

INHIBIDORES DE KRAS G12C

La presente invención se refiere a compuestos heterocíclicos tricíclicos novedosos y sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, a composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos y las sales heterocíclicos tricíclicos, y a métodos para usar los compuestos y las sales para tratar tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovario, colangiocarcinoma o cáncer de esófago.

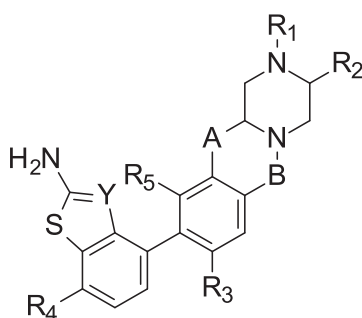
La vía de transducción de señal de MAPK/ERK transmite estímulos extracelulares al núcleo, lo que regula así diversas respuestas celulares, que incluyen la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celulares. La proteína KRas es un iniciador de la vía de transducción de señal de MAPK/ERK y funciona como un interruptor responsable de inducir la división celular. En su estado inactivo, KRas se fija al difosfato de guanosina (GDP), y envía eficazmente una señal negativa para suprimir la división celular. En respuesta a una señal extracelular, KRas se activa alostéricamente, lo que permite el intercambio de nucleótidos de GDP por trifosfato de guanosina (GTP). En su estado activo fijado a GTP, KRas recluta y activa las proteínas necesarias para la propagación de la señalización inducida por el factor de crecimiento, así como otros receptores de señalización celular. Los ejemplos de las proteínas reclutadas por KRas-GTP son c-Raf y PI3-quinasa. KRas, como GTP-asa, convierte nuevamente el GTP fijado en GDP, lo que vuelve así a un estado inactivo, y vuelve a propagar señales para suprimir la división celular. Las mutaciones de ganancia de función de KRas exhiben un mayor grado de fijación de GTP y una capacidad disminuida para convertir GTP en GDP. El resultado es un aumento de la señal de MAPK/ERK que promueve el crecimiento de células cancerosas. Las mutaciones sin sentido de KRas en el codón 12 son las mutaciones más comunes y disminuyen notablemente la actividad de la GTPasa.

Se han identificado mutaciones oncogénicas de KRas en aproximadamente el 30 % de los tipos de cáncer humanos y se ha demostrado que activan múltiples vías de transducción de señal corriente abajo. A pesar de la prevalencia de las mutaciones de KRas, ha sido una diana terapéutica difícil. (Cox, A.D. *Drugging the Undruggable RAS: Mission Possible?* Nat. Rev. Drug Disc. 2014, 13, 828-851; Pylayeva-Gupta, y *et al.* *RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web.* Nat. Rev. Cancer 2011, 11, 761-774).

WO2015/054572 y WO2016/164675 describen ciertos derivados de quinazolina capaces de fijarse a KRas G12C. WO2016/044772 también divulga métodos para usar dichos derivados de quinazolina. WO2020/0081282 divulga inhibidores de KRas G12C. WO2018/206539 y WO2020/178282 divulgan ciertos compuestos heteroarilo capaces de fijarse a las proteínas KRas G12C RAS.

Aún existe la necesidad de proporcionar inhibidores de KRas de molécula pequeña alternativos. En particular, existe una necesidad de proporcionar inhibidores de KRas más potentes y administrables por vía oral que sean útiles para tratar el cáncer. Más particularmente, existe una necesidad de proporcionar inhibidores de moléculas pequeñas que inhiban específicamente la actividad de KRas GTP. También existe una necesidad de proporcionar inhibidores de KRas de molécula pequeña que exhiban una mayor eficacia en una actividad inhibidora de KRas igual o reducida. Además, existe un deseo de proporcionar inhibidores de KRas que exhiban mejores propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas. También existe una necesidad de proporcionar inhibidores de KRas más potentes que exhiban una mayor eficacia con efectos inadecuados o no deseados reducidos o minimizados. La presente invención aborda una o más de estas necesidades al proporcionar inhibidores de KRas novedosos.

La presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I:



Fórmula I

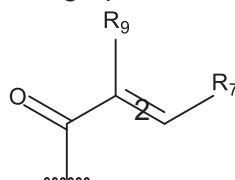
o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de aquel, en donde:

A es $-\text{OCH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$, o $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2-$;

B es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(\text{O})-$;

Y es $-\text{C}(\text{CN})-$ o $-\text{N}-$;

R_1 es $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CR}_8$, o un grupo de la fórmula



;

R₂ es H, metilo, o -CH₂CN;

R₃ y R₅ son cada uno independientemente H, halógeno, -C₀₋₃ alquil-ciclopropilo, -C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀, o -O-C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀;

R₄ es H, halógeno, o -C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀;

R₆ es H, o -C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀;

R₇ es H, halógeno, -NR₁₁R₁₂, -CH₂NR₁₁R₁₂, -C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀ o R₁₃, -C₀₋₃ alquilo ciclopropilo, o -O-C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀ o R₁₃;

R₈ es H, -C₁₋₄ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀, o -C₃₋₆ cicloalquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀;

R₉ es H, halógeno, -CN, -C₀₋₃ alquil-C₃₋₆ cicloalquilo, o C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido 1-3 veces con R₁₀;

R₁₀ es independientemente en cada aparición halógeno, oxígeno, hidroxilo, -C₁₋₄ alquilo, o -O-C₁₋₄ alquilo;

R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente H, -C₁₋₄-alquilo, o C₁₋₄ heteroalquilo, en donde R₁₁ y R₁₂ pueden combinarse para formar un heterocicloalquilo; y

R₁₃ es independientemente en cada aparición -N-C₁₋₄ alquilo.

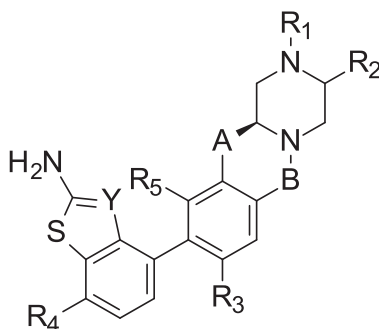
Como se usa en la presente, el término halógeno significa fluoro (F), cloro (Cl), bromo (Br), o yodo (I). Como se usa en la presente, el término alquilo significa radicales de hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada saturados de uno a seis átomos de carbono, por ejemplo, "-C₁₋₆ alquilo". Los ejemplos de alquilos incluyen, entre otros, metilo, etilo, propilo, 1-propilo, isopropilo, butilo, pentilo y hexilo. Como se usa en la presente, el término heteroalquilo significa radicales hidrocarbonados monovalentes de cadena lineal o ramificada saturados que contienen de dos a cinco átomos de carbono y al menos un heteroátomo, por ejemplo, "-C₁₋₄ heteroalquilo". Como se usa en la presente, el término cicloalquilo significa moléculas cíclicas monovalentes saturadas con tres a seis átomos de carbono, por ejemplo, "-C₃₋₆ cicloalquilo". Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Como se usa en la presente, el término cicloheteroalquilo significa moléculas cíclicas monovalentes saturadas con dos a cinco

átomos de carbono y al menos un heteroátomo, por ejemplo, "C₃₋₆ cicloheteroalquilo". Ejemplos de grupos cicloheteroalquilo incluyen, entre otros, pirrolidina, piperidina, imidazolidina, pirazolidina, y piperazina.

En los casos en que se indica un cero, por ejemplo, -C₀₋₃ alquilo-C₃₋₆-cicloalquilo, el componente alquilo del grupo sustituyente puede estar ausente, por lo tanto, si R₉ de la Fórmula I es un grupo ciclopropilo sin alquilo plomo, el sustituyente se describiría por el sustituyente -C₀₋₃ alquilo-ciclopropilo como se describe para R₉ (es decir, el grupo sustituyente sería -C₀-ciclopropilo).

Con respecto a R₁₁ y R₁₂, los dos grupos pueden combinarse con el nitrógeno al que están unidos cuando la química permite formar un heterocicloalquilo. Ejemplos de dichos grupos heterocicloalquilo incluyen, entre otros, piperidina, piperazina, pirimidina, y morfolina.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula Ia



Fórmula Ia

donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, A, B e Y son como se definieron anteriormente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o Ia en donde A es -OCH₂-, -N(R₆)CH₂-, -OCH₂CH₂-, -N(R₆)CH₂CH₂-, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o Ia en donde A es -OCH₂- o -OCH₂CH₂-, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o Ia en donde A es -OCH₂CH₂- o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

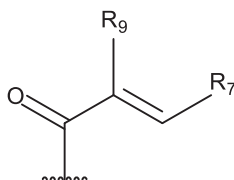
En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o Ia en donde B es -C(O), o una sal aceptable desde el

punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -C(CN)-, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -N-, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₁ es -CN, -C(O)C≡CR₈, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₁ es un grupo de la fórmula



o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₂ es H o metilo, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₂ es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₃ es H, halógeno, metilo, metoxi, etilo, isopropilo, o ciclopropilo, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₃ es halógeno, (preferentemente F o Cl), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₄ es H o halógeno, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R₄ es H o F, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un

compuesto de la Fórmula I o la en donde R_5 es halógeno, (preferentemente Cl), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_6 es H o CH_3 , o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_9 es H, F, Cl, $-CH_2F$, $-CF_3$, o $-CH_2OH$, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_9 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_7 es H, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$, o $-CH_2$, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_7 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

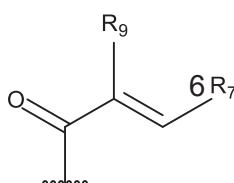
En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_9 es H y R_7 es H, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$, o $-CH_2$, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_9 es H, F, Cl, $-CH_2F$, $-CF_3$, o $-CH_2OH$ y R_7 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_7 y R_9 son ambos H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

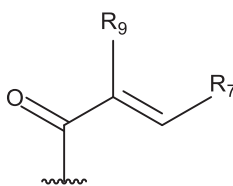
En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_1 es $-CN$, $-C(O)C\equiv CR_8$ y R_8 es H, metilo, $-CH_2F$, o $-CH_2OH$, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_1 es un grupo de la fórmula



y R_7 y R_9 son ambos H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_1 es un grupo de la fórmula



y R_7 es ter-butilo y R_9 es $-CN$, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-OCH_2-$, $-N(R_6)CH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, y B es $-C(O)-$, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-OCH_2-$ o $-OCH_2CH_2-$ y B es $-C(O)-$ o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-OCH_2CH_2-$ y B es $-C(O)-$ o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-OCH_2-$, $-N(R_6)CH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, B es $-C(O)-$ y R_2 es H o $-CH_3$, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-OCH_2-$ o $-OCH_2CH_2-$, B es $-C(O)-$ y R_2 es H o metilo, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-OCH_2CH_2-$, B es $-C(O)-$ y R_2 es H o metilo, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona

un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-\text{OCH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{N}(\text{R}_6)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, B es $-\text{C}(\text{O})-$ y R_2 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-\text{OCH}_2-$ o $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, B es $-\text{C}(\text{O})-$ y R_2 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, B es $-\text{C}(\text{O})-$ y R_2 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es OCH_2CH_2- y R_2 es H o metilo, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ y R_2 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde B es $-\text{C}(\text{O})-$ y R_2 es H o metilo, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde B es $-\text{C}(\text{O})-$ y R_2 es H, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_3 y R_5 se seleccionan cada uno independientemente de H, halógeno o metilo, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_3 o R_5 son halógeno, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_3 y R_5 son halógeno, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde R_3 y R_5 se seleccionan cada uno independientemente de F o Cl, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -C(CN)- y R₄ es H o halógeno (preferentemente F o Cl), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -N- y R₄ H o es halógeno, (preferentemente F o Cl), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

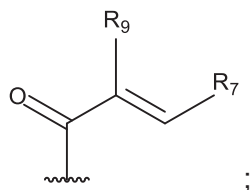
En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -C(CN)-, y R₃ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de metilo o halógeno, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -C(CN)-, y R₃ y R₅ son cada uno halógeno (preferentemente F o Cl), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -N-, y R₃ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de metilo o halógeno, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aun una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde Y es -N-, R₃ y R₅ son cada uno halógeno (preferentemente F o Cl), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En aún una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o la en donde A es -OCH₂-, -OCH₂CH₂-, -N(R₆)CH₂CH₂-, -CH₂OCH₂-, o -CH₂N(R₆)CH₂; B es -CH₂- o -C(O)-; Y es -C(CN)- o -N-; R₁ es -CN, -C(O)C≡CR₈, o un grupo de la fórmula

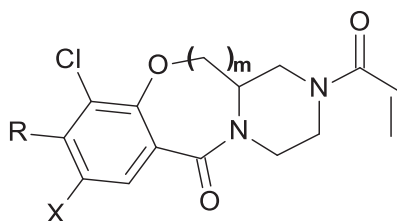


R₂ es H o metilo; R₃ y R₅ son cada uno H, F, Cl o metilo; R₄ es H o F; R₆ es H o metilo; R₇ es H, -CHF₂, -CH₂F, -CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂N(CH₃)₂, -CH₂-morfolina o ter-butilo; R₈ es metilo, -CH₂F o -CH₂OH; y R₉ es H, F, Cl, -CH₂F, -CF₃, -CH₂OH o CN; o

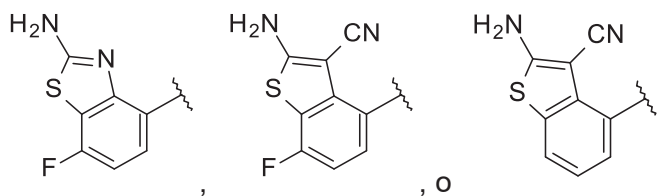
una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En otra forma de realización más, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o la en la que A es $-\text{OCH}_2-$ o $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$; B es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(\text{O})-$; Y es $-\text{C}(\text{CN})-$ o $-\text{N}-$; R_2 , R_7 , y R_8 son cada uno H; R_4 es H o halógeno; R_3 y R_5 son cada uno halógeno; o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

La presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula II:



Fórmula II



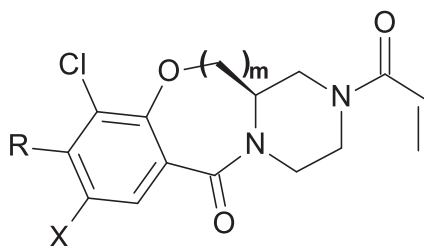
en donde R es

X es Cl o F;

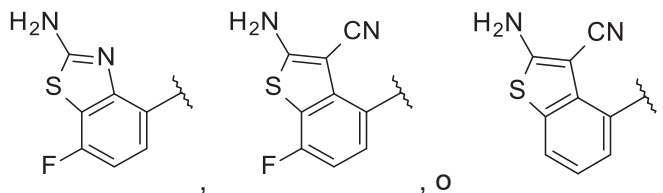
y m es 1 o 2.

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

La presente invención también proporciona un compuesto de la Fórmula IIa:



Fórmula IIa



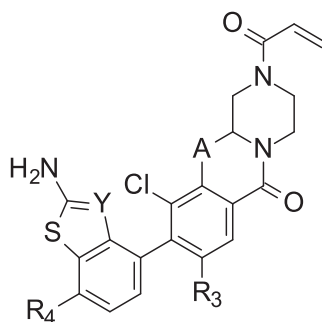
en donde R es

X es Cl o F;

y m es 1 o 2.

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

Otra forma de describir el compuesto de la Fórmula II es con la Fórmula Ib:



Fórmula Ib

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en donde:

A es $-\text{OCH}_2-$ o $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$;

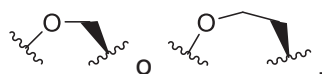
Y es $-\text{C}(\text{CN})-$ o $-\text{N}-$;

R_3 es Cl o F;

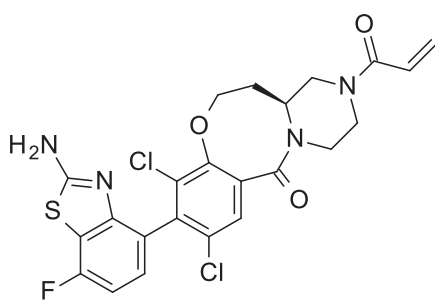
R_4 es H o F cuando Y es C (CN); y

R_4 es F cuando Y es N.

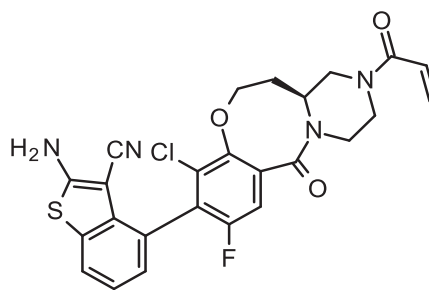
Otra forma de describir el compuesto de la Fórmula Ia es con la Fórmula Ib, en donde A es



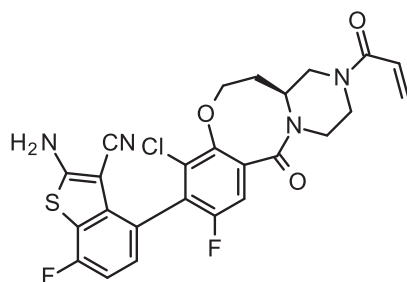
La presente invención también proporciona un compuesto seleccionado de cualquiera de las Fórmulas III-VI a continuación:



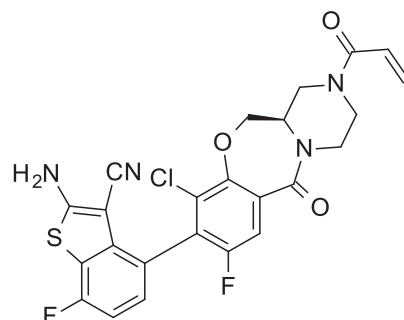
Fórmula III



Fórmula IV



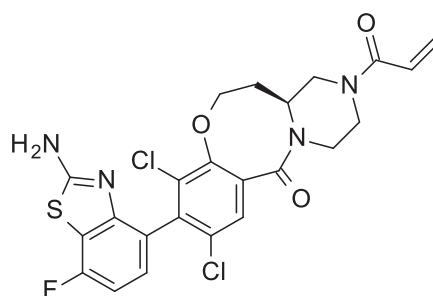
Fórmula V



Fórmula VI

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

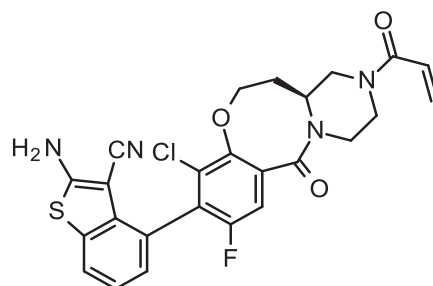
En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula III que es:



Fórmula III,

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

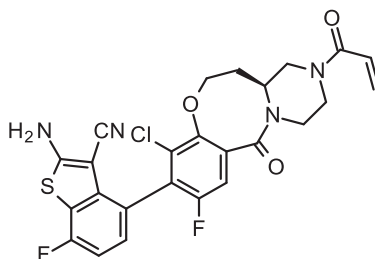
En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula IV que es:



Fórmula IV,

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

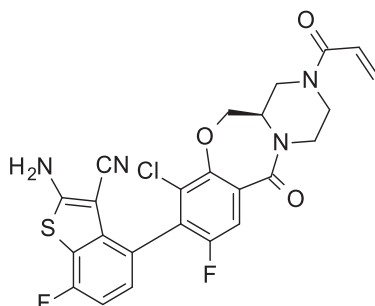
En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula V que es:



Fórmula V,

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula VI que es:



Fórmula VI,

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y un portador, diluyente o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En varias formas de realización, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovario, colangiocarcinoma, o cáncer de esófago. En formas de realización preferidas, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas o cáncer colorrectal. Aun en formas de realización de mayor preferencia, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En aun otra forma, la presente invención comprende un método para tratar el

cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En aun otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas mutante, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, la presente invención comprende un método para tratar tipos de cáncer que tienen KRas G12C mutante de otros orígenes.

La presente invención también proporciona un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, que tiene una mutación KRAS G12C que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

La presente invención también proporciona un método para modular una enzima KRas G12C mutante en un paciente que lo necesita, mediante la administración de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. Preferentemente, el método comprende inhibir una enzima KRas G12C mutante humana.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, en donde el paciente tiene un tipo de cáncer que se determinó que expresa la proteína mutante KRas G12C. El método comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. El estado de mutación de G12C de una o más células cancerosas se puede determinar mediante varios ensayos conocidos en la técnica. Típicamente, se obtienen una o más biopsias que contienen una o más células cancerosas, y se someten a secuenciación y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También se puede usar ADN libre de células en circulación, por ejemplo, en tipos de cáncer avanzados. Los ejemplos no limitativos de secuenciación y técnicas de PCR utilizadas para determinar el estado de mutación (por ejemplo, estado de mutación de G12C, en una o más células cancerosas o en ADN libre de células en

circulación) incluyen secuenciación directa, secuenciación de última generación, reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), PCR múltiple y pirosecuenciación y perfil de múltiples analitos.

La presente invención también proporciona un compuesto o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este de acuerdo con cualquiera de la Fórmula I-VI para su uso en tratamiento. El compuesto o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, se puede usar para tratar el cáncer. Preferentemente, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovario, colangiocarcinoma, o cáncer de esófago. En formas de realización preferidas, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas o cáncer colorrectal. Aun en formas de realización de mayor preferencia, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. En otras formas de realización, el cáncer tiene una o más células cancerosas que expresan la proteína KRas G12C mutante. Preferentemente, el cáncer se selecciona de: cáncer de pulmón de células no pequeñas KRas G12C mutante, cáncer colorrectal KRas G12C mutante y cáncer de páncreas KRas G12C mutante. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas, y una o más células expresan proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer colorrectal, y una o más células expresan proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas y una o más células expresan proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el paciente tiene un tipo de cáncer que se determinó que tenía una o más células que expresan la proteína mutante KRas G12C antes de la administración del compuesto o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. Preferentemente, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovario, colangiocarcinoma, o cáncer de esófago. En formas de realización preferidas, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas o cáncer colorrectal. Aun en formas de realización de mayor preferencia, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. En otras formas de realización, el cáncer tiene una o más células cancerosas que expresan la proteína KRas G12C mutante. Preferentemente, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón de células no

pequeñas KRas G12C mutante, cáncer colorrectal KRas G12C mutante y cáncer de páncreas KRas G12C mutante.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y uno o más de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de CD4/CDK6 o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un inhibidor de EGFR o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un inhibidor de ERK o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un agente de platino y pemetrexed, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en el que el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso en combinación simultánea, separada o secuencial con uno o más de un inhibidor de PD-1 o PD-L1, un inhibidor de CD4/CDK6 o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un inhibidor de EGFR o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un inhibidor de ERK o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un agente de platino y pemetrexed, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en el tratamiento del cáncer. La presente invención también proporciona una combinación que comprende compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y uno o más de un inhibidor de PD-1 o PD-L1, un inhibidor de CD4/CDK6 o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un inhibidor de EGFR o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un inhibidor de ERK o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, un agente de platino y pemetrexed, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en el tratamiento del cáncer.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y un inhibidor de PD-1 o PD-L1, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este,

para uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un inhibidor de PD-1 o PD-L1, para uso en el tratamiento del cáncer. La presente invención también proporciona una combinación que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y un inhibidor de PD-1 o PD-L1, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer. En una forma de realización, el compuesto es un compuesto de la Fórmula I-VI o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es pembrolizumab. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es nivolumab. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es cimiplimab. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es sentilimab. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es atezolizumab. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es avelumab. En otra forma de realización, los PD-1 o PD-L1 inhibidor es durvalumab. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es lodapilimab. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas mutante, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, la presente invención comprende un método para tratar tipos de cáncer que tienen KRas G12C mutante de otros orígenes.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, inhibidor de CDK4/CDK6, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un inhibidor de CDK4/CDK6, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona una

combinación que comprende compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y un inhibidor de CDK4/CDK6, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso simultáneo, separado, o secuencial en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. En otra forma de realización, el inhibidor de CDK4/CDK6 es abemaciclib. En otra forma de realización, el inhibidor de CDK4/CDK6 es palbociclib. En otra forma de realización, el inhibidor de CDK4/CDK6 es ribociclib. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas mutante, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, la presente invención comprende un método para tratar tipos de cáncer que tienen KRas G12C mutante de otros orígenes.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, inhibidor de EGFR, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un inhibidor de EGFR, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para el tratamiento del cáncer. La presente invención también proporciona una combinación que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este y un inhibidor de EGFR, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer. En una forma de realización, el compuesto es un compuesto de la Fórmula I-VI o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En otra forma de realización, el inhibidor de EGFR es erlotinib. En otra forma de realización, el inhibidor de EGFR es afatinib. En otra forma de realización, el inhibidor de EGFR es gefitinib. En otra forma de realización, el inhibidor

de EGFR es cetuximab. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas mutante, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, la presente invención comprende un método para tratar tipos de cáncer que tienen KRas G12C mutante de otros orígenes.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, inhibidor de ERK, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un inhibidor de ERK, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona una combinación que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este y un inhibidor de ERK, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer. En una forma de realización, el compuesto es un compuesto de la Fórmula I-VI o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En otra forma de realización, el inhibidor de ERK es LY3214996. En otra forma de realización, el inhibidor de ERK es LTT462. En otra forma de realización, el inhibidor de ERK es KO-947. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas mutante, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, la presente

invención comprende un método para tratar tipos de cáncer que tienen KRas G12C mutante de otros orígenes.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y un agente de platino, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un agente de platino, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona una combinación que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y un agente de platino, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer. En una forma de realización, el compuesto es un compuesto de la Fórmula I-VI o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En otra forma de realización, el agente de platino es cisplatino. En otra forma de realización, el agente de platino es carboplatino. En otra forma de realización, el agente de platino es oxaliplatino. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas mutante, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, la presente invención comprende un método para tratar tipos de cáncer que tienen KRas G12C mutante de otros orígenes.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y pemetrexed, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para uso en

combinación simultánea, separada o secuencial con pemetrexed, para el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. La presente invención también proporciona una combinación que comprende compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-VI, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y pemetrexed, para uso simultáneo, separado, o secuencial en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína KRas G12C mutante. En una forma de realización, el compuesto es un compuesto de la Fórmula I-VI o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, también se administra al paciente un agente de platino. En otra forma de realización, el agente de platino es cisplatino. En otra forma de realización, el agente de platino es carboplatino. En otra forma de realización, el agente de platino es oxaliplatino. En otra forma de realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, el cáncer es cáncer de páncreas mutante, en donde el cáncer tiene una o más células que expresan una proteína mutante KRas G12C. En otra forma de realización, la presente invención comprende un método para tratar tipos de cáncer que tienen KRas G12C mutante de otros orígenes.

Como se usa en la presente, la expresión "sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a una sal de un compuesto que se considera aceptable para uso clínico y/o veterinario. Se pueden encontrar ejemplos de sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico y metodología común para prepararlas en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" P. Stahl, *et al.*, 2.^a edición revisada, Wiley-VCH, 2011 y S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66(1), 1-19.

Las composiciones farmacéuticas para la presente invención pueden prepararse con aditivos aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Como se usa en la presente para las composiciones farmacéuticas, la expresión "aditivos aceptables desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a uno o más portadores, diluyentes y excipientes que son compatibles con los otros aditivos de la composición o formulación y no son perjudiciales para el paciente. Se pueden encontrar ejemplos de composiciones farmacéuticas y procesos para su preparación en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Loyd, V., *et al.* Eds., 22.^a edición, Mack Publishing

Co., 2012. Los ejemplos no limitativos de portadores, diluyentes y excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen los siguientes: solución salina, agua, almidón, azúcares, manitol y derivados de sílice; agentes aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina y polivinilpirrolidona; caolín y bentonita; y polietilglicoles.

Como se usa en la presente, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad, es decir, una dosis, que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o enfermedad, tal como una lesión cancerosa o progresión del crecimiento celular anormal y/o división celular. El médico tratante, como persona del oficio de nivel medio, puede determinar con facilidad una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas convencionales y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En general, las dosis por día de tratamiento se encuentran en un rango de entre alrededor de 1 mg por día o dos veces por día y 1000 mg por día o dos veces por día, con mayor preferencia, 100 mg por día o dos veces por día y 900 mg por día o dos veces por día. Los factores considerados en la determinación de una cantidad o dosis eficaz de un compuesto incluyen: si se administrará el compuesto o su sal; la administración conjunta de otros agentes, si se utilizan; el tipo de paciente a tratar; el tamaño, la edad y la salud general del paciente; el grado de afectación o estadio y/o la gravedad del trastorno; la respuesta del paciente individual; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; y el uso de otros medicamentos concomitantes.

Un médico tratante, un veterinario u otro profesional de la salud podrán determinar una cantidad eficaz del compuesto para el tratamiento de un paciente que lo necesita. Las composiciones farmacéuticas preferidas se pueden formular como un comprimido o una cápsula para administración oral, una solución para administración oral o una solución inyectable. El comprimido, la cápsula o la solución pueden incluir un compuesto de la presente invención en una cantidad eficaz para tratar a un paciente que necesita tratamiento para el cáncer.

Como se usa en la presente, las expresiones "tratar" o "tratamiento" incluyen ralentizar, reducir o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno o afección existente, que puede incluir específicamente ralentizar el crecimiento de una lesión cancerosa o la progresión del crecimiento celular anormal y/o división celular.

Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un mamífero que necesita un tratamiento. Preferentemente, el paciente es un ser humano que necesita un tratamiento para el cáncer, por ejemplo, tipos de cáncer que tienen KRas G12C

mutante.

Algunas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "AIBN" se refiere a azobisisobutironitrilo; "Boc-Gly-OH" se refiere a N-(ter-butoxicarbonil)glicina; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIEA" se refiere a N,N-diisopropiletilamina; "DMAP" se refiere a 4-dimetilaminopiridina; "DMEM" se refiere al medio Eagle modificado de Dulbecco; "DMF" se refiere a N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "ADN" se refiere a ácido desoxirribonucleico; "DPEPhosPdCl₂" se refiere a diclorobis(difenilfofinofenil)éter paladio (II); "DTT" se refiere a ditioneitol; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "EGTA" se refiere a ácido etilenglicol-bis(b-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético; "ELISA" se refiere a un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima; "ERK" se refiere a quinasas reguladas por señales extracelulares; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "GDP" se refiere a difosfato de guanosina; "GTP" se refiere a trifosfato de guanosina; "HPLC" se refiere a cromatografía de líquidos de alta resolución; "HRP" se refiere a peroxidasa de rábano picante; "IPA" se refiere a alcohol isopropílico; "IPAm" se refiere a isopropilamina; "LC-ES/MS" se refiere a espectrometría de masas mediante cromatografía líquida-electrospray; "LC-MS" se refiere a cromatografía de líquidos - espectrometría de masas; "MAPK" se refiere a proteína quinasas activadas por mitógenos; "MeOH" se refiere a metanol; "NaOMe" se refiere a metóxido de sodio; "NBS" se refiere a N-bromosuccinimida; "NCS" se refiere a N-clorosuccinimida; "NMP" se refiere a 1-metilpirrolidin-2-ona; "PCR" se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa; "RPMI" se refiere a Roswell Park Memorial Institute; "SCX" se refiere a un fuerte intercambio catiónico; "TEA" se refiere a trietilamina; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; y "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

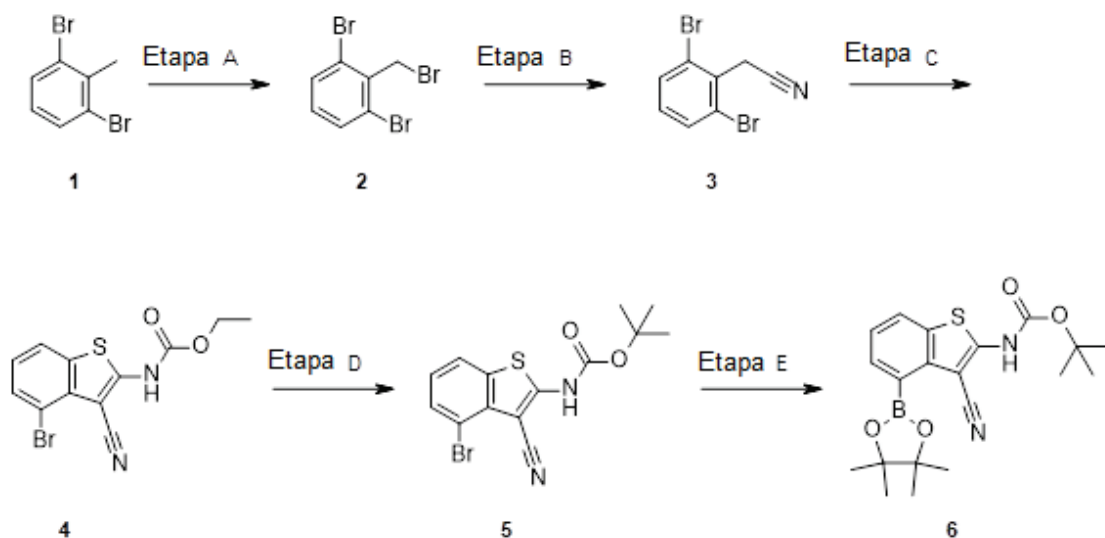
Los isómeros, enantiómeros, diastereómeros y atropisómeros individuales se pueden separar o resolver en cualquier momento conveniente en la síntesis de compuestos enumerados a continuación, a través de métodos, tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véanse, por ejemplo, J. Jacques, *et al.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). La presente invención incluye ciertos compuestos, que son atropisómeros y que pueden existir en diferentes conformaciones o como rotómeros diferentes. Los atropisómeros son compuestos, que existen en diferentes conformaciones que surgen de la rotación restringida alrededor de un enlace simple. Los atropisómeros pueden

aislarse como especies químicas separadas si la barrera de energía para la rotación alrededor del enlace simple es lo suficientemente alta y la velocidad de interconversión es lo suficientemente lenta como para permitir que los rotómeros individuales se separen entre sí. La presente invención contempla todos los isómeros, enantiómeros, diastereómeros y atropisómeros divulgados en la presente o que podrían prepararse utilizando los compuestos divulgados en la presente.

Un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-VI se convierte fácilmente en, y puede aislarse como, una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. La formación de sal puede ocurrir tras la adición de un ácido aceptable desde el punto de vista farmacéutico para formar la sal de adición ácida. Las sales también pueden formarse de manera simultánea tras la desprotección de un nitrógeno u oxígeno, es decir, mediante la eliminación del grupo protector. Se pueden encontrar ejemplos, reacciones y condiciones para la formación de sal en Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); y Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977).

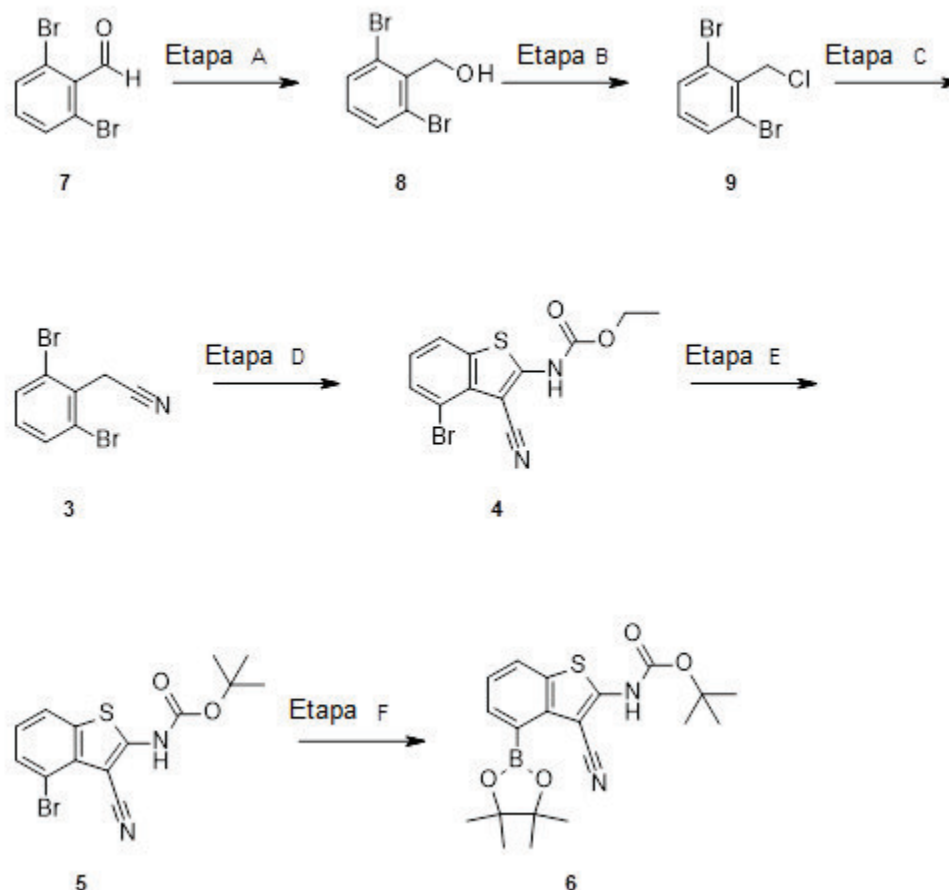
Los compuestos de la presente invención, o las sales de estos, se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos, algunos de los cuales se ilustran en la sección de preparaciones y ejemplos a continuación. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras, o en combinación con etapas de diferentes vías, para preparar compuestos o sales de la presente invención. Los productos de cada etapa en las siguientes preparaciones pueden recuperarse mediante métodos convencionales, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización.

Esquema 1



El Esquema 1, etapa A, representa la bromación del compuesto (1) utilizando NBS y AIBN en un solvente adecuado tal como CCl_4 para obtener el compuesto (2). La etapa B muestra la sustitución nucleófila del compuesto (2) utilizando cianuro de potasio a reflujo en un sistema solvente adecuado tal como EtOH y agua para obtener el compuesto (3). La adición de isotiocianato de etoxycarbonilo al compuesto (3) utilizando hidruro de sodio en un solvente adecuado tal como DMF y la posterior ciclación al compuesto (4) se muestra en la etapa C. La desprotección básica del compuesto (4) con NaOH acuoso en DMSO a reflujo y posterior re-protección utilizando dicarbonato de di-*ter*-butilo con una base adecuada como DIEA y DMAP catalítica en un sistema solvente como THF y DMF para obtener el compuesto (5) se representa en la etapa D. La etapa E muestra la reacción del bromo del compuesto (5) con bis(pinacolato)diboron utilizando una base adecuada como acetato de potasio y un sistema catalizador-ligando como acetato de paladio y 1,1'-bis (diisopropilfosfino)ferroceno en un solvente adecuado como 1,4-dioxano para obtener el compuesto (6). Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que se podría utilizar una variedad de combinaciones de catalizador-ligando para producir esta reacción.

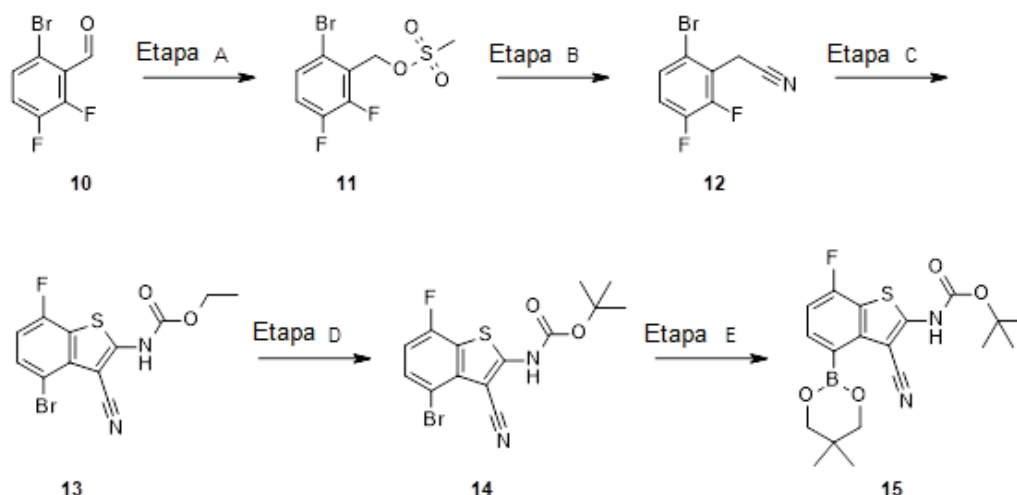
Esquema 2



El Esquema 2 representa una vía alternativa para la síntesis del compuesto (6). La etapa A representa la reducción del benzaldehído (7) utilizando un agente reductor apropiado como borohidruro de sodio en un solvente apropiado como EtOH para obtener el compuesto (8). La etapa B muestra la cloración del compuesto (8) utilizando cloruro de tionilo en un solvente apropiado tal como DCM para obtener el compuesto (9). La etapa C representa la sustitución nucleofílica del compuesto (9) utilizando cianuro de potasio en un solvente apropiado como DMSO para obtener el compuesto (3). La adición de isotiocianato de etoxicarbonilo al compuesto (3) utilizando hidruro de sodio en un solvente adecuado tal como DMF y la posterior ciclación utilizando L-prolina y CuI para obtener el compuesto (4) se muestra en la etapa D. La desprotección básica del compuesto (4) con NaOH acuoso en DMSO a reflujo y posterior reprotección utilizando dicarbonato de di-*ter*-butilo con una base adecuada como DIEA y DMAP catalítica en un solvente como THF para obtener el compuesto (5) se representa en la etapa E. La etapa F muestra la reacción del bromo del compuesto (5) con bis(pinacolato)diboron utilizando una base adecuada como acetato de potasio

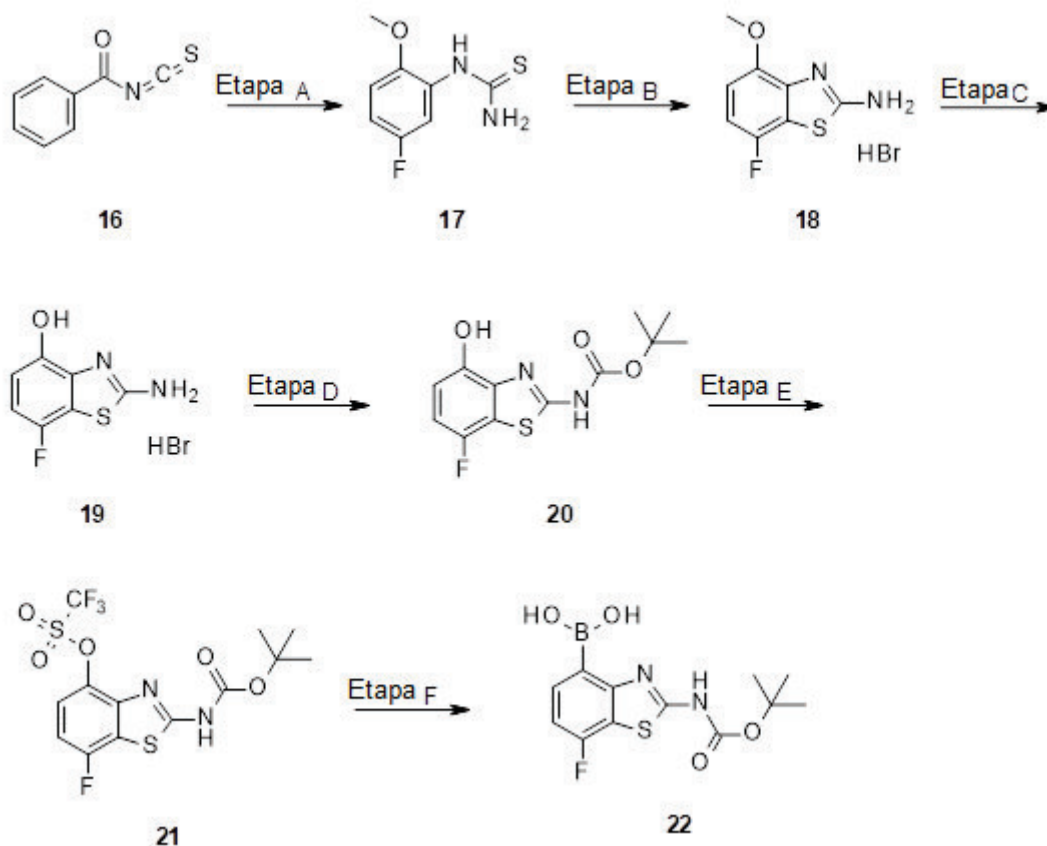
y un sistema catalizador-ligando como acetato de paladio y bis(2-difenilfosfinofenil)éter en un solvente adecuado tal como 1,4-dioxano para obtener el compuesto (6). Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que se podría utilizar una variedad de combinaciones de catalizador-ligando para producir esta reacción.

Esquema 3



El Esquema 3, etapa A, representa la reducción del aldehído del compuesto (10) con borohidruro de sodio en MeOH y la mesilación posterior utilizando anhídrido metanosulfónico con una base adecuada como DIEA en un solvente como THF para obtener el compuesto (11). Las condiciones utilizadas para la transformación del compuesto (11) en el compuesto (12) son esencialmente análogas a las encontradas en el Esquema 1, etapa B. La adición de isotiocianato de etoxicarbonilo al compuesto (12) utilizando *ter*-butóxido de potasio en un solvente adecuado tal como DMF y la posterior ciclación al compuesto (13) se muestran en la etapa C. Las condiciones utilizadas para la transformación del compuesto (13) al compuesto (14) son esencialmente análogas a las encontradas en el Esquema 1, etapa D. La etapa E muestra la reacción del bromo del compuesto (14) con bis(neopentilglicolato)diboro utilizando una base adecuada tal como acetato de potasio y un sistema catalizador-ligando tal como DPEPhosPdCl₂ en un solvente adecuado tal como 1,4-dioxano para obtener el compuesto (15). Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que se podría utilizar una variedad de combinaciones de catalizador-ligando para producir esta reacción.

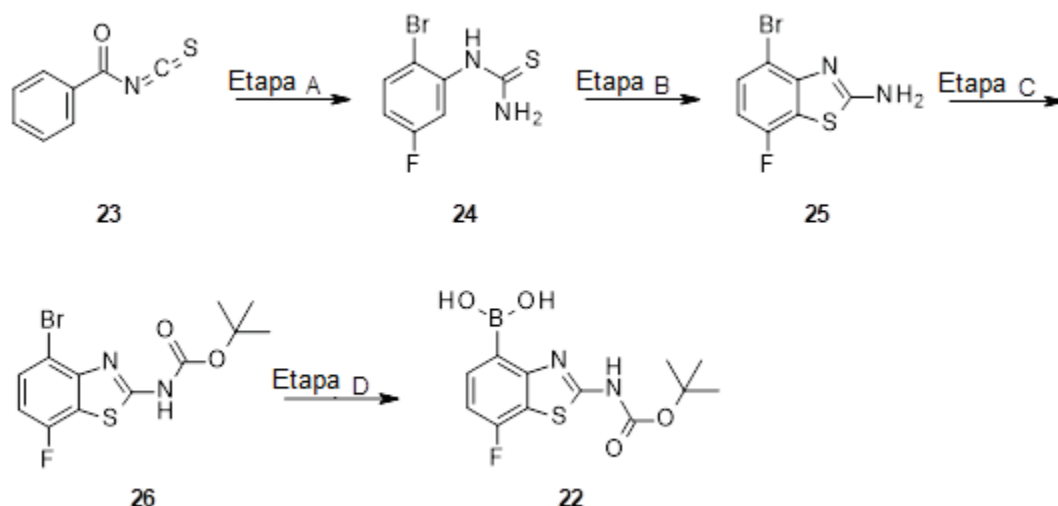
Esquema 4



El Esquema 4, etapa A, representa la formación de una tiourea a partir de la reacción del compuesto (16) y 5-fluoro-2-metoxianilina, mientras se mantiene una temperatura de reacción fría, seguida de una desprotección básica para producir el compuesto (17). La etapa B muestra la ciclación del compuesto (17) en cloroformo después de la adición de bromo para proporcionar el compuesto (18). La etapa C representa la desmetilación del compuesto (18) que se puede lograr mediante la adición de BBr_3 mientras se mantiene una mezcla de reacción fría bajo una atmósfera inerte para obtener el compuesto (19). La etapa D muestra la protección del compuesto (19) con dicarbonato de di-*ter*-butilo utilizando una base adecuada tal como TEA y DMAP catalítica en un sistema solvente tal como 1,4-dioxano para obtener el compuesto (20). El compuesto (20) se trata con una base como piridina seguida de anhídrido trifluorometansulfónico en un solvente como DCM para obtener el compuesto (21) como se muestra en la etapa E. La etapa F representa la reacción del triflato del compuesto (21) con bis(pinacolato)diboron utilizando una base adecuada tal como acetato de potasio y un catalizador tal como tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) en un solvente adecuado tal como 1,4-dioxano para obtener el compuesto (22). Una

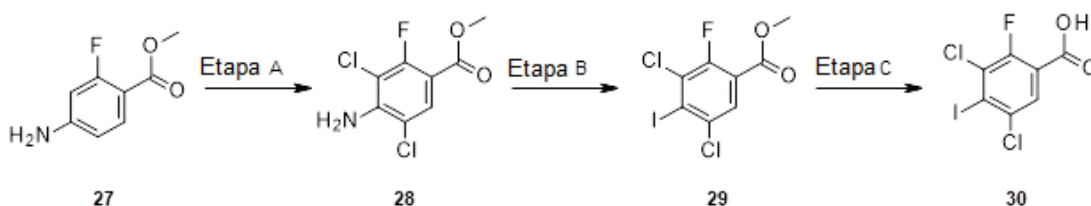
persona del oficio de nivel medio reconocerá que se podría utilizar una variedad de combinaciones de catalizador-ligando para producir esta reacción.

Esquema 5



El Esquema 5 representa una vía alternativa para la síntesis del compuesto (22). La etapa A representa la formación de tiourea a partir de la reacción del compuesto (23) y 2-bromo-5-fluoroanilina en un solvente tal como THF seguido de una desprotección básica para producir el compuesto (24). La etapa B muestra la bromación y ciclación del compuesto (24) utilizando un agente de bromación apropiado tal como tribromuro de piridinio en un solvente tal como ácido sulfúrico para obtener el compuesto (25). La etapa C muestra la protección del compuesto (25) con dicarbonato de di-*ter*-butilo utilizando una base adecuada como DMAP en un sistema solvente como DCM para obtener el compuesto (26). La etapa D representa la transformación del compuesto (26) en el compuesto (22) mediante tratamiento con hidruro de sodio en un solvente tal como THF a bajas temperaturas seguido de la adición de *n*-butillitio y triisopropilborato.

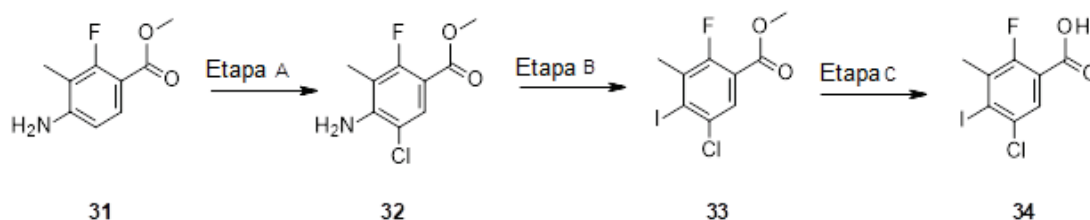
Esquema 6



El Esquema 6, etapa A, representa la cloración del compuesto (27) con NCS en un solvente apropiado como DMF para obtener el compuesto (28). La etapa B muestra

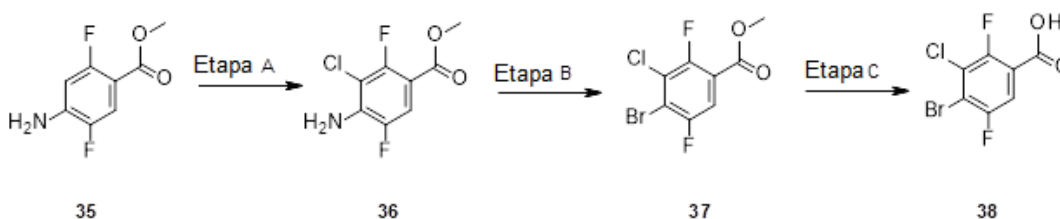
una reacción de Sandmeyer para convertir el nitrógeno de anilina del compuesto (28) en un yodo, cuyas condiciones serán conocidas por una persona del oficio de nivel medio, para obtener el compuesto (29). La etapa C muestra la hidrólisis básica del éster del compuesto (29) al ácido del compuesto (30).

Esquema 7



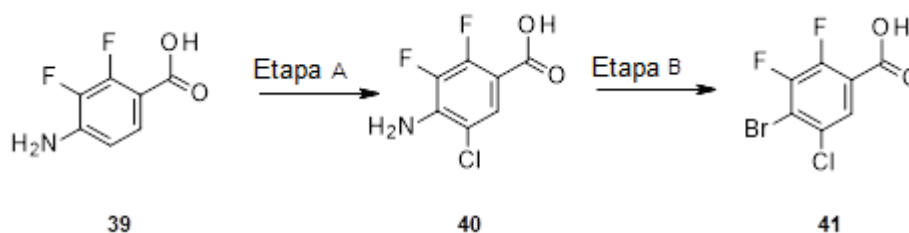
El Esquema 7, las etapas A-C se realizan de una manera esencialmente análoga a los métodos encontrados en las etapas A-C del esquema 6 para obtener los compuestos (32-34).

Esquema 8



El Esquema 8, etapa A, se realiza de una manera esencialmente análoga al método de la etapa A del esquema 6 para obtener el compuesto (36). La etapa B muestra una reacción de Sandmeyer para convertir el nitrógeno de anilina del compuesto (36) en un bromo, cuyas condiciones serán conocidas por una persona del oficio de nivel medio, para obtener el compuesto (37). La etapa C, se realiza de una manera esencialmente análoga al método de la etapa C del esquema 6 para obtener el compuesto (38).

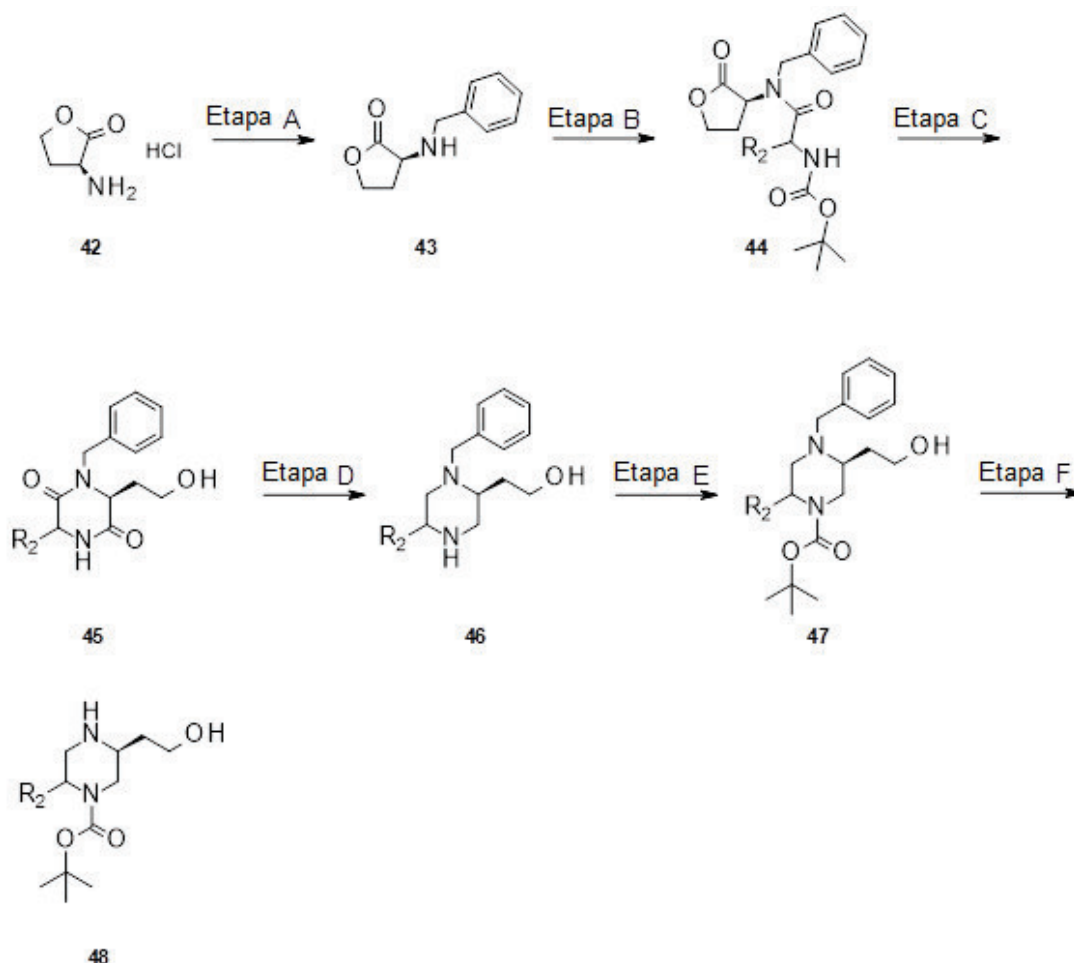
Esquema 9



El Esquema 9, etapa A, se realiza de una manera esencialmente análoga al método de la etapa A del esquema 6 para obtener el compuesto (40). La etapa B, se

realiza de una manera esencialmente análoga al método de la etapa B del esquema 8 para obtener el compuesto (41).

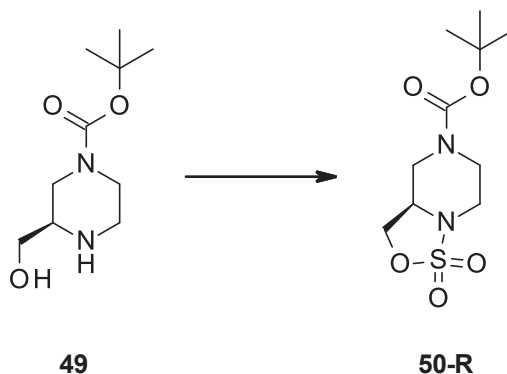
Esquema 10



El Esquema 10, etapa A, representa una aminación reductora entre el compuesto (42) y benzaldehído en un solvente adecuado como DCM con un agente reductor adecuado como triacetoxiborohidruro de sodio para obtener el compuesto (43). La etapa B muestra el acoplamiento de amida entre el compuesto (43) y un aminoácido protegido con boc utilizando anhídrido propilfosfónico con una base adecuada como TEA en un solvente como DCM para obtener el compuesto (44). La etapa C representa la desprotección ácida y la transposición del compuesto (44) utilizando TFA en un solvente como DCM para obtener el compuesto (45). La etapa D muestra la reducción global de amidas del compuesto (45) utilizando un agente reductor como hidruro de litio y aluminio en un solvente como THF para obtener el compuesto (46). La etapa E representa la protección del compuesto (46) utilizando dicarbonato de di-*ter*-butilo en bicarbonato de sodio acuoso para obtener el compuesto

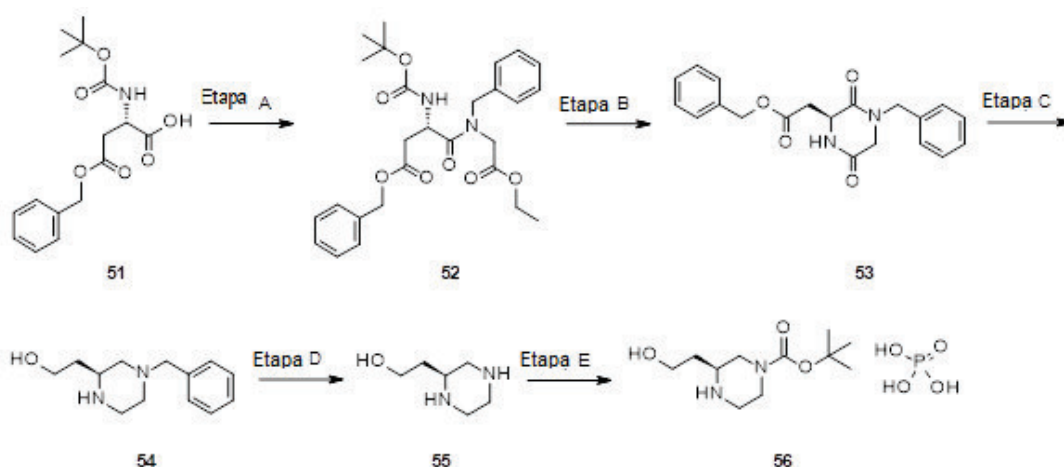
(47). La etapa F muestra la desprotección del compuesto (47) mediante hidrogenación para obtener el compuesto (48).

Esquema 11



El Esquema 11 muestra la ciclación del compuesto (49) utilizando cloruro de tionilo e imidazol en un solvente tal como DCM a -78 °C seguido de tratamiento con peryodato de sodio y cloruro de rutenio (III) en ACN para obtener el compuesto (50-R). El enantiómero S (50-S) se sintetiza utilizando las mismas condiciones.

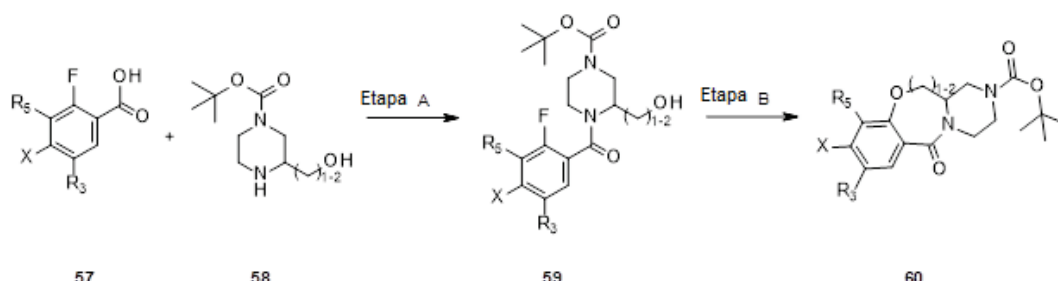
Esquema 12



En el Esquema 12, etapa A, se muestra un acoplamiento de amida entre el compuesto (51) y el éster etílico de bencilglicina utilizando un agente de acoplamiento adecuado tal como N,N'-diciclohexilcarbodiimida en un solvente tal como DCM para obtener el compuesto (52). La etapa B representa la ciclación del compuesto (52) al compuesto (53) utilizando un ácido como TFA en un solvente como DCM. La etapa C representa la reducción y desprotección global de amidas del compuesto (53) con un agente reductor como hidruro de litio y aluminio en un solvente como THF para obtener el compuesto (54). La etapa D muestra la hidrogenación del compuesto (54) al compuesto (55) utilizando un catalizador adecuado como Pd(OH)₂ en un solvente tal como MeOH. La etapa E representa la protección con dicarbonato de di-*ter*-butilo del

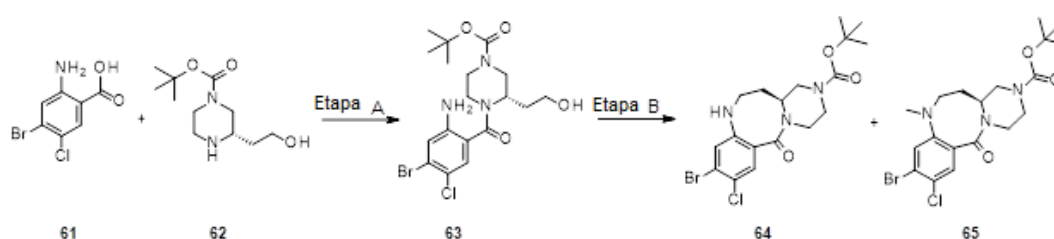
compuesto (55) y la formación de sal subsiguiente con ácido fosfórico para obtener el compuesto (56).

Esquema 13



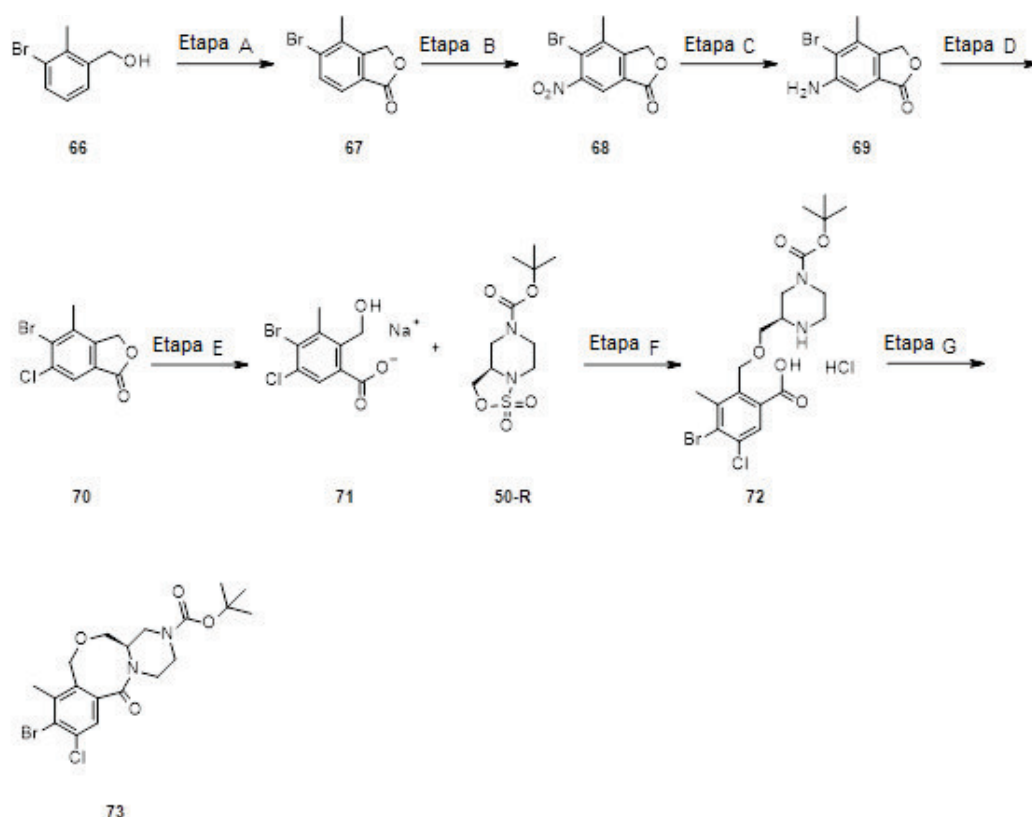
En el Esquema 13, el compuesto (57) representa los ácidos benzoicos de los Esquemas 6-9 así como los ácidos benzoicos disponibles en el comercio. El acoplamiento de amida entre el compuesto (57) y el compuesto (58) utilizando HATU y una base apropiada como DIEA en un solvente como THF para obtener el compuesto (59) se muestra en la etapa A. Alternativamente, el acoplamiento de amida se realiza utilizando 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina y una base apropiada tal como 4-metilmorfolina en un solvente tal como THF. Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que hay una variedad de condiciones con las que realizar un acoplamiento de amida. La etapa B representa la ciclación intramolecular del compuesto (59) al compuesto (60) utilizando una base apropiada tal como hidruro de sodio en un solvente tal como DMF.

Esquema 14



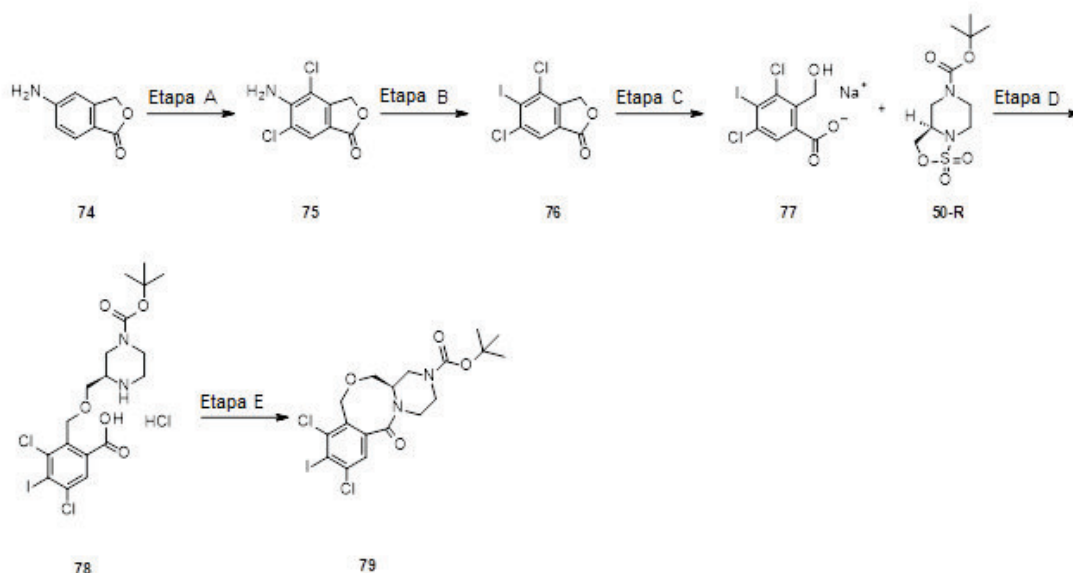
El Esquema 14, etapa A, se realiza de una manera esencialmente análoga al método de la etapa A del esquema 13 para obtener el compuesto (63). La etapa B consiste en la ciclación del compuesto (63) de una manera esencialmente análoga al método de la etapa B del Esquema 13 seguido de metilación con yoduro de metilo. Los compuestos (64) y (65) se recuperan después de esta etapa.

Esquema 15



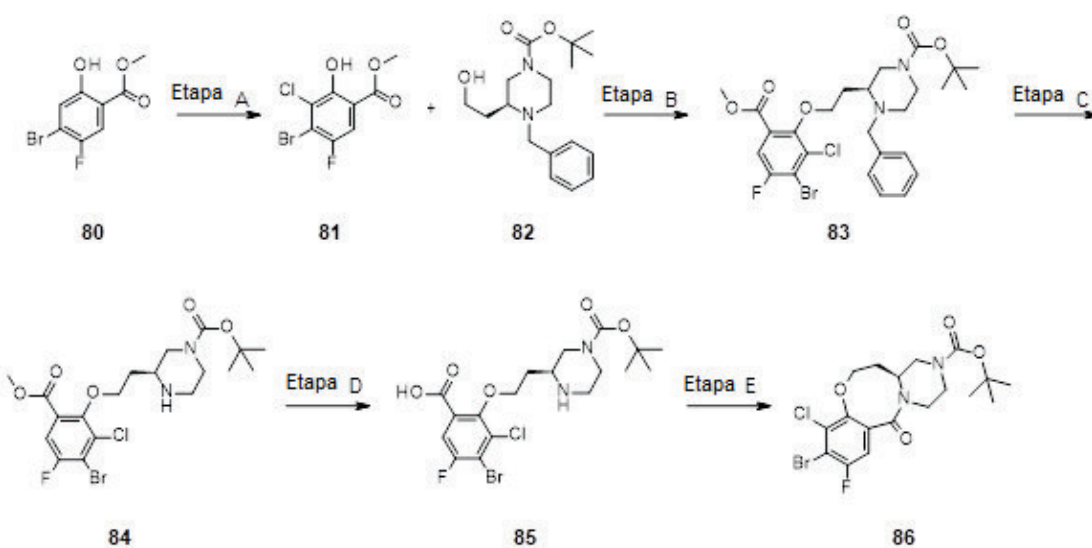
El Esquema 15, etapa A, representa la ciclación del compuesto (66) a través del tratamiento con trifluoroacetato de talio(III) en TFA seguido de la adición de óxido de magnesio, cloruro de litio y MeOH con un catalizador tal como cloruro de paladio(II) en una atmósfera de monóxido de carbono para obtener el compuesto (67). La etapa B muestra la nitración del compuesto (67) utilizando nitrato de potasio en ácido sulfúrico concentrado para obtener el compuesto (68). La hidrogenación del grupo nitro en el compuesto (68) utilizando Pt/C en un sistema solvente como DCM y TFA para obtener el compuesto (69) se muestra en la etapa C. La etapa D muestra una reacción de Sandmeyer para convertir el nitrógeno de anilina del compuesto (69) en cloro, cuyas condiciones serán conocidas por una persona del oficio de nivel medio, para obtener el compuesto (70). La etapa E representa la hidrólisis del compuesto (70) utilizando una base adecuada tal como NaOH acuoso con calor para obtener el compuesto (71). La alquilación del compuesto (71) con el compuesto (50-R) utilizando una base adecuada como NaH en un sistema solvente tal como DMF y THF para obtener el compuesto (72) se muestra en la etapa F. La etapa G representa un acoplamiento de amida intramolecular en compuesto (72) utilizando HATU y una base apropiada tal como DIEA en un solvente tal como DMF para obtener el compuesto (73).

Esquema 16



El Esquema 16, etapa A, se realiza de una manera esencialmente análoga al método de la etapa A del Esquema 6 para obtener el compuesto (75). La etapa B muestra una reacción de Sandmeyer para convertir el nitrógeno de anilina del compuesto (75) en un yodo, cuyas condiciones serán conocidas por una persona del oficio de nivel medio, para obtener el compuesto (76). Las etapas C-E se realizan de una manera esencialmente análoga al método de las etapas E-G del Esquema 15 para obtener los compuestos (77-79).

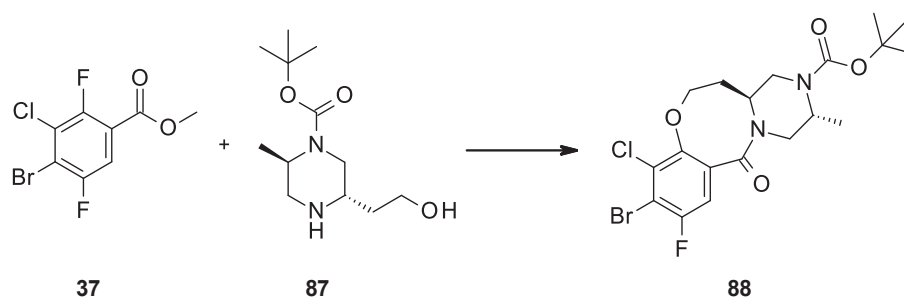
Esquema 17



El Esquema 17, etapa A, representa la cloración del compuesto (80) con un agente clorante apropiado, tal como NCS, en un solvente apropiado, tal como ácido

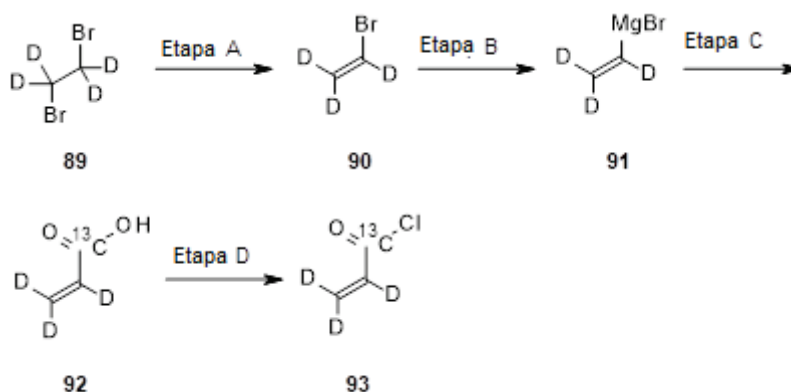
acético, con calentamiento para obtener el compuesto (81). La etapa B representa una reacción de Mitsunobu entre los compuestos (81) y (82) utilizando trifenilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo en un solvente tal como THF para obtener el compuesto (83). La etapa C muestra la desbencilación del compuesto (83) utilizando diisopropilamina y cloroformiato de 1-cloroetilo en un solvente apropiado tal como DCM para obtener el compuesto (84). La etapa D representa la hidrólisis básica del éster en el compuesto (84) utilizando una base apropiada tal como hidróxido de litio en un sistema solvente tal como THF y agua para obtener el compuesto (85). El acoplamiento de amida intramolecular del compuesto (85) utilizando anhídrido propilfosfónico con una base adecuada tal como TEA en un solvente tal como DCM para obtener el compuesto (86) se representa en la etapa E.

Esquema 18



El Esquema 18 muestra el acoplamiento del compuesto (37) y el compuesto (87) y la posterior ciclación para obtener el compuesto (88) utilizando una base apropiada como carbonato de cesio en un solvente tal como DMF con calentamiento.

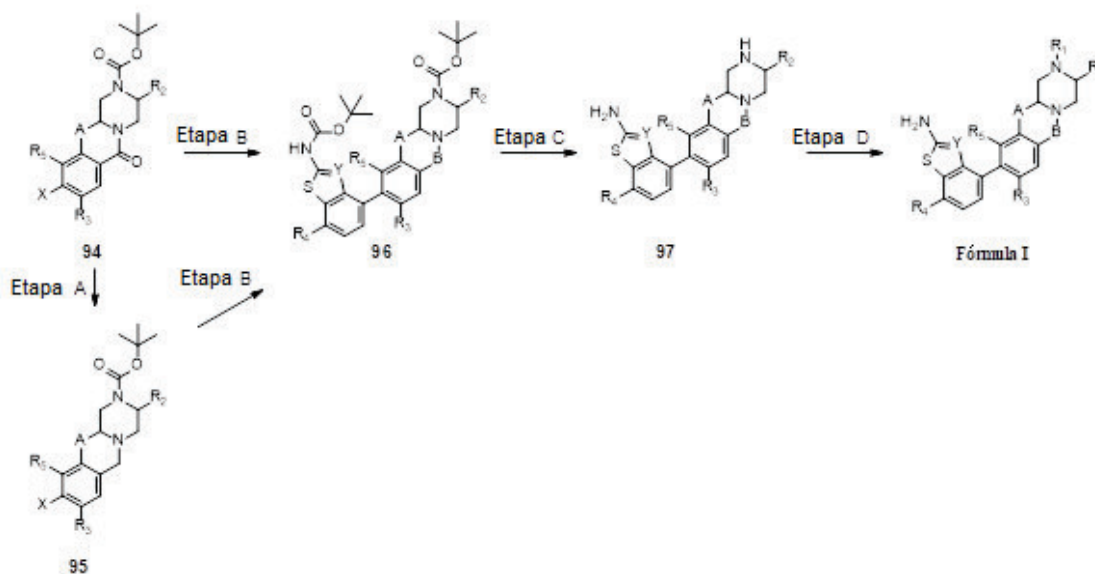
Esquema 19



El Esquema 19, etapa A, muestra la conversión del compuesto (89) en el compuesto (90) mediante el tratamiento con una base adecuada tal como KOH en un sistema solvente tal como EtOH deuterado en D₂O. La etapa B representa una reacción de Grignard del compuesto (90) con magnesio en un solvente tal como THF

para obtener el compuesto (91). La carboxilación del compuesto (91) con $^{13}\text{CO}_2$ en un solvente tal como THF para obtener el compuesto (92) se muestra en la etapa C. La etapa D muestra la reacción del compuesto (92) con cloruro de oxalilo en un solvente tal como DCM con DMF catalítica para obtener el compuesto (93).

Esquema 20



En el Esquema 20, el compuesto (94) representa los núcleos tricíclicos descritos en los Esquemas 13-18. En la etapa A, la amida del compuesto (94) se reduce utilizando un agente reductor adecuado tal como el complejo de borano dimetil sulfuro en THF para obtener el compuesto (95). Tanto el compuesto (94) como el compuesto (95) pueden experimentar un acoplamiento cruzado de Suzuki con boronatos como se describe en los esquemas 1-5 utilizando un catalizador adecuado tal como dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno paladio con una base adecuada tal como fosfato de potasio tribásico en un sistema solvente tal como 1,4-dioxano y agua con calentamiento para obtener el compuesto (96). Este acoplamiento podría alternativamente realizarse utilizando un catalizador adecuado tal como DPEPhosPdCl₂ con una base tal como carbonato de cesio en un solvente tal como tolueno con calentamiento. Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que hay muchas combinaciones de catalizador, base y solvente que se pueden utilizar para realizar este tipo de transformación. La etapa C muestra la desprotección ácida del compuesto (96) con un ácido tal como TFA en un solvente tal como DCM para obtener el compuesto (97). La etapa D muestra un acoplamiento entre el compuesto (97) y un compañero para obtener compuestos de la Fórmula I. El compañero puede ser un cloruro de ácido, un ácido carboxílico o bromuro de cianógeno. En los casos con un

cloruro de ácido, se utiliza una base adecuada tal como TEA o DIEA en un solvente como DCM. El cloruro de ácido también se puede utilizar con carbonato de potasio como base en un sistema solvente bifásico tal como EtOAc, THF y agua. En los casos en los que el componente es un ácido carboxílico, las condiciones incluyen un reactivo de acoplamiento adecuado, tal como anhídrido propilfosfónico, con una base adecuada, tal como DIEA, en un solvente, tal como DMF. Si el componente es bromuro de cianógeno, se utiliza una base adecuada tal como NaOH acuoso en un solvente tal como DCM.

Preparaciones y Ejemplos

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención y representan la síntesis típica de los compuestos de la invención, pero de ningún modo deben interpretarse como limitaciones al alcance de la invención. Los reactivos y materiales de inicio se encuentran fácilmente disponibles o se pueden sintetizar con facilidad mediante procedimientos conocidos o mediante el empleo de diversas modificaciones, que se pueden realizar por una persona del oficio de nivel medio.

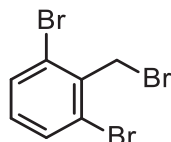
Los compuestos se pueden caracterizar mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas por electrospray (LC-ES/MS) realizadas en un sistema de cromatografía de líquidos Agilent HP1100. Las mediciones de espectrometría de masas por electrospray (adquiridas en modo positivo y/o negativo) se realizan en un espectrómetro de masas cuadrupolar detector de masas selectivo interconectado al HP1100 HPLC. Condiciones de LC-MS (pH bajo): columna: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,1 x 50 mm 3,0 m; 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 % de HCOOH; solvente B: ACN con 0,1 % de ácido fórmico; longitud de onda 214 nm. Condiciones alternativas de LC-MS (pH alto): columna: columnas MS C-18 WATERS™ XTERRA® 2,1 x 50 mm, 3,5 m; 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 de 10 % a 100 % de solvente B en 3 min y al 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: 10 mM de NH₄HCO₃, pH 9; solvente B: ACN; longitud de onda: 214 nm.

La cromatografía de fase inversa preparativa se realiza en un Agilent 1200 LC-ES/MS equipado con un espectrómetro de masas con detector selectivo de masas y un automuestreador/recolector de fracción Leap. Los métodos de pH alto se ejecutan en una columna de tamaño de partícula de 5 µm, 75 X 30 mm Phenomenex® GEMINI®

-NX, con una precolumna de 10 X 20 mm. Velocidad de flujo de 85 ml/min. El eluyente es 10 mM de bicarbonato de amonio (pH 10) en ACN.

Preparación 1

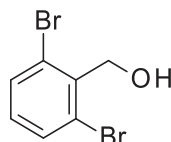
1,3-dibromo-2-(bromometil)benceno



Se agrega NBS (35,0 g, 195 mmol) a una solución de 2,6-dibromotolueno (50,0 g, 194 mmol) en tetracloruro de carbono (500 ml). La mezcla se calienta hasta 80 °C y se agrega AIBN (3,20 g, 19,1 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 16 horas. Después de este tiempo, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se filtra. El filtrado se diluye con EtOAc y se lava con agua, una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Los orgánicos se secan en sulfato de magnesio, se filtran y se concentran al vacío. El residuo resultante se seca en alto vacío para obtener el compuesto del título (67,5 g, 84 %). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,58 (2H, d), 7,04 (1H, t), 4,86 (2H, s).

Preparación 2

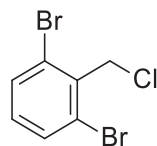
(2,6-dibromofenil)metanol



Se agrega borohidruro de sodio (7,83 g, 207 mmol) en tres porciones a intervalos de 10 minutos a una solución en agitación hasta 0 °C de 2,6-dibromobenzaldehído (148,7 g, 552,3 mmol) en EtOH (1,4 l). Después de la adición final, la mezcla se agita durante 30 minutos antes de inactivar cuidadosamente con una solución acuosa saturada de NH₄Cl (600 ml). Se agregan DCM (1,75 l) y agua (200 ml) y se separan las capas. La capa acuosa se extrae un tiempo adicional con DCM. Los orgánicos combinados se secan en sulfato de sodio y se filtran a través de una almohadilla de sílice enjuagando con EtOAc (2 x 500 ml). El filtrado se concentra al vacío, se recolecta en tolueno y se concentra nuevamente al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (148,7 g, 99 %). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7,66 (2H, d), 7,17 (1H, t), 5,20 (1H, t), 4,74 (2H, d).

Preparación 3

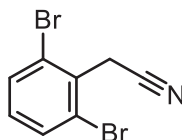
1,3-dibromo-2-(clorometil)benceno



A una solución a 0 °C de (2,6-dibromofenil)metanol (199,3 g, 749,4 mmol) en DCM (1,5 l) tratado con DMF (0,5 ml) se le agrega cloruro de tionilo (160 ml, 2196 mmol) por goteo durante 1 hora. Después de este tiempo, la mezcla se deja calentar hasta temperatura ambiente y luego se calienta hasta 50 °C durante la noche. Se retira el calor y la reacción se enfría hasta 0 °C antes de inactivar cuidadosamente con agua (500 ml). La mezcla se diluye con DCM y las capas se separan. Los orgánicos se lavan con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, agua y de nuevo con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Los extractos orgánicos se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío para obtener el producto del título como un sólido blanco (206,98 g, 95 %). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7,75 (2H, d), 7,26 (1H, t), 4,95 (2H, s).

Preparación 4

2-(2,6-dibromofenil)acetonitrilo



Una mezcla de 1,3-dibromo-2-(bromometil)benceno (57,0 g, 137 mmol) y cianuro de potasio (28,0 g, 417 mmol) en EtOH (350 ml) y agua (90 ml) se calienta a reflujo durante 5 horas. Luego, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se concentra al vacío. El residuo se disuelve en EtOAc y se lava con una solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrae con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavan secuencialmente con agua y cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de magnesio y se concentran al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir 10-100 % de DCM/hexano para obtener el compuesto del título (34,5 g, 87 %). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,62 (2H, d), 7,12 (1H, t), 4,14 (2H, s).

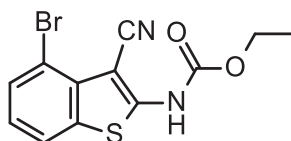
Preparación 4 alternativa

Se agrega cianuro de potasio (142,2 g, 2183,5 mmol) a una solución de 1,3-dibromo-2-(clorometil)benceno (206,98 g, 727,83 mmol) en DMSO (600 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 2 días. Después de este tiempo, la mezcla se vierte en agua helada y se agita durante 2 horas donde se forma un precipitado blanco. El

precipitado se filtra y se lava tres veces con agua antes de secar en un horno de vacío. El sólido resultante se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice al eluir con 10-70 % de DCM/hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (189,23 g, 94 %). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,78 (2H, d), 7,28 (1H, t), 4,22 (2H, s).

Preparación 5

Etil N-(4-bromo-3-ciano-benzotiofen-2-il)carbamato



Se enfría una solución de 2-(2,6-dibromofenil)acetonitrilo (20,0 g, 71,3 mmol) en DMF (200 ml) hasta 0 °C. Se agrega hidruro de sodio (60 % en masa en aceite de parafina) (2,85 g, 71,3 mmol) en porciones. Después de la adición, la mezcla se agita a 0 °C durante 10 minutos, luego se agrega por goteo isotiocianato de etoxicarbonilo (8,60 ml, 71,4 mmol) a 0-5 °C. Después de la adición, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se calienta a 100 °C durante 4 horas. Después de este tiempo, el solvente se evapora al vacío. El residuo se agita en una mezcla de EtOAc y una solución saturada de bicarbonato de sodio. El precipitado resultante se recolecta mediante filtración, se lava con agua y se seca en un horno de vacío a 60-65 °C durante la noche para obtener el compuesto del título (10,5 g, 45 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 322,8/324,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

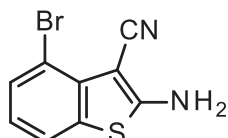
Preparación 5 alternativa

Se suspende hidruro de sodio (60 % en masa en aceite de parafina) (24,85 g, 621,3 mmol) en DMF (500 ml) y se enfría hasta 0 °C. A la suspensión fría se le agrega por goteo una solución de 2-(2,6-dibromofenil)acetonitrilo (169,14 g, 615,19 mmol) en DMF (600 ml) durante 1 hora de modo que la temperatura no supere los 7 °C. Después de 30 minutos, se agrega isotiocianato de etoxicarbonilo (77,81 ml, 646,0 mmol) durante 30 minutos mientras todavía está a 0 °C. La mezcla se agita a 0 °C durante 10 minutos antes de retirarla del baño de hielo y se agita durante 20 minutos adicionales. Después de este tiempo se agregan L-prolina (14,16 g, 123,0 mmol) y yoduro cuproso (11,71 g, 61,49 mmol) y la mezcla se calienta hasta 65 °C durante 4,5 horas. La mezcla se trata con EDTA acuoso 0,5 M (4 l) diluido con EtOAc (1,6 l) y se agita vigorosamente durante la noche. Después de este tiempo, la suspensión turbia resultante se filtra y el sólido recolectado se lava con agua y EtOAc. El sólido se seca al vacío durante 1,5 horas y luego se seca en un horno de vacío durante 2 horas más.

para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (187,24 g, 77 %). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11,76 (1H, s), 8,01 (1H, d), 7,65 (1H, d), 7,27 (1H, t), 4,90 (2H, q), 1,31 (3H, t).

Preparación 6

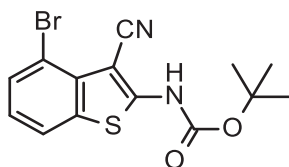
2-amino-4-bromo-benzotiofen-3-carbonitrilo



Se agrega NaOH 5 N (765 ml, 3825 mmol) a una solución de N-(4-bromo-3-ciano-benzotiofen-2-il) carbamato de etilo (155 g, 476,6 mmol) en DMSO (480 ml). La mezcla se calienta hasta 125 °C durante la noche. Después de este tiempo, se retira el calor y la reacción se vierte en agua helada (4,2 l) y se agita vigorosamente durante 10 minutos. Se forma un precipitado que se filtra, se lava con agua y se seca en un horno de vacío durante 2 días para obtener el producto del título como un sólido amarillo (73,6 g, 61 %). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,96 (2H, s), 7,70 (1H, d), 7,46 (1H, d), 7,02 (1H, t).

Preparación 7

ter-butil N- (4-bromo-3-ciano-benzotiofen-2-il)carbamato



Una solución de 2-amino-4-bromo-benzotiofen-3-carbonitrilo (20 g, 79,2 mmol), DIEA (21 ml, 120 mmol) y DMAP (800 mg, 6,55 mmol) en THF (270 ml) y DMF (40 ml) se trata con di-*ter*-butildicarbonato (19,6 g, 87,1 mmol). La mezcla se agita en nitrógeno a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua, solución de bicarbonato de sodio y EtOAc, luego se agita durante 10 minutos. El precipitado resultante se recolecta mediante filtración, se lava con EtOAc frío y se seca en un horno de vacío a 60 °C durante la noche para producir el compuesto del título como un sólido beige (10,8 g, 38,6 %). El filtrado se extrae además dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavan secuencialmente con agua y cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de magnesio y se concentran al vacío. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice, al eluir con 20-100 % de DCM/hexano para

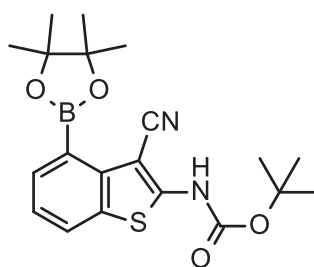
producir compuesto adicional (12,5 g, 45 %) dando un rendimiento total de 23,3 g (83 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 351/353 [M-H] $^-$.

Preparación 7 alternativa

Se agregan DIEA (77 ml, 441 mmol) y DMAP (2 g, 16 mmol) a una solución de 2-amino-4-bromo-benzotiofen-3-carbonitrilo (74,5 g, 294 mmol) en THF (2 l) seguido mediante adición de dicarbonato de di-*ter*-butilo (73,1 g, 325 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente en nitrógeno durante la noche. Después de este tiempo, la mezcla se diluye con agua, EtOAc y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio que luego se filtra para proporcionar un sólido blanquecino. Este sólido se lava con agua y EtOAc y luego se seca durante la noche para obtener el producto del título (32 g, 31 %). A continuación, se separan las capas de filtrado y la acuosa se extrae dos veces con EtOAc. Los orgánicos combinados se lavan con cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de sodio y se concentran al vacío. El residuo resultante se absorbe en DCM (260 ml), se sonica, se diluye adicionalmente con hexanos (275 ml), se sonica, se tritura y se filtra para obtener el producto del título adicional (60,5 g, 58 %) y un rendimiento combinado de 92,5 g (89 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 351/353 [M-H] $^-$.

Preparación 8

ter-butil N-[3-ciano-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzotiofen-2-il]carbamato



Una solución de *ter*-butil N-(4-bromo-3-ciano-benzotiofen-2-il)carbamato (10,90 g, 30,7 mmol), bis(pinacolato)diboro (23,50 g, 92,54 mmol) y acetato de potasio (9,05 g, 92,2 mmol) en 1,4-dioxano (150 ml) se burbujea con nitrógeno a 50 °C durante 30 minutos. El matraz se carga con 1,1'-bis(diisopropilfosfino)ferroceno (2,25 g, 5,38 mmol) y acetato de paladio (0,700 g, 3,12 mmol) y luego se calienta a 100 °C en nitrógeno. Después de 2 horas, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente, se diluye con EtOAc, se filtra a través de tierra diatomácea y se lava con EtOAc. El filtrado se trata con gel de sílice (150 g), se concentra a sequedad y luego se carga en un cartucho. El residuo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir

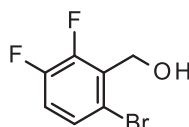
0-50 % de DCM/hexano para obtener el compuesto del título (9,15 g, 67 %). ES/MS (m/z): 399,2 (M-H).

Preparación 8 alternativa

Se calienta 1,4-dioxano (500 ml) a reflujo mientras se burbujea nitrógeno durante 1 hora. Luego, la temperatura se reduce hasta 80 °C mientras se continúa burbujeando con nitrógeno. A esta temperatura, se agregan *ter*-butil N-(4-bromo-3-ciano-benzotiofen-2-il)carbamato (32 g, 90,59 mmol), bis(pinacolato)diboron (60 g, 236 mmol), acetato de potasio (26,67 g, 271,8 mmol), y finalmente acetato de paladio (2,03 g, 9,04 mmol) y bis(2-difenilfosfinofenil)éter (8,54 g, 15,9 mmol). La mezcla se calienta a 100 °C durante tres horas. Después de este tiempo, se retira el calor y la mezcla se diluye con EtOAc, se filtra a través de tierra diatomácea y se concentra al vacío. El residuo resultante se disuelve en DCM, se trata con 200 g de sílice, y se concentra al vacío. Esta sílice se coloca en una precolumna y el material se purifica mediante cromatografía en gel de sílice al eluir con 10-95 % de DCM y una solución premezclada de DCM/EtOAc al 95 %. Las fracciones resultantes se separan en función de su pureza relativa. Cada conjunto se concentra por separado al vacío, se somete a ultrasonidos en heptanos, se tritura, se filtra y se enjuaga con heptanos. Los sólidos resultantes se secan durante la noche y luego se combinan para obtener el compuesto del título (23,86 g, 65 %). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11,32 (1H, s), 8,02 (1H, d), 7,59 (1H, d), 7,34 (1H, t), 1,53 (9H, s), 1,37 (12H, s).

Preparación 9

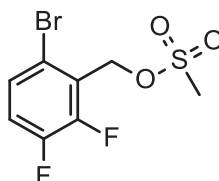
6-bromo-2,3-difluorobencenometanol



Se disuelve 6-bromo-2,3-difluorobenzaldehído (20,0 g, 88,7 mmol) en MeOH (250 ml) y se agrega en porciones borohidruro de sodio (6,70 g, 177 mmol). Después de que la reacción exotérmica se enfría hasta temperatura ambiente (~1 hora), la mezcla de reacción se vierte en una solución saturada de cloruro de amonio y se extrae tres veces con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavan secuencialmente con agua y cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de magnesio y se concentran al vacío. El residuo se seca a alto vacío durante la noche para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (19,5 g, 97 %). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,37 (1H, m), 7,07 (1H, m), 4,88 (2H, m), 2,13 (1H, m).

Preparación 10

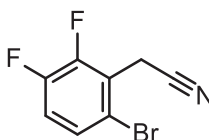
(6-bromo-2,3-difluorofenil)metil metanosulfonato



Se disuelve 6-bromo-2,3-difluorobencenometanol (19,5 g, 85,7 mmol) en THF (200 ml) y se agrega DIEA (18,0 ml, 103 mmol). La mezcla se enfría hasta 0 °C y luego se trata con anhídrido metanosulfónico (17,1 g, 94,2 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 18 horas, la mezcla se diluye con EtOAc:metil *ter*-butil éter (1:1) y se lava con agua fría. Las capas se separan y la acuosa se extrae dos veces con EtOAc:metil *ter*-butil éter (1:1). Los extractos orgánicos combinados se lavan con agua y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secan en sulfato de magnesio y carbonato de potasio, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un aceite amarillo (26,0 g, 99+%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,44 (1H, m), 7,18 (1H, m), 5,43 (2H, d), 3,12 (3H, s).

Preparación 11

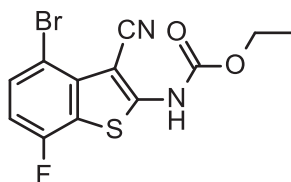
2-(6-bromo-2,3-difluoro-fenil)acetonitrilo



Una mezcla de (6-bromo-2,3-difluorofenil)metil metanosulfonato (26,0 g, 82,0 mmol) y cianuro de potasio (6,06 g, 90,3 mmol) en EtOH (200 ml) y agua (40,0 ml) se calienta a reflujo durante 30 minutos. y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. El solvente se elimina al vacío y el residuo se suspende en DCM. La mezcla se lava con agua, una solución saturada de bicarbonato de sodio y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Los orgánicos se secan en sulfato de magnesio, se filtran y se concentran al vacío. El producto crudo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice al eluir con 10-100 % de DMC/hexano para obtener el compuesto del título (17,9 g, 94 %). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,44 (1H, m), 7,15 (1H, m), 3,91 (2H, d).

Preparación 12

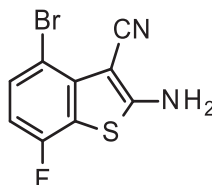
Etil N-(4-bromo-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-2-il)carbamato



Una solución de 2-(6-bromo-2,3-difluoro-fenil)acetonitrilo (17,9 g, 77,2 mmol) en DMF (200 ml) se enfría en un baño de hielo y luego se trata con *ter*-butóxido de potasio (9,30 g, 81,2 mmol) en porciones. Después de la adición, la mezcla se agita durante 10 minutos (la reacción se vuelve de color rojo oscuro) y se agrega por goteo isotiocianato de etoxicarbonilo (9,80 ml, 81,4 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se calienta a 100 °C durante 30 minutos. Luego, la mezcla se enfría en un baño de hielo durante 10 minutos y se agrega agua (500 ml) lentamente con agitación. El precipitado resultante se recolecta mediante filtración, se enjuaga con agua y hexanos y se seca al aire. El sólido se seca en un horno de vacío a 60 °C durante la noche para obtener el compuesto del título (24,5 g, 84 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 340,8/342,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Preparación 13

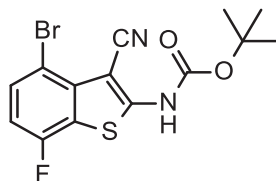
2-amino-4-bromo-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo



Una mezcla de etil N-(4-bromo-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-2-il)carbamato (24,5 g, 71,4 mmol), DMSO (100 ml) y NaOH 5 N (80,0 ml, 400 mmol) se calienta a reflujo durante 4 horas. La mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se trata con agua fría mientras se agita vigorosamente. El precipitado resultante se recolecta mediante filtración, se lava con agua y se seca en un horno de vacío a 65 °C durante la noche para obtener el compuesto del título (15,5 g, 80 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 268,8/270,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Preparación 14

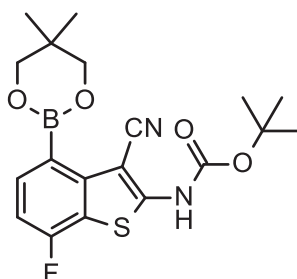
ter-butil N-(4-bromo-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-2-il)carbamato



El compuesto del título se prepara a partir de 2-amino-4-bromo-7-fluorobenzotiofen-3-carbonitrilo de una manera esencialmente análoga al método de la Preparación 7. ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 314,8/316,8 $[\text{M-t-Bu+H}]^+$.

Preparación 15

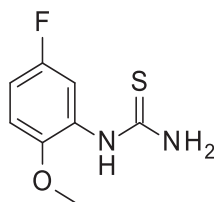
ter-butil N-[3-ciano-4-(5,5-dimetil-1,3,2-dioxaborinan-2-il)-7-fluorobenzotiofen-2-il]carbamato



ter-butil N-(4-bromo-3-ciano-7-fluorobenzotiofen-2-il)carbamato (16,0 g, 41,4 mmol) y bis(neopentilglicolato)diboro (37,0 g, 157 mmol) se disuelven en 1,4-dioxano (300 ml) en nitrógeno. Se agrega acetato de potasio (12,2 g, 124 mmol) y la mezcla se rocía con nitrógeno durante 1 hora a 50 °C. Se agrega DPEPhosPdCl₂ (3,0 g, 4,2 mmol) y el matraz se calienta a 95 °C durante 1 hora. Después, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente, se concentra al vacío hasta ~100 ml, se diluye con heptano (200 ml), se agita durante 10 minutos y luego se filtra a través de tierra diatomácea enjuagando con heptano y heptano:metil *ter-butil* éter (1:1). El filtrado se concentra, se disuelve en un mínimo de DCM y se filtra a través de una almohadilla de gel de sílice enjuagando con EtOAc:heptano (1:1). El filtrado se lava con una solución saturada de cloruro de amonio y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Los orgánicos se secan en sulfato de magnesio, se filtran y se concentran al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, al eluir con 5-50 % (20 % de acetona en DCM)/hexano para obtener el compuesto del título (13,0 g, 78 %). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11,6 (1H, s), 7,61 (1H, m), 7,20 (1H, m), 3,78 (4H, s), 1,54 (9H, s), 1,03 (6H, s).

Preparación 16

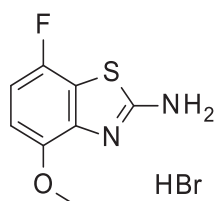
(5-fluoro-2-metoxi-fenil)tiourea



Se combinan isotiocianato de benzoílo (110 g, 671 mmol) y THF (875 ml) y se enfrían hasta 5 °C en nitrógeno. Se agrega por goteo 5-fluoro-2-metoxianilina (83,2 ml, 705 mmol) mientras se mantiene la temperatura de reacción interna por debajo de 10 °C. La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante 30 minutos. Se agregan NaOH 5 N (161 ml, 805 mmol) y agua (200 ml) y la mezcla se calienta a reflujo durante 3,5 horas. Después de este tiempo, se agregan agua (500 ml) y acetato de isopropilo (800 ml) y la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente. Se agrega HCl acuoso concentrado para ajustar el pH a ~9-10. Las capas se separaron. La capa orgánica se seca en sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se concentra al vacío. Se agregan EtOAc (360 ml) y hexanos (840 ml) al residuo y la mezcla se calienta a reflujo durante cinco minutos. Después de este tiempo, la mezcla se enfría a -20 °C y se deja reposar durante la noche. Filtrar y lavar el sólido recolectado con hexanos fríos para obtener el compuesto del título como un sólido incoloro (118 g, 88 %). ES/MS m/z: 201 (M+H).

Preparación 17

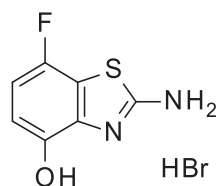
7-fluoro-4-metoxi-1,3-benzotiazol-2-amina bromuro de hidrógeno



Una solución de (5-fluoro-2-metoxi-fenil) tiourea (118 g, 571 mmol) y CHCl_3 (2 l) se enfría hasta 5 °C en atmósfera de nitrógeno. Se agrega bromo (30,1 ml, 582 mmol) por goteo mientras se mantiene la temperatura de reacción interna por debajo de 7 °C. La mezcla se agita a 0 °C durante 30 minutos antes de calentar a reflujo durante 2,25 horas. Después de este tiempo, la mezcla se enfría a -20 °C y se deja reposar durante la noche. Los sólidos resultantes se filtraron y lavaron con hexanos fríos para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo (141 g, 89 %). ES/MS m/z: 199 (M+H).

Preparación 18

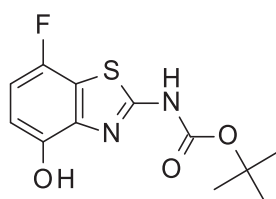
2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-ol bromuro de hidrógeno



BBr₃ (150 ml, 1,589 mmol) se agrega mediante una cánula a DCM (1,5 l) a 0 °C en nitrógeno. Se agrega bromuro de hidrógeno de 7-fluoro-4-metoxi-1,3-benzotiazol-2-amina (141 g, 506 mmol) en porciones durante 15 minutos y la mezcla de reacción se deja calentar lentamente hasta temperatura ambiente y con agitación durante la noche. La mezcla se enfría hasta 0 °C y se inactiva cuidadosamente con MeOH, manteniendo la temperatura interna por debajo de 10 °C. Mientras se enfría, la salida de gas se burbujea en NaOH 5N frío. El sólido resultante se filtra y se lava con DCM frío para obtener el compuesto del título como un sólido incoloro (117 g, 87 %). ES/MS m/z: 185 (M+H).

Preparación 19

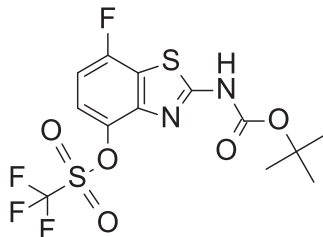
ter-butil (7-fluoro-4-hidroxi-1,3-benzotiazol-2-il)carbamato



Se enfría 2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-ol (117 g, 441 mmol) bromuro de hidrógeno en 1,4-dioxano (1,5 l) hasta 10 °C. Se agrega TEA (129 ml, 926 mmol) mientras se mantiene la temperatura de reacción interna por debajo de 15 °C. Se agregan DMAP (2,7 g, 22 mmol) y dicarbonato de di-*ter*-butilo (228 g, 1014 mmol) y la mezcla de reacción se calienta lentamente hasta temperatura ambiente y se agita durante dos días. La mezcla se diluye con agua, EtOAc y cloruro de sodio acuoso saturado y las capas se separan. La capa orgánica se concentra al vacío. Se agregan MeOH (900 ml) y NaOMe (5 M en MeOH, 132 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se agrega más NaOMe (5 M en MeOH, 10 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante tres horas antes de concentrar al vacío. Se agregan agua y EtOAc y se separan las capas. La capa orgánica se seca en sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se concentra al vacío hasta que se forman sólidos. Se agregan hexanos y los sólidos resultantes se filtran y se lavan con hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido de color tostado claro (97,2 g, 78 %). ES/MS (m/z): 283 (M-H).

Preparación 20

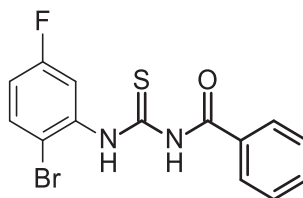
2-[(*ter*-butoxicarbonil)amino]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il trifluorometansulfonato



ter-butil (7-fluoro-4-hidroxi-1,3-benzotiazol-2-il)carbamato (116 g, 407 mmol), DCM (1,4 l) y piridina (66 ml, 814 mmol) y se enfrían hasta 5 °C en nitrógeno. Se agrega por goteo anhídrido trifluorometansulfónico (83 ml, 488 mmol) mientras se mantiene la temperatura de reacción interna por debajo de 10 °C. La mezcla se diluye con agua y las capas se separan. La capa orgánica se lavó con 10 % de ácido cítrico acuoso. La capa orgánica se seca en sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de fase normal, al eluir con 25-28 % de un gradiente de B en A (A: hexanos, B: 25 % de DCM en EtOAc), para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo (123 g, 73 %). ES/MS (m/z): 415 (M-H).

Preparación 21

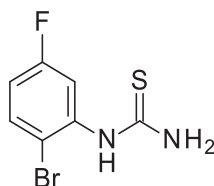
N-[(2-bromo-5-fluoro-fenil)carbamoil]benzamida



Una solución de 2-bromo-5-fluoroanilina (250 g, 1289,4 mmol) en THF (400 ml) se agita con un agitador mecánica superior. Isotiocianato de benzoilo (130 g, 780,6 mmol) en THF (800 ml) se agrega durante 30 minutos utilizando un embudo de adición. Se utiliza un baño de agua para mantener la temperatura interna por debajo de 30 °C durante la adición. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se vierte igualmente en tres matraces de 4 litros que contienen agua (3 l). Los sólidos resultantes se filtraron al vacío a través de un embudo de vidrio sinterizado. Los sólidos se enjuagaron con agua desionizada (8 l) y se secaron al aire al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido de color tostado (456 g, 99 +%). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 353/355 [M-H]⁻.

Preparación 22

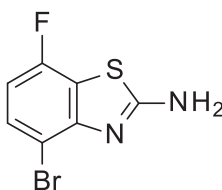
(2-bromo-5-fluoro-fenil)tiourea



A una suspensión de N-[(2-bromo-5-fluoro-fenil)carbamoil]benzamida (1600 g, 4,53 mol), THF (6 l), y MeOH (1,6 l) se agrega NaOH 5N acuoso (1 l). Después de 18 horas de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una almohadilla de tierra diatomácea para eliminar las partículas negras. La almohadilla se aclaró con THF/MeOH y luego con 100 % de MeOH. El solvente se elimina al vacío para obtener un sólido tostado. Se agrega agua helada (4 l) al sólido y con el uso de un agitador superior, se agrega HCl 5 N (~ 300 ml) en porciones de 100 ml para ajustar el pH hasta 7. Se agrega más agua helada y la mezcla se agita durante ~1 hora. Se agrega agua (4 l) y la suspensión se filtra a través de un gran embudo de vidrio sinterizado al vacío. Los sólidos se enjuagan con agua desionizada y, después de eliminar la mayor parte del agua, los sólidos se enjuagan con hexanos (8 l) y se secan al aire. Los sólidos se colocan en un horno de vacío a 50 °C durante 24 horas para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (1035 g, 92 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 249/251 [M-H]⁻.

Preparación 23

4-bromo-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina

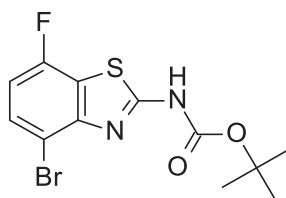


El ácido sulfúrico (350 ml), enfriado con un baño de hielo/cloruro de sodio, se agita con un agitador mecánico superior. Se agrega (2-bromo-5-fluoro-fenil) tiourea (130,5 g, 523,9 mmol) en porciones durante un período de 5 minutos. Después de diez minutos, la temperatura interna alcanzó ~1 °C. En nitrógeno, se agrega tribromuro de piridinio (185 g, 549,53 mmol) en 8 porciones durante un período de ~ 15 minutos mientras se mantiene la temperatura interna por debajo de 5 °C. El vapor generado se burbujea a través de una trampa de NaOH enfriada en hielo. Después de agitar a ~0 °C durante 75 minutos, la reacción se calienta hasta temperatura ambiente. La reacción se calienta luego a una temperatura interna inicial de 50 °C y luego se

calienta gradualmente a 59 °C. Después de 1,5 horas, la reacción se enfría hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vierte en un matraz grande que contiene hielo. El pH se ajusta cuidadosamente a ~7 con NaOH 18,9 N (620 ml). Los sólidos se filtran a través de un embudo de vidrio sinterizado y se enjuagan con agua desionizada hasta que el pH del filtrado coincide con el del agua desionizada. El sólido se seca al aire y luego se coloca en un horno de vacío a ~50 °C durante 24 horas para obtener el compuesto del título como un sólido de color tostado (129,3 g, 99+%). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 247/249 [M+H]⁺.

Preparación 24

ter-butil (4-bromo-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-il)carbamato

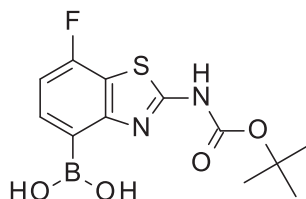


A una suspensión agitada de 4-bromo-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina (370,6 g, 1500 mmol) y DMAP (36,6 g, 300 mmol) en DCM (1500 ml) se le agrega en porciones una solución de dicarbonato de di-*ter*-butilo (388 g, 1724 mmol) disuelto en DCM (150 ml) mediante un embudo de adición a una velocidad tal que se controle la evolución de gas. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se agrega una porción adicional de dicarbonato de di-*ter*-butilo (5,0 g, 23 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se agrega 10 % ácido cítrico acuoso (800 ml) y las capas se separan. La capa acuosa se extrae dos veces con DCM y los extractos orgánicos combinados se lavan una vez con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se concentra al vacío y al residuo se le agrega DCM (200 ml) y hexanos (1800 ml). La suspensión adquirida se filtra, se seca al aire y se reserva el sólido recolectado. El filtrado se concentra al vacío y al residuo se le agrega MeOH (500 ml) y metóxido de sodio (20 ml, 5 N en MeOH, 100 mmol). La mezcla se concentra al vacío a 45 °C. Al residuo se le agrega MeOH (500 ml) y NaOH 5 N (100 ml, 500 mmol). La mezcla se concentra al vacío a 45 °C. Al residuo se le agrega agua y DCM y se separan las capas. La capa acuosa se extrae una vez con DCM. Los orgánicos se secan en sulfato de magnesio anhidro, y se concentran al vacío. Al residuo se le agregan 100 ml de DCM y 900 ml de hexanos, el sólido resultante se suspende, se filtra, se seca al aire y se combina con el sólido adquirido inicialmente para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (489,55 g, 94 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 290,8/292,8 [M-t-

Bu+H]⁺.

Preparación 25

Ácido [2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]borónico



Se combinan trifluorometanosulfonato de 2-[(*ter*-butoxicarbonil)amino]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-ilo (20,0 g, 48,1 mmol), acetato de potasio (14,2 g, 144 mmol), bis(pinacolato)diboro (97,7 g, 385 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (5,55 g, 4,8 mmol) y 1,4-dioxano (240 ml) y se rocían con nitrógeno durante diez minutos. La mezcla se calienta a 80 °C durante la noche antes de enfriar hasta temperatura ambiente y diluir con agua y EtOAc. Las capas se separaron. La capa orgánica se seca en sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se concentra al vacío. Se agregan acetona (500 ml), agua (500 ml) y acetato de amonio (112 g, 1443 mmol). A esto le sigue la adición de NaIO₄ (309 g, 1443 mmol), mientras se mantiene la temperatura de reacción interna entre 18-23 °C. La mezcla se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante la noche. Después de este tiempo, se agrega EtOAc. La mezcla se agita durante 30 minutos, se filtra a través de tierra diatomácea, y las capas se separan. La capa orgánica se concentra al vacío. La capa acuosa se diluye con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se extrae dos veces con EtOAc. Estos extractos orgánicos se combinan con la capa orgánica previamente concentrada. Los extractos combinados se lavan con agua, solución acuosa saturada de cloruro de sodio, agua y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se seca en sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se concentra al vacío. El residuo se suspende en hexanos con una pequeña cantidad de DCM. Los sólidos resultantes se filtran y se lavan con hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido de color tostado (13,4 g, 89 %). ES/MS m/z: 313 (M+H).

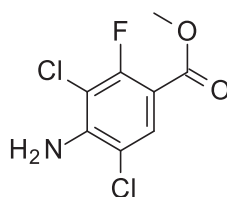
Preparación 25 alternativa

A una suspensión de hidruro de sodio (60 % en aceite de parafina) (34,6 g, 865 mmol) en THF (2000 ml) a una temperatura interna de -17 °C se le agrega una solución de *ter*-butil N-(4-bromo-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-il)carbamato (250,18 g, 720,6 mmol) disuelto en THF (500 ml) durante 15 minutos manteniendo la temperatura interna entre -10 °C y -15 °C durante el transcurso de la adición. Después de la adición, la mezcla se agita entre -10 °C y -15 °C durante 15 minutos, momento en el

que cesa la evolución de gas. La mezcla de reacción se enfría hasta una temperatura interna de -65 °C y luego se agrega *n*-butillitio (350 ml, 2,5M en hexanos, 875 mmol) por goteo mediante un embudo de adición durante 30 minutos a una velocidad tal para mantener la temperatura interna a -60 °C a -65 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agita a esta temperatura durante 20 minutos y luego se agrega por goteo borato de triisopropilo (416 ml, 1800 mmol) durante 15 minutos manteniendo una temperatura interna por debajo de -60 °C. La mezcla de reacción se deja calentar lentamente a una temperatura interna de 0 °C durante 5 horas 45 minutos y luego se agrega cuidadosamente una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (400 ml) para controlar la evolución de gas. A la mezcla se le agrega agua (400 ml) y EtOAc (400 ml) y se separan las capas. A la capa acuosa se le agrega suficiente HCl acuoso 1 N para llevar el pH a 3-4 y luego la capa acuosa se extrae dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentran al vacío. Al residuo se le agrega *n*-heptano (500 ml) y la mezcla se concentra al vacío a 55 °C. Al residuo se le agrega una porción adicional de *n*-heptano (500 ml) y la mezcla se concentra al vacío a 55 °C. Al residuo sólido se le agregan 200 ml de DCM y 1800 ml de hexanos y la mezcla se suspende. El sólido se filtra, se lava con hexanos y se seca al aire para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (217,2 g, 94 %). ES/MS *m/z*: 313 (M+H).

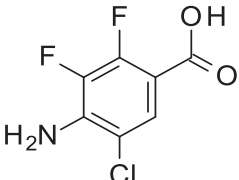
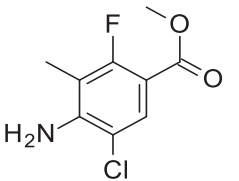
Preparación 26

Metil 4-amino-3,5-dicloro-2-fluoro-benzoato



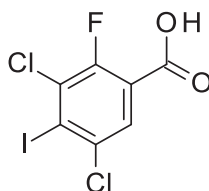
Se disuelven 4-amino-2-fluorobenzoato de metilo (27,0 g, 160 mmol) y NCS (46,3 g, 336 mmol) en DMF (300 ml) y se calienta a 80 °C. Después de 40 minutos, la mezcla de reacción se vierte sobre agua helada y se extrae dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavan una vez con NaOH 5 N, dos veces con LiCl acuoso 0,2 N, se secan en sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título (37,0 g, 97 %). ES/MS *m/z* (³⁵Cl/³⁷Cl) 238/240 [M+H]⁺.

Tabla 1: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 26

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	NMR
27		Ácido 4-amino-5-cloro-2,3-difluoro-benzoico	¹ H NMR (DMSO-d ₆) d 12,96 (s, 1H), 7,54 (dd, J= 2,1, 6,9 Hz, 1H), 6,56 (bs, 2H)
28		Metil 4-amino-5-cloro-2-fluoro-3-metil-benzoato	¹ H NMR (CDCl ₃) d 7,80 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 4,56 (bs, 2H), 3,16 (s, 3H), 2,14 (d, 3H)

Preparación 29

Ácido 3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoico



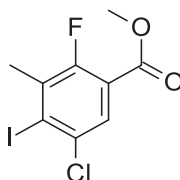
Se combinan yoduro cuproso (10,0 g, 51,5 mmol), ACN (128 ml) y nitrito de *ter*-butilo (13,6 ml, 103 mmol) y la mezcla se calienta a 50 °C durante 30 minutos y luego a la mezcla se le agrega metil 4-amino-3,5-dicloro-2-fluoro-benzoato (6,11 g, 25,7 mmol). Se observa la evolución de gas. Después de 1 hora y 40 minutos a 50 °C, el solvente se elimina al vacío. Se agregan agua, EtOAc y HCl acuoso 1N. La capa acuosa se extrae dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavan con bisulfito de sodio acuoso, se secan en sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentran al vacío. La mezcla cruda se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 3-5 % de EtOAc en hexanos. Las fracciones más limpias se combinan y concentran al vacío para obtener el intermediario de éster metílico (5,85 g, 65 %).

A 3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoato de metilo (5,85 g, 16,8 mmol) se le agrega MeOH (170 ml) y NaOH acuoso 1 N (17 ml). En el transcurso de la agitación a temperatura ambiente durante 40 minutos, el material se disuelve completamente. El MeOH se elimina al vacío. Al residuo se le agrega EtOAc y HCl acuoso 1N. La capa acuosa se extrae dos veces con EtOAc y los extractos orgánicos combinados se

secan en sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título (5,56 g, 99 %): ^1H NMR (CDCl_3) δ 8,063-8,08 (d, 1H, J = 6,34 Hz).

Preparación 30

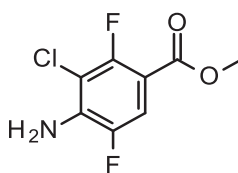
Metil 5-cloro-2-fluoro-4-yodo-3-metil-benzoato



Se agrega 4-amino-5-cloro-2-fluoro-3-metil-benzoato de metilo (14,8 g, 68,0 mmol) en ACN (100 ml) a una mezcla en agitación de yoduro cuproso (15,7 g, 82,4 mmol), ACN (100 ml) y nitrito de *ter*-butilo (12,3 ml, 103 mmol). La reacción se calienta en N_2 a 40 °C durante 18 horas. La mezcla se concentra al vacío hasta la mitad del volumen original, se diluye con EtOAc y se filtra dos veces a través de tierra diatomácea. El filtrado recolectado se concentra al vacío. La mezcla cruda se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con EtOAc en hexanos. Las fracciones más limpias se combinan y concentran al vacío para obtener el compuesto del título (22,46 g, 52,8 %). ^1H NMR (CDCl_3) δ 7,91 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 3,95 (s, 3H), 2,53 (d, J = 3,1 Hz, 3H).

Preparación 31

Metil 4-amino-3-cloro-2,5-difluoro-benzoato

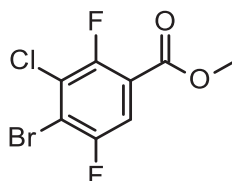


A una solución de 4-amino-2,5-difluorobenzoato de metilo (25 g, 127 mmol) en DMF (100 ml) se le agrega NCS (19,9 g, 146 mmol) a temperatura ambiente y luego la mezcla se calienta a 45 °C. durante 18 horas. La mezcla de reacción se vierte en una mezcla de agua (1,5 l) y éter dietílico (1,2 l) y las capas se separan. La capa acuosa se extrae con éter dietílico (1 l). Los extractos orgánicos combinados se lavan con NaOH acuoso 1 N frío, agua y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Los orgánicos se secan en sulfato de sodio anhidro, y se concentran al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, al eluir con 10-30 % (75 % de EtOAc en DCM)/hexano para obtener el compuesto del título (24,5 g, 87 %).

ES/MS (m/z): 222,2 (M+H).

Preparación 32

Metil 4-bromo-3-cloro-2,5-difluoro-benzoato



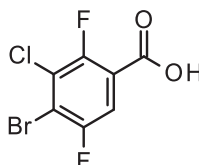
Se agrega metil 4-amino-3-cloro-2,5-difluoro-benzoato (24,5 g, 111 mmol) en ACN (100 ml) a una mezcla fría de bromuro cúprico (6,2 g, 28 mmol) y nitrito de *ter*-butilo. (20 ml, 168 mmol) en ACN (100 ml). La mezcla de color verde se calienta hasta temperatura ambiente durante 18 horas. Después, la mezcla de reacción se diluye con ACN, se filtra a través de una almohadilla de tierra diatomácea, y se enjuaga con DCM. El filtrado se concentra y se diluye con DCM, se filtra de nuevo a través de tierra diatomácea y se enjuaga con DCM. El filtrado se lava con agua, solución saturada de cloruro de amonio (2X), solución acuosa saturada de cloruro de sodio (2X), se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, al eluir con 0-50 % (10 % de EtOAc en DCM)/hexano para obtener el compuesto del título (23,5 g, 70 %). ¹H NMR (CDCl₃) d 7,68 (1H, m), 3,99 (3H, s).

Tabla 2: Compuesto sintetizado de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 32

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	NMR
33		Ácido 4-bromo-5-cloro-2,3-difluoro-benzoico	¹ H NMR (DMSO-d ₆) d 7,89 (dd, J= 2,2, 6,2 Hz, 1H)

Preparación 34

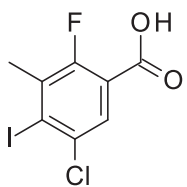
Ácido 4-bromo-3-cloro-2,5-difluoro-benzoico



A una solución de Metil 4-bromo-3-cloro-2,5-difluoro-benzoato (10,8 g, 37,8 mmol) en THF (100 ml) se le agrega MeOH (50 ml). La solución homogénea se enfría

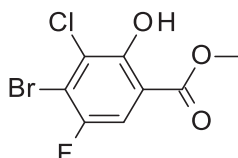
en un baño de hielo y se agrega por goteo NaOH 2 N (60 ml, 120 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 horas. El solvente orgánico se elimina al vacío. La fase acuosa se enfría con hielo y el pH se ajusta a ~2,0 con HCl 5 N (24 ml). La fase acuosa se extrae con EtOAc (3X). Los extractos orgánicos combinados se lavan secuencialmente con cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de magnesio y se concentran al vacío. El residuo resultante se seca en un horno de vacío a 60 °C durante la noche para obtener el compuesto del título (10,3 g, 99 %). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7,81 (dd, J= 6,0, 8,6 Hz, 1H).

Tabla 3: Compuesto sintetizado de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 34

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	NMR
35		Ácido 5-cloro-2-fluoro-4-yodo-3-metil-benzoico	¹ H NMR (DMSO-d ₆) δ 13,62 (s, 1H), 7,84 (d, J= 6,7 Hz, 1H), 2,45 (d, 3H).

Preparación 36

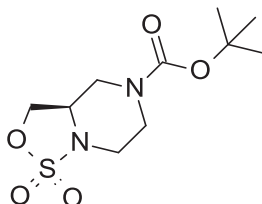
Metil 4-bromo-3-cloro-5-fluoro-2-hidroxibenzoato



A una solución de metilo 4-bromo-5-fluoro-2-hidroxibenzoato (9 g, 34,3 mmol) se agrega en ácido acético (70 ml) NCS (14 g, 104,8 mmol) y la mezcla se calienta hasta 55 °C. Después de 18 horas, se agrega NCS adicional (5,5 g, 37,7 mmol) y la mezcla se agita durante 24 horas a 55 °C. A continuación, la reacción se enfría hasta temperatura ambiente y el exceso de ácido acético se elimina al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice al eluir con 100 % de DCM para obtener el compuesto del título como un sólido (7,1 g, 73 %). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 281/283 [M-H]⁻.

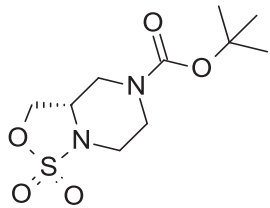
Preparación 37

ter-butil (3aR)-1,1-dioxo-3a,4,6,7-tetrahidro-3H-oxatiazolo[3,4-a]pirazina-5-carboxilato



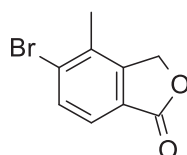
A una suspensión de imidazol (24,9 g, 362 mmol) en DCM (181 ml) a 0 °C se le agrega por goteo cloruro de tionilo (8,0 ml, 110 mmol). La mezcla se agita a 0 °C durante 5 minutos y a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se enfría a -78 °C y se agrega por goteo una solución de *ter*-butil (3R)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato (8,00 g, 36,2 mmol) en DCM (181 ml) durante 45 minutos. La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante 2,5 días. La reacción se inactiva con cloruro de amonio acuoso saturado y se diluye con agua y DCM. Las capas se separan, y la capa acuosa se extrae de nuevo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavan con cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de sodio y se concentran al vacío para obtener un jarabe de color ámbar. A una solución del jarabe en acetonitrilo (282 ml) a 0 °C se le agrega una solución de peryodato de sodio (10,2 g, 47,6 mmol) en agua (92 ml). Se agrega cloruro de rutenio(III) (76 mg, 0,37 mmol). La suspensión resultante se agita a 0 °C durante 5 minutos y a temperatura ambiente durante 5 horas. La reacción se inactiva con cloruro de amonio acuoso saturado y se diluye con agua y EtOAc. Las capas se separan y la capa acuosa se extrae nuevamente con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavan con cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de sodio y se filtran a través de papel de filtro y luego a través de un tapón corto de gel de sílice. El filtrado se concentra al vacío. Al residuo se le agrega DCM y la mezcla se concentra al vacío y se coloca al vacío durante la noche para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color tostado (9,39 g, 93 %). ¹H NMR (CDCl₃) δ 4,63 (1H, dd), 4,23 (1H, t), 4,23 (1H, br s), 4,07 (1H, br s), 3,64 (1H, m), 3,45 (1H, d), 3,13 (1H, m), 2,96 (2H, td), 1,47 (9H, s).

Tabla 4: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 37

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	¹ H NMR (CDCl ₃)
38		<i>ter</i> -butil (3a <i>S</i>)-1,1-dioxo-3a,4,6,7-tetrahidro-3H-oxatiazolo[3,4- <i>a</i>]pirazina-5-carboxilato	4,63 (1H, dd), 4,23 (1H, t), 4,23 (1H, br s), 4,07 (1H, br s), 3,64 (1H, m), 3,45 (1H, d), 3,13 (1H, m), 2,96 (2H, td), 1,47 (9H, s)

Preparación 39

5-bromo-4-metil-3H-isobenzofuran-1-ona

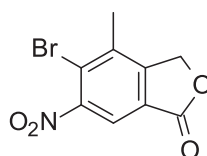


A una suspensión de (3-bromo-2-metilfenil)metanol (15,0 g, 73,1 mmol) en TFA (75 ml) se le agrega trifluoroacetato de talio(III) (41,8 g 73,1 mmol). Se usa TFA adicional (25 ml) para enjuagar el trifluoroacetato de talio(III) en el recipiente de reacción. La mezcla se agita en nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche y se concentra al vacío y se seca al vacío para proporcionar un sólido de color tostado claro. El sólido se coloca en nitrógeno y se combina con óxido de magnesio (6,01 g, 149 mmol), cloruro de litio (6,32 g, 149 mmol) y MeOH (300 ml). Se agrega cloruro de paladio(II) (1,32 g, 7,38 mmol) a la mezcla. La mezcla se purga cinco veces con monóxido de carbono y se coloca en una atmósfera de monóxido de carbono (presión de globo). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se agregan cloruro de paladio(II) (262 mg, 1,46 mmol) y óxido de magnesio (1,18 g, 29,2 mmol). La mezcla se purga tres veces con monóxido de carbono y se coloca en una atmósfera de monóxido de carbono (presión de globo). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agregan cloruro de paladio(II) (262 mg, 1,46 mmol) y óxido de magnesio (1,18 g, 29,2 mmol). La mezcla se purga cuatro veces con monóxido de carbono y se coloca en una atmósfera de monóxido de carbono (presión de globo). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se agregan cloruro de paladio(II) (327 mg, 1,83 mmol) y óxido de magnesio (1,77 g, 43,9 mmol). La mezcla se purga con monóxido de carbono y se coloca en una atmósfera de

monóxido de carbono (presión de globo). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se filtra a través de tierra de diatomeas y se lava a través de tierra diatomácea con EtOAc. El filtrado se concentra al vacío para obtener un residuo. El producto crudo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 0-30 % de EtOAc/hexanos. Las fracciones que contienen producto se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (14,48 g, 70 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 227,0/229,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 40

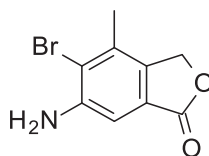
5-bromo-4-metil-6-nitro-3H-isobenzofuran-1-ona



Una solución de 5-bromo-4-metil-3H-isobenzofuran-1-ona (14,4 g, 50,7 mmol, 80 % de pureza) en ácido sulfúrico concentrado (160 ml) se enfría hasta -5 °C y nitrato de potasio (9,62 g, 95,2 mmol). La mezcla se agita en nitrógeno durante 2,5 horas y se agrega hielo (750 g) con agitación. La mezcla se extrae tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavan con cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de sodio y se concentran al vacío. El material crudo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 10-70 % de EtOAc/hexanos. Las fracciones que contienen el producto se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido de color blanquecino a amarillo/naranja (11,98 g, 87 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 289,0/291,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 41

6-amino-5-bromo-4-metil-3H-isobenzofuran-1-ona

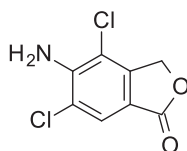


A un matraz a presión se le agrega 5-bromo-4-metil-6-nitro-3H-isobenzofuran-1-ona (11,98 g, 44,04 mmol), DCM (1000 ml), TFA (300 ml, 4 mol) y platino (5 % en carbono, sulfurado, 3,00 g, 0,769 mmol). La mezcla se purga con hidrógeno y se presuriza hasta 45 PSI durante 1,25 horas. La mezcla de reacción se filtra a través de tierra diatomácea y se lava con DCM. El filtrado se concentra al vacío para obtener un residuo. El residuo se seca al vacío y se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 10-60 % de EtOAc/DCM. Las fracciones que contienen el

producto se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido de color durazno (9,86 g, 96 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 242,0/244,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 42

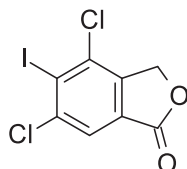
5-amino-4,6-dicloro-3H-isobenzofuran-1-ona



A una solución de 5-amino-3H-isobenzofuran-1-ona (10,44 g, 68,60 mmol) en DMF (100 ml) a temperatura ambiente se le agrega NCS (20,56 g, 150,9 mmol). La mezcla se agita a 50 °C durante 2,5 horas y a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vierte en agua (1 l) y el precipitado se filtra con un filtro de fritas, se lava dos veces con agua y luego con éter dietílico y se seca al aspirar aire a través de la fritas. El precipitado se absorbió en EtOAc, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido de color naranja amarillento (14,27 g, 93 %). ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 218,2/220,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 43

4,6-dicloro-5-yodo-3H-isobenzofuran-1-ona

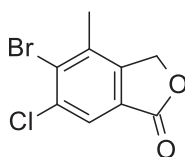


A una suspensión de 5-amino-4,6-dicloro-3H-isobenzofuran-1-ona (8,00 g, 35,6 mmol) en acetonitrilo (237 ml) a -15 °C se le agrega ácido sulfúrico concentrado (6,5 ml, 120 mmol) por goteo. Se agrega lentamente una solución de nitrito de sodio (4,96 g, 71,2 mmol) en agua (36 ml). La mezcla se agita a 0 °C durante 30 minutos. Se agrega por goteo una solución de yoduro de potasio (23,6 g, 142 mmol) en agua (36 ml). La mezcla se agita a 0 °C durante 15 minutos y a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se diluye con sulfito de sodio acuoso saturado y se concentra parcialmente al vacío para eliminar la mayor parte del acetonitrilo. La mezcla se diluye con EtOAc y las capas se separan. La capa orgánica se lava con cloruro de sodio acuoso saturado, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío. El material crudo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 0-25 % de EtOAc/hexanos. Las fracciones que contienen el producto impuro se concentran al vacío y se purifican adicionalmente mediante cromatografía flash de gel

de sílice al eluir con 100 % de DCM. Las fracciones que contienen el producto puro de ambas purificaciones cromatográficas se combinan, se concentran al vacío y se colocan al vacío durante la noche para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (6,62 g, 51 %). ^1H NMR (CDCl_3) δ 7,89 (1H, s), 5,25 (2H, s).

Preparación 44

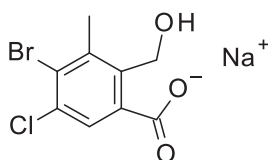
5-bromo-6-cloro-4-metil-3H-isobenzofuran-1-ona



A una suspensión de cloruro cúprico (5,85 g, 43,5 mmol) en acetonitrilo (150 ml) en un baño de agua fría se le agrega nitrito de *ter*-butilo (12,9 ml, 108 mmol) durante 5 minutos. La mezcla se agita durante 10 minutos y se retira el baño de agua fría. La mezcla se agita en nitrógeno durante otros 25 minutos. Se agrega por goteo una solución de 6-amino-5-bromo-4-metil-3H-isobenzofuran-1-ona (8,73 g, 36,1 mmol) en acetonitrilo (550 ml) y la mezcla se agita en nitrógeno durante 1,5 horas. La mezcla se concentra parcialmente al vacío para reducir el volumen a alrededor de 275 ml. La mezcla se diluye con cloruro de sodio acuoso saturado (300 ml) y HCl 1 M (500 ml) y se extrae dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavan dos veces con bicarbonato de sodio acuoso saturado, se lavan dos veces con cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío. El material crudo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 5-30 % de EtOAc/DCM. Las fracciones que contienen el producto se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (9,03 g, 96 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 278,0/280,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 45

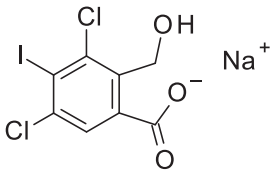
4-bromo-5-cloro-2-(hidroximetil)-3-metil-benzoato de sodio



En un vial con tapa de rosca con una barra de agitación se agregan 5-bromo-6-cloro-4-metil-3H-isobenzofuran-1-ona (2,459 g, 8,557 mmol) y NaOH 1 M (9,4 ml, 9,4 mmol). El vial se tapa y se calienta a 100 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfría hasta temperatura ambiente y se transfiere a un matraz de 1 l. Se agrega tolueno (100 ml) y la mezcla se concentra al vacío y se coloca al vacío durante 3 días

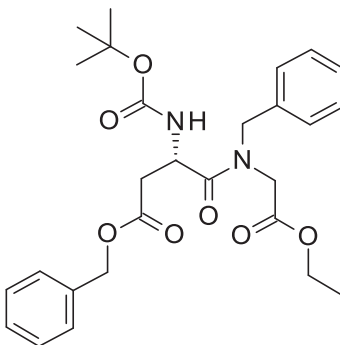
para obtener el compuesto del título como un sólido de color tostado (2,81 g, 99+%).
ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 276,8/278,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Tabla 5: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 45

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS (M+H) m/z
46		3,5-dicloro-2-(hidroximetil)-4-yodo-benzoato de sodio	344,8/346,8

Preparación 47

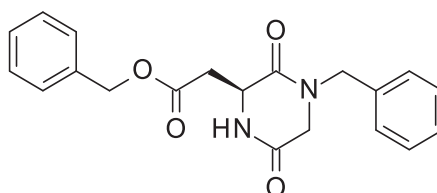
Bencil (3S)-4-[bencil-(2-etoxi-2-oxo-etil)amino]-3-(ter-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato



Se agrega éster 4-bencílico del ácido boc-L-Aspártico (114 g, 352,6 mmol) a un recipiente de reacción. Se agregan DCM (950 ml) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (74,5 g, 361 mmol) y la mezcla se enfría a 10-20 °C. Se agrega por goteo éster etílico de bencilglicina (68,2 g, 353 mmol), manteniendo la temperatura por debajo de 20 °C. La mezcla se agita a 10-20 °C durante 17 horas, luego se filtra y se concentra al vacío. Se agrega MTBE (230 ml) y la mezcla se agita durante 0,5 horas. La mezcla se filtra y se concentra al vacío para obtener el compuesto del título como un aceite (174,4 g, 99 %).

Preparación 48

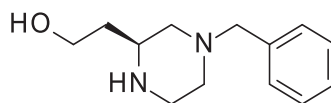
Bencil 2-[(2S)-4-bencil-3,6-dioxo-piperazin-2-il]acetato



Se agrega bencil (3S)-4-[bencil-(2-etoxi-2-oxo-etil)amino]-3-(ter-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato (174,4 g, 349,8 mmol) a un recipiente de reacción junto con DCM (500 ml) y TFA (230 ml). La mezcla se agita a 15-20 °C durante 16 horas, luego se concentra al vacío hasta secarse. El residuo se disuelve en isopropanol (500 ml) y se calienta hasta 80 °C durante 1 hora. La mezcla se concentra al vacío, luego se diluye con agua (230 ml). La mezcla se neutraliza con 15 % de NaOH en agua a pH 8-9 (se utilizan 109 g de 15 % de NaOH acuoso). La mezcla se filtra y se enjuaga con agua (2 x 100 ml). Los sólidos se secan al vacío a 50-55 °C durante 2 días para obtener el compuesto del título como un sólido (95,9 g, 78 %). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,44 – 7,29 (m, 8H), 7,32 – 7,23 (m, 2H), 6,91 (br s, 1H), 5,18 (d, J = 12,1 Hz, 1H), 5,14 (d, J = 12,2 Hz, 1H), 4,64 (d, J = 14,5 Hz, 1H), 4,54 (d, J = 14,5 Hz, 1H), 4,44 (br d, J = 7,9 Hz, 1H), 3,88 (d, J = 17,7 Hz, 1H), 3,82 (d, J = 17,7 Hz, 1H), 3,15 (dd, J = 17,5, 3,4 Hz, 1H), 2,93 (dd, J = 17,5, 8,3 Hz, 1H).

Preparación 49

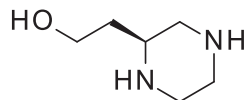
2-[(2S)-4-Bencilpiperazin-2-il]etanol



Se agrega hidruro de litio y aluminio (13 g, 342,5 mmol) a un recipiente de reacción junto con THF (200 ml). La mezcla se enfría hasta -5-0 °C. Se agrega bencil 2-[(2S)-4-bencil-3,6-dioxo-piperazin-2-il]acetato (50 g, 141,9 mmol) a un segundo recipiente junto con THF (400 ml). La solución de bencil 2-[(2S)-4-bencil-3,6-dioxo-piperazin-2-il]acetato se agrega lentamente a la solución de hidruro de litio y aluminio, manteniendo la temperatura entre -5 y 0 °C. La mezcla de reacción se calienta hasta 60-65 °C y se agita durante 2 horas. La mezcla se enfría hasta 20-30 °C y se agita durante 16 horas. Se agrega agua (13 g), luego se agrega 4 % de NaOH en agua (52 g). La mezcla se agita durante 1 hora, se filtra y se concentra al vacío. Se agregan acetato de isopropilo (200 ml) y HCl 2 M (150 g). Las capas se separan y la capa acuosa se lava nuevamente con acetato de isopropilo (100 ml). La capa acuosa se ajusta a pH 11-12 con NaOH y se agrega DCM (150 ml). Las capas se separan y la capa orgánica se lava con agua (100 ml). Las capas se separan y la capa orgánica se concentra al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido (20,1 g, 64 %). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,44 – 7,20 (m, 5H), 3,81 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,50 (s, 2H), 3,08 – 2,93 (m, 2H), 2,93 – 2,82 (m, 1H), 2,76 (d, J = 11,5 Hz, 2H), 2,02 (td, J = 11,1, 3,3 Hz, 1H), 1,85 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 1,67 – 1,52 (m, 2H).

Preparación 50

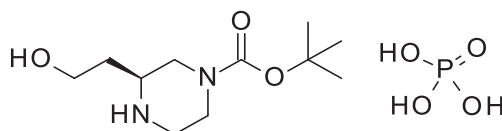
2-[(2S)-Piperazin-2-il]etanol



2-[(2S)-4-bencilpiperazin-2-il]etanol (20 g, 91 mmol) se agrega a un recipiente de reacción purgado con H₂. Se agrega MeOH (200 ml) y se agrega Pd (OH)₂ (2 g). La mezcla se purga con H₂, luego se presuriza a 45 psi de H₂. La mezcla se calienta hasta 50 °C y se agita durante 44 horas. La mezcla de reacción se filtra y se concentra al vacío para obtener el compuesto del título como un aceite (12,7 g, 99+%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 3,84 – 3,65 (m, 2H), 3,44 (s, 1H), 2,99 – 2,83 (m, 4H), 2,78 (td, *J* = 11,6, 2,5 Hz, 1H), 2,68 (td, *J* = 11,4, 2,8 Hz, 1H), 2,54 – 2,42 (m, 1H), 1,65 – 1,43 (m, 2H).

Preparación 51

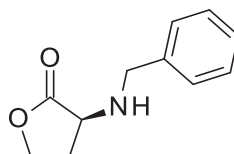
ter-butil (3S)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato;ácido fosfórico



Se agrega 2-[(2S)-piperazin-2-il]etanol (9,2 g, 70,4 mmol) a un recipiente de reacción, junto con MeOH (83 ml) y agua (9 ml). La mezcla se agita durante 0,5 horas a 15 °C. Se agrega dicarbonato de di-*ter*-butilo (15,4 g, 70,6 mmol) a un segundo recipiente, junto con MeOH (92 ml). La solución de dicarbonato de di-*ter*-butilo se agrega a la solución de 2-[(2S)-piperazin-2-il]etanol durante 0,5 horas, manteniendo la temperatura por debajo de 15 °C. La mezcla se agita durante 2 horas a 15 °C. Se combinan ácido fosfórico (85 % en fuerza, 8,11 g, 70,4 mmol) y EtOH en un recipiente separado y se agrega la solución de ácido fosfórico a la mezcla de reacción durante 30 minutos. La mezcla se agita durante 20 minutos a 15 °C, luego se enfría hasta -5° C durante 3 horas. La mezcla se agita a -5 °C durante 1 hora, se filtra y se lava con EtOH, luego se seca a 50 °C durante 4 horas para obtener el compuesto del título como un sólido (5,82 g, 25 %). ¹H NMR (D₂O) δ 4,11 – 4,03 (m, 1H), 4,00 (br s, 1H), 3,75 – 3,62 (m, 2H), 3,43 – 3,30 (m, 2H), 3,30 – 3,18 (m, 1H), 3,17 – 2,95 (m, 2H), 1,86 – 1,78 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

Preparación 52

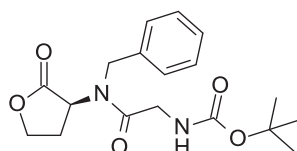
(3S)-3-(bencilamino)tetrahidrofuran-2-ona



Una suspensión de clorhidrato de L-homoserina lactona (100 g, 726,93 mmol, 4Å en polvo tamices moleculares (178 g), y benzaldehído (57 ml, 561,3 mmol) en DCM (2500 ml) se agita durante la noche en nitrógeno a 35 °C. Después de este tiempo, se retira el calentamiento y la mezcla se enfría a 20 °C. Se agrega triacetoxiborohidruro de sodio (208 g, 981,41 mmol) a la mezcla, que luego se deja calentar hasta temperatura ambiente después de 20 minutos y se agita durante 2 horas. Después de este tiempo, la mezcla se enfría hasta -10 °C y se inactiva cuidadosamente con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (400 ml). El pH se ajusta a 8 con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y bicarbonato de sodio sólido. La mezcla se filtra a través de una almohadilla de tierra diatomácea y se enjuaga con EtOH. Las capas se separan y la acuosa se extrae un tiempo adicional con DCM (1 l). Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un aceite transparente (87 g, 66,5 %, 81 % en masa). ES/MS m/z: 192,2 (M+H). Para un trabajo analítico adicional, se purifica una muestra del compuesto del título (1 g) mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 10-50 % de EtOAc/DCM para obtener 422 mg del compuesto del título purificado. Este material se analiza mediante el uso de Chiralpak® IC, 4,6 x 150 mm, 10 % de IPA (0,2 % IPAm)/CO₂, 5 ml/min, 225 nm que muestra >98 % de e.e.

Preparación 53

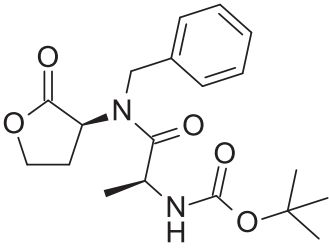
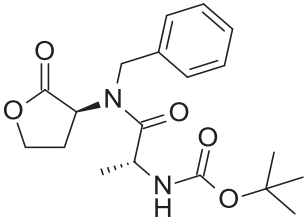
ter-butil N-[2-[bencil-[(3S)-2-oxotetrahydrofuran-3-il]amino]-2-oxo-etil]carbamato



Una mezcla de (3S)-3-(bencilamino)tetrahydrofuran-2-ona (86 g, 364,27 mmol, 81 % en masa), boc-Gly-OH (97 g, 553,71 mmol) y TEA (103 ml, 739 mmol) en DCM (700 ml) se enfría a ~5 °C. Se agrega anhídrido propilfosfónico (50 % en masa en EtOAc) (430 ml, 737 mmol) por goteo durante una hora a la mezcla mientras se mantiene la temperatura interna ~10 °C. Después de la adición, la mezcla se deja calentar hasta temperatura ambiente. Después de siete horas, la mezcla se enfría

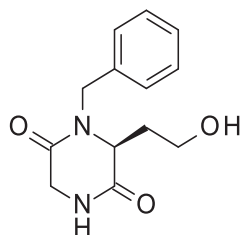
hasta 10 °C y se agrega boc-Gly-OH (3,1 g, 18 mmol), TEA (5 ml, 35,9 mmol) y anhídrido propilfosfónico (50 % en masa en EtOAc) (22 ml, 37,7 mmol). La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante la noche. Después de este tiempo, la mezcla se enfría hasta 8 °C y se agrega boc-Gly-OH (9,6 g, 55 mmol), TEA (10 ml, 71,7 mmol) y anhídrido propilfosfónico (50 % en masa en EtOAc) (42 ml, 71,9 mmol). La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante ~7 horas. Después de este tiempo, la mezcla se vierte sobre hielo y se inactiva cuidadosamente con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (1 l). Se ajusta el pH a 8 con bicarbonato de sodio sólido y se separan las capas. La fase acuosa se extrae dos veces más con DCM. Los orgánicos combinados se lavan con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (500 ml). La capa orgánica se filtra a través de una almohadilla de tierra diatomácea y sulfato de sodio. Los orgánicos se concentran al vacío hasta un volumen de 1 l y se lavan dos veces con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Los extractos orgánicos se secan en sulfato de magnesio, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título que se utilizará sin purificación adicional (194 g, 53,5 %, 35 % en masa). ES/MS m/z: 249,0 (M-t-Bu+H)

Tabla 6: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 53

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M+H)
54		<i>ter</i> -butil N-[(1S)-2-[bencil-[(3S)-2-oxotetrahidrofuran-3-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato	263,0
55		<i>ter</i> -butil N-[(1R)-2-[bencil-[(3S)-2-oxotetrahidrofuran-3-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato	263,0

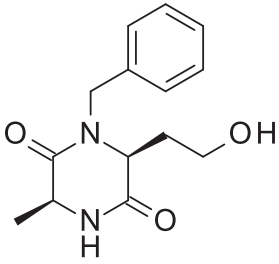
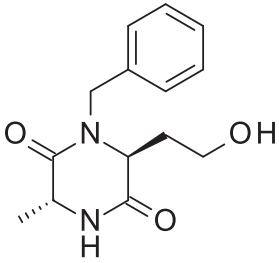
Preparación 56

(6S)-1-Bencil-6-(2-hidroxietil)piperazina-2,5-diona



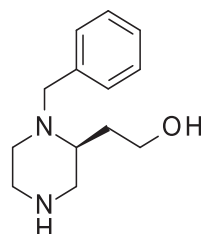
Se agrega TFA (100 ml, 1310 mmol) a una mezcla de *ter*-butil N-[2-[bencil-[(3*S*)-2-oxotetrahidrofuran-3-il]amino]-2-oxo-etil]carbamato (194 g, 194,9 mmol, 35 % en masa) en DCM (500 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente en nitrógeno durante la noche. Después de este tiempo, se agrega TFA adicional (50 ml, 653 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente. Después de dos horas, se agrega TFA adicional (50 ml, 653 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. Después de este tiempo, la reacción se concentra al vacío. El residuo resultante se diluye con agua (600 ml) y se lava dos veces con éter dietílico. El pH se ajusta a 7 con una solución acuosa de NaOH 1 N y luego se ajusta además a pH 12 con una solución acuosa de NaOH 5N. Se agrega MeOH (~10 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente. Se agrega una solución acuosa adicional de NaOH 5 N a la mezcla a intervalos de cinco minutos para reajustar el pH a 12. En total, la mezcla se agita a pH 12 durante 35 minutos. Después de este tiempo, el pH se ajusta a 8 con una solución acuosa de HCl al 10 % y se extrae con DCM (5 x 1 l). El pH acuoso se ajusta luego a 5 con una solución acuosa de HCl al 10 % y se extrae nuevamente con DCM (1 l). Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido de color tostado claro (17 g, 33,4 %). Se realizan extracciones adicionales de la fase acuosa al alternar 25 % de IPA/cloroformo y DCM hasta que el producto del título se elimina de la fase acuosa de acuerdo con LC/MS. A los orgánicos combinados se agrega IPA (150 ml). Los extractos orgánicos se lavan dos veces con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secan en sulfato de sodio y sulfato de magnesio, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título adicional (17,2 g, 35,5 %) para un rendimiento total de 34,2 g (68,9 %). ES/MS *m/z*: 249,0 (*M*+*H*)

Tabla 7: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 56

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
57		(3S,6S)-1-bencil-6-(2-hidroxiethyl)-3-metil-piperazina-2,5-diona	263,0
58		(3R,6S)-1-bencil-6-(2-hidroxiethyl)-3-metil-piperazina-2,5-diona	263,0

Preparación 59

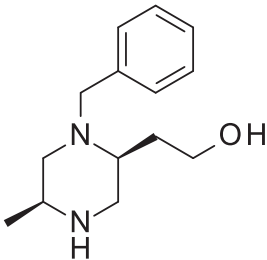
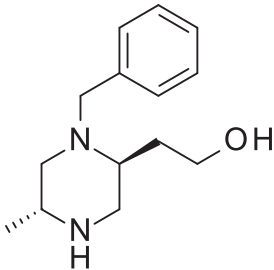
2-[(2S)-1-Bencilpiperazin-2-il]etanol



A una solución a 45 °C de hidruro de litio y aluminio 2 M en THF (131 ml, 262 mmol) se le agrega una solución de (6S)-1-bencil-6-(2-hidroxiethyl)piperazina-2,5-diona (34 g, 131,5 mmol) en THF (200 ml) por goteo. Después de la adición, la mezcla se calienta hasta 60 °C. Después de ~3,5 horas, se agrega hidruro de litio y aluminio 2 M adicional en THF (33 ml, 66 mmol) y la mezcla se agita a 60 °C. Después de una hora, se agrega hidruro de litio y aluminio 2 M adicional en THF (131 ml, 262 mmol) y la mezcla se agita a 60 °C durante la noche. Después de este tiempo, se agrega hidruro de litio y aluminio 2 M en THF (6 ml, 12 mmol) y la mezcla se agita a 60 °C. Después de cuatro horas, se agrega hidruro de litio y aluminio 2 M en THF (6 ml, 12 mmol) y la mezcla se agita durante dos horas a 60 °C. Se retira el calor y la mezcla se enfría hasta 10 °C. Se agrega por goteo agua (16 ml), seguido de la adición por goteo de NaOH acuoso 3,75 M (16 ml) y luego THF (300 ml). Se agrega agua (48 ml) y la

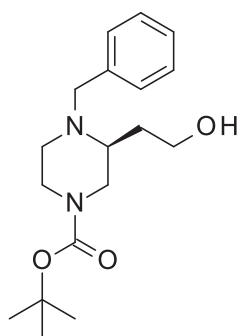
mezcla resultante se agita durante la noche a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la mezcla se filtra a través de una almohadilla de tierra diatomácea y se enjuaga a través de EtOAc. El filtrado se concentra al vacío para obtener el compuesto del título (28,8 g, 67,6 %, 68 % en masa). ES/MS m/z: 221,0 (M+H)

Tabla 8: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 59

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
60		2-[(2S,5S)-1-Bencil-5-metil-piperazin-2-il]etanol	235,0
61		2-[(2S,5R)-1-Bencil-5-metil-piperazin-2-il]etanol	235,0

Preparación 62

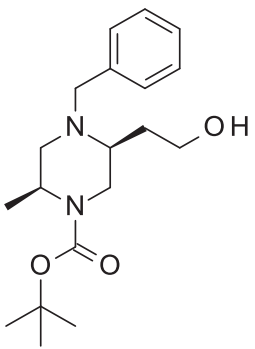
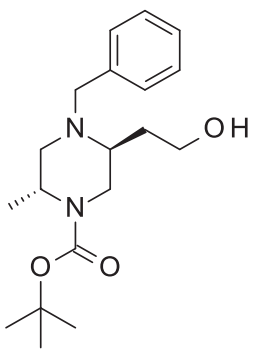
ter-butil (3S)-4-bencil-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato



Se agrega bicarbonato de sodio (80 g, 952 mmol) en agua (500 ml) a 2-[(2S)-1-bencilpiperazin-2-il]etanol (28 g, 86,43 mmol) en 1,4-dioxano (500 ml) a temperatura ambiente. Se agrega dicarbonato de di-*ter*-butilo (26,6 g, 122 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de este tiempo, se agregan hielo (400 ml), agua (200 ml) y EtOAc (1 l) y se separan las capas. La capa acuosa se extrae una vez más con EtOAc (1 l). Los orgánicos combinados se lavan

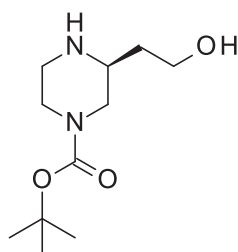
con agua (250 ml) y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (250 ml), se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío. El aceite resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 10-70 % de EtOAc al /hexanos para obtener el compuesto del título (20,79 g, 74 %). ES/MS m/z: 321,2 (M+H) Este material se analiza mediante el uso de Chiralpak® IC, 4,6 x 150 mm, 15 % IPA (0,2 % IPAm)/CO₂, 5 ml/min, 225 nm que muestra 96 % de e.e.

Tabla 9: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 62

Preparación	Estructura	Nombre compuesto del	ES/MS m/z (M+H)
63		<i>ter</i> -butil (2S,5S)-4-bencil-5-(2-hidroxietyl)-2-metil-piperazina-1-carboxilato	335,0
64		<i>ter</i> -butil (2R,5S)-4-bencil-5-(2-hidroxietyl)-2-metil-piperazina-1-carboxilato	335,0

Preparación 65

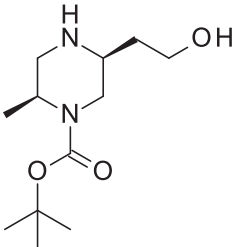
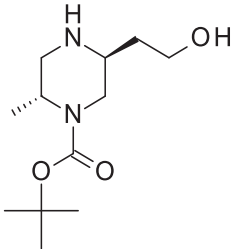
ter-butil (3S)-3-(2-hidroxietyl)piperazina-1-carboxilato



Se agrega 20 % de Pd(OH)₂ en carbono (24,39 g, 176,4 mmol) a un recipiente que se purga con nitrógeno. Se agrega EtOH (620 ml) al recipiente seguido de *ter*-butil

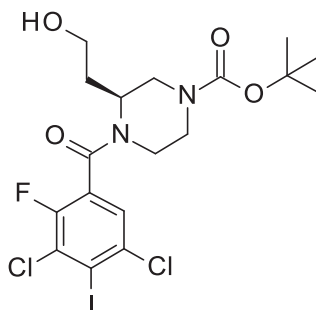
(3S)-4-bencil-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato (61,93 g, 193,3 mmol) y EtOH (620 ml). El recipiente se sella, se purga con nitrógeno, se purga con hidrógeno y se presuriza en hidrógeno (60 psi). El recipiente se coloca en un agitador Parr durante 15 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se filtra y se concentra al vacío para obtener el compuesto del título (42,74 g, 98 %). ES/MS m/z 231,0: (M+H).

Tabla 10: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 65

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M+H)
66		<i>ter</i> -butil (2S,5S)-5-(2-hidroxietil)-2-metil-piperazina-1-carboxilato	245,0
67		<i>ter</i> -butil (2R,5S)-5-(2-hidroxietil)-2-metil-piperazina-1-carboxilato	245,0

Preparación 68

ter-butil (3S)-4-(3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato

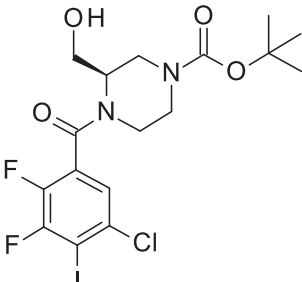
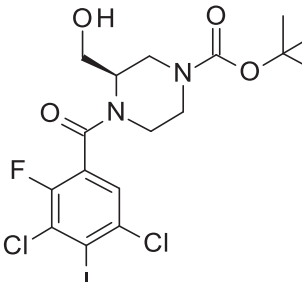
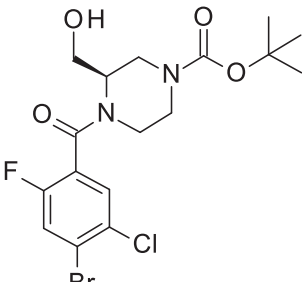
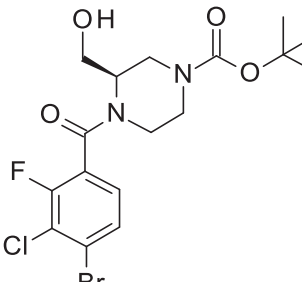
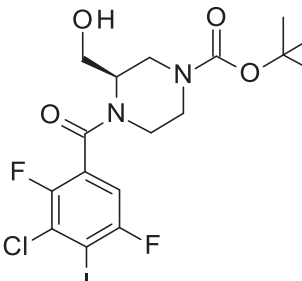


Se agrega ácido 3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoico (0,80 g, 2,4 mmol) a DIEA (2 ml, 11,5 mmol) en THF (22 ml) seguido de HATU (0,84 g, 2,2 mmol) y se agita durante 1 hora. Luego, se agrega *ter*-butil (3S)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato (0,50 g, 2,2 mmol) y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante la noche.

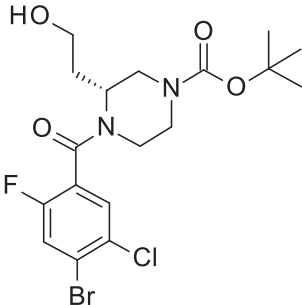
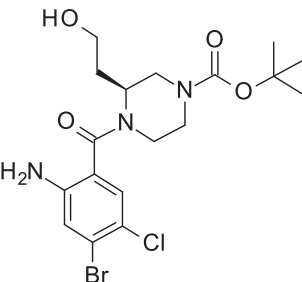
Después de este tiempo, se agrega NaOH 5 N y la reacción se agita durante 1 hora. Se agrega EtOAc y agua. La capa acuosa se extrae dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentran al vacío. La mezcla cruda se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con EtOAc: hexano (30:70) para obtener el compuesto del título (0,858 g, 72 %). ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 491/493 [M-t-Bu+H] $^{+}$.

Tabla 11: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 68.

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
69		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(4-bromo-5-cloro-2,3-difluoro-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato	427,0/429,0
70		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(4-bromo-5-cloro-2-fluoro-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato	408,8/410,8
71		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(4-bromo-3-cloro-2-fluoro-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato	408,9/411,0
72		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(5-3-cloro-2-fluoro-4-yodo-5-metil-benzoil)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	457,0/459,2

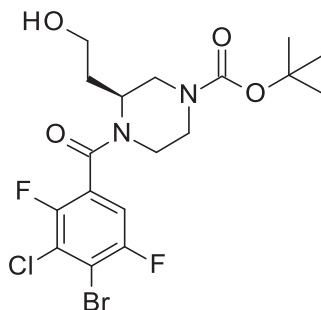
73		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(5-cloro-2,3-difluoro-4-yodo-benzoyl)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	461,0/463,0
74		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoyl)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	476,8/478,8
75		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(4-bromo-5-cloro-2-fluoro-benzoyl)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	394,8/396,8
76		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(4-bromo-3-cloro-2-fluoro-benzoyl)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	394,8/396,8
77		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(3-cloro-2,5-difluoro-4-yodo-benzoyl)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	461,0/463,0

78		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(3-cloro-2,5-difluoro-4-yodo-benzoil)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	461,2/463,0
79		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoil)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	477,0/478,9
80		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato	490,9/492,8
81		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(5-cloro-2,3-difluoro-4-yodo-benzoil)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	461,0/463,0
82		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(4-bromo-5-cloro-2-fluoro-benzoil)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	394,8/396,8

83		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(4-bromo-5-cloro-2-fluoro-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato	408,8/410,8
84		<i>ter</i> -butil (3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-cloro-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato	406,0/408,0

Preparación 85

ter-butil (3S)-4-(4-bromo-3-cloro-2,5-difluoro-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato



Una solución de ácido 4-bromo-3-cloro-2,5-difluoro-benzoico (10,2 g, 37,6 mmol) y 4-metilmorfolina (7,50 ml, 68,0 mmol) en THF (200 ml) se enfría hasta 0 °C en un baño de hielo y se trata con 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (9,10 g, 50,8 mmol). La mezcla se agitó en baño de hielo durante 30 minutos y luego *ter*-butil (3S)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato (0,93M en THF, 40,0 ml, 37,2 mmol) se agrega por goteo a través de un embudo de adición. Después de 1 hora a 0 °C, se agrega NaOH 5 N (35,0 ml, 180 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se diluye con EtOAc, se trata con una solución saturada de bicarbonato de sodio y se agita durante 15 minutos. La fase orgánica se separa, se lava con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se seca en sulfato de magnesio, se filtra y se concentra al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, al eluir con 0-90 % (20 % de acetona

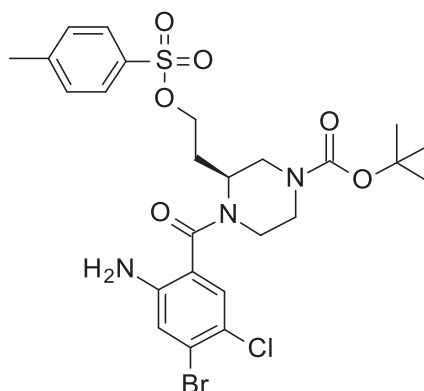
en DCM)/hexano para obtener el compuesto del título (16,0 g, 88 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 427/429 [M-t-Bu+H] $^{+}$.

Tabla 12: Compuesto sintetizado de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 85

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
86		<i>ter</i> -butil (3R)-4-(4-bromo-3-cloro-2,5-difluoro-benzoil)-3-(hidroximetil)piperazina-1-carboxilato	412,8/414,8

Preparación 87

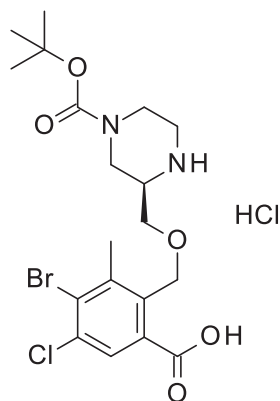
ter-butil (3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-cloro-benzoil)-3-[2-(p-tolilsulfonilo)etil]piperazina-1-carboxilato



A una solución a 0 °C de *ter*-butil (3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-cloro-benzoil)-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato (1 g, 2,16 mmol) y TEA (1 ml, 7,14 mmol) en DCM (25 ml) se agrega DMAP (45 mg, 0,36 mmol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (469 mg, 2,39 mmol). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 15 minutos antes de dejar que se caliente hasta temperatura ambiente. Se agrega más cloruro de p-toluenosulfonilo (122 mg, 0,62 mmol) después de 3 horas. Después de 1 hora, la reacción se diluye con DCM y se lava con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Los orgánicos se lavan con cloruro de sodio acuoso saturado, luego se secan en sulfato de sodio y se concentran al vacío. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice para obtener el compuesto del título (473 mg, 35 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 616,0/618,0 [M+H] $^{+}$

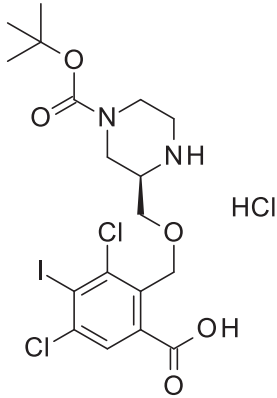
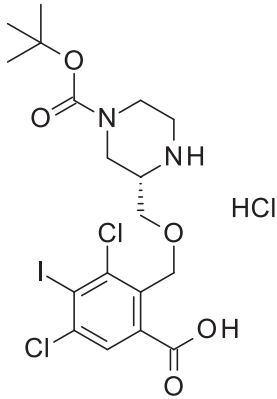
Preparación 88

Clorhidrato del ácido 4-bromo-2-[[[(2R)-4-*ter*-butoxicarbonilpiperazin-2-il]metoximetil]-5-cloro-3-metil-benzoico



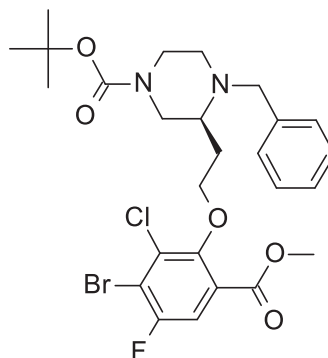
Al 4-bromo-5-cloro-2-(hidroximetil)-3-metil-benzoato de sodio (2,05 g, 6,39 mmol) en un matraz de 250 ml se le agrega tolueno (50 ml) y la mezcla se concentra al vacío. El residuo se disuelve en DMF (21 ml) y THF (11 ml) y se enfría hasta 0 °C. Se agrega hidruro de sodio (60 % en masa en aceite de parafina) (511 mg, 12,8 mmol). Después de la adición, la mezcla se agita a 0 °C durante 10 minutos. A *ter*-butil (3aR)-1,1-dioxo-3a,4,6,7-tetrahidro-3H-oxatiazolo[3,4-a]pirazina-5-carboxilato (1,96 g, 7,04 mmol) en un segundo matraz se le agrega tolueno (20 ml) y la mezcla se concentra al vacío. El residuo se disuelve en THF (11 ml) y se agrega por goteo al contenido del primer matraz a 0 °C. La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante 1,5 horas. Se agrega lentamente HCl 5 M (7 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se inactiva con bicarbonato de sodio acuoso saturado. El pH se reduce a pH 2 mediante la adición lenta de HCl 5 M y la mezcla se diluye con EtOAc. Las capas se separan y la capa acuosa se extrae tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío. El residuo se disuelve en THF (40 ml) y se agrega HCl 5 M (6 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla se diluye con cloruro de sodio acuoso saturado y EtOAc y las capas se separan. La capa orgánica se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío y se coloca al vacío durante 2 horas para obtener el compuesto del título como un sólido de color tostado (4,27 g, 73 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 477,2/479,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Tabla 13: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 88

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M+H)
89		Clorhidrato de ácido 2-[[[(2R)-4-ter-butoxicarbonilpiperazin-2-il]metoximetil]-3,5-dicloro-4-yodo-benzoico	545,2/547,2
90		Clorhidrato del ácido 2-[[[(2S)-4-ter-butoxicarbonilpiperazin-2-il]metoximetil]-3,5-dicloro-4-yodo-benzoico	545,0/547,2

Preparación 91

ter-butil (3S)-4-bencil-3-[2-(3-bromo-2-cloro-4-fluoro-6-metoxicarbonil-fenoxi)etil]piperazina-1-carboxilato

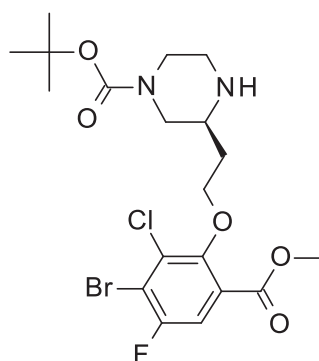


Una solución de metil 4-bromo-3-cloro-5-fluoro-2-hidroxi-benzoato (3,0 g, 11,0 mmol), trifenilfosfina (4,19 g, 16,0 mmol) y *ter*-butil (3S)-4-bencil-3-(2-hidroxietil)piperazina-1-carboxilato (12 ml, 1,039 M en THF) en THF (~50 ml) se enfría

hasta 0 °C durante 10 minutos. Se agrega por goteo azodicarboxilato de diisopropilo (3,1 ml, 16 mmol) y se deja calentar la mezcla hasta temperatura ambiente. Una vez consumido el material de inicio de alcohol, se agrega hielo y la reacción se diluye con EtOAc. La mezcla se lava dos veces con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y la capa orgánica se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío hasta un aceite de color ámbar. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice, al eluir 0-10 % de EtOAc/hexanos para obtener el compuesto del título (6,2 g, 99+%). Se obtiene una muestra analítica de ~95 % de pureza mediante cromatografía en columna de gel de sílice, al eluir con 25-50 % de (1:1 EtOAc:DCM)/hexanos para obtener el compuesto del título como un aceite incoloro. ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 585/587 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 92

ter-butil (3*S*)-3-[2-(3-bromo-2-cloro-4-fluoro-6-metoxycarbonil-fenoxi)etil]piperazina-1-carboxilato

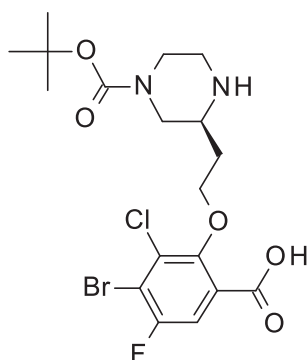


A una solución de *ter*-butil (3*S*)-4-bencil-3-[2-(3-bromo-2-cloro-4-fluoro-6-metoxycarbonil-fenoxi)etil]piperazin-1-carboxilato (7,0 g, 11,35 mmol) en DCM (75 ml) se agrega N,N-diisopropilamina (5,94 ml, 34,1 mmol). La solución se enfría en un baño de hielo y se agrega por goteo cloroformiato de 1-cloroetilo (3,7 ml, 34 mmol). Después de la adición, el baño de hielo se retira y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 18 horas. Se agrega por goteo más cloroformiato de 1-cloroetilo (2 ml, 17 mmol) y N,N-diisopropilamina (3 ml, 17 mmol) a temperatura ambiente y después de 7 horas, más cloroformiato de 1-cloroetilo (0,60 ml, 5,67 mmol) y se agrega N,N-diisopropilamina (1 ml, 5,67 mmol) para consumir el material de inicio restante. La mezcla de reacción se concentra al vacío. Al residuo se le agrega tolueno y la mezcla se concentra (repetir 2X). El semisólido resultante se diluye con MeOH (100 ml) y se agita a temperatura ambiente hasta que se completa la formación del producto. El solvente se elimina al vacío para obtener un residuo de color ámbar. El

residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice al eluir con 0-10 % de MeOH/DCM para obtener el compuesto del título como un sólido (5,11 g, 91 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 495/497 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 93

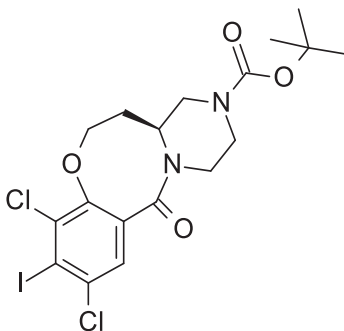
Ácido 4-bromo-2-[2-[(2S)-4-ter-butoxicarbonilpiperazin-2-il]etoxi]-3-cloro-5-fluorobenzoico



Una solución de *ter*-butil (3S)-3-[2-(3-bromo-2-cloro-4-fluoro-6-metoxicarbonil-fenoxi)etil]piperazina-1-carboxilato (5 g, 10,08 mmol) en THF (100 ml) y MeOH (12 ml) se enfría con un baño de hielo. Se agrega una solución acuosa de hidróxido de litio (6,5 ml, 6,25 M) y agua desionizada (10 ml). Se retira el baño de hielo y se agita la mezcla a temperatura ambiente. Después de 3 horas, se agrega hielo a la mezcla de reacción y el pH se ajusta entre 5-6 con ácido cítrico de al 10 % (12 ml). Se agrega una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml) y la mezcla se diluye con EtOAc (400 ml) y las capas se separan. La capa acuosa se extrae nuevamente con EtOAc (300 ml) y los orgánicos combinados se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido (4,83 g, 98 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 481/483 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 94

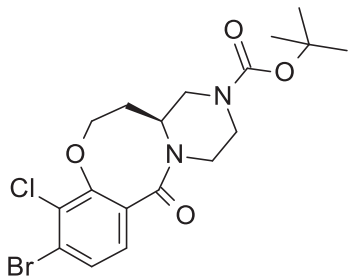
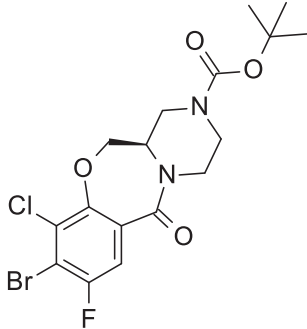
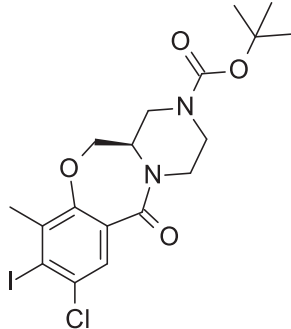
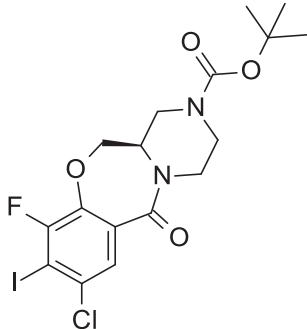
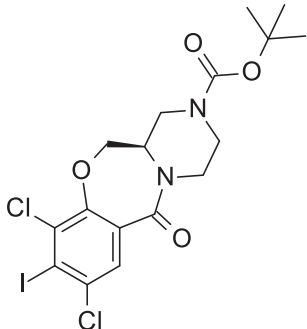
ter-butil (13aS)-8,10-dicloro-9-yodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato

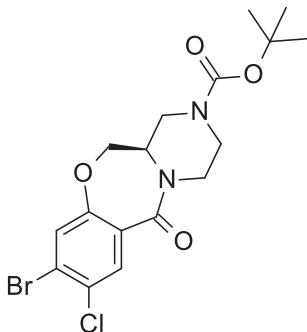
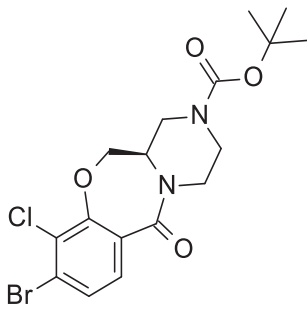
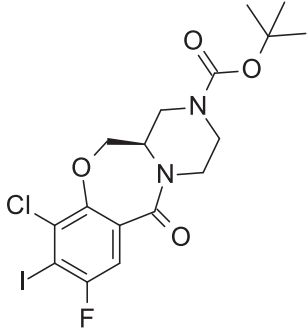
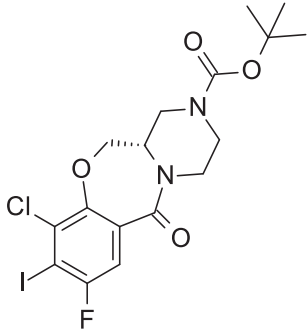
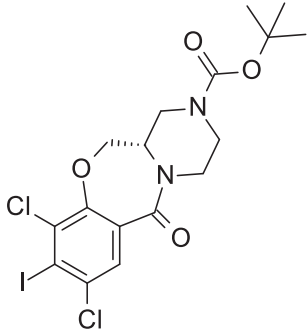


ter-butil (3S)-4-(3,5-dicloro-2-fluoro-4-yodo-benzoil)-3-(2-hidroxietil) piperazina-1-carboxilato (4,438 g, 8,110 mmol) en DMF (100 ml) se enfría hasta 0 °C y luego a la solución se le agrega hidruro de sodio sólido (60 % en masa en aceite de parafina) (0,81 g, 20 mmol). Después de 1 hora a 0 °C, la mezcla de reacción se inactiva con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se agregan agua y EtOAc. La capa acuosa se extrae dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavan dos veces con cloruro de litio acuoso 0,2 M, se secan en sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentran al vacío. La mezcla cruda se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 30-50 % de EtOAc/hexano para obtener el compuesto del título (3,394 g, 79 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 471/473 [M-t-Bu+H]⁺.

Tabla 14: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 94

Preparación	Estructura	Nombre compuesto del	ES/MS m/z (M+H)
95		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-bromo-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	407,0/409,0
96		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-bromo-8-cloro-10-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	406,9/409,0
97		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-bromo-8-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	388,8/390,8

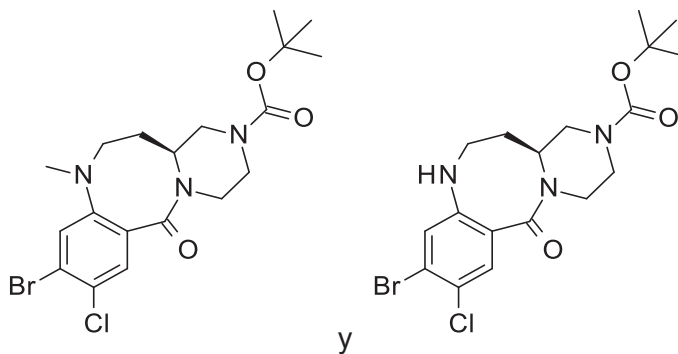
98		<i>ter</i> -butil (13a <i>S</i>)-9-bromo-10-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1- <i>d</i>][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	389,0/391,0
99		<i>ter</i> -butil (4a <i>R</i>)-8-bromo-7-cloro-9-fluoro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	393,0/395,0
100		<i>ter</i> -butil (4a <i>R</i>)-7-cloro-8-yodo-7-metil-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	9437,0
101		<i>ter</i> -butil (4a <i>R</i>)-9-cloro-7-fluoro-8-yodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	441,0/443,0
102		<i>ter</i> -butil (4a <i>R</i>)-7,9-dicloro-8-yodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	456,8/458,8

103		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-bromo-9-cloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	374,8/376,8
104		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-bromo-7-cloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	374,8/376,8
105		<i>ter</i> -butil (4aR)-7-cloro-9-fluoro-8-yodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	441,0/443,0
106		<i>ter</i> -butil (4aS)-7-cloro-9-fluoro-8-yodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	441,0/443,0
107		<i>ter</i> -butil (4aS)-7,9-dicloro-8-yodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	456,9/458,9

108		<i>ter</i> -butil (13aR)-8,10-dicloro-9-yodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	470,8/472,8
109		<i>ter</i> -butil (4aS)-9-cloro-7-fluoro-8-yodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	441,0/443,0
110		<i>ter</i> -butil (4aS)-8-bromo-9-cloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	374,8/376,8
111		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-bromo-8-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	388,8/390,8
112		<i>ter</i> -butil (3S,13aS)-9-bromo-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	421,0/423,0

Preparación 113

ter-butil (13aS)-9-bromo-8-cloro-11-metil-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocina-2-carboxilato y *ter*-butil (13aS)-9-bromo-8-cloro-6-oxo-3,4,11,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocina-2-carboxilato



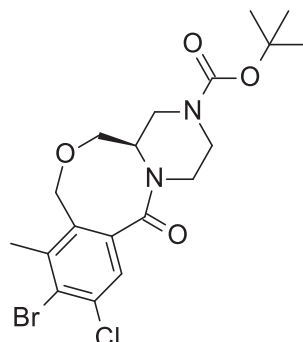
ter-butil

(3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-cloro-benzoil)-3-[2-(p-

tolilsulfonilo)etil]piperazina-1-carboxilato (473 mg, 0,767 mmol) en DMF (15 ml) se enfría hasta 0 °C y luego se agrega hidruro de sodio sólido a la solución (60 % en masa en aceite de parafina) (49 mg, 1,225 mmol). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 2 horas antes de dejar que se caliente hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas más. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se enfría hasta -78 °C y se agrega yoduro de metilo (50 µl, 0,803 mmol). Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se calienta hasta 0 °C y se agita durante 18 horas y se calienta hasta temperatura ambiente. La mezcla se enfría de nuevo hasta 0 °C y se agrega yoduro de metilo adicional (50 µl, 0,803 mmol). Después de 1 hora, no se observa metilación adicional, la mezcla de reacción se calienta hasta temperatura ambiente y se agrega trietilamina (100 µl, 0,717 mmol). Después de otra 1 hora, la mezcla de reacción se inactiva con agua, se diluye con una solución acuosa saturada de NH₄Cl y EtOAc. Las capas se separan y la capa acuosa se extrae dos veces más con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavan con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secan en sulfato de sodio y se concentran al vacío. El sólido resultante se tritura con ACN y se seca al vacío sin purificación adicional para obtener una mezcla de los compuestos del título (3:2 de NH a NMe, 345 mg, 99+%). ES/MS m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 444,0/446,0 [M+H]⁺ y 458,0/460,0 [M+H]⁺.

Preparación 114

ter-butil (13aR)-9-bromo-8-cloro-10-metil-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato



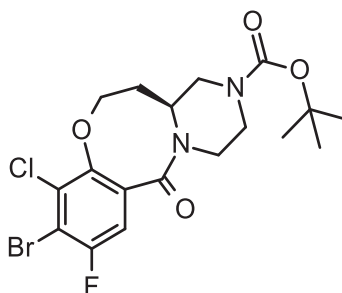
Una solución de clorhidrato de ácido 4-bromo-2-[[[(2R)-4-*ter*-butoxicarbonilpiperazin-2-il]metoximetil]-5-cloro-3-metil-benzoico (500 mg, 0,749 mmol) y DIEA (0,39 ml, 2,2 mmol) en DMF (3,7 ml) se agrega por goteo a una solución de HATU (581 mg, 1,50 mmol) en DMF (3,7 ml) a 0 °C. La mezcla se agita a 0 °C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 30 minutos. En un matraz aparte, una solución de clorhidrato de ácido 4-bromo-2-[[[(2R)-4-*ter*-butoxicarbonilpiperazin-2-il]metoximetil]-5-cloro-3-metil-benzoico (2,62 g, 3,92 mmol, 77 % de pureza) y DIEA (2,1 ml, 12 mmol) en DMF (20 ml) se agrega por goteo a una solución de HATU (3,04 g, 7,84 mmol) en DMF (20 ml) a 0 °C. La mezcla se agita a 0 °C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las dos mezclas de reacción se combinan, se diluyen con EtOAc y se lavan con HCl 0,5 M, agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado y cloruro de sodio acuoso saturado. La capa orgánica se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío. El material crudo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 0-65 % de EtOAc/hexanos. Las fracciones puras se concentran al vacío. Al residuo se le agrega DCM y la mezcla se concentró al vacío y se colocó al vacío durante 3 horas para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (1,95 g, 86 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 459/461 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Tabla 15: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 114

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M+H)
115		<i>ter</i> -butil (13aR)-8,10-dicloro-9-yodo-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	527,2/529,0
116		<i>ter</i> -butil (13aS)-8,10-dicloro-9-yodo-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	471,0/473,0

Preparación 117

ter-butil (13aS)-9-bromo-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato

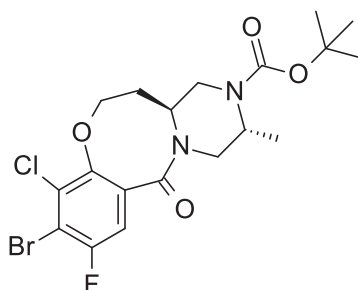


A una solución de ácido 4-bromo-2-[2-[(2S)-4-*ter*-butoxicarbonilpiperazin-2-il]etoxi]-3-cloro-5-fluoro-benzoico (4,8 g, 10 mmol) en DCM (50 ml), enfriado con un baño de hielo, se agrega TEA (2,8 ml, 20 mmol). Anhídrido propilfosfónico (11 ml, 18,8 mmol, 50 % en masa en EtOAc) se agrega por goteo. Después de la adición, la mezcla se agita durante 10 minutos. Se agregan DCM (250 ml) y una solución saturada de cloruro de amonio (100 ml). La capa acuosa se retira y se extrae con DCM (100 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavan con una solución acuosa

saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secan en sulfato de sodio y se filtran. El filtrado se trata con carbón activado (3,5 g) y se agita durante 10 minutos. La mezcla se filtra a través de una almohadilla de tierra diatomácea y se concentra al vacío hasta obtener un aceite. Se agrega cloroformo y se concentra al vacío (repetición 2X) para obtener el compuesto del título como un sólido (4,64 g, 99 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 407/409 $[\text{M}-\text{t-Bu}+\text{H}]^+$.

Preparación 118

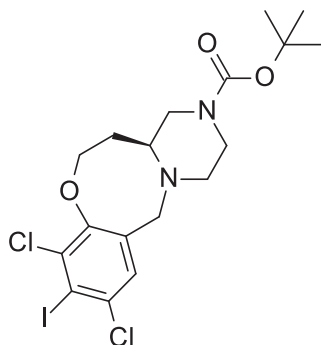
ter-butil (3R,13aS)-9-bromo-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato



Una solución de metil 4-bromo-3-cloro-2,5-difluoro-benzoato (1,00 g, 3,50 mmol) y *ter*-butil (2R,5S)-5-(2-hidroxietil)-2-metilpiperazin-1-carboxilato (1,07 g, 4,38 mmol) en DMF (17,5 ml) se enfría con un baño de hielo. Se agrega carbonato de cesio (2,31 g, 7,01 mmol). La reacción se deja calentar lentamente hasta temperatura ambiente y se agita durante la noche. Después de 18 horas, la reacción se calienta a 80 °C durante 24 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se agrega una solución acuosa semisaturada de cloruro de sodio (50 ml) y la mezcla se diluye con EtOAc (100 ml) y las capas se separan. La capa acuosa se extrae dos veces más con EtOAc (50 ml) y los orgánicos combinados se lavan con agua (2 × 50 ml), solución acuosa saturada de cloruro de sodio (50 ml) y luego se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío. El material crudo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 0-100 % de MTBE/hexano para obtener el compuesto del título como un sólido (690 mg, 41 %). ES/MS m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 476,0/478,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 119

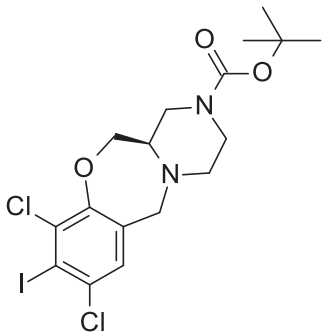
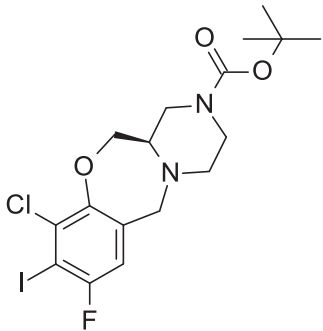
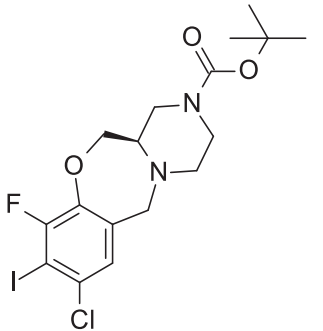
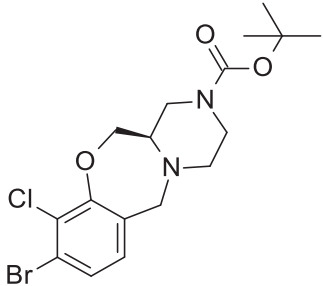
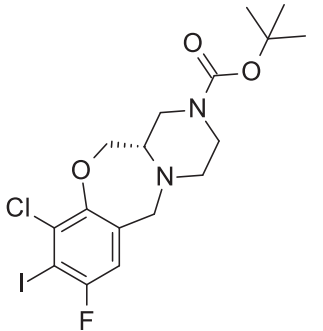
ter-butil (13aS)-8,10-dicloro-9-yodo-3,4,6,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato

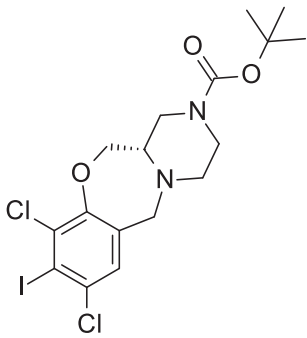
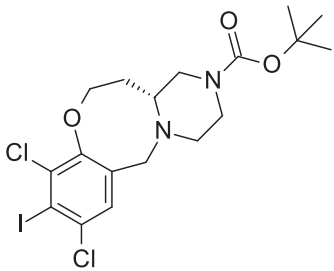
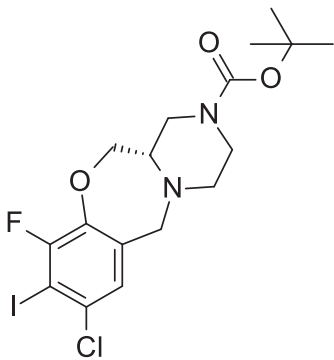
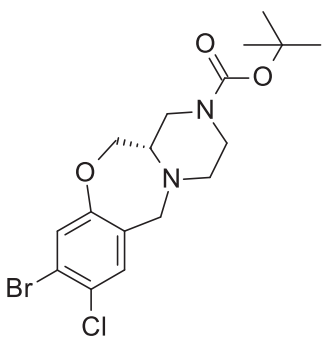
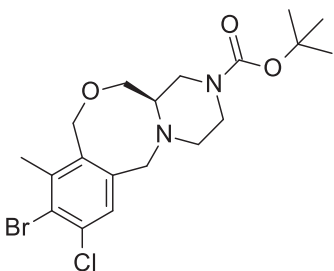


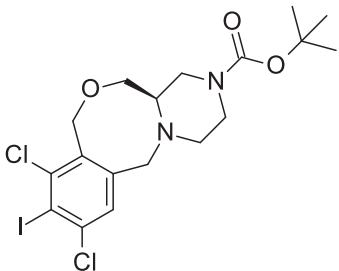
Se agrega complejo de sulfuro de dimetilo de borano 1M en THF (2 ml, 2 mmol) a una mezcla con agitación de *ter*-butil (13aS)-8,10-dicloro-9-yodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato (1,0 g, 1,9 mmol) en THF (20 ml) y se calentó a reflujo durante 18 horas. Después de este tiempo, se agrega a la mezcla más complejo 1M de sulfuro de dimetilo de borano en THF (2 ml, 2 mmol) y se agita a reflujo durante 5 horas más. La mezcla se enfría hasta temperatura ambiente, se inactiva cuidadosamente con MeOH y se concentra al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice al eluir con 30-70 % de EtOAc/hexano para obtener el compuesto del título (900 mg, 90 %). ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 512,8/514,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Tabla 16: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 119

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M+H)
120		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-bromo-8-cloro-3,4,6,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	430,9/433,0

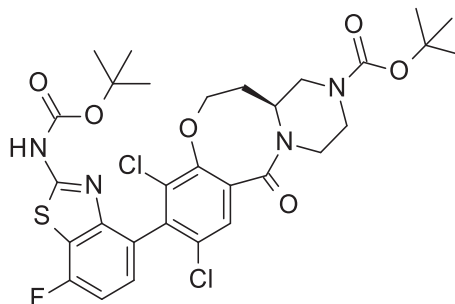
121		<i>ter</i> -butil (4aR)-7,9-dicloro-8-yodo-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	498,8/500,8
122		<i>ter</i> -butil (4aR)-7-cloro-9-fluoro-8-yodo-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	483,2/485,2
123		<i>ter</i> -butil (4aR)-9-cloro-7-fluoro-8-yodo-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	483,0/485,0
124		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-bromo-7-cloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	417,0/419,0
125		<i>ter</i> -butil (4aS)-7-cloro-9-fluoro-8-yodo-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	483,2/485,2

126		<i>ter</i> -butil (4aS)-7,9-dicloro-8-yodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	499,0/501,0
127		<i>ter</i> -butil (13aR)-8,10-dicloro-9-yodo-3,4,6,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	512,9/514,8
128		<i>ter</i> -butil (4aS)-9-cloro-7-fluoro-8-yodo-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	483,0/485,0
129		<i>ter</i> -butil (4aS)-8-bromo-9-cloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	416,8/419,0
130		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-bromo-8-cloro-10-metil-3,4,6,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	445,2/447,2

131		<i>ter</i> -butil (13aR)-8,10-dicloro-9-yodo-3,4,6,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	513,2/515,2
-----	---	---	-------------

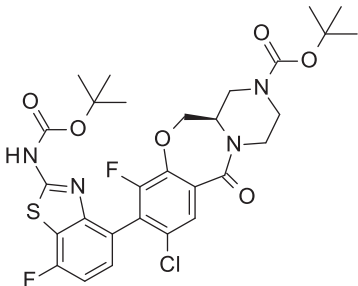
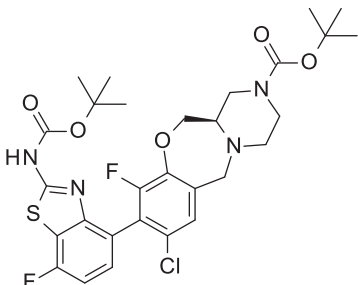
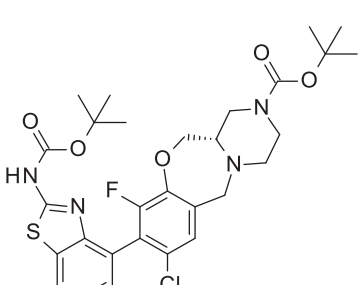
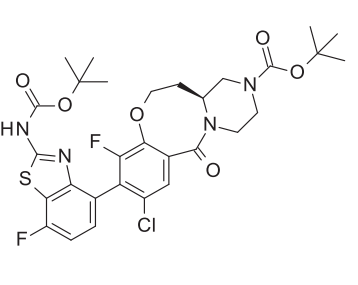
Preparación 132

ter-butil (13aS)-9-[2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8,10-dicloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato

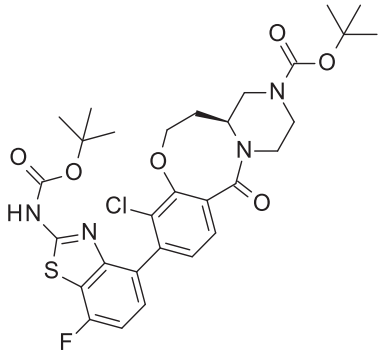
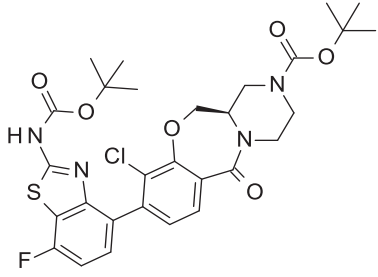
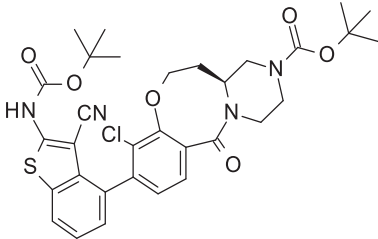
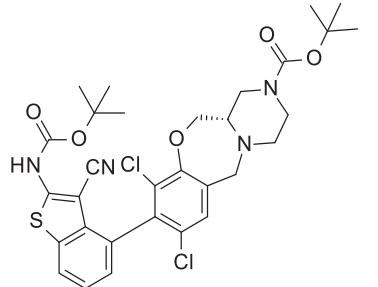
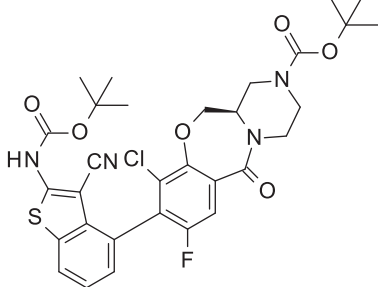


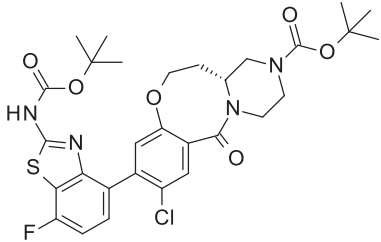
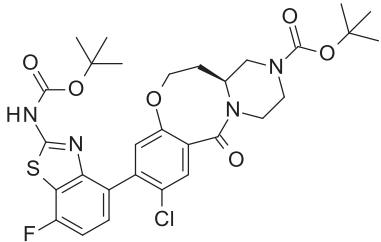
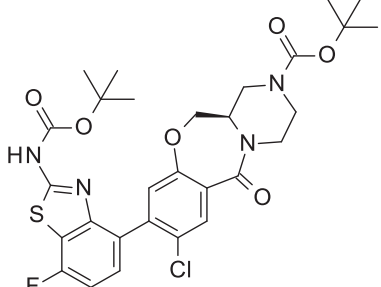
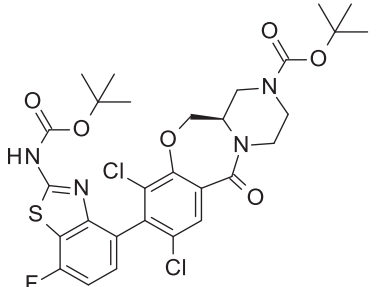
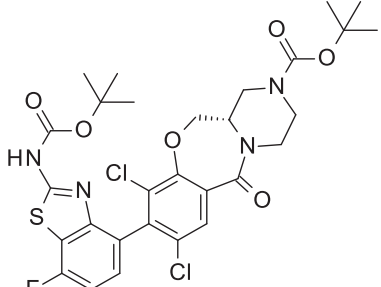
En un tubo con tapa de rosca sellable con una barra de agitación se agrega *ter*-butil (13aS)-8,10-dicloro-9-yodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato (750 mg, 1,423 mmol), ácido [2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]borónico (650 mg, 2,083 mmol), fosfato de potasio tribásico (450 mg, 2,12 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis (di-*ter*-butilfosfino)ferroceno paladio (100 mg, 0,15 mmol). Se agregan 1,4-dioxano (15 ml) y agua (5 ml) previamente mezclados y desgasificados y la mezcla se purga con nitrógeno durante 20 minutos. El tubo se tapa y se calienta a 80 °C durante 1 hora. Se vierte luego el contenido de la mezcla de reacción sobre agua, solución acuosa saturada de cloruro de sodio y EtOAc. Las capas se separan y la capa acuosa se extrae una vez con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de magnesio anhidro, se filtran y se concentran al vacío. El material crudo se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 30-70 % de EtOAc/hexano para obtener el compuesto del título (724 mg, 76 %). ES/MS *m/z* (³⁵Cl/³⁷Cl) 667/669 [M+H]⁺. Relación 45:55 de atropisómeros (LC).

Tabla 17: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 132

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
133		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-9-cloro-7-fluoro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	537,2/539,2
134		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-9-cloro-7-fluoro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	623,2/625,2
135		<i>ter</i> -butil (4aS)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-9-cloro-7-fluoro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	623,2/625,2
136		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8-cloro-10-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	551,1/553,1

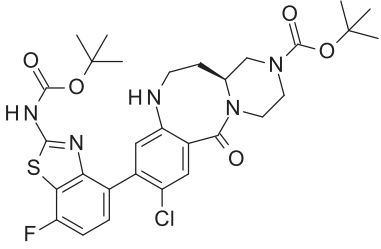
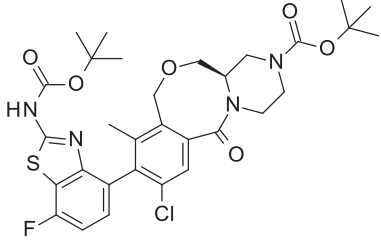
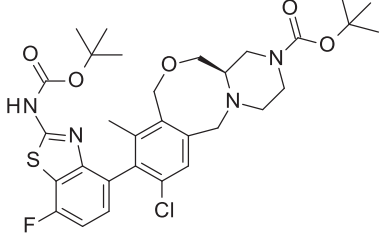
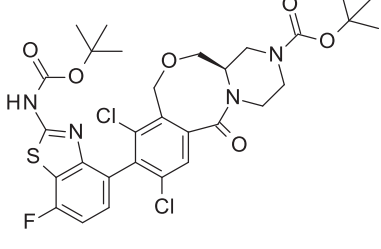
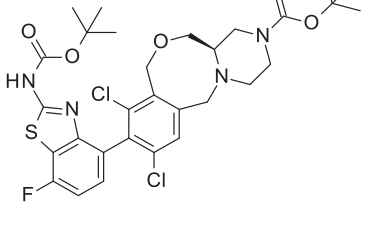
137		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-7-cloro-9-fluoro-11-oxo-2,4,4a,5-tetraidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	537,2/539,2
138		<i>ter</i> -butil (4aS)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-7-cloro-9-fluoro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	623,4/625,4
139		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-9-cloro-7-metil-11-oxo-2,4,4a,5-tetraidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	533,2/534,2
140		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	551,0/553,0

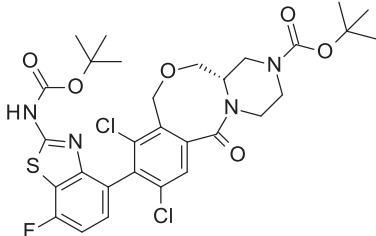
141		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-10-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	533,0/535,0
142		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-7-cloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	519,0/521,0
143		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-benzotiofen-4-il]-10-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	539,0/541,0
144		<i>ter</i> -butil (4aS)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-benzotiofen-4-il]-7,9-dicloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	645,4/647,4
145		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-benzotiofen-4-il]-7-cloro-9-fluoro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	587,2/589,2

146		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-[2-((<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	533,0/535,0
147		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-((<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	533,0/535,0
148		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-((<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	519,0/521,0
149		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-((<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	553,0/555,0
150		<i>ter</i> -butil (4aS)-8-[2-((<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	553,0/555,0

151		<i>ter</i> -butil (4a <i>S</i>)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-9-cloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	605,0/607,0
152		<i>ter</i> -butil (4a <i>R</i>)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-9-cloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	605,0/607,0
153		<i>ter</i> -butil (4a <i>S</i>)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-7,9-dicloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	639,0/641,0
154		<i>ter</i> -butil (4a <i>S</i>)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-7,9-dicloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	639,0/641,0
155		<i>ter</i> -butil (4a <i>R</i>)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxycarbonilamino)-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-4-il]-9-cloro-7-fluoro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1- <i>c</i>][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	605,0/607,0

156		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-benzotiofen-4-il]-8-cloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	639,2/641,2
157		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8,10-dicloro-3,4,6,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	653,0/655,2
158		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8,10-dicloro-3,4,6,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	653,0/655,0
159		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-benzotiofen-4-il]-7,9-dicloro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	603,0/605,0
160		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8-cloro-11-metil-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocina-2-carboxilato	646,2/648,2

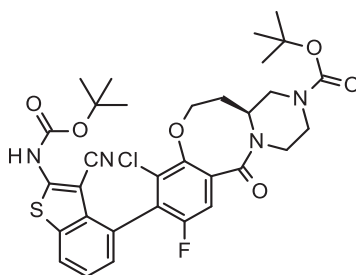
161		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8-cloro-6-oxo-3,4,11,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocina-2-carboxilato	632,2/634,2
162		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8-cloro-10-metil-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	645,2/647,2
163		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8-cloro-10-metil-3,4,6,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	633,4/635,4
164		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8,10-dicloro-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	665,2/667,2
165		<i>ter</i> -butil (13aR)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8,10-dicloro-3,4,6,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocina-	653,4/655,2

		2-carboxilato	
166		<i>ter</i> -butil (13a <i>S</i>)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8,10-dicloro-3,4,6,11,13,13a-hexahidro-1 <i>H</i> -pirazino[2,1- <i>d</i>][2,5]benzoxazocina-2-carboxilato	665,2/667,2

En algunos casos, se utiliza K₂CO₃ en lugar de K₃PO₄

Preparación 167

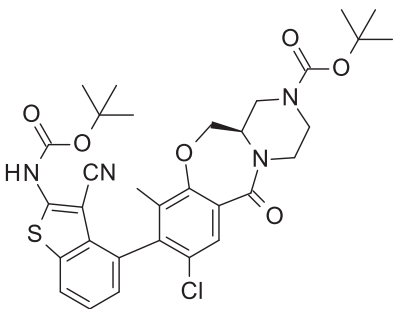
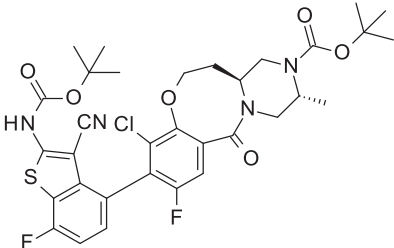
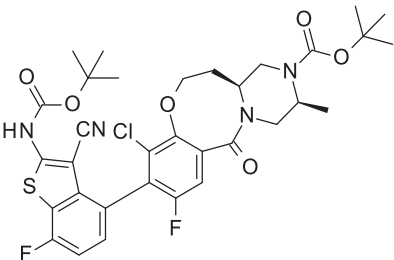
ter-butil (13a*S*)-9-[2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-ciano-benzotiofen-4-il]-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-*d*][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato



A un matraz sellado se le agrega tolueno (300 ml), *ter*-butil (13a*S*)-9-bromo-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-*d*][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato (6,20 g, 11,0 mmol) y *ter*-butil N-[3-ciano-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-carbamato de 2-dioxaborolan-2-il)benzotiofen-2-il] (6,20 g, 15,5 mmol). La mezcla se burbujea con nitrógeno durante 30 minutos y luego se agrega DPEPhosPdCl₂ (1,20 g, 1,68 mmol), seguido de carbonato de cesio (9,00 g, 27,6 mmol). El matraz se cierra herméticamente y se agita a 105 °C durante 6 horas. La mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se filtra a través de tierra diatomácea, se lava con EtOAc y el filtrado se concentra al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, al eluir con 0-30 % de acetona/hexano. El diastereómero deseado se eluye después del no deseado para obtener el compuesto del título (principal, 3,50 g, 49 %). ES/MS *m/z* (³⁵Cl/³⁷Cl) 657,0/659,0 [M+H]⁺.

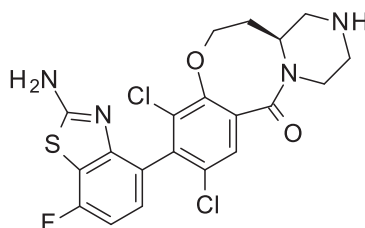
Tabla 18: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 167

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
168		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-4-il]-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	675,2/677,2
169		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-4-il]-7-cloro-9-fluoro-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	605,2/607,2
170		<i>ter</i> -butil (13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-4-il]-8-cloro-10-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	675,2/677,2
171		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-7-fluoro-3-metil-benzotiofen-4-il]-9-cloro-7-metil-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	601,2/603,3

172		<i>ter</i> -butil (4aR)-8-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-metil-benzotiofen-4-il]-9-cloro-7-metil-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-carboxilato	583,2/585,2
173		<i>ter</i> -butil (3R,13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-4-il]-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	689,2/691,2
174		<i>ter</i> -butil (3S,13aS)-9-[2-(<i>ter</i> -butoxicarbonilamino)-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-4-il]-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato	633,4/635,4

Preparación 175

(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8,10-dicloro-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona



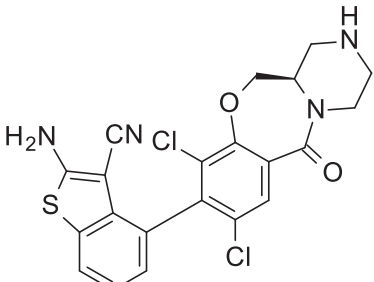
ter-butil (13aS)-9-[2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il]-8,10-dicloro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato (724 mg, 1,084 mmol) se disuelve en DCM (4 ml) y TFA (2 ml, 26,45 mmol)

y se agita a temperatura ambiente. Después de 6 horas, la mezcla se concentra al vacío. El crudo se carga en una columna SCX, se lava con MeOH y se eluye con 7N NH₃ en MeOH. El filtrado se concentra al vacío para obtener el compuesto del título (500 g, 98 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 467/469 [M+H]⁺.

Tabla 19: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 175

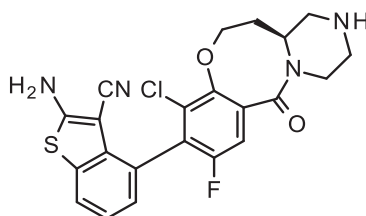
Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
176		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-9-il]-2-amino-7-fluorobenzotiofen-3-carbonitrilo	475,0/477,0
177		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7-cloro-9-fluoro-1,2,3,4,4a5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	437,2/439,2
178		4-[(4aS)-7-cloro-9-fluoro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	423,2/425,2
179		4-[(4aR)-9-cloro-7-metil-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-7-fluorobenzotiofen-3-carbonitrilo	457,2/459,2

180		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-7-metil-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	433,2/435,2
181		(4aR)-8-(2-amino-3-metil-benzotiofen-4-il)-9-cloro-7-metil-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	439,1/441,2
182		4-[(4aS)-7,9-dicloro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	445,0/447,0
183		4-[(4aR)-7-cloro-9-fluoro-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	443,2/445,2
184		4-[(13aS)-8,10-dicloro-1,2,3,4,6,12,13,13a-octahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	453,0/455,0
185		4-[(13aR)-8,10-dicloro-1,2,3,4,6,12,13,13a-octahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	453,0/455,0

186		4-[(4aR)-7,9-dicloro-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	458,9/460,9
-----	---	--	-------------

Preparación 187

4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-9-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo



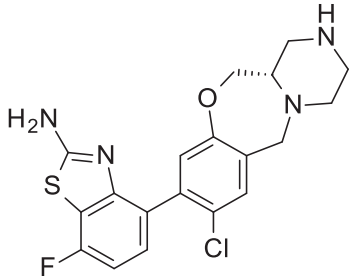
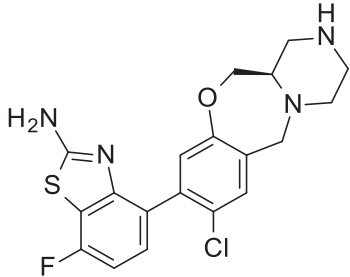
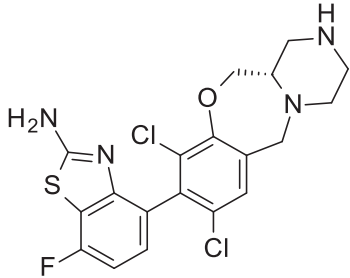
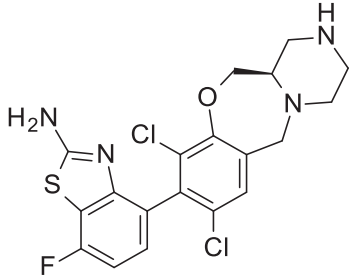
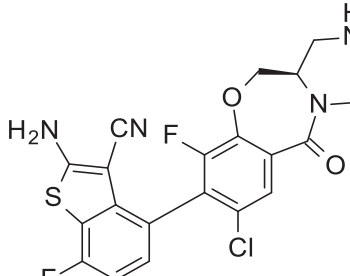
A una suspensión de *ter*-butil (13aS)-9-[2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-ciano-benzotiofen-4-il]-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carboxilato (2,64 g, 4,02 mmol) en DCM (10,0 ml) a 0 °C se le agrega TFA (10 ml) por goteo. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se concentra al vacío, se disuelve en MeOH y se concentra al vacío nuevamente. Este procedimiento se repite una vez más. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, al eluir primero con 0-80 % (10 % de MeOH en DCM)/DCM, y segundo con 0-100 % [10 % (7N NH₃ en MeOH) en DCM]/DCM para obtener el compuesto del título (1,58 g, 86 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 457,0/459,0 [M+H]⁺.

Tabla 20: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la de la Preparación 187

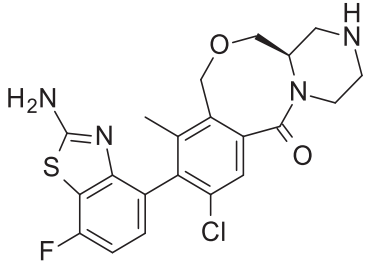
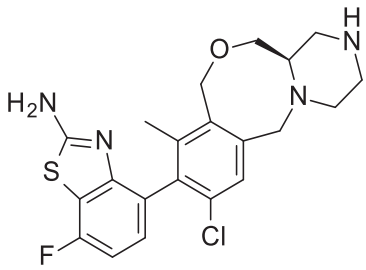
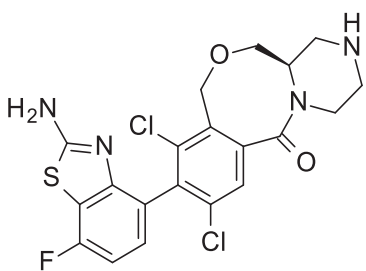
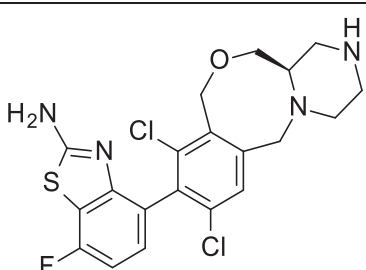
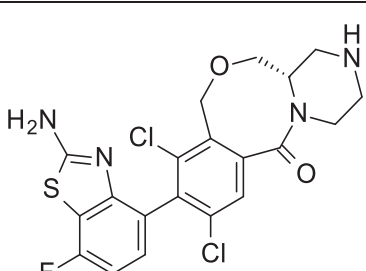
Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
188		4-[(4aR)-9-cloro-7-fluoro-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-7-fluorobenzotiofen-3-carbonitrilo	461,0/463,0
189		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-7-fluoro-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	437,0/439,0
190		4-[(4aR)-9-cloro-7-fluoro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-ilo]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	423,0/425,0
191		4-[(4aS)-9-cloro-7-fluoro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	423,0/425,0
192		4-[(13aS)-8-cloro-10-fluoro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-9-il]-2-amino-7-fluorobenzotiofen-3-carbonitrilo	475,0/477,0

193		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-10-fluoro-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	451,0/453,0
194		4-[(13aS)-8-cloro-10-fluoro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-9-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	457,0/459,0
195		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-10-cloro-8-fluoro-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	451,0/453,0
196		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-10-cloro-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	433,0/435,0
197		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7-cloro-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	419,0/421,0

198		4-[(13aS)-10-cloro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-ilo]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	439,0/441,0
199		(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-chloro-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	433,0/435,0
200		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-chloro-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	432,9/435,0
201		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-chloro-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	418,9/420,9
202		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	452,8/454,8
203		(4aS)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	452,8/454,8

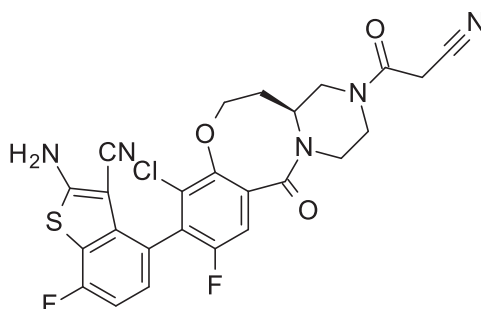
204		4-[(4aS)-9-cloro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	405,0/407,0
205		4-[(4aR)-9-cloro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	405,0/407,0
206		4-[(4aS)-7,9-dicloro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	438,9/441,0
207		4-[(4aR)-7,9-dicloro-2,3,4,4a,5,11-hexahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	438,8/440,9
208		4-[(4aR)-9-chloro-7-fluoro-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	461,0/463,0

209		4-[(13aS)-8-cloro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-ilo]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	439,0/441,0
210		4-[(3R, 13aS)-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	489,0/491,0
211		4-[(3S, 13aS)-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	489,2/491,2
212		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-11-metil-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-ona	446,0/448,0
213		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-1,2,3,4,11,12,13,13a-octahidropirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-ona	432,0/434,0

214		(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-yl)-8-chloro-10-metil-2,3,4,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-6-ona	447,2/449,2
215		4-[(13aR)-8-chloro-10-metil-1,2,3,4,6,11,13,13a-octahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-9-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	433,2/435,2
216		(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-yl)-8,10-dicloro-2,3,4,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-6-ona	467,2/469,2
217		4-[(13aR)-8,10-dicloro-1,2,3,4,6,11,13,13a-octahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-9-il]-7-fluoro-1,3-benzotiazol-2-amina	453,2/455,2
218		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-yl)-8,10-dicloro-2,3,4,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-6-ona	467,2/469,2

Preparación 219

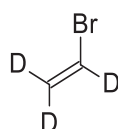
4-[(13aS)-10-cloro-2-(2-cianoacetil)-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo



Ácido cianoacético (138 mg, 1,61 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (222 mg, 1,61 mmol), DIEA (0,5 ml, 3 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (306 mg, 1,60 mmol) se agregan a una suspensión de 4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo (500 mg, 1,05 mmol) en DCM (10 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 18 horas antes de diluir con DCM y lavar con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Las capas orgánicas se secan en sulfato de sodio, se filtran y se concentran al vacío. El residuo se disuelve en DCM (5 ml) y se agregan unas gotas de MeOH y luego se agrega hexano para precipitar el producto. El precipitado se filtra para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (410 mg, 72 %). ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 542,4/544,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Preparación 220

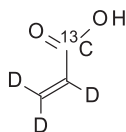
1-bromo-1,2,2-trideuterioetileno



Se agrega 1,2-dibromoetano- $_4$ (25,0 g, 130,28 mmol) por goteo a una solución de hidróxido de potasio (15,19 g, 243,63 mmol) en 95 % de etanol-OD (95 ml) y D_2O (5 ml) a 33 °C. La mezcla se agitó primero a 60 °C durante 1,5 horas, y luego a 63 °C durante 1,5 horas para obtener el compuesto del título como un aceite incoloro, que se destiló continuamente de la reacción durante el transcurso del calentamiento y se recolectó en un matraz receptor enfriado en un baño de hielo seco-acetona (7,3 g, 50 %).

Preparación 221

Ácido 2,3,3-trideuterioprop-2-enoico- ^{13}C

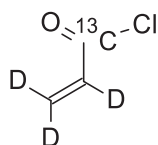


Se colocan en un matraz virutas de magnesio (1,67 g, 69,71 mmol), un cristal de yodo y THF anhidro (20 ml). Mientras tanto, se prepara una solución de 1-bromo-1,2,2-trideuterioetileno (7,3 g, 66,39 mmol) en THF anhidro (30 ml). La mezcla que contiene el magnesio se calienta a 50 °C y se agrega una porción de la solución de bromuro de vinilo (2 ml). La mezcla se calienta a 50 °C hasta que se inicia la reacción de Grignard y la mezcla comienza a refluir (65 °C). La solución de bromuro de vinilo restante en THF se agrega por goteo a una temperatura de 55 a 65 °C durante 1,5 horas. La mezcla resultante se calienta a 65 °C durante 1,5 horas para asegurarse de que se completa la reacción. Esta solución de bromuro de magnesio (1,2,2-trideuteriovinil) recién preparada en THF se enfría hasta temperatura ambiente y se usa inmediatamente.

Se burbujea dióxido de carbono-¹³C gas a través de THF anhidro (50 ml) a -65 °C durante 5 minutos. Se agrega por goteo la solución de bromuro de (1,2,2-trideuteriovinil) magnesio recién preparada en THF (66,39 mmol), momento en el que la temperatura de reacción se eleva hasta -20 °C. La mezcla bifásica se calienta hasta -10 °C y se agita durante 10 minutos. Se burbujea dióxido de carbono-¹³C gas a través de la mezcla durante 2 minutos más. La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante 10 minutos. Se agrega hidroquinona (10 mg), seguido de la adición por goteo de ácido sulfúrico 6 M (6,5 ml) para detener la reacción mientras se mantiene la temperatura por debajo de 20 °C. La mezcla se diluye con éter dietílico (400 ml) y se agrega sulfato de sodio (100 g). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 minutos, se filtra y se concentra al vacío de 0 a 5 °C para obtener el producto crudo (7,5 g) como un aceite amarillo. El producto bruto se purifica mediante una destilación al vacío de recorrido corto para obtener el compuesto del título como un aceite incoloro (1,2 g, 24 %).

Preparación 222

Cloruro de ácido 2,3,3-trideuterioprop-2-enoico-¹³C



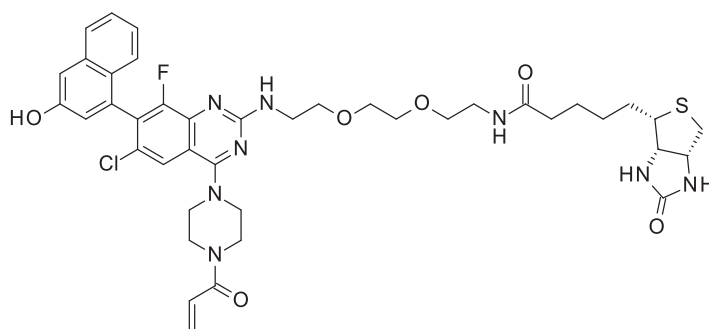
Se agrega cloruro de oxalilo (0,24 ml, 2,85 mmol) a una solución de ácido

2,3,3-trideuterioprop-2-enoico-¹³C (0,181 g, 2,38 mmol) y DMF (1 gota) en DCM anhidro (10 ml) a 0 °C y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. El compuesto del título se usa directamente en la siguiente etapa como solución.

Preparación 223

Sonda KRas

N-(2-{2-[2-({6-cloro-8-fluoro-7-(3-hidroxinaftalen-1-il)-4-[4-(prop-2-enoil)piperazin-1-ilo]quinazolin-2-il)amino]etoxi}etoxi}etil)-5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]116enzoxaze-4-il]pentanamida



Etapa A: *ter*-butil 4-(7-bromo-2,6-dicloro-8-fluoroquinazolin-4-il)piperazin-1-carboxilato (0,51 g, 1,1 mmol) e IPA (5 ml) se combinan en un recipiente de microondas. DIPEA (0,55 ml, 3,3 mmol) y 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]116enzoxaze-4-il]-N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]pentanamida (0,48 g, 1,32 mmol) se agregan y la mezcla se calienta a 120 °C en un reactor de microondas durante seis horas. Después de este tiempo, la mezcla se diluye con solución de cloruro de amonio acuoso saturado y 25 % de IPA en CHCl₃ y se separan las capas. La capa orgánica se lava con cloruro de sodio acuoso saturado, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de fase normal, al eluir con un gradiente de B en A al 50-100 % (A: hexanos, B: 10 % de MeOH en DCM), para obtener el *ter*-butil 4-{7-bromo-6-cloro-8-fluoro-2-[(2-{2-[2-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]116enzoxaze-4-il]pentanoil}amino)etoxi}etoxi}etil)amino]quinazolin-4-il)piperazin-1-carboxilato como un sólido amarillo (0,68 g, 78 %). ES/MS m/z: 819 (M+H).

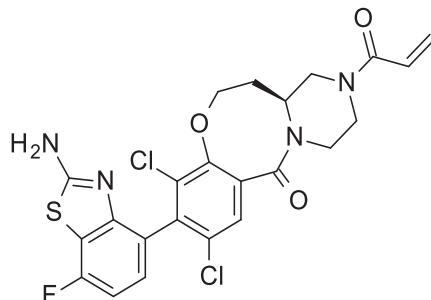
Etapa B: se combinan *ter*-butil 4-{7-bromo-6-cloro-8-fluoro-2-[(2-{2-[2-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]116enzoxaze-4-il]pentanoil}amino)etoxi}etoxi}etil)amino]quinazolin-4-il)piperazina-1-carboxilato (0,30 g, 0,37 mmol), 1,4-dioxano (4 ml) y agua (0,75 ml). Se agregan carbonato de potasio (0,24 g, 1,11 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)naftalen-2-ol (0,20 g, 0,74 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,085 g, 0,074 mmol) y la mezcla se

agita a 85 °C en nitrógeno durante 12 horas. Después de este tiempo, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y se filtra para eliminar los sólidos. El filtrado se diluye con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y EtOAc y las capas se separan. La capa orgánica se lava con cloruro de sodio acuoso saturado, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de fase normal, al eluir con 90-100 % de gradiente de B en A (A: hexanos, B: MeOH al 10 % en DCM), para obtener *ter*-butil 4-{6-cloro-8-flúor-7-(3-hidroxi-naftalen-1-il)-2-[(2-{2-[2-({5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]11*enzoxaze*-4-il]pentanoil}amino)etoxi)etoxi}etil)amino]quinazolin-4-il}piperazina-1-carboxilato como un sólido amarillo (0,31 g, 96 %). ES/MS *m/z*: 881 (M+H).

Etapas C: una solución de *ter*-butil 4-{6-cloro-8-fluoro-7-(3-hidroxi-naftalen-1-il)-2-[(2-{2-[2-({5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]11*enzoxaze*-4-il]pentanoil}amino)etoxi)etoxi}etil)amino]quinazolin-4-il}piperazina-1-carboxilato (0,31 g, 0,35 mmol) en MeOH (4 ml) se enfría hasta 0 °C. Se agrega HCl (3 M en MeOH, 6 ml, 17,5 mmol) y la mezcla se agita a 0 °C durante 30 minutos antes de dejar que se caliente hasta temperatura ambiente. Después de ~18 horas, la mezcla de reacción se concentra al vacío. El residuo se diluye con DCM y se concentra de nuevo al vacío. El residuo resultante se diluye con hexanos y se agita a temperatura ambiente durante dos horas. El sólido resultante se filtra y se seca al vacío para obtener cloruro de hidrógeno N-{2-[2-(2-{[6-cloro-8-fluoro-7-(3-hidroxi-naftalen-1-il)-4-(piperazin-1-il)quinazolin-2-il]amino}etoxi)etoxi}etil)-5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]11*enzoxaze*-4-il]pentanamida. Esta sal de clorhidrato (0,19 g, 0,23 mmol) se neutraliza al combinarla con DIEA (0,16 ml, 0,92 mmol) en DCM (2,5 ml). La mezcla se enfría hasta -78 °C y se agrega cloruro de acrilóilo (0,5 M en DCM, 0,4 ml, 0,21 mmol). Después de 30 minutos, la mezcla se calienta hasta temperatura ambiente. Después de una hora, la mezcla se diluye con MeOH (1 ml) y se concentra al vacío. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de fase inversa, al eluir con 35-60 % de un gradiente de B en A (A: 10 mM de NH₄HCO₃ acuoso con 5 % de MeOH; B: ACN), para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (0,027 g, 14 %). ES/MS *m/z*: 835 (M+H).

Ejemplo 1

(13a*S*)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8,10-dicloro-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-*d*][1,5]benzoxazocin-6-ona

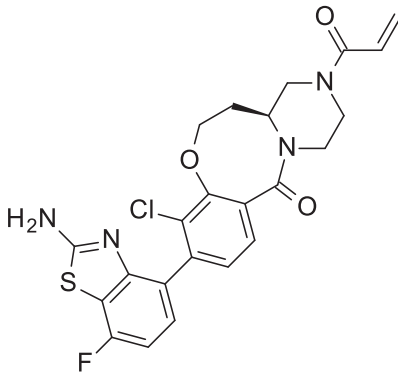
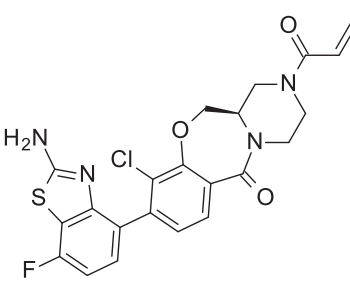
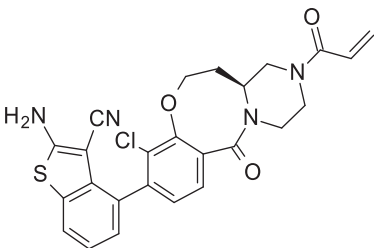
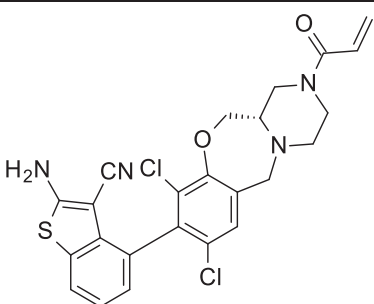
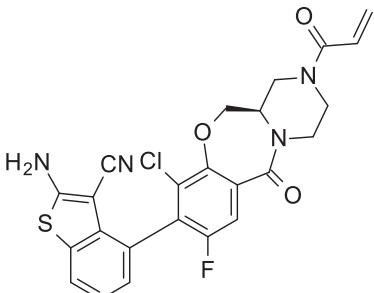


(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8,10-dicloro-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona (500 mg, 1,070 mmol) se disuelve en DCM (5 ml) y TEA (0,75 ml, 5,4 mmol). La mezcla se enfría hasta -78 °C y luego se agrega cloruro de acrilóilo (0,085 ml, 1,0 mmol) y la mezcla se agita a -78 °C. Después de 5 minutos se agregan unas pocas gotas de alcohol isopropílico a -78 °C y luego la mezcla se concentra al vacío y se somete a cromatografía de fase inversa para obtener una mezcla de dos atropisómeros. La mezcla de atropisómeros se separa mediante el uso de Chiralpak® IC, 4,6 x 150 mm, 40 % de EtOH/CO₂, 5 ml/min, 225 nm. El segundo compuesto de la columna se identifica como el atropisómero activo (165 mg, 55 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 521/523 [M+H]⁺ (>98 % e.e.). El atropisómero menos activo es el primero en salir de la columna (133 mg, 44 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 521/523 [M+H]⁺ (>98 % e.e.).

Tabla 21: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la del Ejemplo 1

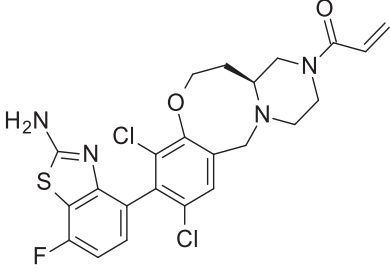
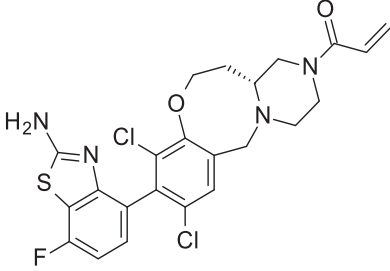
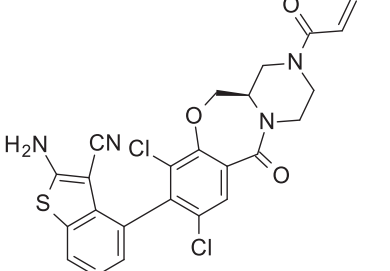
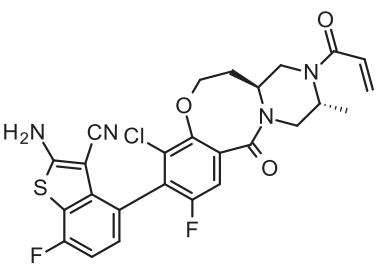
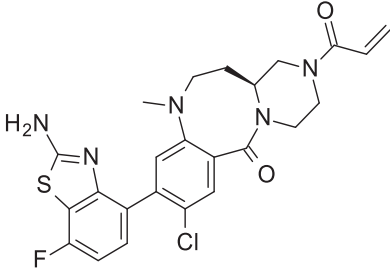
Ejemplo	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
2		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7-cloro-9-fluoro-3-prop-2-enil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	491,2/493,2

3		1-[(4aS)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7-cloro-9-fluoro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-il]prop-2-en-1-ona	477,2/479,2
4		4-[(4aR)-9-cloro-7-metil-11-oxo-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	511,0/513,0
5		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-7-metil-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	487,0/489,0
6		(4aR)-8-(2-amino-3-metil-benzotiofen-4-il)-7-cloro-9-metil-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	493,0/495,0
7		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-10-cloro-8-fluoro-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	505,2/507,2

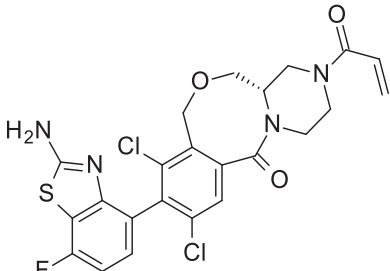
8		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-10-cloro-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	487,0/489,0
9		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7-cloro-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	473,0/475,0
10		4-[(13aS)-10-cloro-6-oxo-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-9-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	493,0/495,0
11		4-[(4aS)-7,9-dicloro-3-prop-2-enoil-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	499,2/501,2
12		4-[(4aR)-7-cloro-9-fluoro-11-oxo-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	497,2/499,2

13		(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-2-prop-2-enol-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	487,0/489,0
14		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-2-prop-2-enol-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	487,0/489,0
15		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-chloro-3-prop-2-enol-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	473,0/475,0
16		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-3-prop-2-enol-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	507,0/509,0
17		(4aS)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-3-prop-2-enol-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	506,9/508,8

18		1-[(4aS)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-il]prop-2-en-1-ona	459,0/461,0
19		1-[(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-il]prop-2-en-1-ona	459,0/461,0
20		1-[(4aS)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-il]prop-2-en-1-ona	493,0/495,0
21		1-[(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-il]prop-2-en-1-ona	493,0/495,0
22		4-[(13aS)-8-cloro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-ilo]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	493,0/495,0

23		1-[(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-yl)-8,10-dicloro-3,4,6,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-2-yl]prop-2-en-1-ona	507,0/509,0
24		1-[(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-yl)-8,10-dicloro-3,4,6,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-2-yl]prop-2-en-1-ona	507,0/509,0
25		4-[(4aR)-7,9-dicloro-11-oxo-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-yl]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	513,0/515,0
26		4-[(3R,13aS)-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-yl]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	543,0/545,0
27		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-yl)-8-cloro-11-metil-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-ona	500,0/502,0

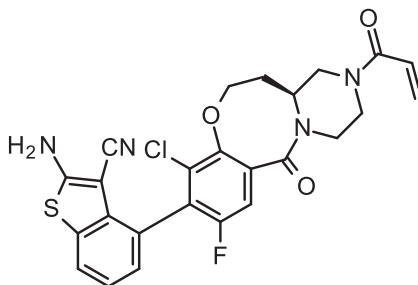
28		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-2-prop-2-enol-3,4,11,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-ona	486,0/488,0
29		(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-10-metil-2-prop-2-enol-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-6-ona	501,0/503,0
30		1-[(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-10-metil-3,4,6,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-2-il]prop-2-en-1-ona	487,0/489,0
31		(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8,10-dicloro-2-prop-2-enol-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-6-ona	521,2/523,2
32		1-[(13aR)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8,10-dicloro-3,4,6,11,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-2-il]prop-2-en-1-ona	507,0/509,0

33		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-yl)-8,10-dichloro-2-prop-2-enyl-1,3,4,11,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][2,5]benzoxazocin-6-ona	521,0/523,0
----	---	--	-------------

En algunos casos, DIEA se usa en lugar de TEA.

Ejemplo 34

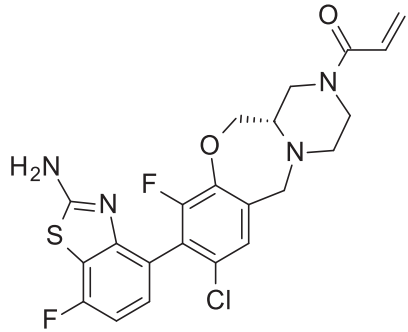
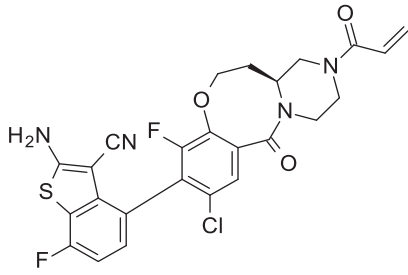
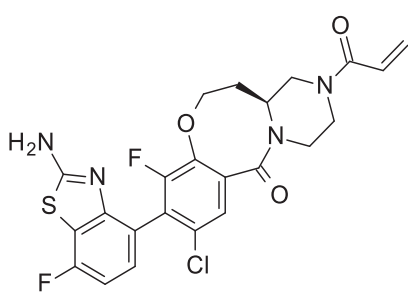
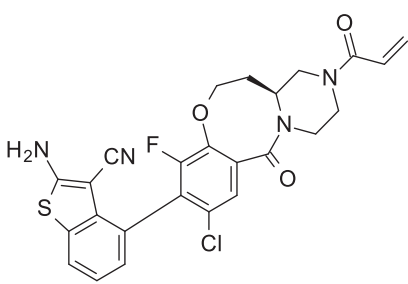
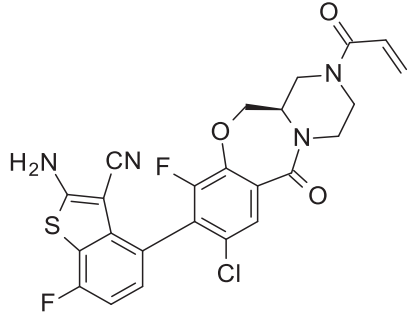
4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2-prop-2-enil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo

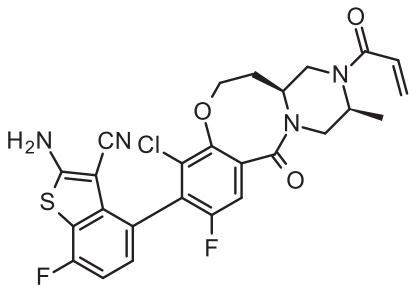
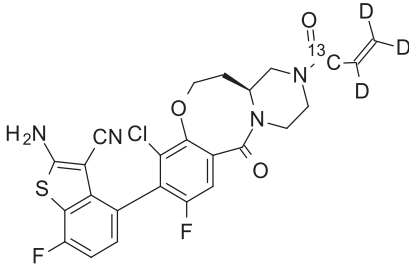


Una suspensión de 4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo (1,58 g, 3,46 mmol) en EtOAc (35 ml), THF (15 ml) y agua (40 ml) se carga con carbonato de potasio (1,90 g, 13,7 mmol). La mezcla se agita rápidamente y se enfría hasta 0 °C. Se agrega por goteo cloruro de acrilóilo en DCM (13,0 ml, 3,25 mmol, 0,25 M) a través de un embudo de adición. Después de 10 minutos de agitación en un baño de hielo, la mezcla se diluye con EtOAc y se vierte en una ampolla de decantación. Las capas se separan y la capa acuosa se extrae nuevamente con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavan secuencialmente con cloruro de sodio acuoso saturado, se secan en sulfato de magnesio y se concentran al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, al eluir primero con 0-100 % (10 % de MeOH en DCM)/DCM, y segundo con 0-100 % [10 % (7N NH₃ en MeOH) en DCM]/DCM para obtener el producto deseado como un sólido esponjoso. El sólido se sonica en éter durante 30 minutos, se filtra y se seca a alto vacío para obtener el compuesto del título (1,60 g, 91 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 511,0/513,0 [M+H]⁺.

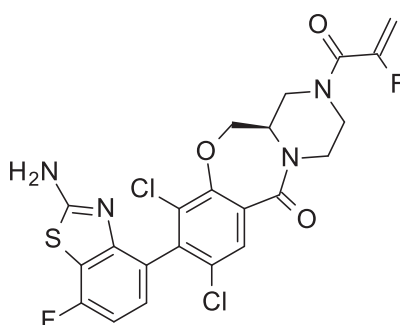
Tabla 22: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la del Ejemplo 34

Ejemplo	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M+H)
35		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	529,0/531,0
36		4-[(4aR)-7-cloro-9-fluoro-11-oxo-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	515,0/517,0
37		(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-7-fluoro-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona	491,0/493,0
38		1-[(4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-7-fluoro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-il]prop-2-en-1-ona	477,0/479,0

39		1-[(4aS)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-9-cloro-7-fluoro-1,2,4,4a,5,11-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-3-il] prop-2-en-1-ona	477,0/479,0
40		4-[(13aS)-8-cloro-10-fluoro-6-oxo-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	529,0/531,0
41		(13aS)-9-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-8-cloro-10-fluoro-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-6-ona	505,0/507,0
42		4-[(13aS)-8-cloro-10-fluoro-6-oxo-2-prop-2-enoil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-benzotiofen-3-carbonitrilo	511,0/513,0
43		4-[(4aR)-9-cloro-7-fluoro-11-oxo-3-prop-2-enoil-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-8-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	515,0/517,0

44		4-[(3S,13aS)-10-cloro-8-fluoro-3-metil-6-oxo-2-prop-2-enil-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	542,4/544,4
45		4-[(13aS)-10-chloro-8-fluoro-6-oxo-2-(2,3,3-trideuterioprop-2-enil)-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo- ¹³ C	533,1/535,1

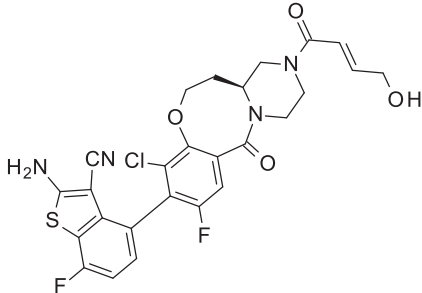
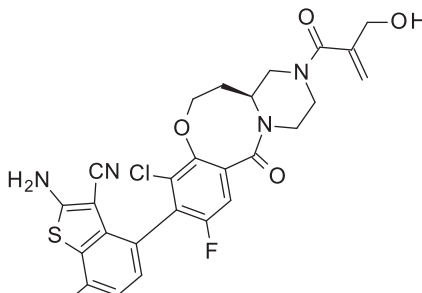
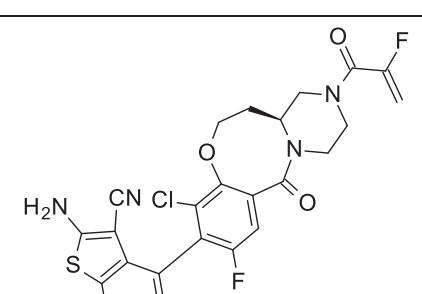
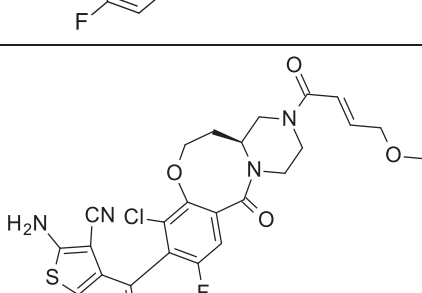
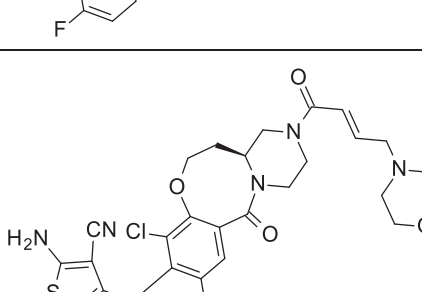
Ejemplo 46

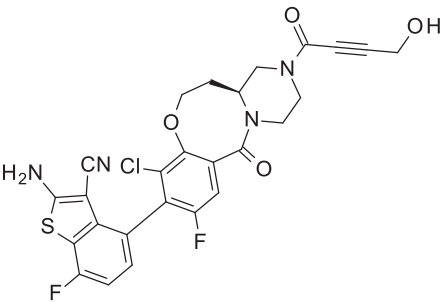
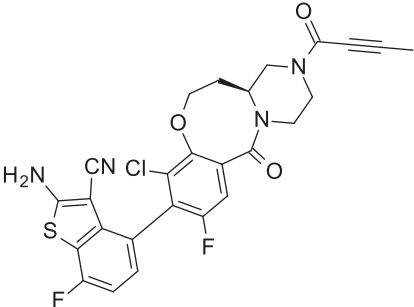


A una solución (4aR)-8-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzotiazol-4-il)-7,9-dicloro-1,2,3,4,4a,5-hexahidropirazino[2,1-c][1,4]benzoxazepina-11-ona (46 mg, 0,10 mmol), ácido 2-fluoroprop-2-enoico (11 mg, 0,12 mmol), DIEA (53 µl, 0,30 mmol) en DMF (1 ml) enfriada en un baño de hielo a 0 °C se agrega una solución de anhídrido propilfosfónico al 50 % en peso en EtOAc (91 µl, 0,15 mmol). Después de 45 min, la mezcla de reacción se concentra al vacío. La mezcla cruda se purifica mediante cromatografía de fase inversa, al eluir con 20-80 % de gradiente de B en A (A: NH₄HCO₃ acuoso 10 mM con 5 % MeOH; B: ACN), para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (25 mg, 47 %). ES/MS m/z: 525 (M+H)

Tabla 23: Compuestos sintetizados de una manera esencialmente análoga a la del Ejemplo 46

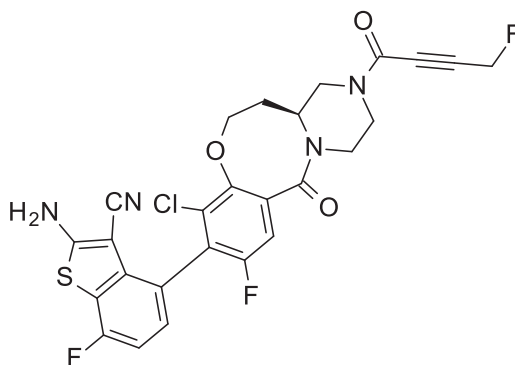
Ejemplo	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M + H)
47		4-[(13aS)-10-cloro-2-[(E)-4,4-difluorobut-2-enil]-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	579,5/581,4
48		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2-[2-(trifluorometil)prop-2-enil]-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	597,5/599,5
49		4-[(13aS)-10-cloro-2-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enil]-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	586,6/588,6
50		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-[(E)-4-fluorobut-2-enil]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	561,5/563,5

51		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-[(E)-4-hidroxi-but-2-enoil]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	559,4/561,4
52		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-[2-(hidroximetil)prop-2-enoil]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	559,4/561,4
53		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-(2-fluoroprop-2-enoil)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	547,0/549,0
54		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-[(E)-4-metoxibut-2-enoil]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	573,6/575,6
55		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-[(E)-4-morfolinobut-2-enoil]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	628,6/630,6

56		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-(4-hidroxibut-2-inoil)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	557,5/559,4
57		4-[(13aS)-2-But-2-inoil-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	541,4/543,4

Ejemplo 58

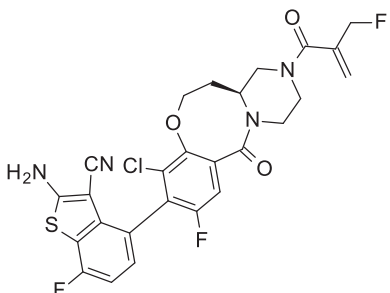
4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-(4-fluorobut-2-inoil)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo



Se agrega trifluoruro de dietilaminosulfuro (0,03 ml, 0,2 mmol) por goteo a través de una jeringa a un vial sellado que contiene una solución a 0 °C de 4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-(4-hidroxibut-2-inoilo)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo (120 mg, 0,215 mmol) en DCE (2 ml). La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos y luego se diluye con agua y una solución de IPA/cloroformo al 25 %. Los orgánicos se separan, se secan en sulfato de sodio anhidro, se filtran y se concentran al vacío. El residuo resultante se purifica a través de cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 0-

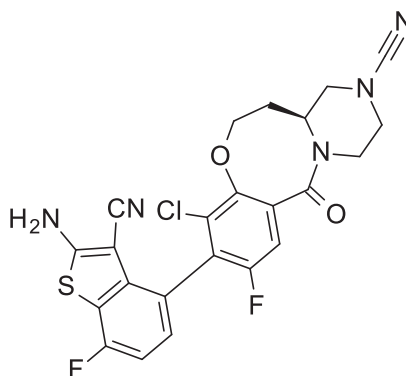
100 % 10 % de 7M NH₃ en DCM/DCM y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de fase inversa para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (7 mg, 6 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 559,4/561,4 [M+H]⁺.

Tabla 24: Compuesto sintetizado de una manera esencialmente análoga a la del Ejemplo 57

Ejemplo	Estructura	Nombre del compuesto	ES/MS m/z (M+H)
59		4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-2-[2-(fluorometil)prop-2-enil]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo	561,4/563,5

Ejemplo 60

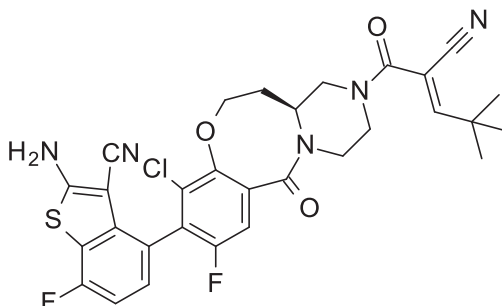
(13aS)-9-(2-amino-3-ciano-7-fluoro-benzotiofen-4-il)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocina-2-carbonitrilo



Se agrega bromuro de cianógeno (3M en DCM, 0,15 ml, 0,45 mmol) a un matraz que contiene 4-[(13aS)-10-cloro-8-fluoro-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahidro-1H-pirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo (100 mg, 0,211 mmol) y NaOH 1 N (1 ml) en DCM (1 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 18 horas y luego se diluye con agua y una solución de IPA/cloroformo al 25 %. Los orgánicos se separan, se secan en sulfato de sodio anhidro, se filtran y se concentran al vacío. El residuo resultante se purifica a través de cromatografía de fase inversa para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (29 mg, 27 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 517,0/519,0 [M+H]⁺.

Ejemplo 61

4-[(13aS)-10-cloro-2-[(E)-2-ciano-4,4-dimetil-pent-2-enoil]-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo



Un vial para microondas de 20 ml se carga con 4-[(13aS)-10-cloro-2-(2-cianoacetil)-8-fluoro-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahidropirazino[2,1-d][1,5]benzoxazocin-9-il]-2-amino-7-fluoro-benzotiofen-3-carbonitrilo (0,410 g, 0,756 mmol), EtOH (8 ml), piperidina (0,15 ml, 1,5 mmol) y trimetilacetaldehído (0,7 ml, 6 mmol) y se sella con una tapón superior. La mezcla de reacción se calienta en un reactor de microondas a 120 °C durante 60 minutos, 90 minutos más a 120 °C y otra 1 hora a 100 °C antes de concentrar al vacío. El residuo resultante se purifica a través de cromatografía flash de gel de sílice al eluir con 0-50 % de acetona:DCM para obtener el producto del título como un sólido amarillo pálido (117 mg, 25 %). ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 610,6/612,6 [M+H]⁺.

Ensayos biológicos

Los siguientes ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados son inhibidores de KRas G12C e inhiben el crecimiento de ciertos tumores *in vitro* y/o *in vivo*.

Ensayo TR-FRET de ocupación de sonda KRas G12C

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de un inhibidor para competir con una sonda para fijarse y modificar covalentemente a KRas G12C en el codón 12. La señal se genera mediante la transferencia de fluorescencia de resolución temporal entre europio en un anticuerpo fijado al anticuerpo con etiqueta anti-histidina etiquetado con europio de KRas G12C LanthaScreen (el anticuerpo anti-His Eu) y marcador fluorescente 647 (Alexa Fluor™) fijado a KRas G12C a través de estreptavidina y un inhibidor biotinilado (la "sonda KRas", ver Preparación 223).

Los inhibidores se evalúan en formato de respuesta a la dosis a partir de reservas de 10 mM en 100 % de DMSO. El Labcyte Echo® 555 se usa para diluir y transferir 100 nl por cavidad que contiene una dilución en serie de 10 puntos, de 2,8

veces, a una placa de ensayo. Se preparan dos copias de la placa de ensayo para medir la potencia después de una incubación de 5 y 60 minutos del inhibidor con KRas G12C. Se agrega KRas G12C etiquetada con His (20 nM) a las placas en amortiguador de ensayo (20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0,01 % de TX-100 y 1 mM de DTT). Después de una incubación de 5 o 60 minutos, se agrega 1 μ M de la sonda KRas y se deja que modifique covalentemente la KRas G12C libre durante 1 hora. Esto se diluye 4 veces en el amortiguador que contiene el anticuerpo anti-His Eu y el marcador recubierto con estreptavidina 647 (ambos de Life Technologies) para lograr KRas G12C (5 nM), anticuerpo anti-His (2 nM), sonda KRas (300 nM) y marcador recubierto con estreptavidina 647 (500 nM). Después de 30 minutos, la señal fluorescente se lee en un lector de placas Envision™ (excitación a 340 nM, emisión de marcador (em) a 665 nM y emisión de anticuerpos a 615 nM). Las cavidades de control máximo carecen de inhibidor y las cavidades de control mínimo carecen tanto de inhibidor como de KRas G12C. La relación de señal (em a 665/em a 615) se convierte en porcentaje de inhibición utilizando la siguiente ecuación: % de inhibición = $100 - [(señal\ de\ compuesto\ de\ prueba - mediana\ de\ señal\ mínima) / (mediana\ de\ señal\ máxima - mediana\ de\ señal\ mínima) \times 100]$. La IC₅₀ se determina mediante el ajuste del porcentaje de inhibición en cada concentración de inhibidor a la ecuación logística no lineal de cuatro parámetros utilizando Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$ en donde, y = % de inhibición, A = asíntota mínima, B = asíntota máxima, C = IC₅₀ relativa o la concentración de inhibidor que produce 50 % de inhibición en el rango ajustado de ambas asíntotas, y D = pendiente de Hill.

Los compuestos dentro del alcance de esta invención se evalúan en este ensayo sustancialmente como se describió anteriormente. Los compuestos ejemplificados de la invención evaluados en este ensayo exhiben actividad inhibidora de KRas G12C al competir con una sonda para fijarse y modificar covalentemente KRas G12C en el codón 12. El compuesto del Ejemplo 1, por ejemplo, evaluados en este ensayo exhibe una IC₅₀ de menos de 0,015 M, a los 5 y 60 minutos, n = 4.

AlphaLISA® para Phospho-ERK en H358 celular

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos de prueba para inhibir la fosforilación de p-ERK1/2, un efector corriente abajo de KRas en las células de cáncer de pulmón humano H358 (ATCC CRL-5807). En resumen, el ensayo AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) es un inmunoensayo tipo sándwich para la detección cuantitativa de phospho-ERK 1/2 (fosforilado en Thr202/Tyr204 en ERK1, o Thr185/Tyr187 en ERK2) en lisados

celulares con tecnología Alpha (Perkin Elmer Cat # ALSU-PERK-A50K).

Las células H358 se colocan en placas a 40 K células por cavidad en 100 µl de medio (RPMI 1640, GIBCO Cat # 22400-071) que contiene 10 % de FBS (GIBCO Cat #: 10082-147) en una placa de 96 cavidades (Costar # 3596) y se incuban durante la noche en bandejas húmedas a 37 °C, 5 % de CO₂. A la mañana siguiente, 10 µl de compuestos de prueba diluidos en serie (3 veces) (concentración máxima de 50 µM) y 10 µl de controles (cavidades de señal máxima: 5 % de DMSO y cavidades de señal mínima: 2 µM de N-(3-{3-ciclopropil-5-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidropirido[4,3-D]pirimidin-1(2H)-il}fenil)acetamida (trametinib, como control positivo) se agregan a la placa celular y se incuban durante 2 horas en bandejas húmedas a 37 °C/5 % de CO₂. El amortiguador de lisis se prepara a temperatura ambiente que contiene un cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasa. El medio de cultivo se retira invirtiendo y agitando la placa celular en el sumidero y luego se seca con una toalla de papel. Se agrega amortiguador de lisis a la placa celular (50 µl por cavidad) y la placa se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos en un agitador. Para la detección de p-ERK, las microesferas aceptoras se diluyen en una mezcla de suspensión con amortiguador. Mediante un distribuidor de líquidos STARlet, se transfieren 5 µl de microesferas aceptoras y 2 µl de lisado celular como una dilución en punta de una sola etapa a una placa de ensayo de 384 cavidades. La placa de ensayo se sella con lámina de aluminio y se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas. Las microesferas donantes se diluyen en una mezcla de suspensión con amortiguador. Mediante el STARlet, se agregan 5 µl de microesferas donantes a la placa de ensayo que luego se sella y se envuelve con lámina de aluminio. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. La placa de ensayo se lee en un lector de placas EnVision™ (Perkin Elmer) utilizando un programa de luminiscencia.

La señal se convierte en porcentaje de inhibición utilizando la siguiente ecuación: % de inhibición = 100 - [(señal de compuesto de prueba - mediana de señal mínima) / (mediana de señal máxima - mediana de señal mínima) x 100]. La señal máxima es una cavidad de control sin inhibidor. La señal mínima es una cavidad de control que contiene un inhibidor de referencia suficiente para inhibir completamente la actividad. La IC₅₀ se determina mediante el ajuste del porcentaje de inhibición en cada concentración de inhibidor a la ecuación logística no lineal de cuatro parámetros utilizando Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$ en donde, y = % de inhibición, A = asíntota mínima, B = asíntota máxima, C = IC₅₀ relativa o la

concentración de inhibidor que produce 50 % de inhibición en el rango ajustado de ambas asíntotas, y D = pendiente de Hill.

Los compuestos dentro del alcance de esta invención se evalúan en este ensayo sustancialmente como se describió anteriormente. Los compuestos de los Ejemplos exhiben la capacidad de inhibir la fosforilación de p-ERK1/2. El compuesto del Ejemplo 1, por ejemplo, exhibió una IC₅₀ relativa en este ensayo de 0,00178 μ M n = 3. Estos datos muestran que los compuestos de los Ejemplos exhiben actividad de inhibición de KRas G12C en este ensayo celular.

ELISA RAS GTPasa activa en las células H358

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de los compuestos de prueba para inhibir la actividad constitutiva de RAS GTPasa en las células de cáncer de pulmón humano H358 (ATCC CRL-5807). El kit ELISA RAS GTPasa (motivo activo cat. N.º 52097) contiene una placa de 96 cavidades recubierta previamente con glutatión para capturar una proteína GST-Raf-RBD suministrada por el kit. El RAS activado (fijado a GTP) en extractos celulares se fija específicamente al Raf-RBD. El RAS fijado se detecta con un anticuerpo primario que reconoce KRas humana. Un anticuerpo secundario conjugado con HRP reconoce el anticuerpo primario y una solución de desarrollo proporciona una lectura quimioluminiscente.

Las células H358 se colocan en placas a 80.000 células/cavidad en 90 μ l de medio libre de suero (RPMI 1640, GIBCO) y se incuban durante la noche a 37 °C/5 % de CO₂. A la mañana siguiente, 10 μ l de compuestos de prueba diluidos en serie (3 veces) (concentración máxima de 500 μ M) y 10 μ l de controles (cavidades de señal máxima: 5 % de DMSO y cavidades de señal mínima: 500 μ M de 1-[4-[6-cloro-8-fluoro-7-(3-hidroxi-1-naftil)quinazolin-4-il]piperazin-1-il]prop-2-en-1-ona, WO2015054572 como un inhibidor) se agregan a la placa celular y se incuban durante 2 horas a 37 °C/5 % de CO₂. El amortiguador de lisis/fijación completo se prepara con un cóctel inhibidor de proteasa y GST-Raf-RBD, y se almacena en hielo. Una hora antes de que se complete la incubación de la placa celular, se diluyen 50 μ l de GST-Raf-RBD en el amortiguador de lisis/fijación, y se agrega el amortiguador a la placa de ensayo ELISA y se incuba durante 1 hora a 4 °C con balanceo suave. Después de 2 h, las células se lavan con 100 μ l de PBS helada y se lisan con 100 μ l de amortiguador de lisis/fijación. La placa celular se agita durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, la placa celular se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se prepara 1X de amortiguador de lavado a temperatura ambiente y luego se usa para lavar (3 x 100 μ l) la placa de ensayo recubierta con GST-Raf-RBD.

Después del lavado, se agregan 50 µl de lisado celular a la placa de ensayo recubierta con GST-Raf-RBD y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Durante este período de incubación, se prepara 1X de amortiguador de fijación a anticuerpo y se lleva hasta temperatura ambiente. La placa de ensayo se lava 3 x 100 µl con 1X de amortiguador de lavado y luego se agregan 50 µl de anticuerpo primario (diluido 1:500 en 1x de amortiguador de fijación a anticuerpo). La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa de ensayo se lava 3 x 100 µl con 1X de amortiguador de lavado y luego se agregan 50 µl de anticuerpo secundario (diluido 1:5000 en 1X de amortiguador de fijación a anticuerpo) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa de ensayo se lava 4 x 100 µl con 1X de amortiguador de lavado y luego se agregan 50 µl de solución de trabajo quimioluminiscente a temperatura ambiente. La placa de ensayo se lee en un lector de placas EnVision™ (Perkin Elmer) utilizando un programa de luminiscencia.

La señal se convierte en porcentaje de inhibición utilizando la siguiente ecuación: % de inhibición = $100 - [(señal\ de\ compuesto\ de\ prueba - mediana\ de\ señal\ mínima) / (mediana\ de\ señal\ máxima - mediana\ de\ señal\ mínima) \times 100]$. La señal máxima es una cavidad de control sin inhibidor. La señal mínima es una cavidad de control que contiene un inhibidor de referencia suficiente para inhibir completamente la actividad. La IC₅₀ se determina mediante el ajuste del porcentaje de inhibición en cada concentración de inhibidor a la ecuación logística no lineal de cuatro parámetros utilizando Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$ en donde, y = % de inhibición, A = asíntota mínima, B = asíntota máxima, C = IC₅₀ relativa o la concentración de inhibidor que produce 50 % de inhibición en el rango ajustado de ambas asíntotas, y D = pendiente de Hill.

Los compuestos dentro del alcance de esta invención se evalúan en este ensayo sustancialmente como se describió anteriormente. Los compuestos de los Ejemplos exhiben una capacidad para inhibir la actividad constitutiva de RAS GTPasa. El compuesto del Ejemplo 1, por ejemplo, exhibió una IC₅₀ relativa de 0,00672 µM, n = 4 en este ensayo. Estos datos muestran que los compuestos de los Ejemplos exhiben actividad de inhibición de KRas-GTP en este cultivo celular de cáncer de pulmón humano.

Ensayo de proliferación 3D de células H358

El propósito de este ensayo es evaluar la inhibición del compuesto de prueba en un ensayo de proliferación 3D utilizando células de cáncer de pulmón humano, H358, (ATCC CRL-5807). La señal que refleja la proliferación celular se detecta con el

reactivo 3D CellTiterGlo® (Promega G9683). Las células se cultivan en RPMI 1640 (GIBCO®) enriquecido con 10 % de FBS inactivado por calor y 0,1 mg/ml de penicilina/estreptomicina. Las células H358 se cultivan en la fase de crecimiento, y se colocan cinco mil células por cavidad en una placa con superficie de unión ultrabaja de 96 cavidades con fondo redondo negro transparente (Corning® cat. 4520) con 80 µl/cavidad de medio de cultivo. Las células se incuban durante la noche a 37 °C en una cámara de humedad. Se agregan 20 µl/cavidad de compuesto de prueba diluido en serie a la placa que luego se incuba durante 96 horas. Las placas se llevan hasta temperatura ambiente y se agrega un volumen igual de reactivo CellTiterGlo® 3D a temperatura ambiente. Las placas se agitan a 750 RPM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente para estabilizar la señal, la señal luminiscente se mide en el lector de placas EnVision™. La señal se convierte en porcentaje de inhibición utilizando la siguiente ecuación: % de inhibición = 100 - [(señal de compuesto de prueba - mediana de señal mínima)/(mediana de señal máxima - mediana de señal mínima) x 100]. La señal máxima es una cavidad de control sin inhibidor. La señal mínima es una cavidad de control que contiene un inhibidor de referencia (trametinib) suficiente para inhibir completamente la proliferación celular. La IC₅₀ se determina mediante el ajuste del porcentaje de inhibición en cada concentración de inhibidor a la ecuación logística no lineal de cuatro parámetros utilizando Genedata Screener®: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$ en donde, y = % de inhibición, A = asíntota mínima, B = asíntota máxima, C = IC₅₀ relativa o la concentración de inhibidor que produce 50 % de inhibición en el rango ajustado de ambas asíntotas, y D = pendiente de Hill.

Los compuestos dentro del alcance de esta invención se evalúan en este ensayo sustancialmente como se describió anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1, por ejemplo, presenta una IC₅₀ relativa 0,0083 µM en este ensayo. Estos datos muestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la proliferación de células de cáncer de pulmón humano H358.

Ensayo de proliferación celular CellTiterGlo®

El propósito de este ensayo es evaluar el crecimiento de líneas tumorales mutantes KRas G12C después del tratamiento con un compuesto de prueba. Se recolecta un panel de líneas celulares tumorales que contienen KRas G12C u otras mutaciones de KRas (Tabla 25). Todas las líneas celulares son de ATCC u otras fuentes indicadas.

Típicamente, las células se cultivan en RPMI1640 o medio Eagle modificado de

Dulbecco (DMEM, GIBCO) enriquecido con 10 % de FBS (GIBCO, Invitrogen). Para el cultivo en 2D, las células (4×10^3 /cavidad) mantenidas en el medio de crecimiento descrito anteriormente se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 cavidades Corning® cat. 3603) un día antes del tratamiento. Las células se tratan con compuesto durante 96 horas y luego se analizan para determinar su viabilidad mediante el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia [Luminescent Cell Viability Assay®] CellTiterGlo® (Promega #G7572 para 2D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y un lector de placas EnVision™. La regresión no lineal y las curvas de respuesta a la dosis sigmoideas se utilizan para calcular la concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) con el software GraphPad Prism 4®.

Tabla 25: Actividades de antiproliferación *in vitro* de los Ejemplos 1, 34-36 en un panel de líneas celulares tumorales de mutación de KRas G12C

Línea celular	Ejemplo 1		Ejemplo 34		Ejemplo 35		Ejemplo 36	
	% de inh. A 10 μ M	IC ₅₀ (μ M)	% de inh. A 10 μ M	IC ₅₀ (μ M)	% de inh. A 10 μ M	IC ₅₀ (μ M)	% de inh. A 10 μ M	IC ₅₀ (μ M)
H358 (pulmón)	94,5	0,004	95,6	0,002	96,4	0,002	89,1	0,008
SW1463 (colon)	95,3	0,006	90,1	0,004	94,3	0,005	82,7	0,014
MiaPaca-2 (páncr)	77,2	0,018	82,9	0,01	85,8	0,011	79,6	0,081
H23 (pulmón)	98,2	0,045	96,8	0,026	98	0,024	96,7	0,1
LU99 (pulmón)	89,9	0,303	91,9	0,201	96,6	0,173	99,1	0,349
SW837 (recto)	60,8	0,25	59,6	0,2	64,2	0,33	58,7	0,57
HCC44 (pulmón)	46,4	>10	41	>10	64,3	2,23	80,6	2,839
LXFA-983L (pulmón)	78,6	3,609	68,8	>10	83,1	>10	88	>10
H2122 (pulmón)	80,4	1,17	78,1	0,66	79,7	0,9	92,8	1,36
SW756 (cuello uterino)	51,9	1,63	56,9	1,08	56,7	1,55	58,1	2,52
Calu-1 (pulmón)	45,4	>10	50,6	1,14	56	0,48	77,4	2,925
H1792 (pulmón)	63,6	3,011	56,7	4,354	81,7	1,41	97,4	2,032
UM-UC-3 (vejiga)	54,3	0,73	56,1	0,51	80,4	1,09	91,6	1,86
KYSE-410 (esof)	64,6	5,84	63,2	>10	68,3	7,974	43,1	>10
H1373 (pulmón)	68,8	1,813	67,7	6,739	86,3	3,544	82,6	5,494

Línea celular	Ejemplo 1		Ejemplo 34		Ejemplo 35		Ejemplo 36	
	% de inh. A 10 μ M	IC50 (μ M)	% de inh. A 10 μ M	IC50 (μ M)	% de inh. A 10 μ M	IC50 (μ M)	% de inh. A 10 μ M	IC50 (μ M)
SW1573 (pulmón)	35	>10	60,8	7,823	44,7	>10	54,3	9,35
H2030 (pulmón)	32,9	>10	41,1	>10	40,3	>10	55,8	>10
A549 (pulmón)	19,1	>10	18,8	>10	31,6	>10	62,1	9,5

Los datos indican que el compuesto de los Ejemplos 1, 34-36 inhiben el crecimiento de las líneas celulares tumorales KRas G12C mutantes enumeradas en la Tabla 26.

Como se resume en la Tabla 25, los compuestos de los Ejemplos 1, 34-36 exhibieron actividades de antiproliferación en la mayoría de las células tumorales con mutación de KRas G12C en condiciones de cultivo 2D. En células A549 con mutación de KRas G12S, los compuestos de los Ejemplos 1, 34-36 exhibieron poca actividad, lo que sugiere que los Ejemplos 1, 34-36 inhiben selectivamente las células tumorales con mutación de KRas G12C.

Inhibición de los marcadores farmacodinámicos (PD) KRas G12C en el modelo de xenoinjerto H358 y el modelo de xenoinjerto MiaPaca-2 de cáncer de páncreas

El propósito de estos ensayos es evaluar la inhibición diana *in vivo* de un compuesto de prueba administrado por vía oral. Se implantan células H358 de cáncer de pulmón humano, o células MiaPaca-2 de cáncer de páncreas, en modelos de tumor de xenoinjerto de ratones *nude*. Se implantan células H358 o MiaPaca-2 (10×10^6 en una mezcla Matrigel® 1:1, volumen total de 0,2 ml) mediante inyección subcutánea en la pata trasera de ratones hembra *nude* (Harlan Laboratories). Se utiliza un total de 3-4 ratones en cada grupo para acoplamiento diana y el estudio de PD. El tratamiento se inicia con la administración oral (sonda) de un compuesto o vehículo de prueba (20 % de Captisol®, 25 mM de fosfato, pH 2,0 en 0,2 ml) cuando el tamaño del tumor alcanza aproximadamente 300 mg.

Para la inhibición de la diana *in vivo* y el análisis de PD, los tumores se muelen con mortero sobre hielo seco y se agregan fragmentos de tumor a 800 μ l de amortiguador de lisis que contiene 1 % de Triton™ X-100, 25 mM de Tris, pH 7,5, 150 mM de cloruro de sodio, 1 mM de EDTA y 1 mM de EGTA con cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas Halt (Thermo Scientific, cat. N.º 1861281) en tubos de matriz de lisis D (MP Biomedical®, cat. N.º 6913-500) con una microesfera grande adicional (microesfera de cerámica de 1/4", cat. N.º 6540-412 de MP Biomedical®) por tubo. Los

fragmentos tumorales se homogenizan en una preparación rápida Thermo Bio101® (FP120) en el ajuste 4 durante 15 minutos mientras están fríos durante un total de 2 veces. Los lisados se centrifugan a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para aclarar. El cálculo de proteínas se realiza en el sobrenadante de lisado a través de un ensayo de proteína BioRad Dc® y los lisados se diluyen en amortiguador de lisis/fijación completo del kit Ras GTPase Chemi ELISA® (motivo activo, cat. N.º 52097). El ELISA de KRas activo se realizó de la siguiente manera: las cavidades de ELISA recubiertas con glutatión se incubaron con RAF1-GST diluido en amortiguador de lisis/fijación completo durante 1 hora a 4 °C con agitación suave. Las cavidades se lavan 3 veces con amortiguador de lavado y se agregan 100 µg de lisados a cada cavidad y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación leve. Las cavidades se lavan 3 veces más, luego se agrega a cada cavidad el anticuerpo primario diluido en un amortiguador de fijación a anticuerpo. Las placas se incuban durante 1 hora. Las cavidades se lavan 3 veces más antes de agregar a cada cavidad el anticuerpo secundario conjugado con HRP, diluido en amortiguador de fijación a anticuerpo. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Las cavidades ELISA se lavan 4 veces, se agrega reactivo quimioluminiscente y luego se lee la luminiscencia. Para el ELISA pERK Meso Scale Discovery, se utilizan 25 µg de proteína que contiene 0,1 % de SDS; el kit de lisado de células enteras Meso Scale Discovery para pERK es proporcionado por Meso Scale Discovery.

Dosis dependiente de la inhibición de la diana *in vivo* y efectos farmacodinámicos en el modelo de xenoinjerto H388 de cáncer de pulmón:

El propósito de este ensayo es evaluar la inhibición de la diana *in vivo* dependiente de la dosis y los efectos farmacodinámicos en un modelo de cáncer de pulmón. El compuesto de prueba se dosifica en el modelo de xenoinjerto de ratón H358 de cáncer de pulmón en un rango de dosis de 12,5 a 100 mg/kg. Las muestras tumorales se recolectan 8 horas después de una dosis única. Se preparan los lisados tumorales y se mide la inhibición de pERK, pMEK y KRas activo como se describió anteriormente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 26; el compuesto del Ejemplo 34 exhibe una inhibición dependiente de la dosis de pERK y KRas activo después de un tratamiento de dosis única de 12,5 a 100 mg/kg a las 8 horas. El compuesto del Ejemplo 35 también muestra una buena inhibición de pERK y KRas activo después de un tratamiento de dosis única de 12,5 a 100 mg/kg. A estos niveles de dosis se observan 82,2 %-90,6 % de inhibición de pERK y 73,4 %-94 % de inhibición de KRas activo.

Tabla 26: Inhibición dependiente de la dosis de pERK, pMEK y Kras activo en el modelo de xenoinjerto H358 de ratones

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo	% de inhibición de KRas activo	% de inhibición de pERK
Vehículo	0	8	0	0
Ejemplo 35	12,5	8	81	82,2
	25	8	73,4	85,3
	50	8	94	90,6
	100	8	91,9	88,9
Ejemplo 34	12,5	8	14,2	26,9
	25	8	35,1	53,2
	50	8	31,5	54
	100	8	69,3	74,8

Inhibición de la diana *in vivo* dependiente del tiempo y efectos farmacodinámicos en el modelo de xenoinjerto H388 de ratón de cáncer de pulmón

El propósito de este ensayo es evaluar la inhibición de la diana *in vivo* dependiente del tiempo y los efectos farmacodinámicos en un modelo de cáncer de pulmón. Los compuestos de los Ejemplos 35 y 36 también se dosifican a 30 mg/kg en un experimento de transcurso de tiempo. Después de una dosis única, las muestras tumorales se recolectan a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la dosis. Se preparan los lisados tumorales y se mide la inhibición de pERK, pMEK y KRas activo como se describió anteriormente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 27. El compuesto del Ejemplo 35 exhibe una inhibición dependiente del tiempo de pERK y KRas activo después de un tratamiento de dosis única de 30 mg/kg. A 30 mg/kg, se observa una inhibición de pERK de 82,6 % a las 8 horas, y la inhibición de pERK disminuye a 65,2 % a las 24 horas. Para el KRas activo, se logra una inhibición de 80,2 % a las 8 horas y la inhibición del KRas activo disminuye a 54,9 % a las 24 horas. El compuesto del Ejemplo 36 exhibe una inhibición dependiente del tiempo de pERK y KRas activo después de un tratamiento de dosis única de 30 mg/kg. A 30 mg/kg, se observa una inhibición de pERK de 82,6 % a las 8 horas, y la inhibición de pERK disminuye a 48,8 % a las 24 horas. Para el KRas activo, se logra una inhibición del 88,5 % a las 8 horas, y la inhibición del KRas activo disminuye a 43,2 % a las 24 horas.

Tabla 27. Inhibición dependiente del tiempo de pERK y KRas activo en el modelo H358

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	% de inhibición de KRas activo	% de inhibición de pERK
Vehículo	0	4 u 8	0	0
Ejemplo 35	30	2	7,6	67,9
	30	4	65,7	73,2
	30	8	80,2	82,6
	30	12	39,3	71,1
	30	24	54,9	65,2
Ejemplo 36	30	2	72,6	79,7
	30	4	72,4	84,2
	30	8	88,5	86,9
	30	24	43,2	48,8

Inhibición de la diana *in vivo* y efectos farmacodinámicos en modelo de xenoinjerto de ratón MiaPaca-2 de cáncer de páncreas

El propósito de este ensayo es evaluar la inhibición de la diana *in vivo* dependiente del tiempo y de la dosis y los efectos farmacodinámicos en un modelo de cáncer de páncreas. El compuesto del Ejemplo 35 se dosifica a 5, 10 o 30 mg/kg en un experimento de transcurso de tiempo. Después de una dosis única, las muestras tumorales se recolectan a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la dosis. Se preparan los lisados tumorales y se mide la inhibición de pERK y KRas activo como se describió anteriormente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 28. El compuesto del Ejemplo 35 exhibe una inhibición dependiente del tiempo de pERK y KRas activo después de un tratamiento de dosis única de 5, 10 o 30 mg/kg. A 5 mg/kg, a las 4 horas se observa un 63,8 % de inhibición de Ras activo y un 50,9 % de inhibición de pERK. A 10 mg/kg, se observa un 85,5 % de inhibición de Ras activo y un 58,5 % de inhibición de pERK a las 4 horas. A 30 mg/kg, se observa una inhibición de 90,9 % de Ras activo y un 58,7 % de inhibición de pERK a las 4 horas, y una inhibición de 60,7 % del Ras activo se mantiene a las 24 horas.

Tabla 28. Inhibición dependiente de la dosis y el tiempo de pERK y KRas activo en el modelo MiaPaca-2

Dosis (mg/kg)	Tiempo de duración (horas)	% de inhibición de KRas activo	% de inhibición de pERK
	4	0	0
5	2	24,3	51
5	4	63,8	50,9
5	8	57	59
5	12	34,3	47,4
5	24	4,3	-30,2
10	2	67,8	68,5
10	4	85,5	58,5
10	8	78,9	57,6
10	12	44,7	49
10	24	22,8	-14,9
30	2	76	59,5
30	4	90,9	58,7
30	8	89	54,3
30	12	68,9	58,4
30	24	60,7	15,6

Actividad de crecimiento antitumoral en el modelo de xenoinjerto H358 de ratón de cáncer de pulmón:

El propósito de este ensayo es determinar las actividades antitumorales de los compuestos de prueba (Ejemplos 34, 35 y 36) en un modelo de xenoinjerto de ratón H358 de cáncer de pulmón. Las células tumorales de pulmón H358 (10×10^6) se implantan mediante inyección subcutánea en la pata trasera de ratones hembra *nude* (Taconic Biosciences). Se utilizan un total de 4 ratones en cada grupo para el estudio de eficacia. El tratamiento se inicia con la administración oral (sonda) de un compuesto o vehículo de prueba (20 % de Captisol®, 25 mM de fosfato, pH 2,0 en un volumen de 0,2 ml una o dos veces al día durante 28 días cuando el tamaño del tumor alcanza aproximadamente 300 mg). Se controla el crecimiento del tumor y el peso corporal en el tiempo para evaluar la eficacia y los signos de toxicidad. Los resultados resumidos se proporcionan en la Tabla 29. A 100 mg/kg en un cronograma de dosis una vez al día, se observó una regresión del crecimiento tumoral de -6,28 a -30,96 % para el compuesto del Ejemplo 34. A 30 mg/kg en un cronograma de dosis dos veces al día, se observó una regresión tumoral de -67,68 a -72,14 % para el compuesto del Ejemplo 35. A 30 mg/kg en un cronograma de dosis de dos veces al día, se logró una progresión tumoral de -68,96 % para el compuesto del Ejemplo 36. No se observó una pérdida significativa de peso corporal de los animales durante todo el estudio para estos compuestos.

Tabla 29: Actividad de crecimiento antitumoral en el modelo de xenoinjerto H358 de ratón de cáncer de pulmón

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Cronograma de dosis	% de regresión (día 12)	% de regresión (día 26)
Ejemplo 35	30	PO, BID	-72,14	-67,68
Ejemplo 36	30	PO, BID	-68,96	NA
Ejemplo 34	100	PO, QD	-30,96	-6,28

Actividades de crecimiento antitumoral en otros modelos de cáncer de pulmón y modelos de tipos de cáncer colorrectal, de páncreas, de vejiga y esofágico

Además de los modelos de xenoinjerto H358, el compuesto del Ejemplo 35 se evalúa en muchos otros modelos de xenoinjerto o xenoinjerto derivado del paciente (PDX) de cáncer de pulmón, colorrectal, de páncreas, de vejiga y esofágico a diferentes dosis. Para los modelos de xenoinjerto de H1373, HCC44, MiaPaca-2, SW1463, KYSE-410 y UM-UC-3, típicamente $5-10 \times 10^6$ células en una mezcla 1:1 de matrigel (0,2 ml de volumen total) se implantan por vía subcutánea en la pata trasera de ratones *nude*. Por lo general, se utilizan un total de 4 ratones en cada grupo para el estudio de eficacia. El tratamiento se inicia con la administración oral (sonda) de un compuesto o vehículo de prueba (20 % de Captisol®, 25 mM de fosfato, pH 2,0) en un volumen de 0,2 ml cuando el tamaño del tumor alcanza aproximadamente 200-300 mg. Se controla el crecimiento del tumor y el peso corporal en el tiempo para evaluar la eficacia y los signos de toxicidad. Para el modelo EL3187 PDX, los viales congelados que contienen fragmentos tumorales se descongelan a 37 °C en un baño de agua. Los fragmentos de tumor se transfieren a un tubo Falcon de 50 ml y el medio DMEM helado se agrega lentamente al tubo hasta un volumen total de 35 ml. Luego se centrifugan los fragmentos tumorales a 130 xg durante 2 minutos a 4 °C y se aspira el sobrenadante. Esta etapa de lavado se repite dos veces y los fragmentos de tumor se resuspenden en 10 ml de DMEM para su implantación en ratones atímicos nude-Foxn1nu (Envigo RMS, Inc., Mount Comfort, Indiana). Una vez que los volúmenes tumorales alcanzan de 800 a 1000 mm³, los animales se sacrifican y los tumores se recogen mediante el uso de una técnica aséptica. Los tumores frescos se cortan en fragmentos de 10 a 15 mm³ y se colocan en medio de hibernación Gibco frío. Los fragmentos de tumor se implantan por vía subcutánea en animales con una aguja de trocar de 10 g. Cuando el tamaño del tumor alcanza de 200 a 300 mm³, los animales se aleatorizan para el tratamiento del compuesto.

Las actividades de crecimiento o regresión antitumorales del compuesto del Ejemplo 35 se resumen en la Tabla 30. Entre los modelos enumerados en la Tabla 31,

EL3187 es un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) y todos los demás son modelos de xenoinjerto tumoral. Como se ilustra en la Tabla 31, el compuesto del Ejemplo 35 demuestra actividades antitumorales dependientes de la dosis en todos los modelos, lo que sugiere que el compuesto del Ejemplo 35 es activo contra tipos de cáncer con mutación KRasG12C, que incluyen cáncer de pulmón, colorrectal, de páncreas, de vejiga y esofágico.

Tabla 30: Actividad de crecimiento antitumoral por compuesto del Ejemplo 35 en modelos PDX o de xenoinjerto de cáncer de pulmón, colorrectal, de páncreas, de vejiga y esofágico.

Modelos de xenoinjerto/PDX (tipo de tumor)	Ejemplo 35 inhibición del crecimiento tumoral (%) o regresión (-%)									
	1 mg/kg		3 mg/kg		5 mg/kg		10 mg/kg		30 mg/kg	
	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28	QD x28	BID x28
H1373 (pulmón)					97,9	-26,3	-21,3	-49	-49,7	
HCC44 (pulmón)					28,3	57,5	32,7	61,8	77	84,1
EL3187 (pulmón)	52	89,2	-39,8	-91			-96	-96		
MiaPaca-2 (páncreas)					81,7	-36,1	-27	-45,2	-42	-43,6
SW1463 (CRC)					52,5	48,8	78,3	79,5	89,8	98,8
SW837 (CRC)					18,2	83,6	95,2	62,1	83,5	-23,8
KYSE-410 Esófago							25,3	51,5	66,7	61,8
UM-UC-3 (vejiga)					34,3	45,3	33,6	75	83,1	85

Eficacia combinada *in vitro* del compuesto del Ejemplo 35 con otros tratamientos dirigidos

Además de la monoterapia, se evalúa la eficacia de combinación del compuesto del Ejemplo 35 con otros tratamientos dirigidos, tales como el inhibidor de CDK4 y CDK6 abemaciclib, los inhibidores de molécula pequeña de EGFR erlotinib o afatinib, el anticuerpo monoclonal de EGFR cetuximab y el inhibidor de ERK LY3214996. Se obtienen once líneas celulares para este estudio de ATCC y se cultivan en las condiciones recomendadas por ATCC. Todas las líneas celulares tienen una mutación KRAS G12C y son seis líneas celulares de cáncer de pulmón (H358, H1373, H1792, H2030, H2122, SW1573 y HCC44), dos líneas celulares de cáncer colorrectal (SW837 y SW1463), una línea celular de cáncer de páncreas (MiaPaca-2) y una línea celular de cáncer de esófago (KYSE410). El ensayo de proliferación se realiza como un ensayo de crecimiento de 4 días mediante Cell TiterGlo® como

lectura. En resumen, las células se colocan en placas de cultivo celular de 96 cavidades y se dejan adherir durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se tratan con compuestos, ya sea tratamientos individuales o tratamientos conjuntos. Primero, los compuestos de prueba se diluyen en serie en DMSO, luego se diluyen en un medio como una concentración de 5X con 1 % de DMSO, y finalmente se agregan a las células en un medio para diluir a 1X. Las células se incuban a 37 °C durante 4 días más. Al final del período de incubación, el reactivo Cell TiterGlo® se mezcla y se agrega a las cavidades. Después de 10 minutos, la luminiscencia se lee mediante un instrumento Perkin Elmer Envision. Se generan valores absolutos de IC₅₀ generados por un modelo logístico de 4 parámetros para los tratamientos únicos y conjuntos, seguidos de índices de combinación para cada tratamiento conjunto y línea celular. Los valores de combinación de IC₅₀ se ajustan en función de la concentración total de cada compuesto cuando se suman. (Ejemplo: para una relación de concentración 1:1 del compuesto 1 y el compuesto 2, la combinación IC₅₀ aumenta por un factor de 2). El índice de combinación (CI) mide el grado en que la potencia de un tratamiento conjunto difiere de la potencia esperada si es aditiva y está en función de la definición de aditividad de Loewe.

$$CI = \frac{C_{A,y}}{IC_{A,y}} + \frac{C_{B,y}}{IC_{B,y}}$$

en donde

- $C_{A,y}$ y $C_{B,y}$ son las concentraciones de los tratamientos A y B que producen un efecto, y, cuando se administran en combinación
- $IC_{A,y}$ y $IC_{B,y}$ son las concentraciones de A y B que producen un efecto, y, cuando se administran individualmente

En algunos casos, si se utiliza un valor estimado de IC₅₀ para el cálculo de CI, el CI calculado se denomina índice de potenciación. La interpretación biológica de la combinación o índice de potenciación es la siguiente: sinérgica si la combinación o índice de potenciación: sinérgica si el índice de combinación <0,5, aditivo si el índice de combinación está entre 0,5 y 2, y antagonista si el índice de combinación es >2.

Como se muestra en la Tabla 31, la combinación del compuesto del Ejemplo 35 y abemaciclib tiene una eficacia aditiva o sinérgica en la inhibición de las células tumorales con la mutación de KRas G12C. Entre las once líneas celulares probadas, se observan efectos aditivos en cinco líneas celulares, con un índice de combinación (CI) entre 0,5 y 1,2, y se observa un efecto sinérgico en seis líneas celulares, con CI <0,5, lo que sugiere que la combinación del compuesto del Ejemplo 35 y abemaciclib

puede proporcionar beneficios a los pacientes con cáncer con una mutación KRas G12C.

Tabla 31: Combinación *in vitro* del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de CDK4/CDK6 Abemaciclib

Nombre de la línea celular	Compuesto	Compuesto IC50 (μM)	Ejemplo 35 IC50 (μM)	Combo IC50 (μM)	Índice de combinación o potenciación
SW1463	Abemaciclib	0,16253	0,001089422	0,001861309	0,859990152
SW837	Abemaciclib	3,2175	0,413147553	0,276563347	0,377680849
H358	Abemaciclib	0,47697	0,003199233	0,006847357	1,077334012
HCC44	Abemaciclib	3,64845	1,764025208	2,86634865	1,205263179
NCI-H1373	Abemaciclib	4,27817	0,403993227	0,11698021	0,158451664
NCI-H1792	Abemaciclib	0,40097	0,118134759	0,041106255	0,225239313
NCI-H2030	Abemaciclib	1,81728	0,819557983	0,357361105	0,316343687
NCI-H2122	Abemaciclib	0,32737	0,031200861	0,02784263	0,488708133
SW1573	Abemaciclib	0,35607	10,7632	0,614058717	0,890789114
KYSE-410	Abemaciclib	1,94423	4,89618484	0,773507455	0,277914318
MIAPACA2	Abemaciclib	0,28033	0,00748134	0,01060427	0,727628496

Como se muestra en la Tabla 32, la combinación del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de molécula pequeña de EGFR erlotinib o afatinib tiene un efecto aditivo o sinérgico en la inhibición de células tumorales que albergan una mutación KRasG12C. Para la combinación de erlotinib, entre once líneas celulares probadas, se observa un efecto aditivo en cinco líneas celulares, con un índice de combinación o potenciación entre 0,5 y 1,15, y se observa un efecto sinérgico en seis líneas celulares, con índice de combinación o potenciación <0,5. Para la combinación de afatinib, entre nueve líneas celulares probadas, se observa un efecto de adición en cuatro líneas celulares, con un CI entre 0,5 y 1,1, y un efecto sinérgico en cinco líneas celulares, con un CI <0,5. Estos datos sugieren que la combinación del Ejemplo 35 y un inhibidor de molécula pequeña de EGFR puede proporcionar beneficios a los pacientes con cáncer con una mutación KRas G12C.

Tabla 32: Combinación *in vitro* del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de moléculas pequeñas de EGFR Erlotinib o Afatinib

Nombre de la línea celular	Compuesto	Compuesto IC50 (μM)	Ejemplo 35 IC50 (μM)	Combo IC50 (μM)	Índice de combinación o potenciación
SW1463	Erlotinib	0,40193	0,001089	0,002231	1,026498376
SW837	Erlotinib	>10	0,413148	0,140876	0,170491111
H358	Erlotinib	2,19247	0,003199	0,007357	1,151488525
HCC44	Erlotinib	>10	1,764025	1,567802	0,444381951
NCI-H1373	Erlotinib	>10	0,403993	0,411429	0,509203323
NCI-H1792	Erlotinib	>10	0,118135	0,090106	0,381370715
NCI-H2030	Erlotinib	>10	0,819558	0,424816	0,259174125
NCI-H2122	Erlotinib	12,1511	0,031201	0,030705	0,493309984
SW1573	Erlotinib	>10	10,7632	11,32891	0,526279729
KYSE-410	Erlotinib	>10	4,896185	1,153993	0,11784619
MIAPACA2	Erlotinib	>10	0,007481	0,015373	1,027399401
Nombre de la línea celular	Compuesto	Compuesto IC50 (μM)	Ejemplo 35 IC50 (μM)	Combo IC50 (μM)	Índice de combinación o potenciación
SW1463	Afatinib	0,05612	0,003248	0,003838	0,625028705
SW837	Afatinib	1,28333	0,321329	0,06905	0,134347371
H358	Afatinib	0,30551	0,002231	0,004945	1,11655131
NCI-H1373	Afatinib	2,21668	0,255708	0,090101	0,196502052
NCI-H1792	Afatinib	3,39177	0,903764	0,2928	0,205152445
NCI-H2122	Afatinib	1,45096	0,03372	0,019501	0,295874375
SW1573	Afatinib	1,58254	12,736	2,456936	0,872720042
KYSE-410	Afatinib	0,65031	4,058337	0,041564	0,03707842
MIAPACA2	Afatinib	1,94391	0,005951	0,011389	0,959906159

Como se muestra en la Tabla 33, la combinación del compuesto del Ejemplo 35 y el anticuerpo EGFR cetuximab tiene una eficacia aditiva o sinérgica en la inhibición de células tumorales con la mutación KRas G12C. Entre las once líneas celulares probadas, cinco líneas celulares tienen efectos aditivos con un índice de potenciación (CI) entre 0,5 y 1,06, y seis líneas celulares tienen efectos sinérgicos con un índice de potenciación <0,5, lo que sugiere que la combinación del Ejemplo 35 y Cetuximab puede proporcionar beneficios a los pacientes con cáncer con mutación KRasG12C.

Tabla 33: Combinación *in vitro* del Ejemplo 35 y el anticuerpo EGFR Cetuximab

Nombre de la línea celular	Compuesto	Compuesto IC50 (μM)	Ejemplo 35 IC50 (μM)	Combo IC50 (μM)	Índice de potenciación
SW1463	Cetuximab	>20	0,001089422	<0,00152	<0,4663
SW837	Cetuximab	>20	0,413147553	0,059912256	0,048338062
H358	Cetuximab	>20	0,003199233	0,004884468	0,508920734
HCC44	Cetuximab	>20	1,764025208	5,643865533	1,066474845
NCI-H1373	Cetuximab	>20	0,403993227	0,433760358	0,357894084
NCI-H1792	Cetuximab	>20	0,118134759	0,054252171	0,153079899
NCI-H2030	Cetuximab	>20	0,819557983	2,161595154	0,879171131
NCI-H2122	Cetuximab	>20	0,031200861	0,021630045	0,23108385
SW1573	Cetuximab	>20	10,7632	23,86318501	0,739036253
KYSE-410	Cetuximab	>20	4,89618484	1,117690734	0,076092629
MIAPACA2	Cetuximab	>20	0,00748134	0,018187633	0,810355342

Como se muestra en la Tabla 34, la combinación del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de ERK LY3219446 tiene una eficacia aditiva o sinérgica en la inhibición de células tumorales con la mutación KRas G12C. Entre diez líneas celulares probadas, se observa un efecto aditivo en 5 líneas celulares, con un CI entre 0,5 y 1,2, y un efecto sinérgico se observa en 5 líneas celulares, con un índice de combinación o potenciación <0,5, lo que sugiere que la combinación del Ejemplo 35 y un inhibidor de ERK puede beneficiar a los pacientes con cáncer con la mutación KRas G12C.

Tabla 34: Combinación *in vitro* del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de ERK LY3214996

Nombre de la línea celular	Compuesto	Compuesto IC50 (uM)	Ejemplo 35 IC50 (uM)	Combo_ IC50 (uM)	Combinación o índice de potenciación
SW1463	LY3214996	0,42099	0,001089	0,001225	0,563579
SW837	LY3214996	3,4288	0,413148	0,149674	0,202965
H358	LY3214996	1,67124	0,001854	0,004485	1,210955
HCC44	LY3214996	3,26824	1,764025	1,988401	0,867799
NCI-H1373	LY3214996	9,2603	0,403993	0,304663	0,393514
NCI-H1792	LY3214996	3,51533	0,862901	1,310947	0,946077
NCI-H2122	LY3214996	1,60091	0,108719	0,068988	0,338821
SW1573	LY3214996	>10	10,7632	8,05786	0,374325
KYSE-410	LY3214996	4,59338	4,896185	2,178332	0,459569
MIAPACA2	LY3214996	0,8405	0,00628	0,014545	1,166658

Eficacia combinada *in vitro* del compuesto del Ejemplo 35 con quimioterapias

El compuesto del Ejemplo 35 también se combina con quimioterapia, que incluye pemetrexed, carboplatino o cisplatino, en tres líneas celulares de cáncer de pulmón, H1792, H358 y H2122, *in vitro*. Como se muestra en la Tabla 35, para la

combinación de pemetrexed, se observan efectos aditivos o sinérgicos en función del CI. Se observan efectos de combinación similares con la combinación de carboplatino y cisplatino.

Tabla 35: Combinación *in vitro* del compuesto del Ejemplo 35 y quimioterapias (índice de combinación).

Líneas celulares	NCI-H1792	NCI-H358	NCI-H2122
ABS IC50 Ejemplo 35 (uM)	0,8399	0,001	0,209
ABS IC50 pemetrexed (uM)	20	20	0,003739
ABS IC50 Combo (uM)	1,305	0,001	0,000084
Índice de combinación	0,809	0,5	0,011
ABS IC50 carboplatino (uM)	20	20	20
ABS IC50 Combo (uM)	2,6	0,001	0,0363
Índice de combinación	1,616	0,5	0,087
ABS IC50 cisplatino (uM)	0,312	0,773	1,163
ABS IC50 Combo (uM)	0,134	0,001	0,15
Índice de combinación	0,296	0,5	0,422

Eficacia combinada *in vivo* del Ejemplo 35 con otras tratamientos dirigidos

El compuesto del Ejemplo 35 se evalúa en combinación con el inhibidor de CDK4/CDK6 abemaciclib, los inhibidores de molécula pequeña de EGFR erlotinib o afatinib, el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab, o el inhibidor de ERK LY3214996, en un modelo animal PDX. Se utilizan un total de seis modelos de xenoinjerto o PDX *in vivo*: cuatro modelos de pulmón (H358, H1373, LU99 y EL3187 PDX), un modelo colorrectal (SW1463) y un modelo de páncreas (MiaPaca-2). La Tabla 36 es un resumen de todos estos resultados de estudios de combinación *in vivo*.

La combinación del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de CDK4/6 abemaciclib se estudia en los seis modelos. En los seis modelos, la combinación es mejor que para el compuesto del Ejemplo 35 o para abemaciclib solo. En cuatro modelos de cáncer de pulmón y en un modelo de cáncer de páncreas, se observa una sinergia y una regresión significativa del crecimiento tumoral para la combinación. En el modelo colorrectal SW1463, se observa una mejor actividad antitumoral que para el compuesto del Ejemplo 35 o para abemaciclib solo.

La combinación del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de molécula pequeña de EGFR erlotinib se lleva a cabo en los seis modelos. En los seis modelos, la combinación es mejor que para el compuesto del Ejemplo 35 o para erlotinib solo. En tres modelos de cáncer de pulmón y un modelo de cáncer de páncreas, se observan sinergia y regresión significativa del crecimiento tumoral para la

combinación. En el modelo SW1463 de cáncer colorrectal y el modelo LU99 de cáncer de pulmón, la combinación es mejor que para el compuesto del Ejemplo 35 o el erlotinib solo. En el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón H358, se observa un efecto aditivo y una mejor actividad antitumoral con la combinación del compuesto del Ejemplo 3 y el inhibidor de molécula pequeña de EGFR afatinib, en relación con cualquiera de los compuestos solos.

Los estudios de combinación *in vivo* del Ejemplo 35 y el anticuerpo cetuximab de EGFR se llevan a cabo en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón H358 y el modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal SW1463. En ambos modelos, se observa regresión del crecimiento tumoral y una mejor eficacia de combinación para la combinación. La combinación es mejor que el compuesto del Ejemplo 35 o cetuximab solo.

La combinación del compuesto del Ejemplo 35 y el inhibidor de ERK (ERKi) LY3214996 se estudia en los seis modelos. En los seis modelos, se observa sinergia o efecto aditivo para la combinación, y la combinación es mejor que el compuesto del Ejemplo 35 o el inhibidor de ERK solo. En tres modelos de cáncer de pulmón (H358, H1373 y EL3187), un modelo de cáncer de páncreas y un modelo colorrectal, se observa una regresión significativa del crecimiento tumoral.

Tabla 36. Actividades antitumorales *in vivo* del compuesto del Ejemplo 35 en combinación con otros tratamientos dirigidos en modelos de xenoinjerto tumoral o PDX

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Dosis	Inhibición del crecimiento tumoral (%) y regresión (-%) en modelos de xenoinjerto o PDX							
			H358 (Pulmón)	H1373 (Pulmón)	EL3187 (Pulmón PDX)	Mia Paca-2 (Páncr)	SW1463 (CRC)	LU99 (Pulmón)		
Ejemplo 35	3	QDx28	-	-	-	85,2	-	-	-	-
	10	QDx28	74,9	46,6	98,5	-	-27	44	68,7	-
	30	QDx28	-	-	-	-	-	-	-	76,2
ERKi	100	QDx28	71,1	-	85,2	85,4	46,5	-	92,7	28,6
abemaciclib	50	QDx28	77	-	77,6	41,3	45,1	53	-	(-21,5)*
erlotinib	25	QDx28	76,9	-	50,6	29,5	(-77,7)*	40,9	-	(-23,1)*
cetuximab	20	QDx28	-	87	-	-	-	97,9	94,7	-
afatinib	25	QDx28	-	77,4	-	-	-	-	-	-
Ejemplo 35 + ERKi	10+100	-	-22,1	-	-70,2	-83,3	-65,4	-	-24,8	-3,7
Ejemplo 35 + abemaciclib	10+50	-	-61,8	-	-54,4	-96	-59,8	81	-	-37,4
Ejemplo 35 + erlotinib	10+25	-	-64	-	-48,9	-89,9	-62,2	88	-	98,9
Ejemplo 35 + cetuximab	30+20	-	-	-34,6	-	-	-	-20,2	-42,8	-
Ejemplo 35 + afatinib	10+25	-	-	91,3	-	-	-	-	-	-

*Indica que el volumen tumoral promedio fue mayor que el del grupo de control de vehículo

Eficacia combinada con inmunoterapias, anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1

Se utiliza un modelo singénico de ratón para evaluar los efectos de la combinación de inhibición de KRas G12C e inmunoterapia. En este modelo, la mutación de KRas G12D se convierte en mutación de KRas G12C mediante CRISPR knock-in en la línea celular CT-26, una línea celular de tumor colorrectal de ratón. La

inserción de KRas G12C se confirma por caracterización genética y funcional. La línea celular modificada por ingeniería genética se denomina CT-26-H4/KRas G12C. Estas células se implantan en los ratones Balb/c, y el tratamiento con compuesto se inicia 6 días después de la implantación de las células tumorales. En este estudio, el compuesto del Ejemplo 35 se combina con un anticuerpo anti-PD-L1 (RMP1 (BioXcell Cat. No. BE0146)) o un anticuerpo anti-PD-1 (Holmgaard RB, *et al.*, *J. Immunotherapy Cancer* 2018; 6(47): 1-15), con el cronograma de dosis que se indica en la Tabla 37. Como se muestra en la Tabla 37, el compuesto del Ejemplo 35 demuestra una actividad de agente único significativa, con un promedio de inhibición del crecimiento tumoral del 89,4 % y sin respuesta completa a 30 mg/kg al final de la dosis de 3 semanas. Un anticuerpo anti-PD-L1 de ratón 178G7 muestra un 36,1 % de inhibición del crecimiento tumoral, sin respuesta completa, y el anticuerpo anti-PD-1 RMP1 muestra un 70,7 % de inhibición del crecimiento tumoral y un 10 % (1 de 10) de respuesta completa al final de la dosis (día 21) o día 59. Sin embargo, la combinación del compuesto del Ejemplo 35 con el anticuerpo anti-PD-L1 o anti-PD-1 logra una actividad antitumoral significativamente mejor. Al final de la dosis de 3 semanas, la combinación del compuesto del Ejemplo 35 con el anticuerpo anti-PD-L1 o anti-PD-1 muestra -33,9 % y -19,4 % de regresión tumoral, y 30 % y 40 % de respuesta completa, respectivamente. Después de 3 semanas, se suspende el tratamiento con compuesto y todos los tumores en grupos de monoterapia, con la excepción de 1 animal en el grupo anti-PD-1, comenzaron a crecer de nuevo. Sin embargo, muchos tumores en los dos grupos de combinación no muestran signos de recrecimiento. 38 días después de la última dosis (día 59), los grupos de combinación tienen una respuesta completa de 40 % y 60 %, lo que indica que se eliminan muchos tumores en los grupos de combinación. Estos resultados sugieren que el tratamiento con el compuesto del Ejemplo 35, en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 o anti-PD-1, puede ser beneficioso para los pacientes con cáncer con la mutación KRas G12C.

Tabla 37: Actividades antitumorales *in vivo* del Ejemplo 35 en combinación con inmunoterapia (anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1) en el modelo singénico CT-26-H4/KRas G12C

Tratamiento	Dosis	Frecuencia de dosis	TGI (T/C) (%)	% de regresión	Regresión completa (día 21)	Regresión completa (día 59)
Vehículo		PO, QDx21	-	-	0/10	0/10
Ejemplo 35	30 mg/kg	PO, QDx21	89,4 (11,6)	-	0/10	0/10
Anticuerpo PD-L1 (178G7)	500 µg/ratón	IP, Q7Dx3	36,1 (63,9)	-	0/10	0/10
Anticuerpo PD-1 (RMP1-14)	250 µg/ratón	IP, BIWx3	-70,7 (29,3)	-	1/10	1/10
Ejemplo 35 + Anticuerpo PD-L1 (178G7)	30 mg/kg	PO, QDx21	-	-33,9	3/10	4/10
	500 µg/ratón	IP, Q7Dx3				
Ejemplo 35 + Anticuerpo PD-1 (RMP1-14)	30 mg/kg	PO, QDx21	-	-19,4	4/10	6/10
	250 µg/ratón	IP, BIWx3				