). Diluir con cloruro de amonio acuoso saturado (40 ml) y EtOAc (80 ml). Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc adicional. Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 25-40 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,75 g, 58 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 427,0/429,0 $[M+H]^+$.

Preparación 34

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-diclorofenil)metanol

Disolver [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-diclorofenil)metanona (490,0 mg, 1,045 mmol) y una solución 1,0 *M* en tolueno de (S)-1-butil-3,3-difenilhexahidropirrolo[1,2-c] [1,3,2]oxazaborol (0,10 ml, 0,10 mmol) en THF (20,9 ml) y enfriar la mezcla a -15 °C. Añadir una solución 1,0 *M* de complejo de borano-THF en THF (0,69 ml, 0,69 mmol). Dejar que la reacción se caliente a temperatura ambiente y agitar la reacción durante 17 hr. Inactivar mediante la adición de MeOH (1 ml). Diluir con cloruro de amonio acuoso saturado (40 ml) y EtOAc (40 ml). Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc adicional (2 x 40 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión

reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 5-25 % de MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (246,8 mg, 50 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 470/472 $[M+H]^+$.

Preparación 35

(R)-(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-fenil-metanol

Suspender [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-fenil-metanona (0,866 g, 2,17 mmol) y (R,R)-Ts-DENEB™ (70,4 mg, 10,8 mmol) en complejo de ácido fórmico-trietilamina 5:2 (15 ml), y agitar durante 4 horas a temperatura ambiente. Diluir la mezcla de reacción con agua (60 ml). Extraer la capa acuosa con DCM. Evaporar los extractos orgánicos a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 15-30 % de acetona en hexanos durante 20 min, para obtener el compuesto del título (0,420 g, 48 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 402,0/404,0 $[M+H]^+$.

Preparación 36

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanol

Suspender [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanona (0,50 g, 1,0 mmol) y (R,R)-Ts-DENEB™ (30 mg, 0,05 mmol) en complejo de ácido-trietilamina fórmico 5:2 (10 ml) y agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Diluir la mezcla de reacción con agua (50 ml), y extraer la capa acuosa con DCM. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-40 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,45 g, 95 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 454,0/456,0/458,0 $[M+H]^+$.

Preparación 37

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-etilfenil)metanol

Suspender [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-etilfenil)metanona (0,975 g, 2,28 mmol)

y (R,R)-Ts-DENEB™ (74 mg, 0,11 mmol) en complejo de ácido-trietilamina fórmico 5:2 (22 ml), y agitar 4 horas a temperatura ambiente. Diluir la mezcla de reacción con agua (250 ml). Extraer la capa acuosa con DCM. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-20 % de EtOAc en hexanos durante 30 min, para obtener el compuesto del título (0,37 g, 38 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 430,2/432,2 $[M+H]^+$.

Preparación 38

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-difluorofenil)metanol

Añadir (R,R)-Ts-DENEB™ (93 mg, 0,143 mmol) a una mezcla de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-difluorofenil)metanona (1,12 g, 2,57 mmol) y complejo de ácido fórmico-trietilamina 5:2 (10 ml) a temperatura ambiente. Enjuagar el recipiente de reacción con N_2 y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 hr. Diluir la mezcla resultante con agua (75 ml) y DCM (25 ml) y mezclar durante 5 min. Separar las capas y extraer la capa acuosa con DCM. Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 5-10 % de EtOAc en DCM, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,8 g, 69 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 438 $[M+H]^+$.

Preparación 39

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(p-tolil)metanol

Añadir complejo de ácido fórmico-trietilamina 5:2 (4,0 ml) a una mezcla de (R,R)Ts-DENEB™ (31,8 mg, 0,048 mmol) y [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(p-tolil)metanona (405,0 mg, 0,978 mmol) en 1,4-dioxano (4,0 ml) a temperatura ambiente. Agitar a temperatura ambiente durante 4 hr. Diluir con agua (15 ml) y extraer con EtOAc (3 × 40 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10 a 30 % de MTBE en

hexanos, para obtener el compuesto del título (144 mg, 38 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 416/418 $[M+H]^+$.

Preparación 40

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-fluorofenil)metanol

Añadir (R,R)-Ts-DENEB™ (242 mg, 0,372 mmol) a una mezcla de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-fluorofenil)metanona (1,41 g, 3,24 mmol) complejo 5:2 de ácido fórmico-trietilamina (25 ml) y 1,4-dioxano (12 ml) y agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 hr. Diluir la mezcla con agua (80 ml) y DCM (40 ml) y mezclar durante 5 min. Separar las capas y extraer la capa acuosa con DCM adicional (2 x 40 ml). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 4-10 % de EtOAc en DCM, para obtener el compuesto del título (1,01 g, 73 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 420 $[M+H]^+$.

Preparación 41

(R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-fenil-metanol

Agitar una mezcla de (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-fenil-metanol (0,399 g, 0,993 mmol) y 7 *N* NH_3 en MeOH (15 ml, 105 mmol) en un recipiente de reacción sellado. Calentar a microondas la mezcla a 100 °C durante 8 hr. Enfriar el recipiente a temperatura ambiente y evaporar el solvente bajo una corriente de N_2. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 50-100 % de una mezcla de MeOH/MTBE 10 % en hexanos 25 min, para obtener el compuesto del título (0,295 g, 78 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 383,2 $[M+H]^+$.

Preparación 42

(R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol

Añadir (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metil]4-nitrobenzoato (10,1 g,

17,3 mmol), hidróxido de amonio (28 % en agua, 50 ml) y 1,4-dioxano (50 ml) a un recipiente sellado y calentar a 110 °C durante 18 hr. Enfriar la reacción a 0 °C y añadir agua (50 ml) y EtOAc (100 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 50 ml). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo por filtración a través de un conector de sílice, eluyendo con una mezcla isocrática de hexanos:EtOAc (1: 1) para obtener el compuesto del título (6,78 g, 75 % de rendimiento) como un sólido vítreo de color marrón que se utiliza sin purificación adicional.

Preparación alternativa 42

Colocar un reactor tubular de 300 ml acero inoxidable sin soldadura (o-d. = 1/8”) en el interior de un horno de GC. Enjuagar con una proporción 3:10 de hidróxido de amonio (28 % en agua)/dioxano a 10 ml/min durante 40 min. Aplicar una presión de retorno de N_2 (800 psig) a la salida del sistema de reacción y ajustar la temperatura del horno GC a 200 °C. Bombear una solución de (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol (200,0 g, 458,41 mmol) una proporción 3:10 de hidróxido de amonio (28 % en agua)/dioxano (1,300 ml) a través del reactor a 10 ml/min (tiempo de residencia 30 min) utilizando una bomba de jeringa de alta presión de 1l Teledyne CIUO™. Después del consumo de esta solución de alimentación, lavar el reactor con 3:10 hidróxido de amonio (28 % en agua): dioxano (600 ml) con bombeo a 10 ml/min. Eliminar los solventes de las soluciones recogidas en vacío hasta 1/3 del volumen, añadir agua (300 ml) y extraer con EtOAc (3 x 150 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con cloruro de sodio acuoso saturado, secar sobre sulfato sódico, filtrar y evaporar el filtrado bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante por trituración a partir de hexano (200 ml) para obtener el compuesto del título (189,0 g, 95 % de pureza). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 416,0/418,0 $[M+H]^+$.

Preparación 43

(1R)-1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(4-clorofenil)etanol

Disolver (1R)-1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(4-clorofenil)etanol (11,4 g, 25,3 mmol) en hidróxido de amonio (28 % en agua, 60 ml) y 1,4-dioxano (60 ml) en un

recipiente sellado y calentar a 110 °C durante 18 hr. Enfriar a temperatura ambiente y eliminar los solventes a presión reducida. Añadir agua (50 ml) y EtOAc (100 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (3 × 100 ml). Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato sódico, filtrar, y evaporar el filtrado a presión reducida para obtener el compuesto del título (10,7 g, 96 % de rendimiento) como un sólido vítreo de color marrón. ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 431,00/433,20 $[M+H]^+$.

Preparación 44

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metanol

Disolver diastereómero de [[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metil] 4-nitrobenzoato (21 g, 33,9 mmol) en hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 100 ml) y 1,4-dioxano (100 ml) en un tubo sellado, y calentar la mezcla a 110 °C durante 18 hr. Enfriar el tubo a temperatura ambiente, recoger el sólido precipitado por filtración y lavar la torta de filtración con agua. Disolver la torta de filtración en EtOAc (300 ml). Lavar la capa orgánica resultante con agua y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo por filtración a través de un tapón de gel de sílice, eluyendo con una mezcla isocrática de hexanos: EtOAc (1: 1) para obtener el compuesto del título (13,5 g, 80 % de rendimiento) como un diastereómero como un aceite incoloro. ES/MS *m/z* 451,2/452,2 $[M+H]^+$.

Preparación 45

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metanol

Agitar diastereómero de [[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metil] 4-nitrobenzoato (0,105 g, 0,18 mmol), 1,4-dioxano (4 ml), e hidróxido de amonio (30 % en peso en agua, 6 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar la reacción a 85 °C. Después de 24 horas a 85 °C enfriar a temperatura ambiente, añadir hidróxido de amonio adicional (30 % en peso en agua, 6 ml), y agitar a 95 °C durante 24 h adicionales. Enfriar a temperatura ambiente y añadir agua (50 ml). Extraer con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 50-100 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del

título (0,053 g, 71 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 417,2/419,2 $[M+H]^+$.

Preparación 46

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanol

Agitar una mezcla de diastereómeros de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanol (0,12 mg, 0,26 mmol), 1,4-dioxano (2 ml), e hidróxido de amonio (30 % en peso en agua, 4 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar la mezcla a 80 °C. Después de 12 horas, enfriar el tubo a temperatura ambiente, y añadir hidróxido de amonio adicional (30 % en peso en agua, 4 ml). Continuar calentando el recipiente sellado a 80 °C durante 3 horas más. Enfriar la reacción a temperatura ambiente, diluir con agua, y extraer con DCM (3 x 25 ml). Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato sódico, filtrar y evaporar el filtrado bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-50 % de EtOAc en DCM durante 30 min, para obtener el compuesto del título (0,070 g, 61 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 435,2/437,2 $[M+H]^+$.

Preparación 47

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-etilfenil)metanol

Agitar una mezcla de diastereómeros de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-etilfenil)metanol (0,370 g, 0,861 mmol), 1,4-dioxano (4 ml), e hidróxido de amonio (30 % en peso en agua, 6 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar la mezcla a 80 °C durante 12 horas. Enfriar el recipiente a la temperatura ambiente, diluir la mezcla con agua, y extraer con EtOAc (3 × 25 ml). Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato sódico, filtrar y evaporar el filtrado bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-100 % de EtOAc en DCM durante 30 min, para obtener el compuesto del título (0,240 g, 68 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 411,2 $[M+H]^+$.

Preparación 48

Diastereómero del 4-[[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-hidroxi-metil]benzonitrilo

Disolver diastereómero de 4-[[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-hidroxi-metil]benzonitrilo (0,765 g, 1,79 mmol) en 1,4-dioxano (4 ml) e hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 4 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar la reacción a 85 °C y agitar durante 18 hr. Enfriar la reacción a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 60-75 % de una mezcla 9:1 de 10 % $NH_3$7 *N* en MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,64 g, 88 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 408 $[M+H]^+$.

Preparación 49

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-difluorofenil)metanol

Disolver diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-difluorofenil)metanol (795,9 mg, 1,76 mmol) en 1,4-dioxano (4 ml) y añadir hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 6 ml) en un recipiente de reacción. Sellar el recipiente y calentar la mezcla a 85 °C con agitación durante 18 h. Enfriar el recipiente a la temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Disolver el sólido resultante en una solución de 2 % de MeOH en DCM y filtrar la solución a través de un conector de lana de vidrio. Concentrar el filtrado para obtener el compuesto del título (694,5 mg, 79 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 419 $[M+H]^+$.

Preparación 50

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-diclorofenil)metanol

Disolver diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-diclorofenil)metanol (245,0 mg, 0,520 mmol), en hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 2,0 ml) y 1,4-dioxano (2,0 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar el recipiente a 85 °C y agitar durante 18 hr. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-50 % de una mezcla de 10 % de MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (184,6 mg, 78 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 451/453 $[M+H]^+$.

Preparación 51

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(p-tolil)metanol

Disolver diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(p-tolil)metanol (144 mg, 0,346 mmol) en hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 4,0 ml) y 1,4-dioxano (4,0 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar la reacción a 85 °C y agitar durante 18 hr. Enfriar la reacción a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 25-75 % de una mezcla de 10 % de MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (119,4 mg, 87 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 397 $[M+H]^+$.

Preparación 52

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-fluorofenil)metanol

Cargar dos recipientes sellados cada uno con diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-fluorofenil)metanol (505 mg, 1,20 mmol), hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 15 ml) y 1,4-dioxano (15 ml). Calentar las mezclas a 85 °C y agitar durante 18 hr. Enfriar las mezclas a temperatura ambiente y añadir hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 8 ml). Calentar ambas mezclas a 75 °C y agitar durante 60 horas. Combinar los contenidos de ambos recipientes, y concentrar a sequedad bajo presión reducida. Disolver el residuo resultante en una solución de 2 % de MeOH en DCM y filtrar a través de un conector de lana de vidrio. Concentrar el filtrado para obtener un residuo. Purificar el residuo mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de MeOH al 5 % en DCM, para obtener el compuesto del título (909,6 mg, 93 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 401 $[M+H]^+$.

Preparación 53

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(3,4-diclorofenil)etanol

Disolver diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(3,4-diclorofenil)etanol

(150,0 mg, 0,309 mmol), hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 3,0 ml) y 1,4-dioxano (3,1 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar la reacción a 85 °C y agitar durante 18 hr. Enfriar la reacción a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-50 % de una mezcla de 10 % de MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (110,9 mg, 77 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 465/467 $[M+H]^+$.

Preparación 54

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(2-fluorofenil)etanol

Disolver diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(2-fluorofenil)etanol (0,48 g, 1,1 mmol) en 1,4-dioxano (6 ml) e hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 4 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar el recipiente a 85 °C y agitar durante 22 hr. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 25-75 % de una mezcla 9:1 de 10 % NH_3 7 *N* en MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,35 g, 75 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 415,0 $[M+H]^+$.

Preparación 55

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[2-(trifluorometil)fenil]etanol

Disolver diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[2-(trifluorometil)fenil]etanol (0,18 g, 0,37 mmol) en 1,4-dioxano (3 ml) e hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 1 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar el recipiente a 85 °C y agitar durante 22 hr. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 50-75 % de una mezcla 9:1 de 10 % NH_3 7 *N* en MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,14 g, 84 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 465,0 $[M+H]^+$.

Preparación 56

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[4-(trifluorometil)fenil]etanol

Disolver 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[4-(trifluorometil)fenil]etanol (0,33 g, 0,68 mmol) en 1,4-dioxano (2 ml) e hidróxido de amonio (28 % en peso en agua, 3 ml) en un recipiente de reacción sellado. Calentar el recipiente a 85 °C y agitar el contenido durante 22 horas. Enfriar la reacción a temperatura ambiente y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 25-75 % de una mezcla 9:1 de 10 % NH_3 7 *N* en MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (0,152 g, 48 % de rendimiento). ES/MS m/z 465,0 $[M+H]^+$.

Preparación 57

(R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-Aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-cloro-3-(ciclopropoxi)fenil]metanol

Coloque un reactor tubular de 59 ml acero inoxidable sin soldadura (o.d. = 1/8”) en el interior de un horno de GC. Lavar con proporción 1:6 de hidróxido de amonio (28 % en agua)/dioxano a 2,0 ml/min durante 40 min. Aplicar una presión de retorno de N_2 (1400-1500 psig) a la salida del sistema de reacción y ajustar la temperatura del horno GC a 200 °C. Bombear una solución del diastereómero de (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-cloro-3-(ciclopropoxi)fenil]metanol (35,3 g, 70,2 mmol) en una mezcla 1/6 de hidróxido de amonio (28 % en agua)/dioxano (350 ml) a través del reactor a 0,25 ml/min (30 min. de tiempo de permanencia) utilizando una bomba de jeringa de 1l de alta presión Teledyne de ISCO™. Después del consumo de esta solución de alimentación, lavar el reactor con 1:6 hidróxido de amonio (28 % en agua): dioxano (89 ml) con bombeo a 2,0 ml/min. Añadir agua (1400 ml) y EtOAc (500 ml). Separar la capa orgánica resultante y extraer la capa acuosa con EtOAc (200 ml). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener el compuesto del título (34 g, 88,6 % de pureza). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 473,1/475,1 $[M+H]^+$. ^1H RMN (300 MHz, d_6-DMSO) δ 0,73-0,63 (m, 4H), 1,30 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 4,10 (dd, J = 1,6, 6,6 Hz, 1H), 4,66 (dd, J = 4,3, 6,4 Hz, 1H), 5,11 (dd, J = 1,8, 6,2 Hz, 1H), 5,33 (dd, J = 3,3, 6,3 Hz, 1H), 6,12 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 6,30

(d, J = 4,1 Hz, 1H), 6,64 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 6,86-6,90 (m, 1H), 6,93 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,14 (s , 2H), 7,28 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 8,09 (s, 1H).

Preparación 58

(1R)-1-[(3aR,4R,6S,6aR)-2,2-Dimetil-4-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(4-clorofenil)etanol

En un recipiente de reacción de alta presión bajo atmósfera de N_2, añadir una solución 2,0 *M* de $Al(CH_3)_3$ en tolueno (120 µl, 0,24 mmol) a una mezcla en agitación de (1R)-1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(4-clorofenil)etanol (0,30 mg, 0,666 mmol), tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (0,154 g, 0,016 mmol), y THF seco (8 ml). Sellar el recipiente de reacción y calentar la mezcla a 70 °C. Después de 6 horas a 70 °C, enfriar el recipiente a temperatura ambiente y añadir cuidadosamente HCl acuoso 1 *N* (15 ml). Diluir la mezcla con agua (15 ml) y extraer con EtOAc (3 × 20 ml). Combinar los extractos orgánicos; lavar con cloruro de sodio acuoso saturado, secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con una mezcla isocrática de 1:1 EtOAc:hexanos, para obtener el compuesto del título (0,270 g, 89 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 430,0/432,0 $[M+H]^+$.

Preparación 59

Diastereómero del [(3aR,4R,6R,6aR)-2,2-dimetil-4-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanol

En un recipiente de reacción de alta presión bajo atmósfera de N_2, añadir una solución 2,0 *M* de $Al(CH_3)_3$ en tolueno (120 µl, 0,24 mmol) a una mezcla en agitación de diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanol (0,271 mg, 0,597 mmol), tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (0,138 mg, 0,119 mmol), y THF seco (2,2 ml). Sellar el recipiente de reacción y calentar la mezcla a 80 °C. Después de 6 horas a 80 °C, enfriar el recipiente a temperatura ambiente y añadir cuidadosamente HCl acuoso 1 *N* (10 ml). Diluir con agua (15 ml), y extraer con EtOAc (3 × 20 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con cloruro de sodio acuoso saturado, secar sobre sulfato sódico, filtrar, y evaporar el filtrado a presión reducida para obtener el compuesto del título (0,266 g, 83 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 434,2/436,2 $[M+H]^+$.

Preparación 60

Diastereómero del 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-2,2-dimetil-4-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(3,4-diclorofenil)etanol

Añadir una solución 2,0 *M* de $Al(CH_3)_3$ en tolueno (0,57 g, 1,41 mmol) a una mezcla de diastereómeros de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(3,4-diclorofenil)etanol (171,4 mg, 0,354 mmol), tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (0,082 g, 0,071 mmol) en 1,4-dioxano (4,4 ml) a temperatura ambiente. Calentar la mezcla a 80 °C durante 8 horas. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente e inactivar con cloruro de amonio saturado (20 ml). Añadir EtOAc (40 ml) y extraer la capa acuosa con EtOAc (4 × 30 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 25-40 % de una mezcla 9:1 de 10 % NH_3 7 *N* en MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título (125,9 mg, 77 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 451/453 $[M+H]^+$.

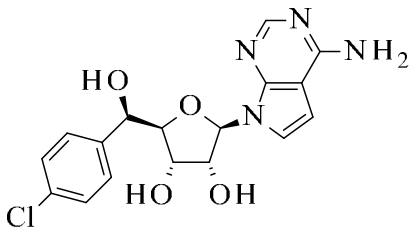
Preparación 61

(R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-2,2-Dimetil-4-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol

En un recipiente de reacción de alta presión bajo atmósfera de N_2, añadir una solución 2,0 *M* de $Al(CH_3)_3$ en tolueno (120 µl, 0,24 mmol) a una mezcla en agitación de diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol (0,50 g, 1,15 mmol), tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (0,266 g, 0,230 mmol), y THF seco (13,8 ml). Sellar el recipiente de reacción y calentar a 70 °C. Después de 6 horas a 70 °C, enfriar a temperatura ambiente y cuidadosamente e inactivar con HCl acuoso 1 *N* (15 ml). Diluir con agua (15 ml), y extraer con EtOAc (3 × 20 ml). Combinar los extractos orgánicos; lavar con cloruro de sodio acuoso saturado, secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con una mezcla isocrática de 1:1 EtOAc: hexanos, para obtener el compuesto del título (0,50 g, 95 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 416,0/418,0 $[M+H]^+$.

Ejemplo 1

(2R,3R,4S,5R)-2-(4-Aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(R)-(4-clorofenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Disolver (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol, (6,78 g, 13,0 mmol) en TFA (90 ml) a 0 °C. Añadir agua (9 ml) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Retirar los solventes a presión reducida y recoger el residuo en MeOH (25 ml). Enfriar la mezcla a 0 °C y añadir hidróxido de amonio acuoso (28 % en peso) por goteo hasta pH ~ 10. Eliminar el solvente bajo presión reducida para obtener una mezcla en bruto. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-2 % de MeOH en EtOAc, para obtener un residuo. Disolver el residuo en EtOAc (50 ml) y eliminar los solventes a presión reducida. Añadir el sólido vítreo ligero resultante al agua (aproximadamente 50 ml) y agitar la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Filtrar el sólido blanco resultante y lavar con agua (50 ml). Secar el sólido para obtener el compuesto del título (3,24 g, 66 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 377,05/379,05 $[M+H]^+$. ^1H RMN (300 MHz, d_6-DMSO) δ 4,01 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 4,63 (dd, J = 5,3, 7,5 Hz, 1H), 4,81 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 5,01 (bs, 1H), 5,20 (bs, 1H), 5,91 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 6,59 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 6,69 (bs, 1H), 7,11 (bs, 2H) , 7,32-7,45 (m, 5H), 8,05 (s, 1H).

Preparación alternativa A Ejemplo 1, Forma cristalina I

Dispersar (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol (15,38 g, 0,037 mol) en 2-propanol (50 ml) a 0 °C. Añadir una solución de 4,99 M en 2-propanol HCl (200 ml, 1,000 mmol) y agua (4 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 18 hr. Añadir solución adicional de 4,99 *M* en 2-propanol HCl (25 ml) y agitar la mezcla 24 horas a temperatura ambiente. Calentar la mezcla a 40 °C durante 2 horas. Concentrar a presión reducida y agregar EtOH (50 ml) y agua (50 ml) al residuo resultante. Enfriar a 0 °C y añadir NH_4OH acuoso (28 % de rendimiento) por goteo para ajustar el pH a ~ 10 y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 hr. Concentrar a presión

reducida dando como resultado un sólido de color amarillo pálido. Añadir agua (50 ml) por goteo al sólido amarillo, seguido de la adición de NH_4OH (28 %, 2 ml) para ajustar el pH a 9, y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 hr. Recoger el precipitado resultante por filtración, enjuagar la torta de filtro con agua (50 ml), y secar a vacío durante 2 días para obtener el compuesto del título (13,37 g, 96 % de rendimiento).

Preparación alternativa B, Ejemplo 1

Química de flujo

Colocar un reactor de 200 ml de PTFE (o.d. = 1/8”) en el interior de un horno de GC. Enjuagar con EtOAc (300 ml). Ajustar la temperatura del horno de GC a 55 °C. Usando una bomba de jeringa de 1 l Teledyne ISCO™, bombear una solución de (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol (186,0 g, 01,57 mmol) en 5:2:2 EtOH:MeOH:EtOAc (1674 ml) a 8,5 ml/min y combinar en una mezcladora en T con una corriente de HCl 6 *N* acuoso. Bombear la mezcla a través del reactor a 1,5 ml/min con una bomba peristáltica (lo que da un tiempo total de permanencia de 20 min). Después del consumo de esta solución de alimentación, lavar el reactor con una mezcla 5:1 EtOAc:HCl acuoso 6 *N* (400 ml) a 10 ml/min. Concentrar la solución recogida a presión reducida y enfriar la solución acuosa resultante a 10 °C en un baño de hielo/agua. Añadir NH_4OH (28 %, 2 ml) por goteo para ajustar el pH ~ 10 y agitar la mezcla con enfriamiento a 10 °C durante 35 hr. Recoger el sólido resultante, enjuagar con agua (100 ml), y secar a vacío durante 2 días a 35 °C, para obtener el compuesto del título anhidro (134,5 g; 89 % de rendimiento).

Obtener los patrones de difracción en polvo de rayos X de los sólidos cristalinos en un difractómetro de polvo de rayos X Endeavor Bruker D4, equipado con una fuente CuKa (λ = 1,54060 Å) y un detector de Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. Analizar la muestra entre 4 y 40°en 2θ, con un tamaño de paso de 0,0087° en 2θ y una velocidad de barrido de 0,5 segundos/paso, y con 0,6 mm de divergencia, 5,28 mm antidispersor fijo, y ranuras del detector de 9,5 mm. Empacar el polvo seco en un soporte de muestra de cuarzo y obtener una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Es bien sabido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de factores tales como la morfología cristalina y el hábito. Cuando los efectos de orientación preferida están presentes, las intensidades de pico se alteran, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo se mantienen sin cambios. Véase,

por ejemplo, La Farmacopea de Estados Unidos 35 - Formulario Nacional 30 Capítulo <941> Caracterización de sólidos cristalinos y parcialmente cristalinos por difracción de polvo de rayos X (XRPD) Oficial 1 de diciembre de 2012, 1 de mayo de 2013. Además, también es bien sabido en la técnica cristalográfica que para cualquier forma cristalina dada las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden desplazarse debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza la muestra, el desplazamiento de la muestra, o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de la posición del pico de ± 0,2 en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina puede hacerse en base a cualquier combinación única de picos distinguibles (en unidades de ° 2θ), típicamente los picos más prominentes. Ajustar los patrones de difracción de la forma cristalina, recogidos a temperatura ambiente y la humedad relativa, con base en los picos estándar NIST 675 a 8,84 y 26,76 grados 2-theta.

Forma cristalina 1

Caracterizar una muestra preparada de Preparación alternativa A, Ejemplo 1, Forma I, mediante un patrón de difracción de rayos X usando radiación CuKa como la que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico a 25,1° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 17,1°, 13,6°, 20,5°, 24,0°, y 14,5°, con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

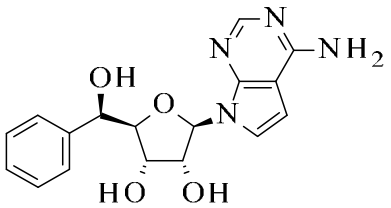
Tabla 1 de picos de difracción de rayos X en polvo del Ejemplo 1, Forma 1 cristalina

Pico	Ángulo (°2θ)	Intensidad (% rendim.)
1	10,1	14
2	13,6	52
3	14,5	28
4	14,9	22
5	15,6	21
6	17,0	54
7	20,5	44
8	20,9	13
9	21,5	24
10	24,0	36
11	24,5	12
12	24,8	17
13	25,0	100
14	25,6	13
15	26,5	17

Pico	Ángulo (°2θ)	Intensidad (% rendim.)
16	26,6	24
17	28,1	11
18	31,5	13

Ejemplo 2

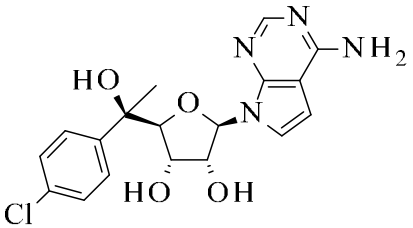
(2R,3R,4S,5R)-2-(4-Aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5[(R)-hidroxi(fenil)metil]tetrahidrofurano-3,4-diol



Agitar una solución de (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-fenil-metanol (0,293 g, 0,766 mmol), HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (9,6 ml) y agua (3 gotas) a temperatura ambiente. Después de 45 min a temperatura ambiente, concentrar la solución a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 50-100 % de acetona en hexano durante 25 min, para obtener el compuesto del título (0,195 g, 74 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 343,0 $[m+ H]^+$. ^{1}H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 4,04-4,06 (m, 2H), 4,55-4,67 (m, 1H), 4,81 (t, J= 3,5 Hz, 1H), 4,95 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 5,19 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 5,92 (d, J= 7,9 Hz, 1H), 6,60 (t, J= 3,4 Hz, 2H), 7,11-7,13 (m, 2H), 7,24 (t, J= 7,2 Hz, 1H), 7,32-7,35 (m, 3H), 7,42 (d, J= 7,3 Hz, 2H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 3

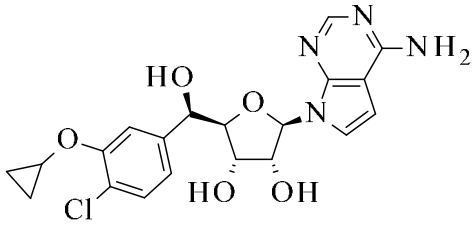
(2R,3R,4S,5S)-2-(4-Aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(1R)-1-(4-clorofenil)-1-hidroxi-etil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Disolver (1R)-1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(4-clorofenil)etanol (10,3 g, 23,9 mmol) en 2-propanol (100 ml) y agitar a 0 °C. Añadir una solución de HCl 4,99 *M* en 2-

propanol (200 ml, 1,000 mmol) y agua (2 ml) por goteo y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 6 hr. Eliminar los solventes a presión reducida para obtener un residuo. Disolver el residuo en EtOH (50 ml), enfriar la mezcla a 0 °C, y añadir hidróxido de amonio acuoso (rendimiento 28 % en peso) por goteo hasta pH ~ 10. Concentrar a presión reducida para obtener un sólido vítreo blanco. Añadir el sólido al agua (aproximadamente 40 ml) y agitar la mezcla durante 4 horas a temperatura ambiente. Filtrar y recoger el sólido blanco resultante, lavar con agua (50 ml) y secar al aire para obtener el compuesto del título (9,0 g, 96 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 391,10/393,10 $[M+H]^+$, ^1H RMN (300 MHz, d_6-DMSO) δ 1,40 (s, 3H), 3,65-3,67 (m, 1H), 4,13 (s, 1H), 4,61-4,68 (m, 1H), 4,78 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 5,12 (d, J= 7,0 Hz, 1H), 5,81 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 6,59 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,10 (bs, 1H), 7,19 (bs, 2H), 7,32 (d, J= 3,3 Hz, 1H), 7,40 (d, J= 8,8 Hz, 2H), 7,58 (d, J= 8,8 Hz, 2H), 8,07 (s, 1H).

Ejemplo 4



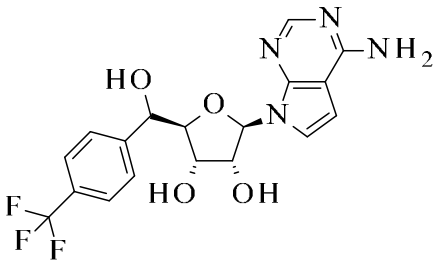
Diastereómero del (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(R)-[4-cloro-3-(ciclopropoxi)fenil]-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol

Colocar un reactor SS de 15 ml (diámetro externo = 1/8”) recubierto de teflón en un equipo de la serie Vapourtec E. Aplicar un regulador de contrapresión (4-5 bar) a la salida del sistema de reacción y ajustar la temperatura y ajustar la temperatura a 82 °C. Bombear una solución del diastereoisómero de (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-cloro-3-(ciclopropoxi)fenil]metanol (32,1 g, 60,1 mmol) en EtOH (317 ml) a 1,1 ml/min y combinar esta solución en una mezcladora en T con una corriente de solución de HCl acuosa 4 *N* bombear esta mezcla a 0,288 ml/min a través del reactor (dando un tiempo de permanencia total de 10 min) a 82 °C. Después del consumo de esta solución de alimentación, lavar el reactor con una mezcla EtOH/ HCl acuoso 4 *N* (400 ml) a 0,29 ml/min. Tratar la mezcla de reacción en bruto con carbón activado, Darco KB® (malla 100; polvo húmedo 13 g) y filtrar a través de un lecho corto de tierra diatomácea. Repetir el tratamiento con carbón activado, Darco KB® (100 de malla; polvo húmedo, 26 g) de filtro y a través de tierra diatomácea. Reducir los solventes orgánicos de las soluciones

recogidas a vacío hasta ¼ de volumen, agregar agua (150 ml) y NH_4OH acuoso y (28 %, 40 ml) por goteo para ajustar el pH a ~ 10, y extraer con EtOAc (2 x 300 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con cloruro de sodio acuoso saturado, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo (17 g). Además, enjuagar ambos lechos de tierra diatomácea con MeOH (1000 ml) y retirar los lavados de filtrado orgánico bajo presión reducida para proporcionar residuo adicional (7,89 g). Combinar ambos residuos en 1:10 MeOH: EtOAc (300 ml) y evaporar el solvente a presión reducida para obtener el compuesto del título (17,45 g; rendimiento del 67 %).ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 433,0/435,0 $[M+H]^+$, ^1H RMN (300 MHz, d_6-DMSO) □ 0,73-0,81 (m, 4H), 3,77-3,83 (m, 1H), 4,00 (d, J= 4,6 Hz, 1H), 4,04-4,09 (m, 1H), 4,67-4,73 (m, 1H), 4,81 (t, J= 4,0 Hz, 1H), 5,04 (d, J= 3,8 Hz, 1H), 5,21 (d, J= 7,3 Hz, 1H), 5,91 (d, J= 7,9 Hz, 1H), 6,58 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 6,65 (d, J= 3,4 Hz, 1H), 7,01 (dd, J= 1,5, 8,2 Hz, 1H), 7,10 (bs, 2H), 7,35 (d, J= 1,6 Hz, 1H), 7,43 (d, J= 1,4 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 5

Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[hidroxi-[4-(trifluorometil)fenil]metil]tetrahidrofuran-3,4-diol

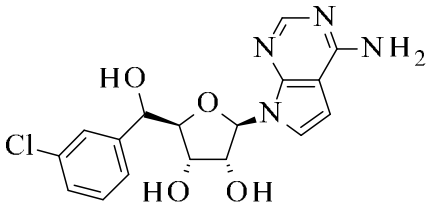


Disolver diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-[4-(trifluorometil)fenil]metanol (13,5 g, 27,0 mmol) en 2-propanol (50 ml) y agitar a 0 °C. Añadir una solución de HCl 4,99 *M* en 2-propanol (200 ml, 0,998 mol) y agua (2 ml) por goteo a la mezcla y agitar a temperatura ambiente durante 3 hr. Eliminar el solvente a presión reducida para obtener un residuo. Disolver el residuo en EtOH (50 ml) y enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir hidróxido de amonio acuoso (28 % en peso) por goteo hasta pH ~ 10 y agitar la mezcla durante 10 min. Eliminar el solvente a presión reducida para obtener un sólido vítreo blanco. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 80-100 % de EtOAc en hexanos, para obtener una espuma. Suspender la espuma en agua (300 ml) y agitar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Filtrar el sólido blanco resultante, lavar la torta del filtro con agua

(50 ml), y secar para obtener el compuesto del título (7,85 g, 71 % de rendimiento) como un diastereómero.ES/MS *m/z* 411,10 $[M+H]^+$. ^1H RMN (300 MHz, d_6-DMSO) δ 4,02-4,07 (m, 2H), 4,65 (td, J= 7,4, 5,1 Hz, 1H), 4,92 (t, J= 3,6 Hz, 1H), 5,02 (d, J= 3,8 Hz, 1H), 5,22 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 5,92 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,60 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 6,81 (d, J= 3,3 Hz, H), 7,11 (s, 2H), 7,32 (d, J= 3,8 Hz, 1H), 7,71-7,63 (m, 4H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 6

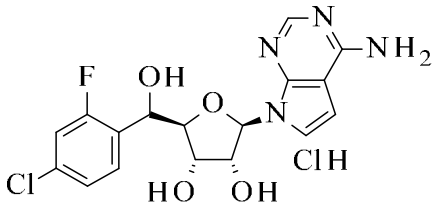
Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(3-clorofenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Mezclar diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-clorofenil)metanol (0,052 g, 0,124 mmol), HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (5 ml) y MeOH (5 ml). Agitar la mezcla a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, concentrar la solución bajo una corriente de N_2 para eliminar el solvente. Disolver en agua (5 ml) y extraer con EtOAc (2 ml). Añadir NaOH acuoso 1 *N* hasta que la solución sea básica, y extraer con DCM (4 x 3 ml). Se combinan los extractos orgánicos, secar sobre sulfato de sodio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar mediante cromatografía de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 50-100 % de EtOAc en hexanos, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,023 g, 49 % de rendimiento).ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 377,0/379,0 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 3,37 (bs, 1H), 4,04-4,08 (m, 2H), 4,63-4,69(m, 1H), 4,85-4,88 (m, 1H), 5,07 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 5,26 (d, J= 7,0 Hz, 1H), 5,96 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 6,64 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 6,76-6,74 (m, 1H), 7,15-7,18 (bs, 1H), 7,33-7,42 (m, 4H), 7,50-7,52 (m, 1H), 8,09 (s, 1H).

Ejemplo 7

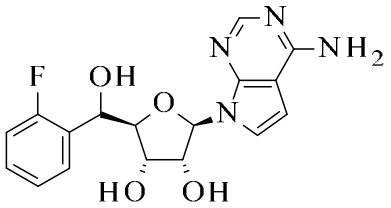
Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(4-cloro-2-fluoro-fenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol clorhidrato



Agitar una solución del diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanol (0,067 g, 0,154 mmol), HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (5,0 ml), y MeOH (5,0 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, concentrar la solución bajo una corriente de N_2 para eliminar el solvente. Triturar el residuo resultante con ACN para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,046 g, 69 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 395/397 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 3,97-4,00 (m, 1H), 4,09-4,11 (m, 1H), 4,44-4,49 (m, 1H), 4,92-4,96 (m, 1H), 6,06-6,09 (m, 1H), 6,98-7,00 (m, 1H), 7,26-7,28 (m, 1H), 7,32-7,35 (m, 1H), 7,51-7,56 (m, 1H), 7,65-7,66 (m, 1H), 8,35 (s, 1H),

Ejemplo 8

Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(2-fluorofenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol

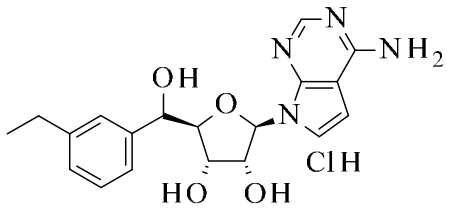


En un recipiente par, evacuar una mezcla de diastereómeros de (2R,3R,4S, 5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-y)-5-[(4-cloro-2-fluoro-fenil)hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol clorhidrato (0,036 g, 0,083 mmol), 10 % Pd/C (0,010 mg, 0,009 mmol) y EtOH (2,0 ml) a presión reducida. Cargar el recipiente con gas hidrógeno a 10 psi. Después de agitar durante 24 horas a 10 psi, añadir trietilamina (0,25 mg, 0,25 mmol) y 10 % Pd/C adicional (0,010 mg, 0,009 mmol). Evacuar el recipiente, y cargar a 10 psi con hidrógeno. Agitar a temperatura ambiente durante 24 h adicionales. Filtrar la mezcla resultante a través de tierra diatomácea, y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía de alta presión en fase reversa (Phenomenex® GEMINI®-NX) eluyendo con un gradiente de 5-45 % de ACN en una mezcla de 5 % de bicarbonato de amonio MeOH/10 mM, pH ~ 10, más de 20 min, a dar

el compuesto del título en forma de un diastereómero (0,010 g, rendimiento del 33 %). ES/MS *m/z* 361 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 4,01-4,03 (m, 2H), 4,63-4,64 (m, 1H), 4,97-5,01 (m, 1H), 5,19-5,21 (m, 1H), 5,89-5,93 (m, 1H), 6,56-6,57 (m, 1H), 6,85-6,89 (m, 1H), 7,31-7,32 (m, 5H), 7,60-7,61 (m, 1H), 8,02 (s, 1H).

Ejemplo 9

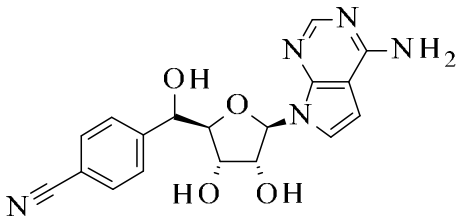
Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(3-etilfenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol clorhidrato



Agitar una solución del diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3-etilfenil)metanol (0,240 g, 0,585 mmol), HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (5,0 ml), y MeOH (5,0 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, concentrar la solución bajo una corriente de N_2 para eliminar el solvente. Triturar el residuo resultante con ACN para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,160 g, 67 % de rendimiento).ES/MS *m/z* 371 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 1,12 (t, J= 7,6 Hz, 3H), 2,51-2,57 (q, J= 7,6 Hz, 2H), 3,98-4,02 (m, 1H), 4,08-4,11 (m, 1H), 4,546-4,50 (m, 1H), 4,69-4,72 (m, 1H), 6,06 (d, J= 7,7 Hz, 1H), 6,97 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,01-7,06 (m, 1H), 7,14-7,27 (m, 4H), 7,68 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 8,35 (s, 1H).

Ejemplo 10

Diastereómero de 4-[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3,4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]-hidroxi-metil]benzonitrilo

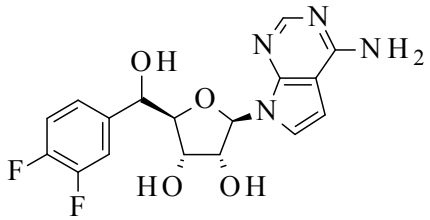


Mezclar TFA (3,5 ml) y agua (0,5 ml) y enfriar a 0ºC. Añadir esto a diastereómero de 4-[[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-hidroxi-metil]benzonitrilo (0,50 g, 1,24 mmol) y

agitar a 0 °C. Después de 1 h, concentrar a presión reducida y disolver el sólido resultante en MeOH. Eluir a través de una columna SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) usando MeOH. Recoger las fracciones adecuadas para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,47 g, rendimiento 100 %). ES/MS *m/z* 368 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) □ 3,33-3,41 (m, 2H), 4,04 (d, J= 4,2 Hz, 2H), 4,61-4,65 (m, 1H), 4,91 (d, J= 4,3 Hz, 1H), 5,06 (d, J= 2,4 Hz, 1H), 5,22-5,26 (m, 1H), 5,94 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,65 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 6,71-6,79 (m, 1H), 7,31-7,35 (m, 2H), 7,39 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,62 (d, J= 8,3 Hz, 2H), 7,80 (d, J= 8,3 Hz, 2H), 8,10 (s, 1H).

Ejemplo 11

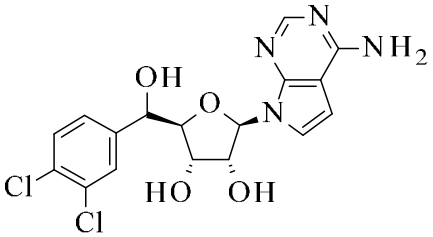
Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(3,4-difluorofenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Mezclar diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4 (4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-difluorofenil)metanol (694 mg, 1,66 mmol), 1,4-dioxano (6 ml), agua (2 ml), HCl 4 *M* en 1,4-dioxano (3 ml, 12 mmol) a 0 °C. Agitar la mezcla durante 18 hr y a continuación, añadir HCl 4 M adicional en 1,4-dioxano (4 ml, 16 mmol). Agitar la mezcla durante otras 18 horas a temperatura ambiente. Añadir HCl (31 % en peso en agua, 0,5 ml). Agitar la mezcla durante 4 hr a temperatura ambiente. Enfriar la mezcla a 0 °C, y añadir lentamente una solución de $NaHCO_3$ saturado hasta que se alcance el pH ~ 7. Extraer con 2-4 % de MeOH en DCM. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida para obtener un residuo en bruto. Purificar el residuo por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla isocrática de 77 % DCM, 15 % de EtOAc, y 7 % de MeOH para obtener el compuesto del título como un diastereómero (408 mg, 64 % rendimiento). ES/MS *m/z* 379 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 4,02-4,04 (m, 2H), 4,63 (td, J= 7,3, 5,2 Hz, 1H), 4,82 (t, J= 3,9 Hz, 1H), 5,03 (d, J= 4,0 Hz, 1H), 5,22 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 5,92 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,61 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 6,73 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,11 (s, 2H), 7,27 (dd, J= 4,0, 8,2 Hz, 1H), 7,34 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,39-7,46 (m, 2H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 12

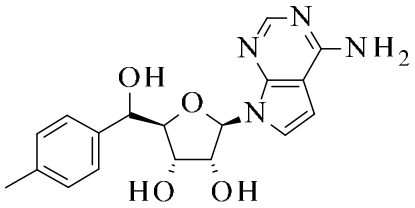
Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(3,4-diclorofenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Mezclar diastereómero de[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(3,4-diclorofenil)metanol (180,0 mg, 0,398 mmol), agua (0,20 ml) y TFA (2,0 ml) a temperatura ambiente. Después de 45 min, concentrar la mezcla a presión reducida y disolver el residuo resultante en MeOH. Eluir la mezcla a través de una columna SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) utilizando MeOH. Reunir las fracciones apropiadas y concentrar al vacío para obtener un residuo en bruto. Purificar el residuo mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de una mezcla de 10 % de NH_3/MeOH en $CHCl_3$ para obtener el compuesto del título como un diastereómero (98,3 mg, 60 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 411/413 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 4,01-4,03 (m, 2H), 4,62 (td, J= 7,3, 5,0 Hz, 1H), 4,84 (t, J= 4,0 Hz, 1H), 5,05 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 5,22 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 5,92 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,60 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 6,77 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,11 (s, 2H), 7,34 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,41 (dd, J= 1,8, 8,4 Hz, 1H), 7,59 (d, J= 8,3 Hz, 1H), 7,65 (d, J= 1,8 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 13

Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[hidroxi(p-tolil)metil]tetrahidrofuran-3,4-diol

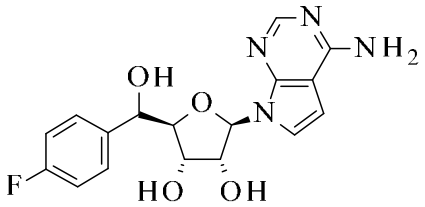


Mezclar diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(p-tolil)metanol (115 mg, 0,290 mmol), agua (0,15 ml) y TFA (1,5 ml) a temperatura ambiente. Después de 90

min, concentrar a presión reducida y disolver el sólido resultante en MeOH. Eluir a través de una columna SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) usando MeOH. Reunir las fracciones adecuadas y evaporar a sequedad a presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 5-15 % de una mezcla de 10 % 7 *N* NH_3/MeOH en DCM, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (50,2 mg, 49 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 357 $[M+H]^+$. ^{1}H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 2,29 (s, H), 4,62-4,67 (m, 1H), 4,77 (t, J= 3,3 Hz, 1H), 4,93 (d, J= 3,8 Hz, 1H), 5,18 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 5,90 (d, J= 7,9 Hz, 1H), 6,58 (dd, J= 3,4, 12,3 Hz, 2H), 7,11-7,15 (m, 3H), 7,29-7,33 (m, 3H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 14

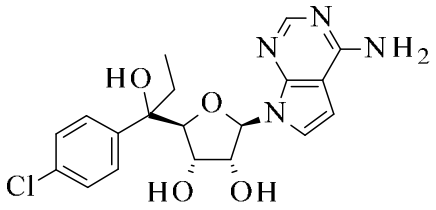
Diastereómero de (2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[(4-fluorofenil)-hidroxi-metil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Mezclar diastereómero de [(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-fluorofenil)metanol (158 mg, 0,394 mmol), 1,4-dioxano (3 ml), agua (0,75 ml) y una solución 4 *M* de HCl en 1,4-dioxano (3 ml, 12 mmol) y agitar la mezcla a 0 °C durante 5 min, luego a temperatura ambiente durante 1 h. Concentrar a presión reducida, a continuación, añadir EtOAc (30 ml) y concentrar de nuevo. Repetir este procedimiento de adición de EtOAc y concentrar dos veces más. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla isocrática de 7 % de MeOH en DCM para obtener el compuesto del título como un diastereómero (103,5 mg, rendimiento 73 %).ES/MS *m/z* 361 $[M+H]^+$. ^{1}H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 4,03 (dd, J= 4,3, 10,6 Hz, 2H), 4,63 (td, J= 7,3, 5,2 Hz, 1H), 4,81 (t, J= 3,7 Hz, 1H), 4,99 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 5,20 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 5,92 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,61 (dd, J= 3,6, 9,5 Hz, 2H), 7,11-7,17 (m, 4H), 7,32 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,45 (dd, J= 5,8, 8,5 Hz, 2H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 15

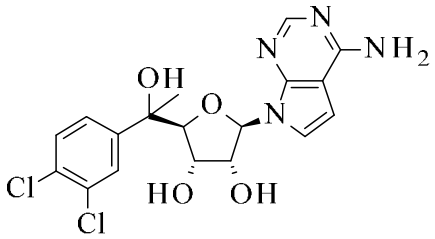
Diastereómero de (2R,3R,4S,5S)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[1-(4-clorofenil)-1-hidroxi-propil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Disolver diastereómero de [(3aR,4R,6S,6aS)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanona (426,9 mg, 0,983 mmol) en THF (5 ml) y enfriar la mezcla a 0 °C. Añadir una solución 1,0 *M* de bromuro de etilmagnesio en THF (1,97 ml, 1,97 mmol) durante 1 min. Agitar durante 15 min y calentar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, inactivar mediante la adición de HCl acuoso 1 *N* (2,48 ml). Diluir la mezcla de reacción con DCM (10 ml). Separar las capas y extraer la capa acuosa con DCM (5 ml). Combinar los extractos orgánicos y evaporar bajo presión reducida. Disolver el residuo en NH_3/MeOH 7 *M* (10 ml, 70 mmol) y calentar en un reactor de microondas a 100 °C durante 6 horas. Evaporar la mezcla resultante bajo una corriente de N_2 a 50 °C. Disolver el residuo resultante en HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (1,29 ml, 49,2 mmol) y añadir agua (35 µl, 1,97 mmol). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 h, y después concentrar la mezcla a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (Phenomenex® GEMINI®-NX) eluyendo con un gradiente de 13 a 48 % de ACN en una mezcla 5 % de MeOH/10 mM de bicarbonato de amonio, pH ~ 10, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (97,8 mg, rendimiento 25 %).ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 405,1/407,2 $[M+H]^+$, ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 0,54 (t, J= 7,4 Hz, 3H), 1,75-1,92 (m, 2H), 3,63 (d, J= 5,0 Hz, 1H), 4,22 (s, 1H), 4,69 (dd, J= 5,3, 7,6 Hz, 1H), 4,78-4,82 (m, 1H), 5,14-5,20 (m, 1H), 5,75 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 6,59 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,31 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J= 8,7 Hz, 2H), 7,53-7,56 (m, 2H), 8,08 (s, 1H).

Ejemplo 16

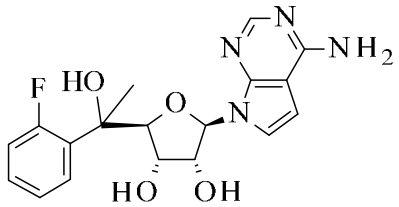
Diastereómero de (2R,3R,4S,5S)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[1-(3,4-diclorofenil)-1-hidroxi-etil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Combinar diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(3,4-dichlorofenil)etanol (101,2 mg, 0,217 mmol), agua (0,1 ml) y TFA (1,0 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar 1 h, concentrar a presión reducida y disolver el sólido resultante en MeOH. Eluir a través de una columna de SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) utilizando MeOH. Reunir las fracciones adecuadas para obtener un residuo. Purificar el residuo resultante por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 5-30 % de una mezcla de 10 % 7 *N* NH_3 en MeOH/MeOH/cloroformo (1:1:2, en volumen) en $CHCl_3$ para obtener el compuesto del título como un diastereómero (81,7 mg, rendimiento 88 %). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 426/428 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 1,42 (s, 3H), 3,66 (t, J= 4,4 Hz, 1H), 4,15 (s, 1H), 4,56-4,65 (m, 1H), 4,85 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 5,14 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 5,83 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,61 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,20 (s, 2H), 7,27 (s, 1H), 7,33 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 7,55 (dd, J= 2,0, 8,5 Hz, 1H), 7,62 (d, J= 8,5 Hz, 1H), 7,81 (d, J= 2,0 Hz, 1H), 8,08 (s, 1H).

Ejemplo 17

Diastereómero de (2R,3R,4S,5S)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[1-(2-fluorofenil)-1-hidroxi-etil]tetrahidrofuran-3,4-diol

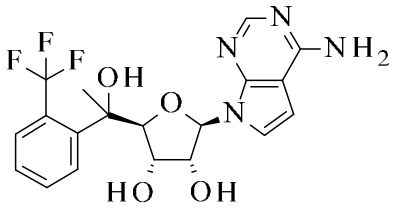


Mezclar TFA (4 ml) y agua (1 ml) y enfriar a 0ºC. Añadir esto a diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(2-fluorofenil)etanol (0,341 g, 0,823 mmol) y agitar a 0 °C. Después de 30 min, concentrar a presión reducida y disolver el sólido resultante en MeOH. Eluir a través de una columna SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) usando MeOH. Recoger las fracciones adecuadas y purificar adicionalmente mediante

cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0 - 100 % de una mezcla de 10 % 7 *N* NH_3/MeOH en DCM, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,271 g, 88 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 375,0 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 1,49 (s, 3H), 3,33 (s, 2H), 3,64 (t, J= 4,4 Hz, 1H), 4,32 (s, 1H), 4,68 (td, J= 7,5, 5,2 Hz, 1H), 4,80 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 5,13 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 5,83 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 6,61 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 7,15-7,27 (m, 4H), 7,31-7,35 (m, 3H), 7,81 (td, J= 8,0, 1,6 Hz, 1H), 8,09 (s, 1H).

Ejemplo 18

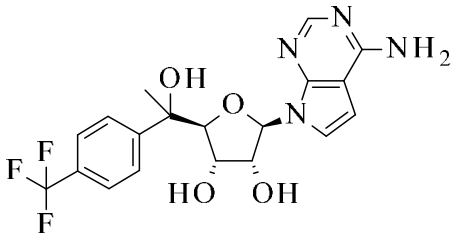
Diastereómero de (2R,3R,4S,5S)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[1-hidroxi-1-[2-(trifluorometil)fenil]etil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Mezclar TFA (3 ml) y agua (1 ml) y enfriar a 0ºC. Añadir esta mezcla a diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[2-(trifluorometil)fenil]etanol (0,137 g, 0,295 mmol) y agitar a 0 °C. Después de 20 min, concentrar la mezcla de reacción a presión reducida y disolver el sólido resultante en MeOH. Eluir la solución a través de una columna SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) usando MeOH. Reunir las fracciones adecuadas y purificar adicionalmente mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-100 % de una mezcla de 10 % de 7 *N* NH_3/MeOH en DCM, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,109 g, 87 % de rendimiento).ES/MS *m/z* 425,0 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 1,52 (s, 3H), 3,76 (t, J= 4,4 Hz, 1H), 4,38 (s, 1H), 4,64 (dd, J= 7,6, 12,8 Hz, 1H), 4,80 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 5,14 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 5,86 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 6,61 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 6,93 (s, 1H), 7,17 (s, 2H), 7,38 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,48 (t, J= 7,6 Hz, 1H), 7,65 (t, J= 7,5 Hz, 1H), 7,81 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 7,87 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H).

Ejemplo 19

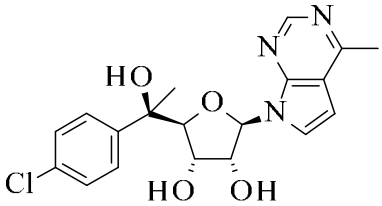
Diastereómero de (2R,3R,4S,5S)-2-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-5-[1-hidroxi-1-[4-(trifluorometil)fenil]etil]tetrahidrofuran-3,4-diol



Mezclar TFA (2 ml) y agua (0,5 ml) y enfriar a 0ºC. Agregar esto a diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-4-(4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-[4-(trifluorometil)fenil]etanol (0,136 g, 0,292 mmol) y agitar a 0 °C. Después de 45 min, concentrar a presión reducida y disolver el sólido resultante en MeOH. Eluir a través de una columna de SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) utilizando MeOH. Recoger las fracciones adecuadas y purificar adicionalmente mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-25 % de una mezcla de 10 % 7 *N* NH_3/MeOH en DCM, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,095 g, 76 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 425,0 $[M+H]^+$. ^{1}H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 1,44 (s, 3H), 3,66 (t, J= 4,3 Hz, 1H), 4,20 (s, 1H), 4,67 (td, J= 7,5, 5,2 Hz, 1H), 4,81 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 5,14 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 5,83 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 6,61 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,21 (s, 2H), 7,27 (s, 1H), 7,33 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,73 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 7,81 (d, J= 8,2 Hz, 2H), 8,09 (s, 1H).

Ejemplo 20

(2S,3S,4R,5R)-2-[(1R)-(1-(4-Clorofenil)-1-hidroxi-ethil]-5-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)tetrahidrofuran-3,4-diol

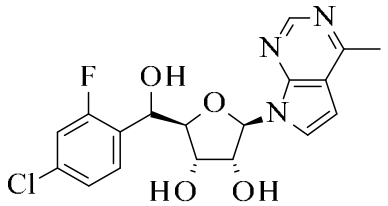


Agitar una mezcla de (1R)-1-[(3aR,4R,6S,6aR)-2,2-dimetil-4-(4-metilpirrol[2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(4-clorofenil)etanol (0,265 g, 0,616 mmol), 4 *N* HCl acuoso en 1,4-dioxano (10 ml), y MeOH (10 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, concentrar la solución bajo una corriente de N_2 para eliminar el solvente. Añadir agua (30 ml), neutralizar a pH ~ 7 con $NaHCO_3$ acuoso saturado, y extraer con DCM (3 × 20 ml). Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato sódico, filtrar, y concentrar el

filtrado bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-50 % de EtOAc en hexanos durante 35 min, para obtener el compuesto del título (0,180 g, 75 % de rendimiento).ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 390,02/392,2 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 1,39 (s, 3H), 2,46-2,48 (m, 5H), 3,30 (s, 1H), 2,65 (s, 3H), 3,68 (t, J= 4,3 Hz, 1H), 4,08 (s, 1H), 4,51-4,54 (m, 1H), 4,84 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 5,15-5,17 (m, 1H), 6,07 (d, J= 7,9 Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 6,76 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,37-7,39 (m, 2H), 7,53-7,56 (m, 2H), 7,79 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 8,64 (s, 1H).

Ejemplo 21

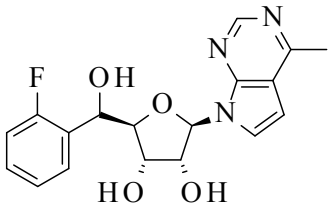
Diastereómero de (2R,3S,4R,5R)-2-[(4-cloro-2-fluoro-fenil)-hidroxi-metil]-5-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)tetrahidrofuran-3,4-diol



Agitar una solución del diastereómero [(3aR,4R,6R,6aR)-2,2-dimetil-4-(4-metilpirrol[2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-cloro-2-fluoro-fenil)metanol (0,220 g, 0,507 mmol), HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (10,0 ml), y MeOH (10,0 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, concentrar la solución bajo una corriente de N_2 para eliminar el solvente. Repartir el residuo entre DCM (25 ml), agua y (25 ml). Neutralizar a pH ~ 7 con $NaHCO_3$ acuoso saturado, y extraer con DCM (4x20 ml). Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato de sodio, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-100 % de EtOAc en hexanos durante 5 min, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,192 g, 96 % de rendimiento).ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 394,2/396,2 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 2,63 (s, 3H), 3,28-3,32 (m, 2H), 3,97-4,02 (m, 1H), 4,08-4,10 (m, 1H), 4,54-4,57 (m, 1H), 4,94-4,97 (m, 1H), 5,13-5,16 (m, 1H), 5,26-5,30 (m, 1H), 6,14 (d, J= 7,7 Hz, 1H), 6,23 (d, J= 4,5 Hz, 1H), 6,75 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,26 (dd, J= 1,9, 8,3 Hz, 1H), 7,33 (dd, J= 2,0, 10,2 Hz, 1H), 7,54 (t, J= 8,2 Hz, 1H), 7,71 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 8,61 (s, 1H).

Ejemplo 22

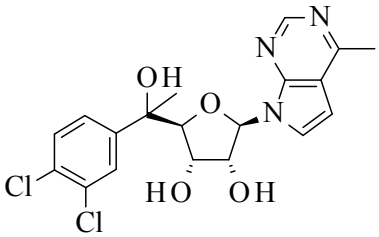
Diastereómero de ((2R,3S,4R,5R)-2-[(2-fluorofenil)-hidroxi-metil]-5-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)tetrahidrofuran-3,4-diol



En un recipiente par, evacuar una mezcla de diastereómero de (2R,3S,4R,5R)-2-[(4-cloro-2-fluoro-fenil)-hidroxi-metil]-5-(4-metilpirrol[2,3-d]pirimidin-7-il) tetrahidrofuran-3,4-diol (0,090 g, 0,228 mmol), 10 % Pd/C (0,025 g), trietilamina (0,069 g, 0,68 mmol), y EtOH (4,0 ml) a presión reducida. Cargar el recipiente con gas hidrógeno a 10 psi, y agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 15 hr. Filtrar la mezcla resultante a través de tierra diatomácea, y concentrar a presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 0-100 % de EtOAc en hexanos durante 5 min, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (0,082 g, 85 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 360,2 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 2,63 (s, 3H), 4,01-4,04 (m, 1H), 4,08-4,11 (m, 1H), 4,56-4,58 (m, 1H), 4,97-5,00 (m, 1H), 5,10 (d, J= 4,2 Hz, 1H), 5,26 (d, J= 7,1 Hz, 1H), 6,13-6,18 (m, 2H), 6,75 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,12-7,14 (m, 1H), 7,18-7,21 (m, 1H), 7,29-7,31 (m, 1H), 7,56-7,57 (m, 1H), 7,71-7,72 (m, 1H), 8,62 (s, 1H).

Ejemplo 23

Diastereómero de (2S,3S,4R,5R)-2-[1-(3,4-diclorofenil)-1-hidroxi-etil]-5-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)tetrahidrofuran-3,4-diol

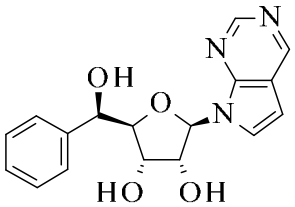


Mezclar diastereómero de 1-[(3aR,4R,6S,6aR)-2,2-dimetil-4-(4-metilpirrol [2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-1-(3,4-diclorofenil)etanol (122,0 mg, 0,26 mmol), agua (0,15 ml) y TFA (1,5 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 h, concentrar a presión reducida y disolver el sólido resultante en MeOH. Eluir a través de una columna SILICYCLE® Si-carbonato (70 ml, 5 g) usando MeOH. Reunir

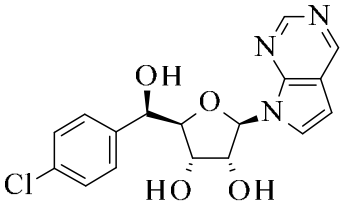
las fracciones apropiadas y concentrar a sequedad bajo presión reducida para obtener un residuo. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 10-50 % de una mezcla de 10 % de MeOH/MTBE en hexanos, para obtener el compuesto del título como un diastereómero (62,8 mg, 56 % de rendimiento). ES/MS *m/z* ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 426/428 $[M+H]^+$. ^1H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 1,45 (s, 3H), 2,69 (s, 3H), 3,73 (t, J= 4,5 Hz, 1H), 4,14 (s, 1H), 4,52 (dd, J= 7,4, 12,7 Hz, 1H), 4,92 (d, J= 4,0 Hz, 1H), 5,19 (d, J= 7,0 Hz, 1H), 6,12 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,32 (s, 1H), 6,80 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,55 (dd, J= 2,0, 8,5 Hz, 1H), 7,63 (d, J= 8,5 Hz, 1H), 7,80-7,81 (m, 2H), 8,68 (s, 1H).

Ejemplo 24 y Ejemplo 25

(2R,3S,4R,5R)-2-[(R)-Hidroxi(fenil)metil]-5-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il-tetrahidrofuran-3,4-diol



(2R,3S,4R,5R)-2-[(R)-(4-Clorofenil)-hidroxi-metil]-5-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il-tetrahidrofuran-3,4-diol



Disolver (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-cloropirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol, (200,0 mg, 0,264 mmol) en EtOAc (30 ml). Hidrogenar la solución con un sistema de flujo THALESNANO™ H-Cube a temperatura ambiente (2000 kPa/1 ml por min/cartucho de Pd/Al_2O_3 de 70 mm). Evaporar la solución resultante a presión reducida, disolver el residuo resultante en EtOAc (20 ml), y repetir la hidrogenación con un nuevo cartucho de Pd/Al_2O_3. Evaporar la solución resultante a presión reducida. Disolver el residuo en HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (5,73 ml, 22,9 mmol) y añadir agua (3 gotas). Agitar la solución a temperatura ambiente durante 45 min y evaporar bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante por cromatografía de alta presión en fase inversa (Phenomenex®

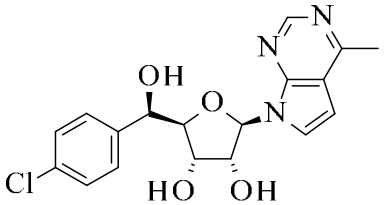
GEMINI®-NX) eluyendo con un gradiente de 5-38 % de ACN en una mezcla de bicarbonato de amonio MeOH/10 mM 5 %, pH ~ 10, para dar Ejemplo 23 y Ejemplo 24.

Ejemplo 24 (2R,3S,4R,5R)-2-[(R)-Hidroxi(fenil)metil]-5-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il-tetrahidrofuran-3,4-diol (15,0 mg, 9,11 % de rendimiento). ES/MS *m/z* 328,1 [M+H)]. ^{1}H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 3,18 (d, J= 5,3 Hz, 3H), 4,05-4,15 (m, 3H), 4,62 (dd, J= 5,2, 7,5 Hz, 1H), 4,80 (t, J= 4,2 Hz, 1H), 5,10 (s, 1H), 5,22-5,30 (m, 1H), 6,22 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 6,74 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,24 (t, J= 7,2 Hz, 1H), 7,32 (t, J= 7,5 Hz, 2H), 7,41 (d, J= 7,4 Hz, 2H), 7,87 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 8,81 (s, 1H), 9,04 (s, 1H).

Ejemplo 25 (2R,3S,4R,5R)-2-[(R)-(4-Clorofenil)-hidroxi-metil]-5-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il-tetrahidrofuran-3,4-diol (51,9 mg, 28,8 % de rendimiento). ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 362,1/364,1 [M+H]$^+$. ^{1}H RMN (400 MHz, d_6-DMSO) δ 3,18 (d, J= 5,3 Hz, 3H), 4,01 (d, J= 5,2 Hz, 1H), 4,08-4,14 (m, 2H), 4,61 (dd, J= 7,2, 12,4 Hz, 1H), 4,81 (t, J= 4,7 Hz, 1H), 5,14 (d, J= 4,2 Hz, 1H), 5,31 (d, J= 6,9 Hz, 1H), 8,81 (s, 1H), 6,06 (d, J= 4,4 Hz, 1H), 6,21 (d, J= 7,7 Hz, 1H), 6,74 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 7,35-7,43 (m, 4H), 7,88 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 9,04 (s, 1H).

Ejemplo 26

(2R,3S,4R,5R)-2-[(R)-(4-Clorofenil)-hidroxi-metil]-5-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)tetrahidrofuran-3,4-diol



Agitar una solución de (R)-[(3aR,4R,6R,6aR)-2,2-dimetil-4-(4-metilpirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]-(4-clorofenil)metanol (0,500 g, 1,08 mmol), HCl 4 *N* en 1,4-dioxano (50 ml), y MeOH (50 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, concentrar la solución bajo una corriente de N_2 para eliminar el solvente. Añadir al residuo DCM (20 ml) agua y (20 ml). Extraer con DCM, y desechar. Ajustar el pH de la fase acuosa con bicarbonato acuoso saturado a pH ~ 10, y extraer con DCM (4 x 20 ml). Combinar los extractos orgánicos, secar sobre sulfato sódico, filtrar, y concentrar el filtrado a presión reducida. Disolver el residuo resultante en EtOAc, filtrar la solución a través de un lecho de gel de sílice, y eluir con EtOAc. Retire el filtrado a presión reducida para obtener el compuesto del título (0,393 g, 97 % de rendimiento).ES/MS *m/z* (^{35}Cl/^{37}Cl) 376,2/378,2 [M+H]$^+$. ^{1}H RMN (400

MHz, d_6-DMSO) δ 2,63 (s, 3H), 3,95-3,97 (m, 1H), 4,05-4,08 (m, 1H), 4,53-4,59 (m, 1H), 4,75-4,79 (m, 1H), 5,09 (d, 1H, J=4,4 Hz), 5,25 (d, 1H, J=7,0 Hz), 6,07-6,13 (m, 2H), 6,75 (d, 1H, J=3,6 Hz), 7,31-7,34 (m, 2H), 7,36-7,40 (m, 2H), 7,76 (s, 1H, J=3,6 Hz), 8,62 (s, 1H).

Los resultados de los siguientes ensayos demuestran evidencia de que los compuestos ejemplificados en el presente documento son útiles como inhibidores de PRMT5 y pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer.

Ensayo de PRMT5/MEP50 SPA

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la actividad enzimática de PRMT5 in vitro mediante la inhibición de la actividad catalítica de complejo PRMT5/MEP50, indicada por la transferencia de metil-^{3}H radiomarcado a un péptido sustrato derivado de la secuencia N-terminal de la histona humana H4.

Expresar el complejo enzimático PRMT5/MEP50 utilizando un sistema de baculovirus/Sf9 y purificar usando cromatografía de afinidad anti-FLAG, (esencialmente como se describe en las preparaciones por Stephen Antonysamy, Zahid Bonday, Robert M. Campbell, Brandon Doile, Zhanna Druzina, Tarun Gheyi, Bomie Han, Louis N. Jungheim, Yuewei Qian, Charles Rauch, Marijane Russell, J. Michael Sauder, Stephen R. Wasserman, Kenneth Weichert, Francis S. Willard, Aiping Zhang, y Spencer Emtage; estructura cristalina del complejo PRMT5:MEP50 humano, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, Volumen 109, páginas 17960-17965.) Diluir la enzima purificada a una reserva de trabajo de 6,67 nM en amortiguador de ensayo (50 mM TRIZMA® preestablecido a pH 8,5, DTT 1 mM, 0,005 % TWEEN® 80 0,01 % HSA).

Añadir enzima (15 µl/pocillo) a una placa de ensayo de 384 pocillos (CORNING® cat. # 3706). Añadir los compuestos de ensayo a partir de una solución de reserva de DMSO 10 mM a la placa como diluciones seriadas en amortiguador de ensayo para lograr concentraciones de ensayo finales que varíen desde 50,0 µM a 25 nm. Crear una mezcla de reacción que contenga 1 µM de sustrato de péptido biotinilado de histona H4, H-SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDK-biotina (SEQ ID NO: 1), preparado por química FastMoc con un péptido ABI 431, y 4 µM de ^{3}H-SAM; 15 Ci/mmol, 0,366 mCi/ml, 37 µM, #cat. NET155000MC PERKIN-ELMER®) en amortiguador de ensayo. A cada pocillo de la placa, añadir 5 µl mezcla de reacción péptido/^{3}H-SAM para producir condiciones de ensayo final de 5 nM de enzima, 1 µM de ^{3}H-SAM, 250 nM de péptido y

50 mM de concentración máxima del compuesto de prueba con 0,5 % de DMSO, a un volumen final de 20 µl. Incubar el ensayo durante 2 horas a temperatura ambiente. Detener la reacción con la adición de HCl de guanidina (5 *M*, 20 µl, Sigma cat. # G3272).

Suspender perlas de centelleo de estreptavidina SPA YSI (PERKIN-ELMER®, # RPNQ0012) a 1 mg/ml en amortiguador Tris pH 8,5 que contenga 5 *M* de guanidina HCl. A cada pocillo, añadir 20 µl de esta suspensión de perlas, agitar las mezclas resultantes, e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente antes de medir su radioactividad, utilizando un contador de centelleo líquido de microplacas como una indicación de la formación de producto peptídico metilado.

Generar datos en bruto de la medición de la radiactividad como cuentas por minuto (CPM). Emplear un control no inhibido (DMSO) y control inhibido al máximo (dehidrosinefungin 250 µM, (aislado esencialmente como se describe en Berry, D. R. y Abbott, B. J. Incorporation of carbon-14-labeled compounds into sinefungin (A9145), a nucleoside antifungal antibiotic. J. Antibiot. 1978 (31) 185-191 y las referencias allí citadas)). Calcular el porcentaje de inhibición a cada concentración de compuesto de prueba en relación a los controles de la siguiente manera:

% de inhibición = [Mediana de CPM (controles no inhibidos) - Mediana de CPM (compuesto de prueba)]/[Mediana de CPM (controles no inhibidos) - Mediana de CPM (controles inhibidos al máx.)] * 100

Representar gráficamente los datos utilizando el software ActivityBase XE o Genedata, como % de inhibición (eje y) en comparación con log concentración de compuesto de prueba (eje x). Calcular los valores de IC_{50} usando una curva logística de 4 parámetros de ajuste al algoritmo.

Los resultados de este ensayo demuestran que todos los compuestos ejemplificados inhiben la actividad catalítica de PRMT5/MEP50 con una IC_{50} de menos de 500 nM. Además, los Ejemplos 1-3 se ensayan esencialmente como se describe anteriormente y presentan la siguiente actividad para PRMT5/MEP50 como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Ejemplo #	PRMT5/MEP50, IC_{50} (nM)
1	4,27 (±1,51, n=7)
2	9,51 (± 5,73, n=13)
3	5,23 (± 3,10, n=3)
4	5,2 (± 1,51, n=3)

Media ± SEM; SEM = error estándar de la media

Protocolo de Proliferación de 7 días

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir la proliferación de células cancerosas.

El día 1, distribuir células A375 (ATCC, DMEM alto en glucosa/10 % de Hi SFB) a 250 células/pocillo (100 µl/pocillo) en una placa de ensayo de 96 pocillos (BD Falcon 35-3219). Se incuban las placas en una incubadora a 37ºC (5 % de CO_2) durante 18-24 h. El día 2, preparar y realizar diluciones seriadas de los compuestos de prueba en medio (10 puntos de dilución seriada al 1:2) a partir de soluciones de reserva del compuesto (10 mM en 100 % DMSO). Añadir 10 µl de los compuestos de prueba diluidos en serie a las placas de células (concentración final de DMSO 0,2 %). Añadir 10 µl del compuesto de referencia (Ejemplo 1) a la columna 1 de las placas de células (20 µM final, 0,2 % DMSO). Incubar las placas de células a 37 °C/5 % CO_2 durante 7 días. En el día nueve, descongelar el amortiguador CELL TITER-GLO® (Promega # G7571) y equilibrar a la temperatura ambiente antes de su uso. Además, equilibrar a temperatura ambiente el sustrato CELL TITER-GLO® liofilizado antes de su uso. Transferir amortiguador CELL TITER-GLO® a una botella de sustrato de color ámbar para reconstituir la mezcla enzima/sustrato liofilizada para formar el reactivo CELL TITER-GLO®. Equilibrar la(s) placa(s) de células a temperatura ambiente durante 5 a 10 min. Retirar suavemente el medio en las placas de las células con golpeteos suaves y transferencia a una pila de toallas de papel. Añadir el reactivo CELL TITER-GLO® (25 µl) a cada pocillo. Incubar las placas durante 10-20 minutos a temperatura ambiente antes de leer. Medir la luminiscencia utilizando el lector de placas Perkin-ELMER® ENVISION® Multi-etiqueta. Analizar estos datos de luminiscencia mediante un ajuste de curva de 4 parámetros usando Activity Base, para obtener los valores de IC_{50} de la proliferación celular.

Los resultados de este ensayo demuestran que los Ejemplos 1-3 tienen efectos antiproliferativos sobre las células tumorales, de acuerdo con su capacidad para inhibir la actividad de PRMT5. Los valores resultantes de IC_{50} de la proliferación se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2

Ejemplo #	Proliferación IC_{50} (nM)
1	10,8 (± 3,4, n=3)
2	31,5 (± 7, n=3)
3	44,0 (n=1)

Media ± SEM; SEM = error estándar de la media

Ensayo qPCR de MDM4 Exon5/6 en Células tumorales A375

El propósito de este ensayo es demostrar la capacidad de los compuestos de prueba para inhibir la función PRMT5 en una célula cancerosa mediante la medición de su capacidad para modular la splicing alternativo de MDM4 dependiente de PRMT5 en células de melanoma A375, como se mide por la relación ARNm de MDM4 que porta los exones 5 y 6 con respecto a las que portan solamente el exón 5.

Cultivar células tumorales A375 (ATCC), una línea celular de cáncer de melanoma, a una confluencia del 70 %-90 % en frascos T150 con el medio de crecimiento (DMEM; HYCLONE™ #SH30022 con 10 % de FBS; GIBCO® 10082-147 o equivalente). Tratar las células con tratamiento estándar de tripsina/EDTA durante 3 min y aspirar y lavar con PBS para liberar las células adherentes del frasco de cultivo. Sembrar las células en una placa de 96 pocillos (Costar 3596) a 5000/pocillo en medio de crecimiento (90 µl). Incubar la placa durante la noche a 37ºC y 5 % de CO_2 y tratar las células con el compuesto de prueba en diluciones seriadas (20, 6,67, 2,22, 0,74, 0,247, 0,082, 0,027, 0,009, 0,003, 0,010 µM, agregado final de DMSO 0,2 % de rendimiento) durante 72 horas. Medir la actividad en relación a los controles máximo (2,0 µM de Ejemplo 2) y mínimo (DMSO 0,2 %)

El Día 5 después de la incubación, eliminar el medio de las placas de cultivo y lavar las células dos veces con PBS frío (150 µl/pocillo). Preparar el reactivo de trabajo de lisis del kit TAQMAN Gene Expression Cells-to-CT (INVITROGEN™ cat. # AM1729) por dilución de DNAsa 1 en la solución de lisis a 1/100. Añadir el reactivo de trabajo de lisis (50 µl/pocillo) a las placas de células, mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Añadir la solución de parada del kit (5 µl) a cada pocillo, mezclar los pocillos e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Preparar la mezcla maestra de transcriptasa reversa en las siguientes proporciones en volumen; amortiguador RT: agua libre de nucleasa: enzima RT a 62,5: 31,25: 6,25. Añadir la mezcla de RT (48 µl/pocillo) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos NUNC™ (THERMO SCIENTIFIC™ # 260860). Añadir la mezcla de RT (20 µl) y cada muestra de lisado celular (5 µl) en el cuadrante 1 de una placa de 384 PCR (Clear Optical Reaction Plate, cat. # 4309849, APPLIED BIOSYSTEMS®) y añadir una segunda adición de mezcla de RT y lisado celular al cuadrante 3. Para la reacción de RT, sellar las placas y luego colocarlos en un termociclador a 37 °C durante 60 minutos; 95 °C durante 5 min; detener a 4 °C. Para la qPCR, preparar cebadores de exón 5 de MDM4 (Life Technologies Hs00967240-m1) y cebadores de exón 6 (Life Technologies Hs00967242-m1) por separado en las siguientes proporciones en volumen de mezcla de RT: H_2O:

sonda de exón a 10:6:1. Añadir exón 5 (17 µl) a las columnas impares de una placa de 384 PCR y agregar exón 6 (17 µl) a las columnas pares. Añadir ADNc (3 µl, de la placa de RT) mediante estampación de cuadrante a cada pocillo de la placa de qPCR que contiene los 17 µl. de solución de cebador de exón. De esta manera, realizar la qPCR para ambos exones sobre ADNc a partir de una reacción única de RT en un lisado celular individual. Sellar las placas, rotar, y colocar en el instrumento de PCR en tiempo real (Life Technologies ViiA7 Real Time PCR). Ejecutar la reacción TAQMAN® en los siguientes ciclos por etapas: etapa 1 (50 °C, 2 min), etapa 2 (95 °C, 10 min), etapa 3 (95 °C, 15 segundos), etapa 4 (60 °C, 60 segundos) repitiendo las etapas 3 y 4 durante 40 ciclos.

Obtener los datos de CT del lector de PCR en tiempo real y realizar los siguientes cálculos, donde “CPD” es el valor de las muestras tratadas con el compuesto, y “DMSO” es la muestra de control mínimo, utilizando una plantilla de Excel:

(CT CPD de Exón 6– CT DMSO de Exón 6) - (CT CPD de Exón 5–CT DMSO de Exón 5) = ΔCT

$2^{(-\Delta CT)}$ = incremento del cambio

Usando el software Genedata, graficar los cambios como Incremento de cambio (eje y) en comparación con Log de concentración del compuesto de prueba (eje x) y calcular los valores de EC_{50} usando un ajuste logístico de 4 parámetros.

Este ensayo demuestra que la totalidad de los compuestos ejemplificados probados en este ensayo inhiben la regulación mediada por PRMT5 del splicing de MDM4, como se indica por la proporción de ARNm producido que porta exón 5 en comparación con ARNm que porta exones 5 y 6.

Por ejemplo, los valores resultantes de EC_{50} para la capacidad de Ejemplos 1, 2, y 3 para modular el splicing de MDM4 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Ejemplo #	EC_{50}MDM4 Exon5/6 (nM)
1	16,79 (± 1,63, n=10)
2	36,72 (± 3,24, n=16)
3	42,38 (± 9,08, n=2)
4	1038 (± 45, n=2)

Media ± SEM; SEM = error estándar de la media

<u>Combinación con inhibidor de BCL2 ABT-199 líneas de células AML (ensayo de proliferación de 4 días y 7 días)</u>

El propósito de este ensayo es demostrar el efecto inhibidor sinérgico sobre la proliferación de líneas de células de AML cuando el inhibidor de PRMT5 se combina con el inhibidor de BCL2, ABT-199 (Abbott Laboratories).

El día 1, la placa de células GDM-1 [ATCC®, mantenidas todo el tiempo en el medio del ensayo de GDM-1: medio RPMI-1640/FBS (GIBCO®) inactivado por calor al 20 %] y células EOL-1 [ATCC®, mantenidas todo el tiempo en el medio del ensayo de EOL-1: medio RPMI-1640/FBS (GIBCO®)inactivado por calor al 10 %] a 4000 y 10000 células/pocillo (100 µl/pocillo), respectivamente, en una placa de ensayo de 96 pocillos (BD FALCON® 35- 3219). Incubar las placas en una incubadora a 37ºC (5 % de CO_2) durante 18-24 h. El día 2, se preparan DMSO 2,0 % con medio de ensayo (como se indicó anteriormente o RPMI-1640/FBS inactivado por calor al 20 % y RPMI-1640/ FBS al 10 % para GDM-1 y EOL-1, respectivamente) y añadir 100 µl a columnas 3-12 en una placa de preparación. Preparar los compuestos de ensayo ABT-199 a 10 µM en DMSO al 2 % el inhibidor de PRMT5 Ejemplo 1 a 25 µM en DMSO al 2 % y dispensar en los pocillos A2 y B2, respectivamente, seguido por dilución seriada (1: 3, 10 puntos) hasta los pocillos A11 y B11, respectivamente. Para el tratamiento combinatorio, diluir en forma seriada los ejemplos de compuestos de ensayo a 1:2 en medio de ensayo (como se indicó anteriormente o RPMI-1640/FBS inactivado por calor al 20 % y RPMI-1640/FBS al 10 % para GDM-1 y EOL-1, respectivamente) en los pocillos C2-C11 (0,1µM) a H2-H11, y luego diluir en serie compuesto de ensayo ABT-199 1: 3 de C2-H2 (1,0 M) de C11-H11. Preparar Estaurosporina 20 mM (disponible en Sigma) en DMSO al 2 % como compuesto de referencia en los pocillos A1 a H1. Añadir 11 µl de compuestos diluidos en forma seriada a los pocillos que contienen 100 µl de células en las placas de células. Las concentraciones de inicio finales en las placas de células son los siguientes: para el compuesto solo, 2,5 µM para el inhibidor de PRMT5 Ejemplo 1 y 1 µM para ABT-199; para la combinación de los dos compuestos, las concentraciones de partida son 0,01 µM para el inhibidor de PRMT5 Ejemplo 1 y 0,1 µM para ABT-199; la concentración final de DMSO es 0,2 %. Incubar las placas de células a 37 °C/5 % de CO_2 durante cuatro o siete días. En el día seis o nueve (para las prueba del tratamiento de cuatro días o siete días, respectivamente), descongelar el amortiguador CELL TITER-GLO® (Promega # G7571) y equilibrar a temperatura ambiente antes de su uso. También, equilibrar el sustrato liofilizado CELL TITER-GLO® a temperatura ambiente antes de su uso. Transferir el CELL TITER-GLO® a una botella de sustrato color ámbar para reconstituir la mezcla liofilizada enzima/sustrato para formar el reactivo CELL TITER-GLO®. Equilibrar las placas de células a temperatura ambiente durante 5 a 10

min. Añadir reactivo CELL TITER-GLO® (100 µl) a cada pocillo. Incubar las placas durante 10-15 minutos a temperatura ambiente antes de leer. Medir la luminiscencia usando el lector PERKIN-ELMER® ENVISION® Multi-Etiqueta. Analizar los datos con Medium Throughput Dorsal, para producir valores de IC_{50} de la proliferación celular e índices de combinación de inhibición basados en análisis de Chou-Talalay. [Chou TC, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. Trends Pharmacol Sci 1983; 4: 450-4].

Los resultados de este ensayo demuestran que una combinación de inhibidor de BCL2 ABT-199 y del inhibidor de PRMT5 Ejemplo 1 tiene un efecto inhibitorio sinérgico sobre la proliferación de células cancerosas. Los valores absolutos resultante de IC50 de proliferación y el índice de combinación se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4

Línea celular	IC_{50} Absoluto PRMT5 Ex 1	IC_{50} Abs ABT-199	IC_{50} Abs Combinación	Índice de combinación	Duración del tratamiento
GDM-1	0,224 µM (+/-0,0191)	0,007 µM (+/-0,001)	0,00014 µM (+/-0,00009)	<0,5, Sinérgico	4 Días
EOL-1	0,006 µM (+/-0,001)	0,030 µM (+/-0,001)	0,000003 µM (+/-0,000001)	<0,5, Sinérgico	7 Días

Media ± error estándar de la media

Ensayo de splicing de exón 5/6 de ARN de MDM4 en xenoinjerto del tumor A375 en ratón

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la retención mediada por PRMT5 del exón 6 en el ARNm procesado de MDM4 en las células tumorales A375 en un modelo de xenoinjerto de tumor de ratón. Este ensayo representa el efecto de un compuesto de prueba sobre eventos específicos del splicing mediado por PRMT5 en tumores en un modelo animal.

Cultivar células A375 en medio (DMEM de alta glucosa/Hi FBS 10 %) a 37 °C en una incubadora (5 % de CO_2) durante 18 a 24 h. Mezclar las células con MATRIGEL® (1:1) e implantar las células (5×10^6/animal) por vía subcutánea en el flanco trasero de ratones (ratones desnudos hembras, Harlan). Las células tumorales implantadas crecen como tumores sólidos. Medir el volumen del tumor y el peso corporal dos veces a la semana con un calibre. Después que el volumen del tumor alcanza aproximadamente 200-250 mm^3 (aproximadamente 20 días después del implante), distribuir de forma aleatoria a los animales, y agruparlos en grupos de compuesto de tratamiento. Administrar los compuestos de ensayo (formulados en SWFI con 1 % de HEC/0,25 %

de Tween® 80/0,05 % de Antiespumante) por sonda oral. Las dosis del compuesto de prueba están en el rango de 3 a 100 mg/kg. Sacrificar los ratones 4 horas después de la última dosis (4 días de dosificación).

Cosechar los tejidos tumorales y homogeneizar como se describe a continuación. Colocar las muestras tumorales en un bol y añadir 1 ml de N_2 líquido. Aplastar el tumor en el recipiente. Transferir pequeñas piezas de tumor (aproximadamente 20 mg cada una) en 2 tubos de matriz D de lisis (MPBIO Cat. # 6913-250). Utilizar un tubo para el procesamiento del ARN y la otra para la preparación de lisado de proteínas. Para el procesamiento de ARN, homogeneizar los tejidos tumorales en un amortiguador de extracción RNEASY® Mini Kit (QIAGEN-74104) (0,5 ml de cada uno) durante 30 segundos utilizando un homogeneizador Bio101 FastPrep FP120 (ajuste 6). El ARN total se purifica con QUARTZY® RNEASY® Mini Kit - 50 (QIAGEN-74104, Mini Handbook RNEASY®, cuarta edición, junio de 2012). Comprobar la concentración de ARN para asegurar una OD 260/280 nm ≥ 1,9. Para la síntesis de ADNc utilizar A & B APPLIED BIOSYSTEMS®, Kit de transcripción de ADNc reverso de alta capacidad (Cat. # 4368813). Utilizar 1 µg de ARN total (10 µl) en cada volumen de reacción de RT de 20 µl que contiene 10 × RT Buffer - 2,0 µl; 25 × dNTP Mix (100 mM) - 0,8 µl; 10 x cebadores al azar de RT – 2,0 µL; transcriptasa inversa MULTISCRIBE™ - 1,0 µl; H_2O libre de nucleasa – 4,2 µl. Optimizar estas condiciones (termociclador de APPLIED BIOSYSTEMS®) para su uso con el Kit de transcripción de ADNc reverso de alta capacidad: Etapa 1 - Temperatura 25 °C/Tiempo 10 min; Etapa 2 - Temperatura 37 °C/Tiempo 120 min; Etapa 3 - Temperatura 85 °C/ Tiempo 5 min; Etapa 4 Temperatura 4 °C hasta su uso posterior. A continuación, ejecutar el programa del termociclador para la reacción TAQMAN® qPCR en un volumen total de 20 µl que contiene 10 µl de 2 × mezcla de PCR, 1 µl de sondas, 3 µl de ADNc preparado (20 ng) y agua (6 µl). [Absolute Blue QPCR ROX Mix (2 ×) de THERMO SCIENTIFIC™. cat #: AB-4139; Sondas de MDM4 (exón 5 y exón 6) de APPLIED BIOSYSTEMS®, cat. #: Hs00967240-m1 y cat. #: Hs00967242-m1 respectivamente; sonda GAPDH de APPLIED BIOSYSTEMS®, cat. #: Hs02758991-g1; Sonda CDKN1A (P21) de APPLIED BIOSYSTEMS®, cat. #: Hs02758991-g1]. Las muestras se ejecutan en la máquina termocicladora ViiA7 TAQMAN (APPLIED BIOSYSTEMS®).

<u>Ensayo Western blot de MDM4 y SmD1-me2S de xenoinjerto del tumor A375 en ratón</u>

Para el Western Blot, homogeneizar los tejidos tumorales como se realizó anteriormente en 500 µl de amortiguador de lisis de kit XY que incluye cóctel completo

Mini inhibidor de proteasa (Roche, cat. #: 11 836 170 001) [este cóctel contiene 10 mg/ml de leupeptina hemisulfato (Sigma cat. # L2884); 10 mg/ml de inhibidor de tripsina-quimotripsina (Sigma cat # T9777.); 10 µg/ml de TPCK (Sigma cat. # T4376); 10 µg/ml de aprotinina (Sigma cat. # A1153); 60 mM de beta-glicerofosfato sal disódica hidrato (Sigma cat. # G9891); 1 % de TRITON™ X-100 (Sigma cat. # T9284); Tris 25 mM pH ~ 7,5 (INVITROGEN™ cat. # 15567-027); 2,5 mM de pirofosfato de sodio dibásico (Fluka cat. # 71501); $NaCl_2$ 300 mM (Mallinckrodt cat. # 7581); 2 mM de TAME (Sigma cat. # T4626); pNPP 15 mM (pNPP sal disódica hexahidrato, Sigma cat. # P4744); 5 mM de clorhidrato de benzamidina hidrato (Sigma cat. # B6506); fluoruro de sodio 10 mM (Sigma cat. # S-7920); 1 mM metavanadato de sodio anhidro (cat. Sigma # 59088); 5g. 1 mM DTT (Sigma cat. # D9779); EDTA 15 mM pH ~ 8,0 (cat. # 15575020 INVITROGEN™); 5 mM EGTA pH ~ 8,0 (Sigma cat. # E3889); 1 mM de microcistina-LR (Fisher/Axxora cat. # A350012m001); 0,25 mM de PEFA Bloc (Sigma cat. # 76307). Sedimentar por centrifugación los lisados proteicos a 8000 rpm durante 10 min y transferir los sobrenadantes a tubos de 1,5 ml para sonicación (amplitud de rendimiento de 25 %) durante 15 segundos. Sedimentar por centrifugación los lisados nuevamente a 15.000 rpm durante 10 min. A partir del sobrenadante, tomar 60 µg de cada lisado de proteínas, mezclar con amortiguador de carga de muestra de SDS-PAGE de [15 µl de lisado de proteínas; 5 µl de amortiguador de muestra x4 (Bio-Rad cat. # 161-0791); 2.25 µl de agente reductor de muestra × 10 (INVITROGEN™ cat. # NP0004); hervir las muestras a 100 °C durante 10 minutos] y correr en SDS-PAGE utilizando gel Tris-Glicina 4-20 % de 1,5 mm x 15 pocillos (INVITROGEN™). Una vez que el frente de colorante llega a la parte inferior del gel, detener la electroforesis y transferir las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa para transferencia de western con los siguientes anticuerpos primarios: anti- MDM4 clon 8C6, monoclonal de ratón de Millipore, cat. # 04-1555, anti-SmD1-Me2S [monoclonal de ratón, 2,14 mg/ml] y con anticuerpo de conejo anti-GAPDH (CAT: AB9485 Abcam). Los anticuerpos monoclonales anti-SmD1-me2S se generan en Eli Lilly en ratones NZB/W (The Jackson Laboratory). Cinco ratones hembra de 6 semanas de edad se inmunizan por vía subcutánea con 75 µg de una mezcla de dos péptidos conjugados a KLH en adyuvante completo de Freund (véase más adelante).

CREAVAGR*GR*GR*GR*GR*GGPRR (ID SEC NO: 2)

REAVAGR*GR*GR*GR*GR*GGPRRC(ID SEC NO: 3)

El asterisco indica dimetil-Arg simétrica. KLH está conjugado con el aminoácido Cys (C). Después de cebado, los ratones se inyectaron por vía subcutánea cada 3 semanas con

50 µg de la mezcla de los dos péptidos conjugados a KLH en adyuvante incompleto de Freund. Diez días después del tercer refuerzo, se recolectó sangre a través de un procedimiento de retro-orbital para medir los títulos de anticuerpos en el suero. Las células de bazo de los ratones positivos se aíslan y se fusionan con la línea celular de mieloma P3X63Ag8.653 (ATCC® CRL-1580) en una relación (1: 4) usando PEG como describe Harlow (Antibodies:. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, 2004). Las células fusionadas se siembran en placas de 96 pocillos y después de 1 semana en medio de selección que contienen HAT y los sobrenadantes se ensayan para la unión a péptidos SmD1-me2S por ELISA. Se estudia la especificidad por ELISA con péptidos no metilados y un péptido simétrica dimetil-Arg SmD3. Las células de hibridoma positivas para ELISA se subclonan mediante diluciones seriadas y los anticuerpos se purifican mediante cromatografía de afinidad con los antígenos de péptidos antes mencionados.

Una vez que la transferencia está completa, bloquear la membrana con amortiguador de bloqueo (amortiguador de bloqueo Odyssey, LI-COR Biosciences cat. # 927-40000 con 0,05 % de TWEEN®-20, BioRad cat. # 161- 0781) y luego tratar la membrana toda la noche a 4 °C con clon 8c6 anti-MDM4, anticuerpo monoclonal de ratón de Millipore, cat. # 04-1555 diluido 1:500, anti-SmD1-me2S (monoclonal de ratón in-house 2,14 mg/ml), diluir 1:300 y con anticuerpo anti-GAPDH de conejo (CAT: AB9485 Abcam) diluir 1:1000 en amortiguador de bloqueo. Lavar las membranas 3 veces con TBS TWEEN® (0,05 % de rendimiento), cada vez durante 10-15 min [10 × TBS (Sigma cat. # 170-6435)]. A continuación incubar las membranas durante 1,5 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios en las siguientes diluciones en amortiguador de bloqueo: IRDye 680LT, cabra anti-conejo, LICOR®cat. # 926-68021, Lote # C10314-03, diluir 1: 6000 y IRDye 800CW, IgG de cabra anti-ratón (H+L), LICOR® cat. # 926-32210, lote # C10131-01, diluir 1: 6000. Lavar las membranas 3 × (10 min cada una) con TBS TWEEN®. Revelar las membranas para la lectura con un sistema de imágenes LICOR® ODYSSEY® para medir la intensidad de la bandas de transferencia de Western detectadas. Calcular el porcentaje de inhibición de los grupos tratados con el compuesto de prueba en relación con las muestras del grupo tratado con vehículo como grupos de inhibición mínima utilizando la siguiente ecuación:

% de inhibición = [mediana de intensidad de banda (controles no inhibidos) - mediana de intensidad de banda (compuesto de prueba)]/[mediana de intensidad de banda (controles no inhibidos) - mediana de la intensidad de banda (controles inhibidos al máximo)] * 100

donde la muestra de control inhibido al máximo se escoge que sea de tumores A375 tomados *ex vivo* a partir de ratones portadores de tumores tras 4 días de la administración oral de Ejemplo 1, 10 mg/kg BID.

Calcular ED_{50} de un estudio de respuesta a la dosis como la dosis necesaria para alcanzar el efecto del 50 % en este punto de tiempo.

Para los ensayos descritos, (Ensayo de splicing de exón 5/6 de ARN de MDM4 en xenoinjerto del tumor A375 en ratón y Ensayo Western blot de MDM4 y SmD1-me2S de xenoinjerto del tumor A375 en ratón), los compuestos de los Ejemplos 1, 2 y 3 logran un efecto del 50 % después de dosis ≤ 30 mg/kg PO administradas QD o BID. Estos resultados demuestran que los compuestos ejemplificados de los Ejemplos 1, 2, y 3 inhiben la actividad de PRMT5 *in vivo*, como se indica por sus efectos sobre sustratos de PRMT5 y los criterios de valoración asociados consiguientes de biología molecular de las células.

Modelos de tumor de xenoinjerto

El propósito de este ensayo es medir en un modelo de cáncer en ratón la reducción en el volumen del tumor en respuesta a la administración del compuesto de prueba.

Cultivar células A375 (melanoma) en DMEM/alta glucosa HYCLONE™ (cat. # SH30022) con 10 % de HI FBS (GIBCO® cat. # 10082-147). Cultivar células Will-2 (DLBCL) en RPMI 1640 con L-glutamina y FBS inactivado por calor al 20 %. Cultivar células Namalwa (linfoma de Burkitt) (ATCC) en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, HEPES 25 mM (GIBCO® 22400-089), 1 mM piruvato de sodio y 7,5 % de FBS. Cultivar células Molt 4 en RPMI 1640 con L-glutamina, 25 mM HEPES [GIBCO 22400-089], piruvato de sodio 1 mM, y 10 % de FBS. Cosechar las células e inyectar por vía subcutánea en el flanco trasero de ratones desnudos (A375: 5 x 10^6 células/animal, mezclado 1:1 con MATRIGEL®; Will-2; 1 x 10^7 células/animal; Namalwa: 2 x 10^6 células/animal; Molt 4: : 5 x 10^6 células/animal, mezclado 1:1 con MATRIGEL®). Cuando se establecen los tumores (aproximadamente 200 mm^3, 7-21 días después del implante), distribuir los animales al azar, y agruparlos en grupos de pruebas y de control. Formular el compuesto de prueba en 1 % de HEC/0,25 % de TWEEN®-80/0,05 % Antiespumante. Administrar los compuestos de prueba y los vehículos por sonda oral. Determinar la respuesta tumoral mediante la medición del volumen del tumor (calibre) realizada dos veces por semana durante el curso del tratamiento e informar como porcentaje de inhibición del volumen del tumor en comparación con el grupo de control

del vehículo.

Ejemplo 1 demuestra actividad anti-tumor dependiente de la dosis la totalidad de los tres modelos de xenoinjerto de tumor. Por ejemplo, en el modelo de melanoma (A375), cuando se administra a 10 mg/kg QD en un esquema de 4 días de administración y 3 días sin administración durante 26 días), se alcanza el 64 % de inhibición; cuando se administra a 15 mg/kg en el mismo esquema, se alcanza el 71 % de inhibición. En el modelo de tumor DLBCL (WILL-2), cuando se administra a 2 mg/kg (BID durante 14 días), se alcanza 50 % de regresión; cuando se administra a 5 mg/kg (QD durante 14 días) se alcanza 74 % de inhibición. En el modelo de tumor de linfoma (Namalwa), cuando se administra a 2 mg/kg (BID durante 14 días) se alcanza el 74 % de inhibición; cuando se administra en 5 mg/kg (QD durante 14 días), se alcanza el 61 % de inhibición. Estos datos demuestran que Ejemplo 1 inhibe el crecimiento de xenoinjerto de tumor en los 3 modelos tumorales anteriores.

Ejemplo 4 en un modelo de leucemia linfoblástica aguda (Molt 4), cuando se administra a 60 mg/kg (BID durante 30 días), se logra -75 % de inhibición. Estos datos demuestran que Ejemplo 4 inhibe el crecimiento de xenoinjerto de tumor en el modelo de tumor anterior.

Los compuestos de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas administradas por una variedad de rutas. Más preferiblemente, tales composiciones son para la administración oral o la administración intravenosa. Tales composiciones farmacéuticas y los procesos para la preparación de las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (D. Troy, et al., eds., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la invención, o una sal de la misma aceptable para uso farmacéutico que, tras la administración de dosis únicas o múltiples para el paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

Una cantidad eficaz puede ser determinada fácilmente por el médico tratante, como una persona del oficio de nivel medio, mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación los resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad eficaz para un paciente, una serie de factores son considerados por el médico tratante, que incluyen, pero se limitan a: la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica o el trastorno implicados; el grado de o la implicación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la

respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen dentro del intervalo diario de aproximadamente 0,05 a 1000 mg. Preferiblemente, tales dosis caen dentro del rango diario de 0,1-500 mg. Más preferiblemente tales dosis caen dentro del rango diario de 0,5-100 mg. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los intervalos mencionados anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial, y por lo tanto los intervalos de dosificación anteriores no están destinados a limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Se entenderá que la cantidad de compuesto realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, los compuestos o compuesto real administrado, la edad, peso y respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.