AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL PÉPTIDO-1 SIMILAR AL GLUCAGÓN

Esta invención se relaciona con los agonistas del receptor del péptido-1 similar al glucagón y los usos terapéuticos de los compuestos para tratar la diabetes mellitus tipo II.

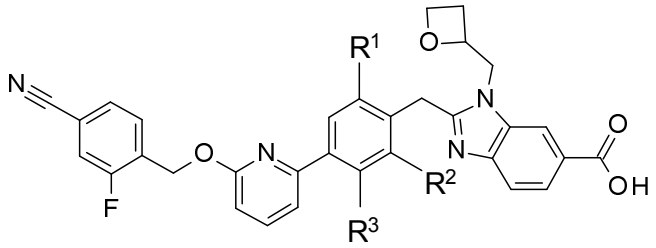
El péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) es un miembro de la familia incretinas de las hormonas peptídicas secretadas por las células enteroendocrinas intestinales L. El GLP-1 induce la liberación de insulina de las células beta de manera dependiente de la glucosa. Sin embargo, el GLP-1 se metaboliza rápidamente, de manera que solo un pequeño porcentaje del GLP-1 puede utilizarse para inducir la secreción de insulina. Para equilibrar esto, se han desarrollado agonistas del receptor del GLP-1 (GLP-1R) para mejorar la secreción de insulina como un tratamiento para la diabetes mellitus tipo II.

La mayoría de los agonistas de GLP-1R, que han sido aprobados para tratar la diabetes mellitus tipo II, son agentes inyectables. Los pacientes, a menudo, prefieren fármacos administrados por vía oral debido a los inconvenientes asociados con la inyección, tales inconvenientes como, dolor y la posibilidad de irritación en el lugar de la inyección.

El documento WO2018/109607 describe ciertos derivados de benzimidazol, que se describen como agonistas de GLP-1R.

Sin embargo, existe la necesidad de agonistas alternativos de GLP-1R. En particular, existe la necesidad de agonistas de GLP-1R, los cuales puedan administrarse por vía oral. Existe una necesidad especial de agonistas de GLP-1R que tengan una potencia mejorada, un perfil toxicológico favorable y/o un perfil farmacocinético los cuales respalden la dosificación una vez al día.

La presente invención proporciona, en consecuencia, un compuesto de la fórmula:



Fórmula I

en donde

R^1 es H o F;

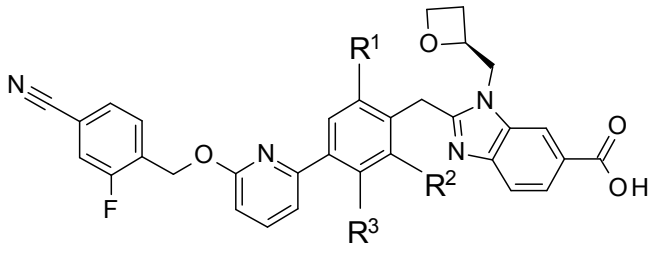
R^2 es H o F; y

R^3 es H o CH_3;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La fórmula I incluye todos los enantiómeros individuales, y sus mezclas, así como también los racematos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

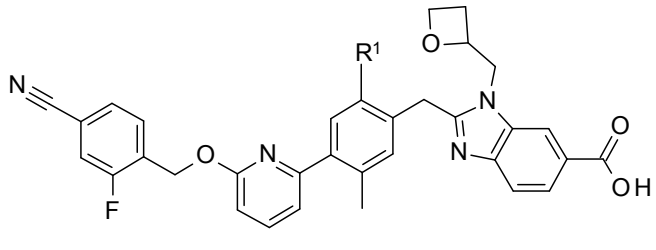
En una modalidad, se proporciona un compuesto de la fórmula:



Fórmula Ia

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

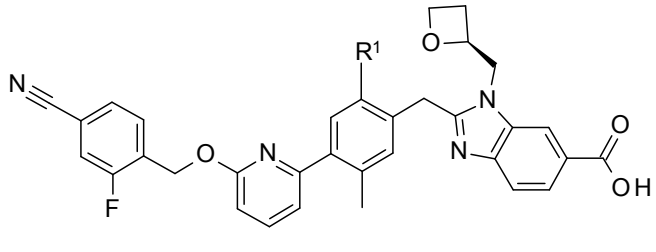
En una modalidad, se proporciona un compuesto de la fórmula:



Fórmula II

en donde R^1 es H o F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

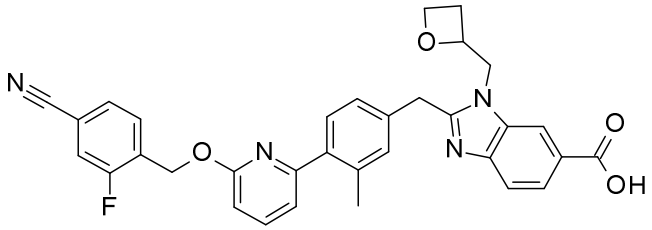
En una modalidad, se proporciona un compuesto de la fórmula:



Fórmula IIa

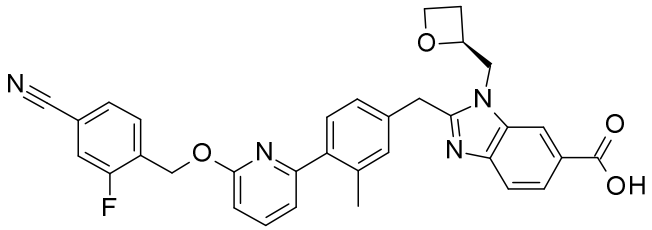
en donde R^1 es H o F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



,

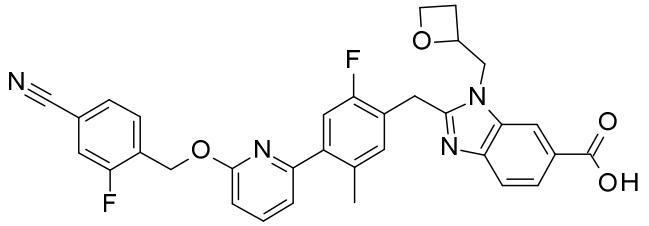
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad preferida, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



,

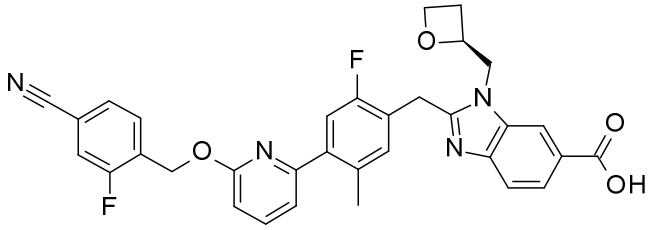
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



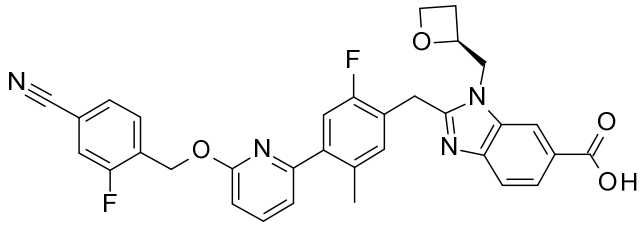
,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad preferida, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



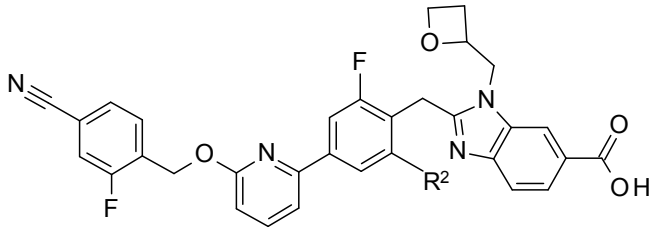
,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona la sal de *terc*-butilamina (también conocida como sal de erbumina) de:



.

En una modalidad, se proporciona un compuesto de la fórmula:

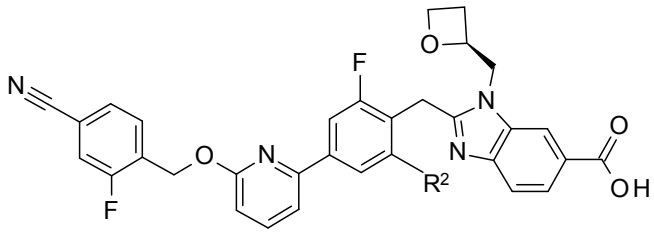


,

Fórmula III

en donde R^2 es H o F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, se proporciona un compuesto de la fórmula:

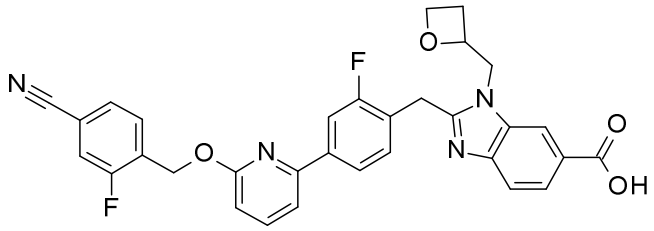


,

Fórmula IIIa

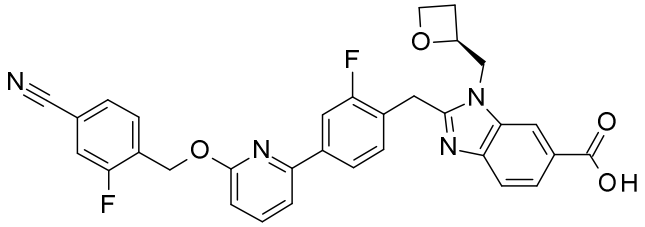
en donde R^2 es H o F, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



,

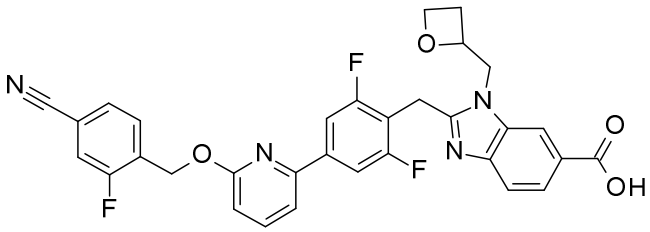
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad preferida, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



,

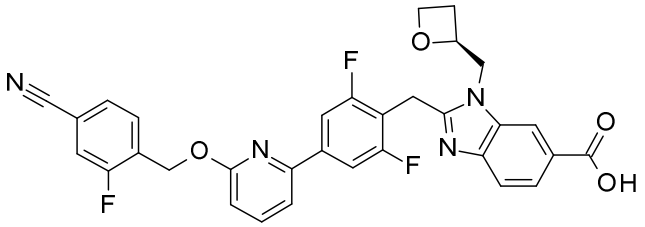
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad preferida, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La Fórmula I abarca las Fórmulas Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa y IIIb y la referencia a la Fórmula I, a continuación, por ejemplo en los métodos de tratamiento y usos terapéuticos, también debe leerse como una referencia a todas y cada una de estas subfórmulas.

En otra modalidad, se proporciona una composición farmacéutica aceptable que comprende un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos, uno de un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad preferida, la composición farmacéuticamente aceptable se formula para administración oral.

En otra modalidad, se proporciona un método de tratamiento de un mamífero para la diabetes mellitus tipo II, el método comprende administrar al mamífero en necesidad de tratamiento una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una

cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y, al menos, uno de un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la composición farmacéuticamente aceptable se formula para administración oral. Preferentemente, el mamífero es un humano.

En otra modalidad, se proporciona un método para tratar a un mamífero para la diabetes mellitus tipo II, el método comprende administrar al mamífero en necesidad de tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad preferida, el mamífero es un humano.

En otra modalidad, se proporciona un método para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un mamífero, el método comprende administrar al mamífero en necesidad de tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad preferida, el mamífero es un humano.

En otra modalidad, se proporciona un método para tratar la hiperglucemia en un mamífero, el método comprende administrar al mamífero en necesidad de tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad preferida, el mamífero es un humano.

En una modalidad, se proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

En otra modalidad, se proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

En otra modalidad, se proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la disminución de los niveles de glucosa en sangre.

En otra modalidad, también se proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la hiperglucemia.

En una modalidad, se proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus.

En una modalidad, se proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para la disminución de los niveles de glucosa en sangre.

En una modalidad, se proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hiperglucemia.

En una modalidad preferida, el compuesto de la Fórmula I se administra por vía oral. En una modalidad preferida, el compuesto de la Fórmula I se administra una vez al día. En otra modalidad preferida, el uso terapéutico es en un humano.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto de la invención que se considera aceptable para uso clínico y/o veterinario. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y de metodologías comunes para su preparación pueden encontrarse en “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use” P. Stahl, y otros, 2da edición revisada, Wiley-VCH, 2011 y S.M. Berge, y otros, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66(1), 1-19.

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas y procesos para su preparación pueden encontrarse en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Loyd, V., y otros Eds., 22da edición, Mack Publishing Co., 2012. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración oral. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se formulan como una tableta, cápsula o una solución. La tableta, cápsula o solución pueden incluir un compuesto de la Formula I en una cantidad efectiva para tratar a un paciente en necesidad de tratamiento.

El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual, tras la administración al paciente en dosis única o múltiple, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. El médico tratante, como experto en la técnica, puede determinar fácilmente la cantidad efectiva mediante el uso de técnicas convencionales y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Los factores considerados en la determinación de una cantidad o dosis efectiva de un compuesto incluyen: si se administrará el compuesto o su sal; la administración conjunta de otros agentes, si se usan; la especie de mamífero a tratar; su tamaño, la edad y la salud general; el grado de afectación o la gravedad del trastorno; la respuesta individual del mamífero; el modo de administración; las características de

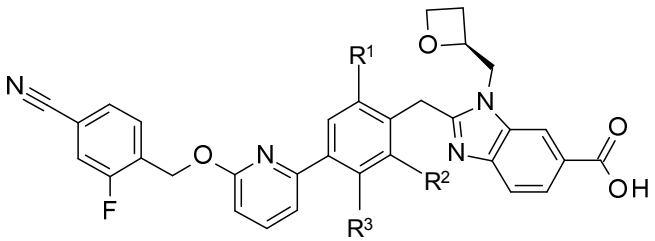
biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; y otras circunstancias relevantes. Los compuestos de la presente invención son efectivos a una dosificación diaria que cae dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal.

Como se usa en la presente descripción, los términos "tratando", "tratar" o "tratamiento" se refieren a disminuir, reducir o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno o afección existente, tal como la hiperglucemia, la cual puede incluir el incremento de la secreción de insulina.

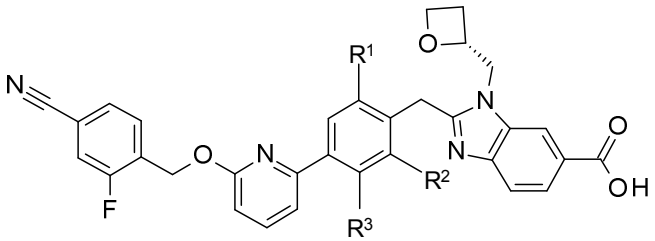
Los compuestos de la Formula I pueden formularse como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía la cual haga que el compuesto sea biodisponible. Preferentemente, tales composiciones son para la administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y los procesos para prepararlas son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington, J. P., “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, L.V. Allen, Editor, 22da Edición, Pharmaceutical Press, 2012).

Los compuestos de la Fórmula I y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles en los usos terapéuticos de la invención, siendo preferidas determinadas configuraciones.

Los compuestos de la presente invención incluyen:



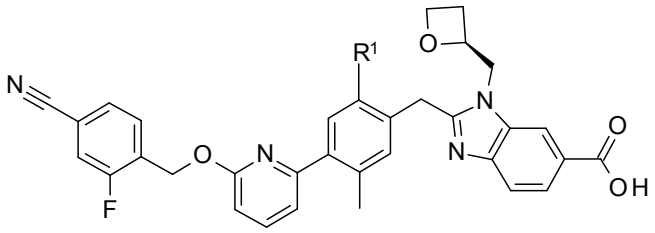
Fórmula Ia; y



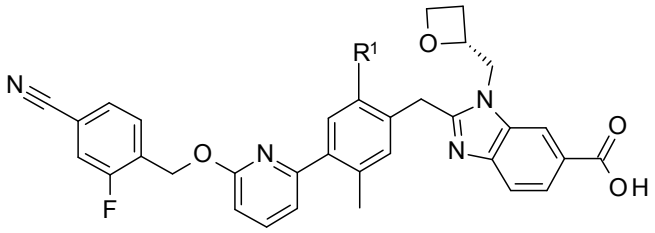
Fórmula Ib,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otros compuestos de la presente invención incluyen:



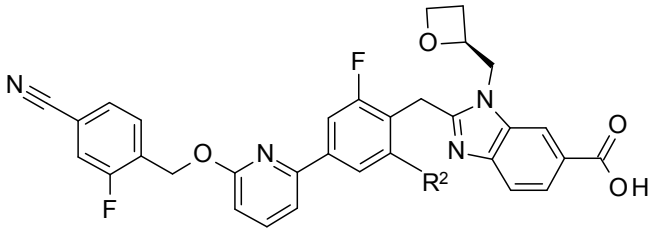
Fórmula IIa; y



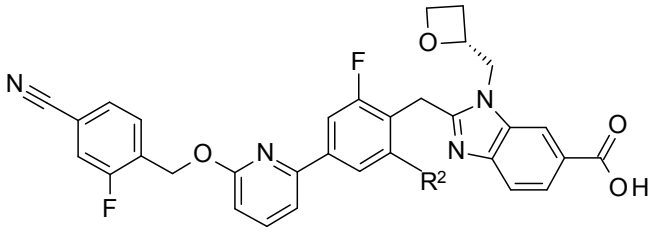
Fórmula IIb,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otros compuestos de la presente invención incluyen:



Fórmula IIIa; y



Fórmula IIIb,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros individuales, las mezclas de estos, y los racematos, se prefieren particularmente los compuestos de la Fórmula Ia, Fórmula IIa y IIIa, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Cualquier experto en la técnica puede separar o resolver los enantiómeros individuales, en cualquier momento conveniente de la síntesis de los compuestos de la invención, mediante métodos tales como las técnicas de cristalización selectiva, la cromatografía quiral (ver, por ejemplo, J. Jacques, y otros, "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley y Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994), o la cromatografía en fluidos supercríticos (SFC) (ver, por ejemplo, T. A. Berger; "*Supercritical Fluid Chromatography Primer*," Agilent Technologies, julio de 2015).

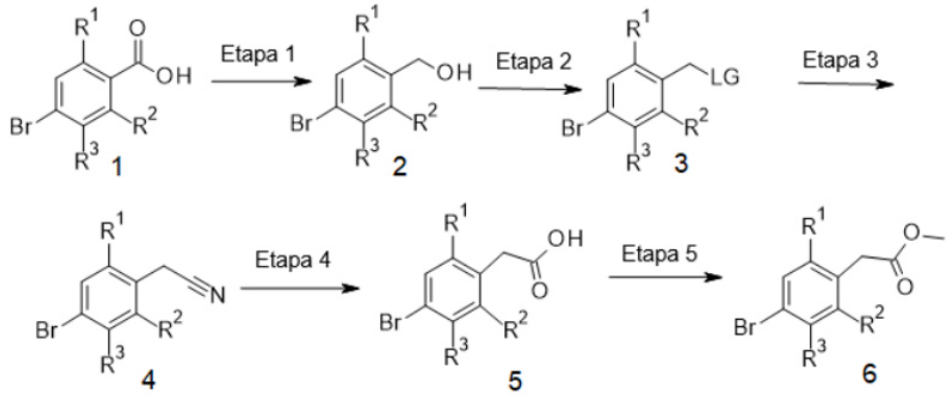
Una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención, puede formarse, por ejemplo, mediante la reacción de un compuesto de la Fórmula I y una base apropiada farmacéuticamente aceptable en un disolvente adecuado y en condiciones estándar bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Bastin, R.J., y otros; *Org. Process. Res. Dev*., 4, 427-435, 2000 y Berge, S.M., y otros; *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19, 1977). Una sal preferida es la sal de *terc*-butilamina (o erbumina).

Ciertas abreviaturas usadas en la presente descripción se definen de acuerdo con Daub GH, y otros, "The Use of Acronyms in Organic Chemistry" *Aldrichimica Acta*, 1984, 17 (1), 6-23. Ciertas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "ATP" se refiere a trifosfato de adenosina; "BSA" se refiere a Albúmina de Suero Bovino; "CAMP" se refiere a adenosina monofosfato-3',5'-cíclica; "DCM" se refiere a diclorometano o cloruro de metileno; "DIPEA" se refiere a N,N-diisopropiletilamina; "DMF" se refiere a N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EC_{50}" se refiere a la concentración de un agente que produce un 50 % de respuesta de la actividad diana en comparación con un compuesto de control positivo predefinido (absoluto EC_{50}); "ES/MS" se refiere a la espectrometría de masas por electroaspersión; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "HATU" se refiere a 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*] hexafluorofosfato de piridinio-3-óxido; "HEK" se refiere a células embrionarias de riñón humano; "HEPES" se refiere al ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina- etanosulfónico ; "H" se refiere a horas u horas, respectivamente; "MeOH" se refiere a metanol o alcohol metílico; "Min" se refiere a minuto o minutos; "$Pd(dppf)Cl_2$" se refiere a [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II); "RT" se refiere a temperatura ambiente; y "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

Los compuestos de la presente invención, pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos, algunos de los cuales se ilustran en Preparaciones y Ejemplos a continuación. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras para preparar los compuestos de

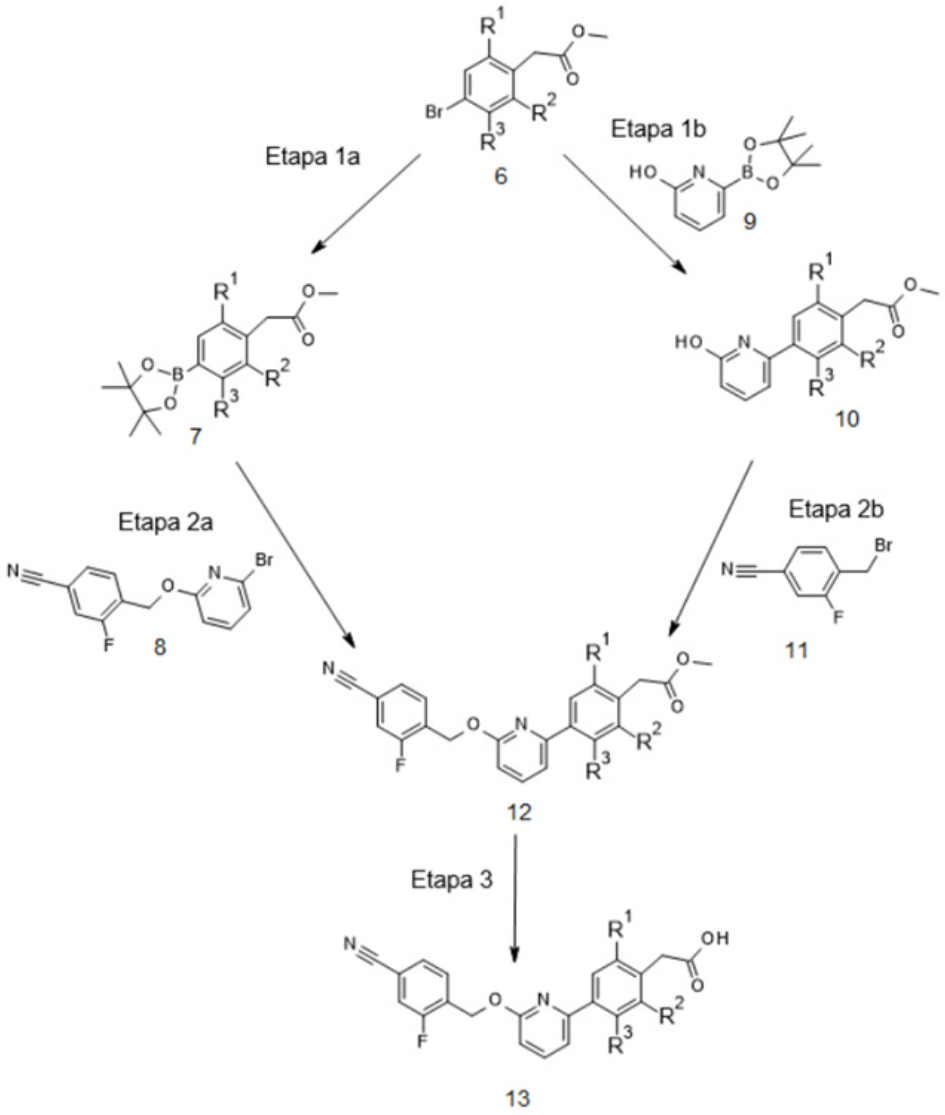
la invención, o las sales de estos. El producto de cada etapa a continuación puede recuperarse mediante métodos convencionales, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Los isómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales pueden separarse o resolverse en cualquier momento conveniente durante la síntesis mediante métodos, tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véanse, por ejemplo, J. Jacques, y otros, "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley y Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994). Sin limitar el alcance de la invención, se proporcionan las siguientes preparaciones y ejemplos para ilustrar adicionalmente la invención.

Esquema 1



El esquema 1 muestra la síntesis del intermediario 6, el cual se usa en la preparación de los compuestos de la Fórmula I. El ácido benzoico 1 primero se reduce con el complejo de dimetilsulfuro de borano en la Etapa 1 para generar el alcohol 2. El alcohol se convierte en un grupo saliente (LG, intermediario 3). Por ejemplo, el alcohol en el intermediario 2 puede convertirse en un grupo mesilato mediante el uso de cloruro de metanosulfonilo a -15 °C en la Etapa 2. o puede convertirse en un bromuro mediante el uso de tribromuro de fósforo a 0 °C. El intermediario 3 se hace reaccionar con NaCN en la Etapa 3 para generar el nitrilo 4. El nitrilo 4 se convierte, con KOH a temperatura elevada en la Etapa 4, para generar el ácido 5, que luego se esterifica en la Etapa 5 para generar el intermediario 6 mediante el uso de cloruro de oxalilo, DMF y metanol.

Esquema 2

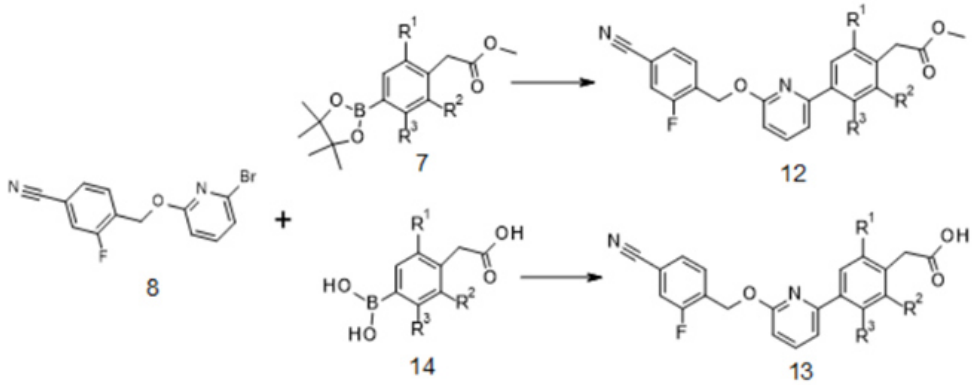


R^1, R^2, y R^3 son como se definen para la Fórmula I

El esquema 2 representa la preparación del intermediario clave 12 para la preparación de los compuestos de la Fórmula I a través de dos rutas. En la primera ruta, el haluro de arilo 6 se somete, en un solo paso, a una borilación de Miyura/acoplamiento de Suzuki: mediante el uso de bis(pinacolato) de diboro, $Pd(dppf)Cl_2$ y acetato de potasio a elevada temperatura, el haluro de arilo 6 se convierte en la Etapa 1a en el éster borónico 7, después de lo cual se añaden bromo piridina 8 y K_2CO_3 a la reacción (Etapa 2a) generándose el intermediario 12. En la segunda ruta, se emplea un proceso de dos etapas: el acoplamiento de Suzuki del haluro de arilo 6 con el éster de pinacol del ácido 6-hidroxipiridina-2-borónico 9 mediante el uso de $Pd(dppf)Cl_2$ y K_2CO_3 a elevada

temperatura (Etapa 1b) proporciona el intermediario 10, el cual se alquila con 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo 6 mediante el uso de Ag_2CO_3 a elevada temperatura (Etapa 2b) para generar el intermediario 12. La hidrólisis del éster del intermediario 12 en la Etapa 3 mediante el uso de LiOH produce el intermediario ácido 13.

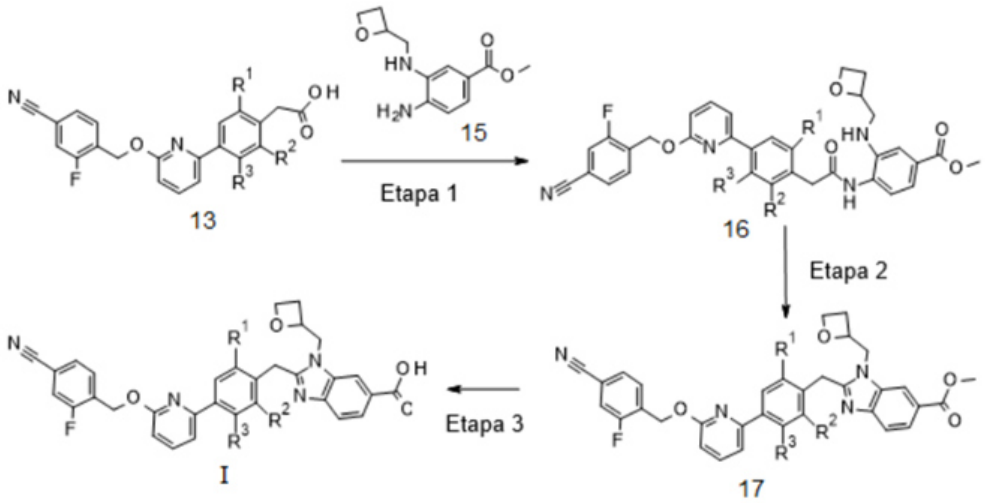
Esquema 3



R^1, R^2, y R^3 son como se definen para la Fórmula I

Alternativamente, los intermediarios clave 12 y 13 pueden prepararse de acuerdo con el Esquema 3, al acoplar la bromopiridina 8 con el éster borónico 7 o el ácido borónico 14 mediante el uso de $Pd(dppf)Cl_2$ y carbonato de potasio a elevada temperatura.

Esquema 4



R^1, R^2, y R^3 son como se definen para la Fórmula I

El esquema 4 muestra la conversión del intermediario clave 13 en compuestos de la Fórmula I. El acoplamiento de amida en la Etapa 1 mediante el uso de HATU y dianilina 15 genera el intermediario 16. La ciclación (Etapa 2) se logra al calentar el

intermediario 16 en ácido acético para generar el benzimidazol 17. Finalmente, en la Etapa 3, los compuestos de la Fórmula I se obtienen por hidrólisis de 17 mediante el uso de LiOH.

Preparaciones y Ejemplos

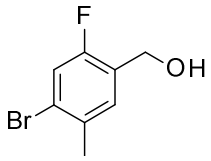
La LC-ES/MS se realiza en un sistema de cromatografía líquida AGILENT® HP1200. Las mediciones de espectrometría de masas por electroaspersión (adquiridas en modo positivo y/o negativo) se realizan en un espectrómetro de masas de cuadrupolo con detección selectiva de masas acoplado a un HPLC que puede tener o no un ELSD. Condiciones de LC-MS (pH bajo): columna: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,0 x 50 mm 3,0 μm, 110 Å; gradiente: 5-95 % de B en 1,5 min, luego 95 % de B durante 0,5 min, temperatura de la columna: 50 °C +/-10 °C; velocidad de flujo: 1,2 ml/min; volumen de inyección 1 μL; Disolvente A: agua desionizada con HCOOH al 0,1 %; Disolvente B: ACN con ácido fórmico al 0,1 %; longitud de onda 200-400 nm y 212-216 nm. Si el HPLC está equipado con un ELSD, se ajusta la temperatura del evaporador a 45 °C, la temperatura del nebulizador a 40 °C y la velocidad de flujo del gas a 1,6 SLM. Condiciones alternativas de LC-MS (pH alto): columna: Waters xBridge® C18 2,1 x 50 mm, 3,5 μm; gradiente: 5-95 % de B en 1,5 min, luego 95 % de B durante 0,50 min; temperatura de la columna: 50 °C +/- 10 °C; velocidad de flujo: 1,2 ml/min; volumen de inyección: 1 µl; Disolvente A: NH_4HCO_3 10 mM pH 9; Disolvente B: ACN; longitud de onda: 200-400 nm y 212-216 nm; si tuviera ELSD: temperatura del evaporador 45 °C, temperatura del nebulizador 40 °C y velocidad de flujo de gas 1,60 SLM.

Los patrones de difracción de rayos X de polvo (PXRD) de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de rayos X de polvo Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuKα y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. La muestra se sometió a un barrido entre 4 y 40 2θ°, con un tamaño de paso de 0,008 2θ° y una velocidad de barrido de 0,5 segundos/paso, y utilizando una divergencia de 1,0 mm, una antidispersión fija de 6,6 mm y ranuras de detección de 11,3 mm. El polvo seco se coloca en un portamuestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa utilizando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de la forma cristalina se registran a temperatura y humedad relativa ambiente. Las posiciones de los picos del cristal se determinan en un MDI-Jade después de un cambio completo de patrón en función de un estándar interno NIST 675 con picos de 8,853 y 26,774 2θ°. En la técnica de la cristalografía se sabe que, para cualquier forma cristalina determinada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como el hábito y la morfología de los cristales. Cuando los efectos de la orientación

preferida están presentes, las intensidades de los picos se alteran, pero las posiciones características de los picos del polimorfo no cambian. Ver, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos núm. 23, Formulario Nacional #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, es bien conocido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma cristalina dada, las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden cambiar debido a una variación en la temperatura a la cual se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, se presume una variabilidad de posición de los picos de ± 0,2 2θ° a tener en cuenta en estas potenciales variaciones sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma de cristal puede hacerse basada en cualquier combinación única de los picos característicos.

Preparación 1

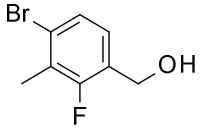
(4-bromo-2-fluor-5-metilfenil) metanol



Adicionar a un matraz: ácido 4-bromo-2-fluor-5-metil benzoico (100 g, 421 mmol), THF (200 ml) y borano (complejo de dimetil sulfuro, solución 2 mol/l en THF, 210 ml, 10 mmol). Agitar la mezcla a RT durante toda la noche. Detener la mezcla de reacción con HCl (solución acuosa 1,0 N, 50 ml) y filtrar la mezcla. Concentrar el filtrado al vacío y particionar el residuo entre EtOAc (400 ml) y agua (400 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (400 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar para generar el compuesto del título como un sólido (93,5 g, 99 %). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,29 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,26 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 4,69 (s, 2H), 2,38 (s, 3H).

Preparación 2

(4-bromo-2-fluor-3-metil-fenil) metanol

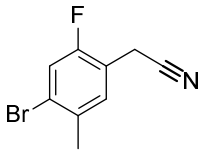


Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 1 mediante el uso de ácido 4-bromo-2-fluor-3-metil benzoico. Purificar el

producto mediante cromatografía sobre gel de sílice mediante el uso de un gradiente de EtOAc del 10 al 35 % en hexano. Tiempo de retención del pico en LC-ES /MS: 1,01 min.

Preparación 3

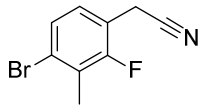
2-(4-bromo-2-fluor-5-metilfenil) acetonitrilo



Disolver (4-bromo-2-fluor-5-metilfenil) metanol (92 g, 420 mmol) en DCM (500 ml) y adicionar trietilamina (120 ml, 861 mmol). Enfriar la mezcla a -15 °C y adicionar, por goteo, una solución de cloruro de metanosulfonilo (40 ml, 517 mmol) en DCM (30 ml) a la mezcla de reacción. Agitar la mezcla durante 30 minutos a RT. Particionar la mezcla de reacción entre DCM (500 ml) y agua (500 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (500 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar. Disolver el residuo en DMF (400 ml) y enfriar la mezcla con un baño de hielo. Adicionar NaCN (21,0 g, 429 mmol) en una porción a la mezcla de reacción y agitar a RT durante toda la noche. Particionar la mezcla entre EtOAc (400 ml) y agua (500 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (500 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar. Purificar el residuo por cromatografía sobre gel de sílice mediante el uso de un gradiente de EtOAc del 10 al 30 % en hexano para obtener el compuesto del título (47,0 g, 48 %) como un aceite. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,34 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 3,71 (s, 2H), 2,41 (s, 3H).

Preparación 4

2-(4-bromo-2-fluor-3-metil-fenil) acetonitrilo

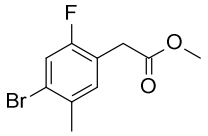


Mezclar (4-bromo-2-fluor-3-metil-fenil) metanol (1,90 g, 8,67 mmol) y DCM (20 ml). Enfriar la mezcla a 0 °C, luego adicionar, por goteo, tribromuro de fósforo (1,0 ml, 11 mmol) . Agitar la mezcla a 0 °C durante 15 min, luego basificar la mezcla con $NaHCO_3$ acuoso saturado (10 ml). Extraer la mezcla con DCM (40 ml). Lavar la fase orgánica con salmuera (30 ml), secar sobre (Na_2SO_4), filtrar y concentrar para obtener un sólido. Disolver el sólido en DMSO (10 ml), luego adicionar NaCN (0,60 g, 13,0 mmol) y agitar durante 1 h. Particionar la mezcla entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml). Lavar la fase

orgánica con salmuera (50 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar y concentrar para obtener el producto como sólido (1,3 g, 64 %). Tiempo de retención del pico en LC-ES/MS: 1,17 min

Preparación 5

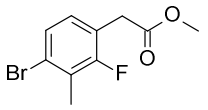
2-(4-bromo-2-fluor-5-metil-fenil) acetato de metilo



Añadir a un matraz: 2-(4-bromo-2-fluor-5-metilfenil) acetonitrilo (1,20 g, 5,10 mmol), etanol (5 ml), agua (3 ml) e hidróxido de potasio (0,90 g, 16 mmol). Calentar la mezcla a 90 °C durante toda la noche. Enfriar la mezcla con un baño de hielo y acidificar con HCl 1,0 M hasta pH 4-5, luego particionar la mezcla entre EtOAc (30 ml) y agua (30 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (30 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar para generar ácido 2- (4-bromo-2-fluoro-5-metil-fenil) acético en forma de sólido. Disolver este en DCM (10 ml), luego adicionar DMF (0,05 ml, 0,6 mmol) y cloruro de oxalilo (0,5 ml, 6 mmol) a temperatura ambiente. Agitar la mezcla a RT durante 30 minutos, luego adicionar MeOH (2 ml, 49,4 mmol) por goteo. Después de 30 min, eliminar el disolvente al vacío y particionar el residuo entre EtOAc (40 ml) y $NaHCO_3$ al 5 % (30 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (40 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar para generar el compuesto del título como un aceite (1,1 g, 80 %). ES/MS *m/z* (^{79}Br,^{81}Br) 278,280 ($M+NH_4^+$).

Preparación 6

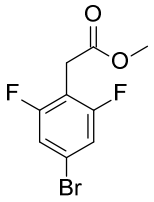
2-(4-bromo-2-fluor-3-metil-fenil) acetato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 5 mediante el uso de 2-(4-bromo-2-fluor-3-metil-fenil) acetonitrilo. Tiempo de retención máximo en LC-ES /MS: 1,22 min.

Preparación 7

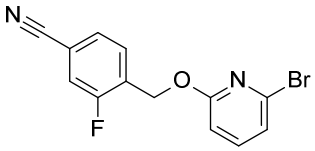
2-(4-bromo-2,6-difluorofenil) acetato de metilo



Mezclar ácido 4-bromo-2,6-difluor-fenil acético (3,30 g, 12,5 mmol), DCM (20 ml), DMF (0,05 ml, 0,6 mmol) y cloruro de oxalilo (1,3 ml, 15 mmol). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego adicionar MeOH (1,5 ml, 37 mmol, 100 % en masa) por goteo. Concentrar la mezcla y particionar entre EtOAc (30 ml) y $NaHCO_3$ acuoso saturado (15 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (30 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar para generar el compuesto del título como un aceite (3,41 g, rendimiento cuantitativo), el cual se usa sin purificación adicional en la Preparación 10. ES/MS *m/z* (^{79}Br,^{81}Br) 265,267 (M+H).

Preparación 8

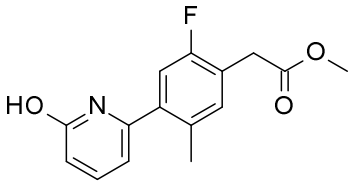
4-[(6-Bromo-2-piridil) oximetil]-3-fluor benzonitrilo



Disolver 2-bromo-6-fluorpiridina (2,50 g, 13,8 mmol) y 3-fluor-4-(hidroximetil) benzonitrilo (2,15 g, 13,8 mmol) en 1,4-dioxano (25 ml) y agregar una solución de *terc*-butóxido de potasio (20 % en peso en THF, 10,0 ml, 16,6 mmol) por goteo durante 12 min a RT. Calentar la mezcla de reacción a 40 °C durante 30 min. Verter la mezcla en K_2CO_3 acuoso (1 M) y extraer dos veces con EtOAc. Lavar la fase orgánica con agua y NaCl acuoso saturado, secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar. Secar el residuo en una estufa de vacío a 50 °C para obtener el compuesto del título (4,23 g, 95 %) como un sólido amarillo claro. ES/MS *m/z* (^{79}Br,^{81}Br) 307,309 (M+H).

Preparación 9

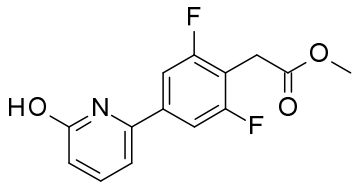
2-[2-fluor-4-(6-hidroxi-2-piridil) 5-metil-fenil] acetato de metilo



Adicionar a un matraz, el éster de pinacol del ácido 6-hidroxipiridin-2-borónico (1,6 g, 6,9 mmol), 2-(4-bromo-2-fluor-5-metil-fenil) acetato de metilo (2,2 g, 8,4 mmol), THF (15 ml), agua (1 ml) y carbonato de potasio (2,0 g, 14 mmol). Purgar la mezcla con nitrógeno durante 10 minutos, luego agregar $Pd(dppf)Cl_2$ (0,26 g, 0,35 mmol) y calentar a 75 °C durante 2 h. Particionar la mezcla entre EtOAc (30 ml) y agua (30 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (30 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar y concentrar para dar el compuesto del título (1,4 g, 74 %) como un sólido. ES/MS *m/z* 276 (M+H), 274 (M-H).

Preparación 10

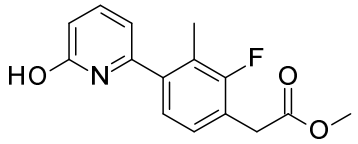
2-[2,6-difluor-4-(6-hidroxi-2-piridil) fenil] acetato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 9 mediante el uso de 2-(4-bromo-2,6-difluor-fenil) acetato de metilo, al calentar la reacción a 75 °C durante toda la noche. ES/MS *m/z* 280 (M+H).

Preparación 11

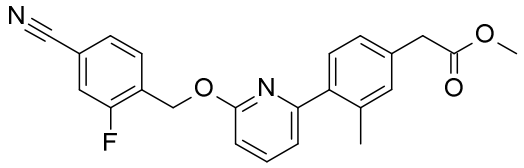
2-[2-fluor-4-(6-hidroxi-2-piridil)-3-metil-fenil] acetato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 9 mediante el uso de 2-(4-bromo-2-fluor-3-metil-fenil) acetato de metilo, al calentar la reacción a 75 °C durante toda la noche (18 h). ES/MS *m/z* 276 (M+H), 274 (M-H).

Preparación 12

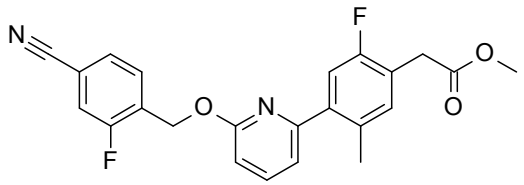
2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-3-metil-fenil] acetato de metilo



Disolver el ácido 2-(4-bromo-3-metilfenil) acético (10,7 g, 45,8 mmol) en DCM (50 ml). Enfriar la mezcla en un baño de hielo/agua, y luego agregar cloruro de oxalilo (4,8 ml, 55 mmol) y DMF (0,1 ml). Retirar el baño de hielo/agua y agitar a temperatura ambiente durante 2 h. Adicionar MeOH (6,0 ml) por goteo durante 2 min y agitar a RT durante 1 h. Concentrar la mezcla de reacción al vacío y disolver el residuo en EtOAc. Lavar las fases orgánicas con $NaHCO_3$ acuoso saturado y NaCl acuoso saturado. Secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4, a continuación, filtrar y concentrar. Adicionar al residuo, bis(pinacolato) de diboro (12,8 g, 50,4 mmol) y acetato de potasio (13,6 g, 137 mmol). Burbujear nitrógeno a través de la mezcla de reacción durante 15 minutos, luego adicionar $Pd(dppf)Cl_2$ (complejo con DCM, 1,13 g, 1,37 mmol). Calentar la reacción bajo nitrógeno a 85 °C durante 15 h en un baño de aceite, luego retirar el matraz de reacción del baño de aceite. Disolver el carbonato de potasio (9,49 g, 68,7 mmol) en agua (60 ml), burbujear nitrógeno a través de la solución durante 10 minutos, y luego adicionar esta solución a la mezcla de reacción seguido de 4-[(6-bromo-2-piridil) oximetilo]-3-fluor benzonitrilo (14,1 g, 45,8 mmol). Burbujear nitrógeno a través de toda la mezcla de reacción durante 5 min y calentar bajo nitrógeno a 85 °C durante 6 h. Enfriar la reacción hasta temperatura cercana a la ambiente y concentrar al vacío para eliminar la mayor parte del 1,4-dioxano. Diluir esta mezcla con EtOAc (200 ml) y lavar con agua y NaCl acuoso saturado. Secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4, a continuación, filtrar y concentrar. Purificar el producto bruto por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc desde 5 hasta 50 % en hexano para obtener el compuesto del título (13,3 g, 70 %) como un sólido amarillo claro. ES/MS *m/z* 391 (M+H).

Preparación 13

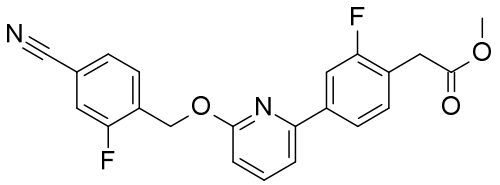
2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil] acetato de metilo



Adicionar a un matraz, 2-[2-fluor-4-(6-hidroxi-2-piridil)-5-metil-fenil] acetato de metilo (1,40 g, 5,09 mmol), 1,4-dioxano (35 ml), carbonato de plata (1,7 g, 6,2 mmol) y 4-(bromometil)-3-fluor benzonitrilo (1,4 g, 6,2 mmol). Calentar la mezcla a 60 °C durante toda la noche. Filtrar el sólido y concentrar el filtrado. Purificar el residuo por cromatografía sobre gel de sílice mediante el uso de EtOAc desde 12 a 55 % en hexano para generar el compuesto del título (1,60 g, 77 %) como un sólido. ES/MS *m/z* 409 (M+H), 407 (M-H).

Preparación 14

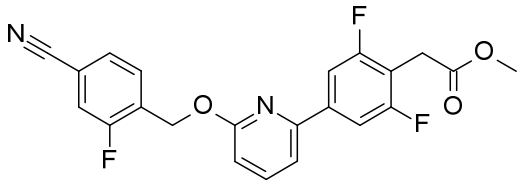
2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-fenil] acetato de metilo



Cargar un matraz con 4-[(6-bromo-2-piridil)oximetil]-3-fluor benzonitrilo (2,02 g, 6,58 mmol), 2-(2-fluor-4-(4,4,5,5 -tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil) acetato de metilo (2,99 g, 9,88 mmol), K_2CO_3 (2,30 g, 16,5 mmol), 1,4-dioxano (30 ml) y agua (10 ml). Burbujear nitrógeno a través de la mezcla durante 10 min. Añadir el complejo $Pd(dppf)Cl_2$ DCM (492 mg, 0,658 mmol) a la mezcla y calentar a 80 °C bajo nitrógeno durante 5 h. Enfriar la mezcla de reacción, diluir con EtOAc (75 ml) y filtrar a través de una capa de Celite®. Lavar el filtrado con agua y NaCl acuoso saturado, secar sobre Na_2S_4, filtrar y concentrar. Purificar el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice con un gradiente de EtOAc del 5 al 90 % en hexano para obtener el compuesto del título (2,68 g, 94 %). ES/MS *m/z* 395 (M+H).

Preparación 15

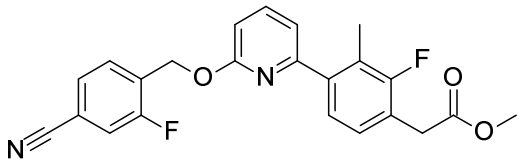
2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2,6-difluor-fenil] acetato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 13 mediante el uso de 2-[2,6-difluor-4-(6-hidroxi-2-piridil) fenil] acetato de metilo, al calentar la reacción a 80 °C durante toda la noche. ES/MS *m/z* 413 (M+H).

Preparación 16

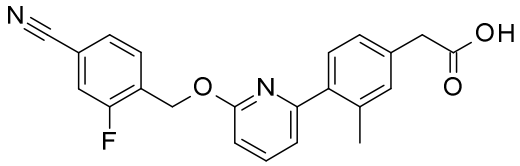
2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-3-metil-fenil] acetato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 13 usando 2-[2-fluor-4-(6-hidroxi-2-piridil)-3-metil-fenil] acetato de metilo, al calentar la reacción a 80 °C durante 3 h. ES/MS *m/z* 409 (M+H).

Preparación 17

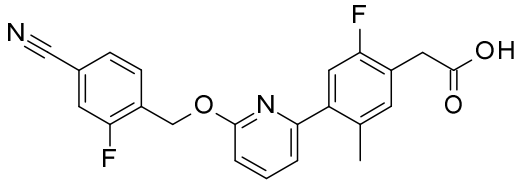
Ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-3-metil-fenil] acético



Adicionar a un matraz, 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-3-metil-fenil] acetato de metilo (1,20 g, 3,07 mmol), ACN (20 ml), agua (10 ml) e hidróxido de litio (0,35 g, 15 mmol). Calentar la mezcla a 45 °C durante 3 h. Enfriar la mezcla con un baño de hielo y acidificar con HCl 1,0 M hasta pH = 4-5. Particionar la mezcla entre EtOAc (30 ml) y agua (30 ml). Lavar la fase orgánica con salmuera (30 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar para generar el compuesto del título (1,1 g, 95 %) como un sólido. ES/MS *m/z* 377 (M+H).

Preparación 18

Ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil] acético

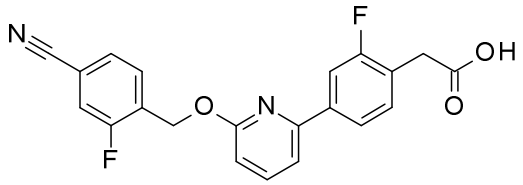


Adicionar a un vial 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil] acetato de metilo (1,6 g, 3,9 mmol), ACN (20 ml), agua (6 ml) e hidróxido de litio (0,45 g, 19 mmol). Calentar la mezcla a 45 °C durante 2 h, enfriar la mezcla con un baño de hielo y acidificar con HCl 1,0 M hasta pH = 4-5. Particionar la mezcla entre EtOAc

(50 ml) y agua (50 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (50 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar y concentrar para obtener el compuesto del título (1,55 g, 100 %) como un sólido. ES/MS m/z 395 (M+H).

Preparación 19

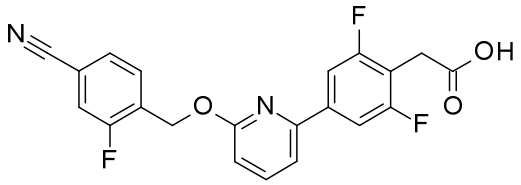
Ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-fenil] acético



Disolver 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-fenil] acetato de metilo (2,68 g, 6,25 mmol) en THF (50 ml), luego adicionar hidróxido de litio (797 mg, 32,9 mmol) y agua (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 h, ajustar el pH de la mezcla de reacción a 5 con HCl acuoso (1 M). Eliminar los disolventes volátiles *al vacío* para generar una suspensión acuosa. Filtrar y secar el sólido para obtener el compuesto del título (2,24 g, 88 %). ES/MS *m/z* 381 (M+H).

Preparación 20

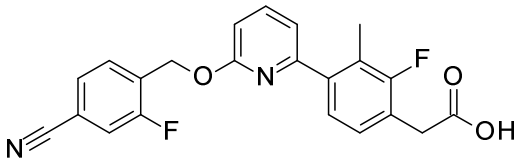
Ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2,6-difluor-fenil] acético



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 18 mediante el uso de 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2,6-difluor-fenil] acetato de metilo. ES/MS *m/z* 399 (M+H).

Preparación 21

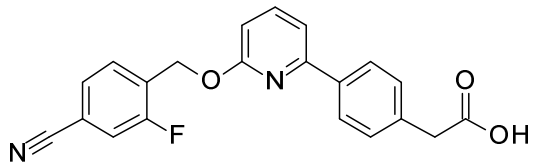
Ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-3-metil-fenil] acético



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 17 mediante el uso de 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-3-metil-fenil] acetato de metilo. ES/MS m/z 395 (M+H).

Preparación 22

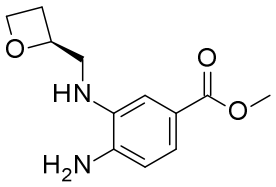
Ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]fenil] acético



Mezclar 4-[(6-bromo-2-piridil)oximetil]-3-fluor-benzonitrilo (0,70 g, 2,3 mmol) y ácido 2-(4-boronofenil) acético (0,64 g, 3,4 mmol), THF (15 ml), agua (5 ml) y carbonato de potasio (0,63 g, 4,6 mmol) . Purgar la mezcla con nitrógeno durante 10 minutos, luego adicionar $Pd(dppf)Cl_2$ (0,085 g, 0,11 mmol) y calentar la mezcla a 75 °C durante 8 h. Acidificar la mezcla hasta pH 4-5 con HCl acuoso (1 M). Particionar la mezcla entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml). Lavar la fase orgánica con salmuera (50 ml), secar sobre (Na_2SO_4), luego filtrar y concentrar. Purificar el residuo por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc desde 25 hasta 65 % en hexano para obtener el compuesto del título (800 mg, rendimiento 97 %) como un sólido. ES/MS *m/z* 363,0 (M+H).

Preparación 23

4-amino-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo



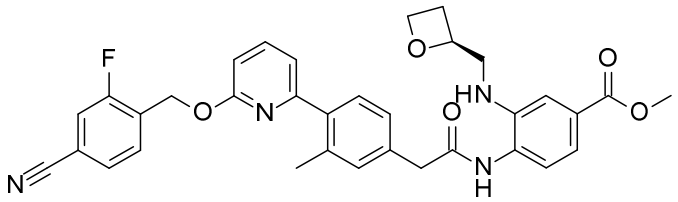
A una solución de 3-fluor-4-nitro-benzoato de metilo (2,0 g, 10 mmol) en THF (10 ml) y DMF (10 ml) adicionar trietilamina (3,1 ml, 22 mmol) a RT. A la solución ligeramente amarilla, adicionar [(2S)-oxetan-2-il] metanamina (Austin Chemical Company, 1,0 g, 11 mmol) y agitar la solución de color rojizo durante toda la noche. Diluir la reacción con EtOAc (100 ml) y agua (50 ml). Separar la capa orgánica y luego volver a extraer la capa acuosa con EtOAc (2 x 50 ml). Combinar las fases orgánicas y lavar con NaCl acuoso saturado. Secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4, filtrar, concentrar y secar el residuo a

alto vacío. Esto genera 4-nitro-3-[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo bruto (2,8 g, 10 mmol) como un sólido amarillo (ES MS *m/z* 267 (M + H)).

A continuación, disolver el 4-nitro-3-[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo (2,8 g, 10 mmol) en THF (50 ml) y adicionar paladio sobre carbono (5 % pre humedecido con agua, 0,5 g). Purgar al vacío la mezcla de reacción con hidrógeno y luego agitar bajo un globo de hidrógeno a temperatura ambiente durante 2 h, tiempo durante el cual el color amarillo se desvanece. Filtrar la mezcla a través de Celite® y concentrar para obtener el compuesto del título (2,4 g, 99 %). ES/MS *m/z* 237 (M+H).

Preparación 24

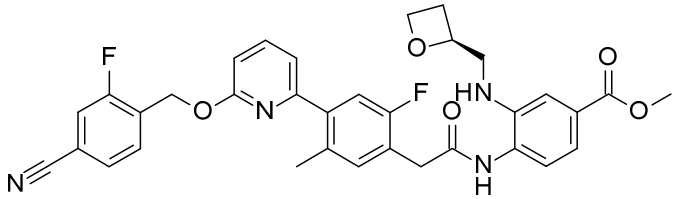
4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-3-metil-fenil]acetil] amino]-3-[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo



Adicionar a un vial ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-3-metil-fenil] acético (1,10 g, 2,92 mmol), DMF (10 ml), HATU (1,4 g, 3,6 mmol), 4-amino-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo (0,76 g, 3,2 mmol) y DIPEA (1,5 ml, 8,6 mmol). Agitar la mezcla a RT durante 30 minutos, luego particionar entre EtOAc (30 ml) y agua (30 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (30 ml), luego secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar. Purificar el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc desde 10 hasta 35 % en DCM para obtener el compuesto del título (1,2 g, 69 %) como sólido. ES/MS *m/z* 595 (M+1), 593 (M-1).

Preparación 25

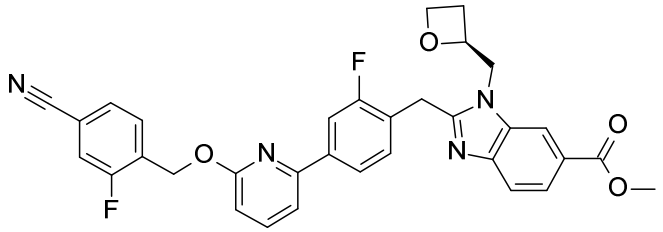
4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil] acetil] amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo



Adicionar a un matraz: ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil] acético (1,20 g, 3,04 mmol), DMF (15 ml), HATU (1,2 g, 3,1 mmol), 4-amino-3- [[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo (0,80 g, 3,4 mmol) y DIPEA (1,5 ml, 8,6 mmol). Agitar la mezcla a RT durante 30 minutos, luego particionar entre EtOAc (30 ml) y agua (30 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (30 ml), luego secar sobre Na_2SO_4, filtrar y concentrar. Purificar el residuo por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc desde 10 hasta 35 % en DCM para obtener el compuesto del título en forma sólida (1,20 g, 64 %). ES/MS *m/z* 613 (M+1), 611 (M-H).

Preparación 26

2-[[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-fenil] metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il] metil] benzimidazol-5-carboxilato de metilo

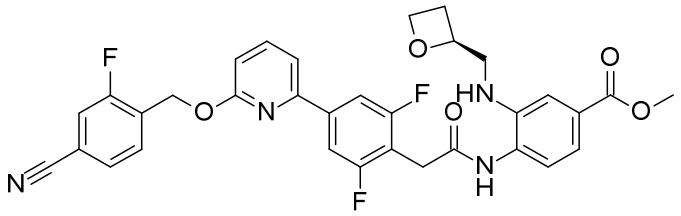


A un matraz de fondo redondo, adicionar ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-fenil] acético (205 mg, 0,540 mmol), 4-amino-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo (116 mg, 0,490 mmol), HATU (224 mg, 0,589 mmol), DIPEA (0,26 ml, 1,5 mmol) y DMF (5 ml). Después de agitar a RT durante 3,5 h, diluir la mezcla de reacción con EtOAc (30 ml) y lavar con agua y NaCl acuoso saturado. Secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4, filtrar y concentrar. Purificar el residuo por cromatografía sobre gel de sílice mediante el uso de un gradiente desde 0 a 10 % de MeOH en DCM para obtener la amida intermediaria (326 mg). ES/MS *m/z* 599 (M+H).

Calentar la amida intermediaria con ácido acético (5 ml) a 50 °C durante 15 h. Concentrar la mezcla de reacción *al vacío* y disolver el residuo restante en EtOAc (25 ml). Lavar las fases orgánicas con $NaHCO_3$ acuoso saturado y NaCl acuoso saturado. Secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4, filtrar y concentrar el filtrado al vacío. Purificar lo resultante por cromatografía sobre gel de sílice mediante el uso de un gradiente de EtOAc desde 20 a 100 % en hexano para obtener el compuesto del título (152 mg, 52 %). ES/MS *m/z* 581 (M+H).

Preparación 27

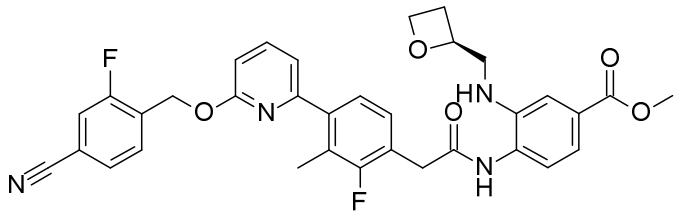
4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2,6-difluor-fenil]acetil]amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil]amino] benzoato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 24 mediante el uso de ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2,6-difluor-fenil] acético. Colectar el producto que precipita durante el tratamiento acuoso por filtración y usar sin purificación posterior. ES/MS *m/z* 617 (M+H), 615 (M-H).

Preparación 28

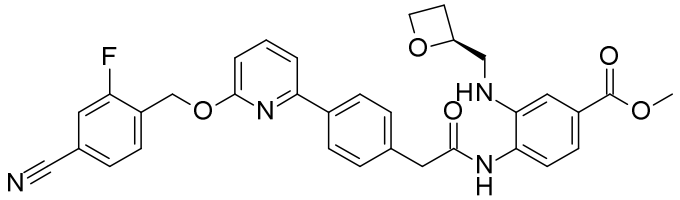
4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-3-metil-fenil] acetil] amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 24 mediante el uso de ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-3-metil-fenil] acético. ES/MS *m/z* 613 (M+H), 611 (M-H).

Preparación 29

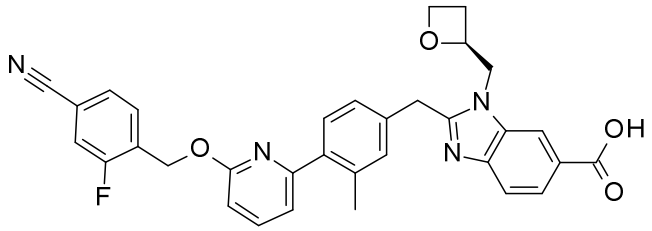
4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil] fenil]acetil] amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil]amino] benzoato de metilo



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 25 mediante el uso de ácido 2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]fenil] acético. ES/MS *m/z* 581,0 (M+H), 579,0 (M-H).

Ejemplo 1

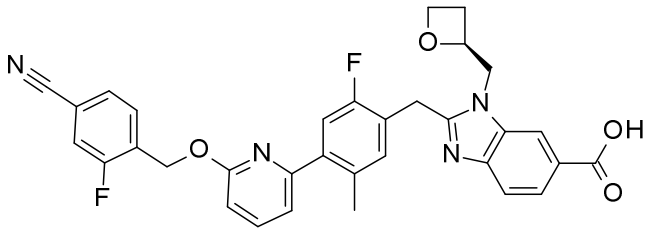
Ácido 2-[[4-[6-[(4-Ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-3-metil-fenil] metil]-3-[[((2S)-oxetan-2-il]metil]benzimidazol-5-carboxílico



Adicionar a un vial 4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-3-metil-fenil]acetil]amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil]amino] benzoato de metilo (1,2 g, 2,0 mmol) y ácido acético (6 ml). Calentar la mezcla a 80 °C durante 2 h, luego eliminar el disolvente *al vacío*. Particionar el residuo entre EtOAc (30 ml) y $NaHCO_3$ acuoso (5 %, 20 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (30 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar. Disolver el residuo en ACN (5 ml) y agua (3 ml), luego adicionar a la mezcla LiOH (0,22 g, 9,2 mmol) y agitar a 50 °C durante 2 h. Eliminar el disolvente *al vacío*. Purificar el residuo mediante cromatografía flash de fase invertida mediante el uso de un gradiente desde 20 a 35 % de ACN en NH_4HCO_3 acuoso al 5 % para generar el compuesto del título (900 mg, 79 %) como un sólido. ES/MS *m/z* 563 (M+H), 561 (M-H).

Ejemplo 2

Ácido 2-[[4-[6-[(4-Ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil]metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il]metil] benzimidazol-5-carboxílico

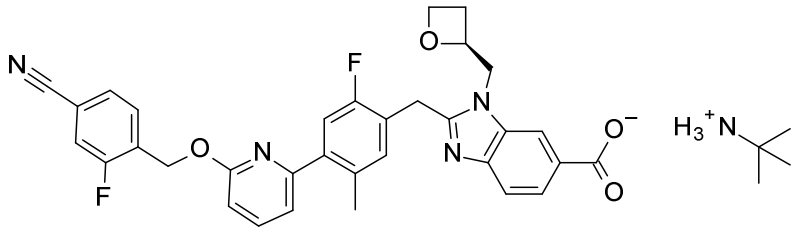


Adicionar a un vial 4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil] acetil]amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil]amino] benzoato de metilo (1,20 g, 1,96 mmol) y ácido acético (15 ml), luego calentar la mezcla a 80 °C durante 2 h. Eliminar el disolvente *al vacío*. Particionar el residuo entre EtOAc (30 ml) y $NaHCO_3$ acuoso (5 %, 20 ml). Lavar la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (30 ml), secar sobre Na_2SO_4, filtrar, y concentrar. Disolver el residuo en ACN (10 ml) y agua (4 ml), luego adicionar a la mezcla LiOH (0,24 g, 10 mmol) y agitar a 50 °C durante 2 h. Acidificar la mezcla con

ácido cítrico acuoso saturado hasta pH = 4-5. Eliminar el disolvente al vacío. Purificar el residuo mediante cromatografía flash de fase invertida mediante el uso de un gradiente desde 20 a 35 % de ACN en NH_4HCO_3 acuoso al 5 % para generar el compuesto del título (745 mg, 66 %) como un sólido. ES/MS *m/z* 581 (M+H), 579 (M-H).

Ejemplo 2a

2-[[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil] metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il] metil] benzimidazol-5-carboxilato de *terc*-butilamonio



Método 1 - preparación sin cristales semillas

Suspender el ácido 2-[[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil]metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il] metil] benzimidazol-5-carboxílico (555 mg, 0,96 mmol) en acetona (6 ml) mientras se agita a 800 rpm a 50 °C, generando una suspensión de un sólido blanco. Adicionar *terc*-butilamina (115 µL, 1,09 mmol, 1,14 eq) observando una breve clarificación de la mezcla seguida de la precipitación de un sólido blanco. Agitar esta suspensión a 50 °C durante 1 h, luego apagar el calentamiento y permitir que la muestra se agite a medida que se acerca a la RT. Filtrar el sólido por filtración al vacío y secar en el lugar durante 15 min bajo una corriente de nitrógeno, entonces secar *al vacío* a 50 °C durante 1 h para generar el compuesto del título (612 mg, 98 %).

Método 2 - preparación con cristales semilla

Mezclar ácido 2-[[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil metoxi]-2-piridil]-2-fluoro-5-metil-fenil] metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il]metil] benzimidazol-5 carboxílico (50 g, 86,1 mmol), acetona (658 ml) y agua (42 ml), y calentar la mezcla a 50 °C. Filtrar la mezcla sobre papel GF/F y enjuagar con 94:6 v:v acetona:agua (25 ml). Calentar la solución resultante a 50 °C. Preparar una solución de *terc*-butilamina (10 ml, 94,7 mmol, 1,1 eq) y 94:6 v:v acetona:agua (25 ml). Adicionar una porción de la solución de *terc-butilamina* (7 ml) seguida de cristales semilla de 2 -[[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenil]metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il] metil] benzimidazol-5-carboxilato de *terc-butilamonio* (50 mg). Adicionar la solución de *terc-butilamina* restante durante aproximadamente 1 h a través de una bomba de jeringa a una velocidad de 0,47 ml/min. Calentar la suspensión resultante a 50 °C durante 2 h, luego enfriar la mezcla a

temperatura ambiente durante toda la noche. Filtrar la suspensión y enjuaguar con acetona (2 × 100 ml). Secar la torta húmeda a 50 °C *al vacío* hasta un peso constante para generar el compuesto del título (51,8 g, 92 %) como un sólido amarillo pálido.

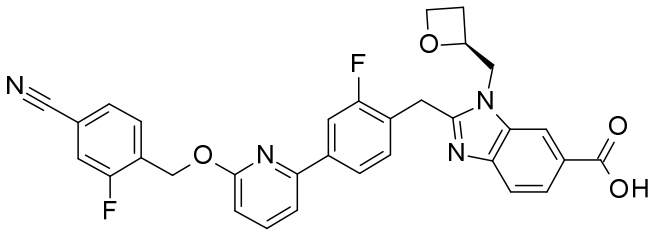
Caracterizar una muestra preparada del compuesto del título mediante patrón de XRD mediante el uso de radiación CuKα que tiene picos de difracción (valores 2-teta) como se describen en la Tabla 1 a continuación, y en particular que tiene picos a 6,9 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 16,3 y 22,5; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 1. Picos de difracción de rayos X en polvo de 2-[[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-5-metil-fenilo] metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il] metil] benzimidazol-5-carboxilato de *terc-butilamonio*

Pico	Ángulo (°2-Teta) +/-0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	5,5	26,20 %
2	6,9	64,90 %
3	11,2	49,20 %
4	16,3	100,00 %
5	17,1	34,70 %
6	19,6	53,00 %
7	21,8	43,10 %
8	22,5	93,80 %
9	27,3	41,10 %
10	28,0	37,90 %

Ejemplo 3

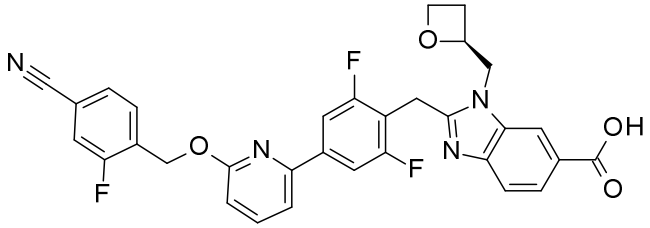
Ácido 2-[[4-[6-[(4-Ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-fenil] metil]-3-[(2S)-oxetan-2-ilmetil] benzimidazol-5-carboxílico



Disolver 2-[[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2-fluor-fenil] metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il] metil] benzimidazol-5-carboxilato de metilo (152 mg, 0,256 mmol) en THF (6 ml), luego adicionar hidróxido de litio (31 mg, 1,26 mmol) y agua (2 ml). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h, luego ajustar el pH a 6 con HCl acuoso (1 N). Eliminar el THF *al vacío* y colectar el sólido restante por filtración. Purificar por cromatografía flash de fase invertida mediante el uso de un gradiente desde 10 a 40 % de ACN en NH_4HCO_3 acuoso (10 mM, pH 10) para obtener el compuesto del título (60 mg, 41 %). ES/MS *m/z* 567 (M+H).

Ejemplo 4

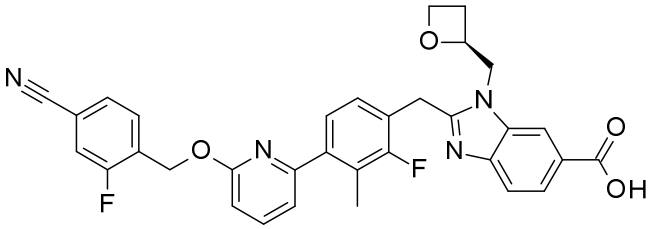
Ácido 2-[[4-[6-[(4-Ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2,6-difluor-fenil] metil]-3-[(2S)-oxetan-2-ilmetil] benzimidazol-5-carboxílico



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 mediante el uso de 4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil) metoxi]-2-piridil]-2,6-difluor-fenil] acetil] amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo. Purificar el producto por cromatografía flash de fase invertida mediante el uso de un gradiente desde 30 a 50 % de ACN en NH_4HCO_3 acuoso (10 mM, pH 10). ES/MS *m/z* 585 (M+H), 583 (M-H).

Ejemplo 5

Ácido 2-[[4-[6-[(4-Ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-3-metil-fenil]metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il]metil] benzimidazol-5 carboxílico

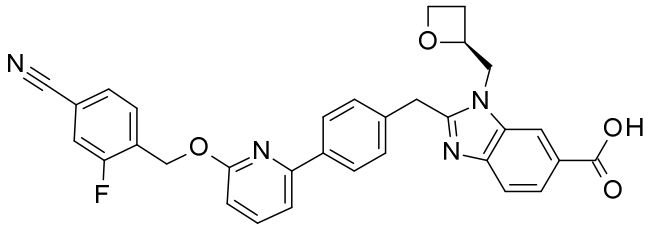


Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en el Ejemplo 2 mediante el uso de 4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]-2-fluor-3-metil-fenil] acetil]amino-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo. Purificar el producto por cromatografía flash de fase invertida mediante el uso de un gradiente

desde 5 a 40 % de ACN en NH_4HCO_3 acuoso al 5 %. ES/MS *m/z* 581 (M+H), 579 (M-H).

Ejemplo 6

Ácido 2-[[4-[6-[(4-Ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]fenil] metil]-3-[[(2S)-oxetan-2-il]metil] benzimidazol 5-carboxílico



Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 mediante el uso de 4-[[2-[4-[6-[(4-ciano-2-fluor-fenil)metoxi]-2-piridil]fenil]acetil]amino]-3-[[(2S)-oxetan-2-ilmetil] amino] benzoato de metilo. Purificar el producto crudo por cromatografía flash de fase invertida mediante el uso de un gradiente desde 20 a 35 % de ACN en NH_4HCO_3 acuoso al 5 %. ES/MS *m/z* 549,0 (M+H), 547,1 (M-H).

Ensayos biológicos

Ensayo de AMPc en células HEK293 para el Receptor del GLP-1 humano

La actividad funcional del receptor del GLP-1 se determina mediante el uso de la formación de AMPc en una línea celular clonal HEK293 que expresa el GLP-1R humano (número de acceso NCBI NP_002053) con una densidad de expresión de 581 ± 94 (n=6) y 104 ± 12 (n=5) fmol/mg de proteína (determinada mediante el uso de análisis de unión de competición homóloga de [^{125}I]GLP-1(7-36)NH_2). Las células que expresan el receptor hGLP-1R se tratan con un compuesto (curva de concentración-respuesta de 20 puntos en DMSO, dilución directa de 2,75 veces de Labcyte Echo, placa Corning de 384 pocillos Cat# 3570) en DMEM (Gibco Cat# 31053) suplementado con 1X de GlutaMAX™ (Gibco Cat# 35050), caseína bovina al 0,1 % (Sigma C4765-10ML), 250 µM IBMX (3-isobutil-1-metilxantina, Acros Cat# 228420010) y 20 mM de HEPES (Gibco Cat# 15630) en un volumen de ensayo de 20 µL (concentración final de DMSO es 0,5 %). Después de una incubación de 30 minutos a 37 °C, el incremento resultante en AMPc intracelular se determina cuantitativamente mediante el uso del kit de ensayo CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Brevemente, los niveles de AMPc dentro de la célula se detectan al adicionar el conjugado cAMP-d2 en el tampón de lisis celular (10 µL) seguido del anticuerpo anti-cAMP-Criptato de Eu^{3+}, también en el tampón de lisis celular (10 µL). El ensayo competitivo resultante se incuba durante al menos

60 minutos a RT y luego se detecta mediante el uso de un instrumento PerkinElmer Envision® con una excitación a 320 nm y una emisión a 665 nm y 620 nm. Las unidades Envision (emisión a 665nm/620nm*10 000) son inversamente proporcionales a la cantidad de AMPc presente y se convierten a nM de AMPc por pocillo mediante el uso de una curva estándar de AMPc. La cantidad de AMPc generado (nM) en cada pocillo se convierte en un por ciento de la respuesta máxima observada con GLP-1(7-36)NH_2 humano. El valor relativo de EC_{50} y el máximo porcentual ($E_{máx}$) se derivan por análisis de regresión no lineal mediante el uso del por ciento de respuesta máxima *vs*. la concentración de compuesto añadido, ajustado a una ecuación logística de cuatro parámetros. Los datos de EC_{50} y $E_{máx}$ cuando los compuestos de los Ejemplos 1-6 se prueban en el ensayo de AMPc descrito anteriormente, mediante el uso de las células HEK293 que expresan 581 y 104 fmol/mg de GLP-1R se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Estos datos indican que los compuestos de los Ejemplos 1-6 son agonistas del receptor GLP-1 humano.

Tabla 2. Línea celular HEK293 con 581 fmol/mg de densidad de expresión de GLP-1R, respuesta de AMPc intracelular

Ejemplo	EC_{50} (nM) ± SEM (n)	$E_{máx}$ (%) ± SEM (n)
1	9,33 ± 1,36 nM (n = 6)	99,5 ± 2,53 nM (n = 6)
2	1,14 ± 0,315 nM (n = 6)	104 ± 4,35 (n = 6)
3	3,08 ± 0,379 nM (n = 5)	99 ± 3,69 (n = 5)
4	3,99 ± 0,378 nM (n = 3)	99,2 ± 4 (n = 3)
5	6,45 ± 0,934 nM (n = 3)	105 ± 2,43 (n = 3)
6	20 ± 6,51 (n = 4)	101 ± 3,42 (n = 4)

Tabla 3. Línea celular HEK293 con 104 fmol/mg de densidad de expresión de GLP-1R, respuesta de AMPc intracelular

Ejemplo	EC_{50} (nM) ± SEM (n)	$E_{máx}$ (%) ± SEM (n)
1	20 ± 3,25 (n = 6)	71,4 ± 2,26 nM (n = 6)
2	3,97 ± 0,61 nM (n = 6)	79,2 ± 3,2 nM (n = 6)
3	10 ± 2,3 (n = 5)	81,7 ± 3,86 nM (n = 5)
4	9,59 ± 2,36 nM (n = 3)	78,3 ± 5,1 nM (n = 3)
5	23,6 ± 5,43 nM (n = 3)	76,7 ± 3,88 nM (n = 3)
6	47,7 ± 17,9 nM (n = 4)	80,3 ± 3,1 nM (n = 4)

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal *in vivo* en ratones genéticamente modificados con GLP-1R humano

La potencia de los compuestos ejemplos para disminuir la concentración de glucosa en sangre *in vivo* se determina mediante el uso de ratones que expresan el GLP-1R humano (número de acceso NCBI NP_002053) a partir del locus genético *Glp-1r* de ratón (Jun, LS, y otros, PLoS One. 2014 9: e93746). A ratones que ayunaron durante toda la noche se les administra, por vía oral, el compuesto de prueba solubilizado en Kolliphor® al 10 % (HS15) en polietilenglicol de 400 (PEG400). Una hora después de la dosis, a los animales se les administra glucosa por inyección intraperitoneal (2 g/kg), y los niveles de glucosa en sangre se miden de forma intermitente durante las siguientes dos horas mediante el uso de glucómetros. Se suministra un intervalo de dosis del compuesto de prueba, y se determina el área bajo la curva de los cálculos para cada grupo de dosis y se ajusta a un modelo logístico de cuatro parámetros para calcular la potencia *in vivo* como una ED_{50} con un intervalo de confianza del 95 %. Cuando los compuestos de los Ejemplos 1-3 se probaron en la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal *in vivo* descrita anteriormente, estos exhiben potencia para disminuir la concentración de glucosa en sangre en ratones que expresan el GLP-1R humano con valores de ED_{50} (e intervalo de confianza del 95 %) como se muestra en la Tabla 4, que indica que estos compuestos son potentes agonistas de GLP-1R disponibles por vía oral en ratones.

Tabla 4. Eficacia de disminución de glucosa en sangre en ratones que expresan el GLP-1R humano

Ejemplo	Disminución de la glucosa en sangre ED_{50} (mg/kg)	Intervalo de confianza del 95 %
1	0,09	0,0301-0,2592
2	0,07	0,0246-0,1808
3	0,06	0,013-0,246

Farmacocinética en primates no humanos (NHP):

El compuesto de prueba se administra a monos Cynomolgus machos en ayunas por vía intravenosa (IV) a 0,5 mg/kg (mediante el uso de un volumen de dosis de 1 ml/kg). Se colectan series de muestras de sangre a las 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la dosis para el bolo IV. Después del tratamiento con un coagulante EDTA, se obtiene el plasma mediante centrifugación y se almacena a -70 °C hasta el

análisis mediante LC-MS/MS. La concentración del artículo de prueba se determina en plasma. El análisis no compartimental se usa para calcular el aclaramiento plasmático y el volumen de distribución en estado estacionario. La Tabla 5 muestra los datos farmacocinéticos de los compuestos de los Ejemplos 1-3 en este ensayo. Estos datos, en parte, se usan para informar las proyecciones del mecanismo de PK humano, los cuales sugieran un perfil farmacocinético humano para respaldar la dosificación una vez al día.

Tabla 5. Datos farmacocinéticos en monos Cynomolgus

Ejemplo	Aclaramiento plasmático (ml/min/kg)	Volumen de distribución (l/kg)	Vehículo
1	13	1,2	A
2	11	1,1	A
3	6	1,1	B

*Vehículo A: DMSO al 5 % y 95 % (CAPTISOL® al 20 % (p/v) en agua; Vehículo B: captisol al 20 % (p/v) en agua + 1 equivalente molar de NaOH

Ensayo de actividad enzimática de la fosfodiesterasa 10 (PDE10)

Para generar la proteína fosfodiesterasa 10A1 (PDE10A1), un clon PDE10A1 de longitud completa correspondiente al GenBank ID AAD32595.1 se clona en pFastBac1 (Invitrogen). La proteína PDE10A1 con una etiqueta FLAG C-terminal se expresa por infección baculoviral de células de insecto y se purifica mediante el uso de M2-agarosa anti-FLAG (Sigma) y cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) y se almacena a -80 °C en pequeñas alícuotas (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %).

Las actividades de la enzima PDE10A1 se miden con un ensayo de centelleo de proximidad basado en silicato de itrio (SPA) que detecta monofosfatos de nucleótidos radiactivos pero no monofosfatos cíclicos. El tampón de ensayo está compuesto por Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 8 mM, EDTA 3,4 mM y BSA al 0,1 % (Sigma). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos (3706, Corning) en un volumen total de 50 μl: que comprende 24 μl de enzima PDE10A1, 1 μl del compuesto de prueba y 25 μl del nucleótido cíclico. Los compuestos de prueba se diluyen en DMSO puro mediante el uso de curvas de respuesta a concentración de diez puntos con un factor de dilución de 3 veces y 1 μl se dispensa acústicamente en placas de ensayo mediante el uso del Echo555 (Labcyte). 24 μl de la proteína PDE10A1 se incuban con 1 μl del

compuesto durante 30 min antes de iniciar la reacción por la adición del sustrato [8-^{3}H]-cGMP (6,5 Ci/mmol, Perkin Elmer). La concentración final de componentes es 70 pM de PDE10A1, 80 nM (^{3}H-cGMP) y DMSO al 2 % en tampón de ensayo. La concentración máxima del compuesto en la mezcla de reacción es de 10 μM. Las reacciones se incuban durante 60 minutos a RT antes de inactivar y la adición de 400 mg/por pocillo de perlas de SPA (RPNQ0150, Perkin Elmer). La radiactividad asociada a la perla (producto) se cuantifica 12 h después con un contador Microbeta (Perkin Elmer). Los datos se normalizan a % de inhibición y los valores de IC_{50} se calculan mediante el uso de la ecuación logística de 4 parámetros como se describe en (Campbell, RM; Dymshitz, J.; Eastwood, BJ; y otros, "Data Standardization for Results Management." In: Sittampalam, G.S.; Grossman, A.; Brimacombe, K.; y otros; eds. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Co. y el Centro Nacional para el Avance de las Ciencias Translacionales; 2004.) . La Tabla 6 muestra la actividad de los compuestos de los Ejemplos 1-4 en este ensayo. Estos datos muestran que los compuestos de los Ejemplos 1 al 4 tienen una afinidad de unión débil a PDE10A, lo cual indica un riesgo de toxicidad reducido.

Tabla 6. Potencia *in vitro* para la inhibición de PDE10A1

Ejemplo	IC_{50} (μM), n = 1
1	>10
2	7,43
3	>10
4	5,41

Ensayo de afinidad de unión de radioligando al canal hERG K^+ humano

La afinidad de los compuestos por el canal hERG K^+ humano en las células HEK-293 transfectadas se evalúa en un ensayo de unión de radioligandos como se describe en la presente descripción. Los homogeneizados de la membrana celular (aproximadamente 40 μg de proteína) se incuban durante 60 minutos a 22 °C con [^{3}H]dofetilida 3 nM en ausencia o presencia del compuesto de prueba en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 10 KCl mM y $MgCl_2$ 1 mM. El ensayo se lleva a cabo en un formato de placa de 96 pocillos con un volumen de 200 μL, que contiene un máximo de DMSO al 1 % a partir de la solubilización inicial del compuesto de prueba. Después de la incubación, las muestras se filtran rápidamente al vacío a través de filtros de fibra de vidrio (GF/B, Packard) previamente empapadas con PEI al 0,3 % y enjuagadas varias veces con Tris-HCl 50 mM helado, KCl 10 mM y $MgCl_2$ 1 mM

mediante el uso de un colector de células de 96 muestras (Unifilter, Packard). Los filtros se secan y luego se cuentan para determinar la radiactividad en un contador de centelleo (Topcount, Packard) mediante el uso de un cóctel de centelleo (Microscint 0, Packard). La Tabla 7 muestra la actividad de los Ejemplos 1-3 en este ensayo, expresada como un porcentaje de inhibición de la unión específica del radioligando de control. Estos datos muestran que los compuestos de los Ejemplos 1 a 3 tienen una actividad inhibidora de hERG débil, lo que indica un riesgo de toxicidad reducido.

Tabla 7. Por ciento de inhibición de afinidad por radioligando del canal hERG K^+ humano

Ejemplo	Por ciento de inhibición (%) a una concentración de 100 µM del compuesto, n = 1
1	0
2	54
3	37