

COMPUESTOS MACROCÍCLICOS COMO INHIBIDORES DE MUTANTES DE KRAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

La presente invención se refiere a compuestos orgánicos útiles para el tratamiento y/o
5 profilaxis en un mamífero y, en particular, a la inhibición de mutante de KRAS útil para
tratar tipos de cáncer.

CAMPO DE LA INVENCION

RAS es uno de los proto-oncogenes más conocidos. Aproximadamente 30 % de los
10 tipos de cáncer humano contienen mutaciones en tres de los miembros más notables,
KRAS, HRAS y NRAS, lo que los convierte en las causas oncogénicas más
predominantes. Las mutaciones de KRAS en general se asocian a un mal pronóstico,
especialmente en cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, tipos de cáncer de pulmón.
Como la isoforma RAS mutada con mayor frecuencia, KRAS se ha estudiado
15 intensamente en los últimos años. Entre los alelos de KRAS que ocurren más
comúnmente (que incluyen G12D, G12V, G12C, G13D, G12R, G12A, G12S, Q61H,
etc.), G12C, G12D y G12V representan más de la mitad de todos los tipos de cáncer
causados por K-RAS en cáncer colorrectal (CRC), adenocarcinoma ductal pancreático
(PDAC), adenocarcinoma de pulmón (LUAD). Cabe destacar que las amplificaciones
20 de tipo silvestre de KRAS también se encuentran en 7 % de todos los tipos de cáncer
alterados por KRAS (de ovario, esofagogástrico, uterino), por lo que se clasifican entre
las mayores alteraciones.

Todas las proteínas RAS pertenecen a una familia de proteínas de pequeñas
GTPasas que hidrolizan GTP a GDP. KRAS está estructuralmente dividido en un
25 lóbulo de unión al efector seguido del lóbulo alostérico y una región del extremo
carboxi que es responsable del anclaje de membrana. El lóbulo efector comprende las
regiones de bucle P, *switch* I y *switch* II. Los bucles *switch* I/II cumplen una función
fundamental en la señalización corriente abajo de KRAS a través de la mediación de
interacciones proteína–proteína con proteínas efectoras que incluyen RAF en la vía de
30 proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) o PI3K en la vía fosfatidilinositol
3-quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (AKT).

La proteína KRAS cambia entre una forma inactiva a una activa mediante la unión a
GTP y GDP, respectivamente. En condiciones fisiológicas, la transición entre estos
dos estados está regulada por factores de intercambio de nucleótido de guanina
35 (GEF), tales como Homólogo 1 de Son Of Sevenless (SOS1) o proteínas que activan

GTPasa (GAP) que implican catalizar el intercambio de GDP por GTP, lo que potencia la actividad de GTPasa intrínseca o acelera la hidrólisis de GTP mediada por RAS. En respuesta a estímulos extracelulares, la RAS-GDP inactiva se convierte en RAS-GTP activa que se une directamente a dominios de unión RAF RAS (RAF^{RBD}), reclutando la familia quinasa RAF de citoplasma a membranas, en donde se dimerizan y se vuelven activas. La RAF activada posteriormente lleva a cabo una cadena de reacciones de fosforilación en su proteína quinasa corriente abajo activada por mitógenos (MEK) y quinasa regulada por señal extracelular (ERK), y propaga la señal de crecimiento. De la familia RAF de proteínas quinasas (tres isoformas conocidas ARAF, BRAF, CRAF/RAF1), BRAF se muta con mayor frecuencia y sigue siendo el activador más potente de MEK. A pesar de que los miembros individuales de la familia RAS y RAF revelaron distintas preferencias de unión, todas las RAF poseen el RBD conservado para la transmisión directa de señalización de MAPK, frecuentemente usada para caracterizar la inhibición de KRAS (por ejemplo, KRAS-BRAF^{RBD} en la presente). Para KRAS, las mutaciones en las posiciones 12, 13, 61 y 146 producen un desplazamiento hacia la forma KRAS activa al afectar la hidrólisis de nucleótidos o activar el intercambio de nucleótidos, lo que produce la hiperactivación de la vía de MAPK que da como resultado tumorigénesis.

A pesar de su reconocida importancia en neoplasias cancerosas, los constantes esfuerzos en el pasado no lograron desarrollar tratamientos aprobados para cáncer de mutante de KRAS hasta hace poco, el primer fármaco selectivo AMG510 tiene aprobación rápida como tratamiento de segunda línea en cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) causado por KRAS G12C. Sin embargo, la resistencia clínica adquirida a inhibidores de KRAS G12C surge de manera rigurosa con los progresos de la enfermedad después de alrededor de 6 meses de tratamiento. Todas las mutaciones convergen para reactivar la señalización de RAS–MAPK, con mutantes RAS secundarios en puntos calientes oncogénicos (por ejemplo, G12/G13/Q61) y dentro de la cavidad *switch* II (por ejemplo, H95, R68 y Y96) según se observó; además, más de 85 % de todos los tipos de cáncer causados por tipo silvestre amplificado o mutación de KRAS todavía carecen de agentes novedosos. En conjunto, tanto el sinfín de mecanismos de escape como diversos alelos oncogénicos, resaltan la necesidad médica urgente de tratamientos adicionales contra KRAS. Como tales, se inventaron compuestos orales que inhiben y actúan sobre alelos de KRAS para el tratamiento de tipos de cáncer causados por mutantes de KRAS.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos novedosos:

1. Un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxo-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
2. Un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-4-fluoro-*N*-[(1*S*)-1-[[[(7*S*,13*S*)-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
3. Un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
4. Un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Los compuestos anteriores muestran una buena inhibición de KRAS para G12C. En una forma de realización, en comparación con el compuesto de referencia, los compuestos de la presente invención tenían propiedades farmacocinéticas mucho mejores y sorprendentemente mejor rendimiento en la actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto tumoral mutado de KRAS difícil. En otra forma de realización, los compuestos de esta invención mostraron inhibición superior de células cancerosas y estabilidad de hepatocitos humanos. Además, los compuestos de la presente invención también muestran perfiles de solubilidad y citotoxicidad buenos o mejorados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

Figura 1. Análisis cristalográfico de rayos X del compuesto **G5**.

Figura 2. Estudios de injerto H2122 *in vivo* del ejemplo 1 y RMC-6291.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” indica sales que no son biológicamente o de otro modo indeseables. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen tanto sales de adición ácidas como básicas.

La expresión “sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable” indica aquellas sales farmacéuticamente aceptables formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido fosfórico y ácidos orgánicos seleccionados de clases alifáticas, cicloalifáticas, aromáticas, aralifáticas, heterocíclicas, carboxílicas y sulfónicas de ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido maleico, ácido maloneico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido glutámico, ácido antranílico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido embónico, ácido fenilacético, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido *p*-toluensulfónico y ácido salicílico.

La expresión “sal de adición básica farmacéuticamente aceptable” indica aquellas sales farmacéuticamente aceptables formadas con una base orgánica o inorgánica. Los ejemplos de bases inorgánicas aceptables incluyen sales de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso y aluminio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como resinas de isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperizina, piperidina, *N*-etilpiperidina y poliamina.

La expresión “un metabolito farmacéuticamente activo” indica un producto farmacológicamente activo que se produce a través del metabolismo en el cuerpo de un compuesto especificado o una sal de este. Después de ingresar en el cuerpo, la mayoría de los fármacos son sustratos para reacciones químicas que pueden cambiar sus propiedades físicas y efectos biológicos. Estas conversiones metabólicas, que en general afectan la polaridad de los compuestos de la invención, alteran el modo en que los fármacos se distribuyen en el cuerpo y se excretan de este. Sin embargo, en

algunos casos, el metabolismo de un fármaco es necesario para el efecto terapéutico.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” indica una cantidad de un compuesto o molécula de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, (i) trata o previene la enfermedad, afección o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular, o (iii) previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular descrito en la presente. La cantidad terapéuticamente eficaz variará según el compuesto, el estado de la enfermedad que se está tratando, la gravedad de la enfermedad que se trata, la edad y salud relativa del sujeto, la vía y la forma de administración, el criterio del profesional médico o veterinario, y otros factores.

La expresión “composición farmacéutica” indica una mezcla o solución que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente farmacéutico activo junto con excipientes farmacéuticamente aceptables que se desean administrar a un mamífero, por ejemplo, un ser humano que los necesita.

Las expresiones “excipiente farmacéuticamente aceptable”, “portador farmacéuticamente aceptable” y “excipiente terapéuticamente inerte” se pueden utilizar de manera indistinta e indican cualquier ingrediente farmacéuticamente aceptable en una composición farmacéutica que no tiene actividad terapéutica y que no es tóxico para el sujeto al que se le administra, tal como desintegrantes, aglutinantes, agentes de relleno, solventes, amortiguadores, agentes de tonicidad, estabilizantes, antioxidantes, tensioactivos, portadores, diluyentes o lubricantes usados en la formulación de productos farmacéuticos.

INHIBIDOR DE KRAS

La presente invención se refiere a (i) un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Otra forma de realización de la presente invención es (ii) un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-4-fluoro-*N*-[(1*S*)-1-[[7*S*,13*S*)-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal

farmacéuticamente aceptable de este.

Otra forma de realización de la presente invención es (iii) un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Otra forma de realización de la presente invención es (iv) un compuesto que es 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Otra forma de realización de la presente invención es (v) un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para su uso como sustancia terapéuticamente activa.

Otra forma de realización de la presente invención es (vi) una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otra forma de realización de la presente invención es (vii) el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para tratar una enfermedad relacionada con la proteína KRAS G12C.

Otra forma de realización de la presente invención es (viii) el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para inhibir la interacción de RAS con efectores corriente abajo, en donde los efectores corriente abajo son RAF y PI3K.

Otra forma de realización de la presente invención es (ix) el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para inhibir la señalización de MAPK y PI3K oncogénicas en propagación.

Otra forma de realización de la presente invención es (x) el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para el tratamiento o profilaxis de tipos de cáncer causados por mutación de KRAS, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, melanoma, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

Otra forma de realización de la presente invención es (xi) el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para el tratamiento o profilaxis de tipos de cáncer

causados por mutación de KRAS, en donde el cáncer se selecciona de adenocarcinoma pancreático, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón no microcítico.

Otra forma de realización de la presente invención es (xii) un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para el
5 tratamiento o profilaxis de tipos de cáncer causados por mutación de KRAS, en donde el cáncer se selecciona de adenocarcinoma pancreático, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón no microcítico.

Otra forma de realización de la presente invención es (xiii) el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de (i) a (iv) para la preparación de un medicamento para el
10 tratamiento o profilaxis de tipos de cáncer causados por mutación de KRAS, en donde el cáncer se selecciona de adenocarcinoma pancreático, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón no microcítico.

Otra forma de realización de la presente invención es (xiv) un método para el tratamiento o profilaxis de tipos de cáncer causados por mutación de KRAS, en donde
15 el cáncer se selecciona de adenocarcinoma pancreático, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón no microcítico, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se define en cualquiera de (i) a (iv).

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y SU ADMINISTRACIÓN

Otra forma de realización proporciona composiciones farmacéuticas o medicamentos
20 que contienen los compuestos de la invención y un portador, diluyente o excipiente terapéuticamente inerte, así como también métodos para usar los compuestos de la invención para preparar tales composiciones y medicamentos. En un ejemplo, los compuestos de fórmula (I) se pueden formular al mezclar a temperatura ambiente, al pH adecuado y con el grado de pureza deseado, con portadores fisiológicamente
25 aceptables, es decir, portadores que no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas en una forma de administración galénica. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y de la concentración del compuesto, pero preferentemente varía de alrededor de 3 a alrededor de 8. En un ejemplo, un compuesto de fórmula (I) se formula en un amortiguador de acetato, a un
30 pH de 5. En otra forma de realización, los compuestos de fórmula (I) son estériles. El compuesto se puede almacenar, por ejemplo, como una composición amorfa o sólida, como una formulación liofilizada o como una solución acuosa.

Las composiciones se formulan, dosifican y administran de acuerdo con las buenas prácticas médicas. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno
35 particular en tratamiento, el mamífero particular en tratamiento, la afección clínica del

paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores conocidos por los profesionales de la salud. La “cantidad eficaz” del compuesto que se debe administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para inhibir la interacción de RAS mutante (por ejemplo, KRAS G12C) con RAF, por lo que bloquea la señalización de MAPK oncogénica. Por ejemplo, tal cantidad puede ser menor a la cantidad que es tóxica para células normales, o para el mamífero en su totalidad.

En un ejemplo, la cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de la invención administrado por vía parenteral por dosis variará de alrededor de 0,1 a 1000 mg/kg, de manera alternativa, de alrededor de 0,1 a 1000 mg/kg de peso corporal del paciente por día, en donde el rango inicial habitual del compuesto usado es de 0,3 a 15 mg/kg/día. En otra forma de realización, las formas de dosis unitarias orales, tales como comprimidos y cápsulas, contienen preferentemente de alrededor de 1 a alrededor de 1000 mg del compuesto de la invención.

Los compuestos de la invención se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración oral, tópica (que incluye bucal y sublingual), rectal, vaginal, transdérmica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intradérmica, intratecal y epidural e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar con cualquier forma de administración conveniente, por ejemplo, comprimidos, polvos, cápsulas, soluciones, dispersiones, suspensiones, jarabes, pulverizaciones, supositorios, geles, emulsiones, parches, etc. Tales composiciones pueden contener componentes convencionales en preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, diluyentes, portadores, modificadores de pH, endulzantes, agentes volumétricos y otros agentes activos.

Una formulación típica se prepara al mezclar un compuesto de la presente invención y un portador o excipiente. Los portadores y excipientes adecuados son ampliamente conocidos por las personas del oficio de nivel medio y se describen con detalle en, por ejemplo, Ansel, Howard C., *et al.*, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Filadelfia: Lippincott, Williams y Wilkins, 2004; Gennaro, Alfonso R., *et al.* Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Filadelfia: Lippincott, Williams y Wilkins, 2000; y Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005. Las formulaciones también pueden

incluir uno o más amortiguadores, agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulgentes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes de opacidad, deslizantes, auxiliares de procesamiento, colorantes, endulzantes, agentes perfumantes, agentes saborizantes, diluyentes y otros aditivos conocidos para proporcionar una presentación agradable del fármaco (es decir, un compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica de este) o ayudar en la elaboración del producto farmacéutico (es decir, el medicamento). Un ejemplo de una forma de dosis oral adecuada es un comprimido que contiene de alrededor de 1 a 1000 mg del compuesto de la invención junto con alrededor de 1 a 1000 mg de lactosa anhidra, de alrededor de 1 a 1000 mg de croscarmelosa de sodio, de alrededor de 1 a 1000 mg de polivinilpirrolidona (PVP) K30, y de alrededor de 1 a 1000 mg de estearato de magnesio. Primero, los ingredientes en polvo se mezclan juntos y luego se mezclan con una solución de la PVP. La composición resultante se puede secar, granular, mezclar con el estearato de magnesio y comprimir hasta formar un comprimido usando el equipo convencional. Un ejemplo de una formulación en aerosol se puede preparar al disolver el compuesto, por ejemplo, de 5 a 400 mg de la invención en una solución amortiguadora adecuada, por ejemplo, un amortiguador de fosfato, agregar un tonificador, por ejemplo, una sal tal como cloruro de sodio, si se desea. La solución se puede filtrar, por ejemplo, usando un filtro de 0,2 micrómetros, para retirar impurezas y contaminantes.

Por lo tanto, una forma de realización incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable de este. Otra forma de realización incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable de este, junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otra forma de realización incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de tipos de cáncer causados por KRAS mutante. Otra forma de realización incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de tipos de cáncer causados por KRAS mutante.

Las siguientes composiciones A y B ilustran composiciones típicas de la presente invención, pero sirven simplemente como representativas de estas.

Composición A

Un compuesto de la presente invención puede usarse de una manera conocida *per se*

como el ingrediente activo para la producción de comprimidos de la siguiente composición:

	<u>Por cada comprimido</u>
Ingrediente activo	200 mg
5 Celulosa microcristalina	155 mg
Almidón de maíz	25 mg
Talco	25 mg
Hidroxipropilmetilcelulosa	<u>20 mg</u>
	425 mg

10 **Composición B**

Un compuesto de la presente invención puede usarse de una manera conocida *per se* como el ingrediente activo para la producción de cápsulas de la siguiente composición:

	<u>Por cada cápsula</u>
Ingrediente activo	100,0 mg
15 Almidón de maíz	20,0 mg
Lactosa	95,0 mg
Talco	4,5 mg
Estearato de magnesio	<u>0,5 mg</u>
	220,0 mg

20 **INDICACIONES Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO**

Los compuestos de la invención inducen una cavidad de unión nueva en KRAS al impulsar la formación de un tri-complejo de alta afinidad entre proteína KRAS y la ampliamente expresada ciclofilina A (CYPA), que inhiben la interacción de KRAS con efectores corriente abajo, tales como RAF y PI3K. En consecuencia, los compuestos de la invención son útiles para inhibir la señalización de MAPK y PI3K oncogénicas en propagación, por lo que reducen la proliferación celular, en particular, células cancerosas. Los compuestos de la invención son útiles para la terminación de señalización de RAS en células que expresan mutante de RAS, por ejemplo, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, etc., causados por mutación de KRAS. De manera alternativa, los compuestos de la invención son útiles para la terminación de señalización de RAS en tumor sólido maligno donde la función oncogénica de la mutación de KRAS está reforzada por la desregulación o mutación de vías efectoras tales como MAPK, señalización causada por PI3K-AKT-mTOR (diana de mamífero de rapamicina), para tratamiento dirigido en adenocarcinoma de

páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, etc.

Otra forma de realización incluye un método para tratar o prevenir cáncer en un mamífero que necesita dicho tratamiento, en donde el método comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I), un estereoisómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable de este.

EJEMPLOS

La invención se comprenderá más en detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

ABREVIATURAS

La invención se comprenderá más en detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

Las abreviaturas usadas en la presente son las siguientes:

ACN	acetonitrilo
Ac	acuoso
(Boc) ₂ ^o	di- <i>ter</i> -butildicarbonato
(<i>R</i>)-binap	(<i>R</i>)-(+)-2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
CDCl ₃ :	cloroformo deuterado
CMPI	2-cloro-1-metilpiridinio yoduro
Cs ₂ CO ₃	carbonato de cesio
DMF:	dimetil formamida
DMSO:	sulfóxido de dimetilo
EDCI:	clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EtOAc o EA:	acetato de etilo
HATU:	(hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-
triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinio 3-óxido)	
h:	horas
HPLC:	cromatografía de líquidos de alta resolución
HOBt:	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
[Ir(OMe)(COD)] ₂	dímero de (1,5-ciclooctadien)(metoxi)iridio(I)
MS: (ESI):	espectroscopia de masas (ionización por pulverización de electrones)
min	minutos
NMM:	<i>N</i> -metilmorfolina
RMN:	resonancia magnética nuclear
NPLC:	cromatografía de líquidos de fase normal
Pd(dppf)Cl ₂ :	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II)

Pd(dtbpf)Cl₂: [1,1'-bis(di-ter-butylfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II)
 Pd(OH)₂: hidróxido de paladio
 Pd-PESSI-IPent Cl: [1,3-bis[2,6-bis(1-etilpropil)fenil]-4,5-dicloro-imidazol-2-il]-dicloro-(3-cloro-1-piridil)paladio
 5 HPLC preparativa: cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa
 RT o rt: temperatura ambiente
 sat.: saturado
 SFC: cromatografía de fluido supercrítico
 TBAF: fluoruro de tetrabutilamonio
 10 TEA: trietilamina
 TFA: ácido trifluoroacético
 THF: tetrahidrofurano
 T₄P: 1,3,5,2,4,6-trioxatrisfosforinano, 2,4,6-tributil-, 2,4,6-trioxido

CONDICIONES EXPERIMENTALES GENERALES

- 15 Los intermediarios y compuestos finales se purificaron mediante cromatografía flash mediante el uso de uno de los siguientes instrumentos: i) sistema Biotage SP1 y el módulo Quad 12/25 Cartridge. ii) instrumento de cromatografía combi-flash ISCO. Marca del gel de sílice y tamaño de poro: i) KP-SIL 60 Å, tamaño de partícula: 40-60 µm; ii) N.º de registro de CAS: Gel de sílice: 63231-67-4, tamaño de partícula: gel de sílice de 47-60 micrómetros; iii) ZCX de Qingdao Haiyang Chemical Co., Ltd, poro: 200-300 o 300-400.

- Los intermediarios y compuestos finales se purificaron mediante HPLC preparativa en columna de fase inversa usando una columna XBridge™ Prep-C18 (5 µm, OBDTM 30 × 100 mm), columna SunFire™ Prep-C18 (5 µm, OBD™ 30 × 100 mm), Phenomenex Synergi-C18 (10 µm, 25 × 150 mm) o Phenomenex Gemini-C18 (10 µm, 25 × 150 mm).
 25 Sistema de purificación Waters AutoP (administrador de muestras 2767, bomba 2525, detector: Micromass ZQ y UV 2487, sistema de solventes: acetonitrilo e hidróxido de amonio al 0,1 % en agua; acetonitrilo y FA al 0,1 % en agua o acetonitrilo y TFA al 0,1 % en agua). O sistema de purificación Gilson-281 (bomba 322, detector: UV 156, sistema de solventes: acetonitrilo e hidróxido de amonio al 0,05 % en agua; acetonitrilo y FA al 0,225 % en agua; acetonitrilo y HCl al 0,05 % en agua; acetonitrilo y TFA al 0,075 % en agua; o acetonitrilo y agua).
 30

- Para la separación quiral por SFC, los intermediarios se separaron por columna quiral (Daicel chiralpak IC, 5 µm, 30 × 250 mm), AS (10 µm, 30 × 250 mm) o AD (10 µm, 30 × 250 mm) usando el sistema de SFC de Mettler Toledo Multigram III, SFC preparativa
 35

Waters 80Q o SFC preparativa Thar 80, sistema de solventes: CO₂ e IPA (TEA al 0,5 % en IPA) o CO₂ y MeOH (NH₃·H₂O al 0,1 % en MeOH), contrapresión de 100 bar, detección UV a 254 o 220 nm.

Los espectros LC/MS de los compuestos se obtuvieron con LC/MS (Waters™ Alliance 2795-Micromass ZQ, Shimadzu Alliance 2020-Micromass ZQ o Agilent Alliance 6110-Micromass ZQ), las condiciones de LC/MS fueron como se indica a continuación (tiempo de corrida 3 o 1,5 min):

Condición ácida I: A: TFA al 0,1 % en H₂O; B: TFA al 0,1 % en acetonitrilo;

Condición ácida II: A: TFA al 0,0375 % en H₂O; B: TFA al 0,01875 % en acetonitrilo;

10 Condición básica I: A: NH₃·H₂O al 0,1 % en H₂O; B: acetonitrilo;

Condición básica II: A: NH₃·H₂O al 0,025 % en H₂O; B: acetonitrilo;

Condición neutra: A: H₂O; B: acetonitrilo.

Espectros de masa (MS): en general solo se informan los iones que indican la masa de origen y, a menos que se indique lo contrario, el ion de masa citado es el ion de masa positivo (MH)⁺.

Los espectros de RMN se obtuvieron mediante Bruker Avance 400 Mhz o 500 Mhz.

Las reacciones asistidas por microondas se llevaron a cabo en un sintetizador de microondas Biotage Initiator Sixty. Todas las reacciones que involucran reactivos sensibles al aire se llevaron a cabo en una atmósfera de argón o nitrógeno. Los reactivos se utilizaron tal como se recibieron de los proveedores comerciales sin purificación adicional, a menos que se indicara lo contrario.

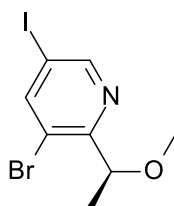
EJEMPLOS PREPARATIVOS

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar el significado de la presente invención, pero de ningún modo deben considerarse limitativos del significado de la presente invención:

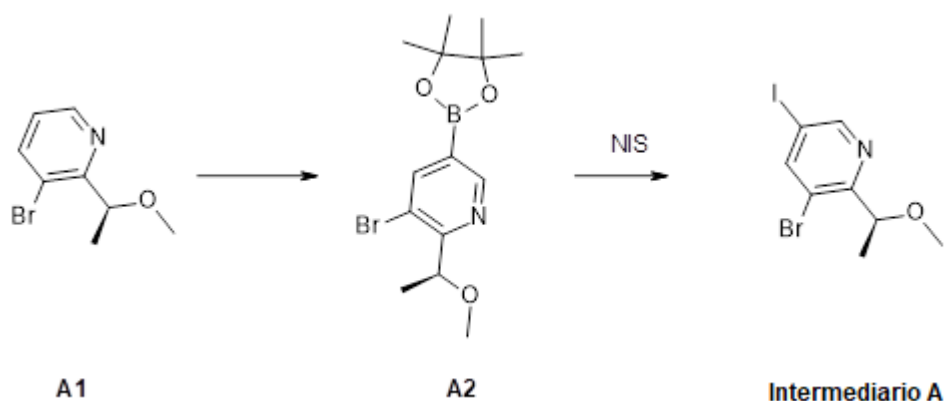
25 Preparación de intermediarios

Intermediario A

3-bromo-5-yodo-2-[(1S)-1-metoxietil]piridina



El intermediario **A** del título se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:



Etap 1: Preparación de 3-bromo-2-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (compuesto A2)

A una solución de 3-bromo-2-[(1S)-1-metoxietil]piridina (compuesto **A1**, 2,0 g, 9,26 mmol) y bis(pinacolato)diboro (3,5 g, 13,9 mmol) en THF (30 ml) se agregaron 4,4'-di-*ter*-butil-2,2'-bipiridina (372,7 mg, 1,39 mmol) y [Ir(OMe)(COD)]₂ (306,3 mg, 0,460 mmol). La mezcla se agitó a 75 °C durante 16 horas en protección de N₂. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EA/PE: 0-20 %) para obtener 3-bromo-2-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (compuesto **A2**, 2,4 g) como aceite amarillo.

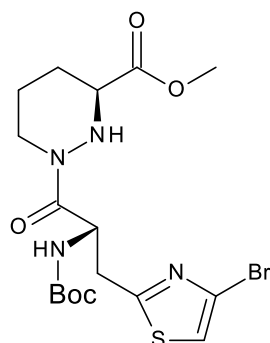
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,91 (d, *J* = 1,4 Hz, 1 H), 8,21 (d, *J* = 1,4 Hz, 1 H), 4,95 (q, *J* = 6,5 Hz, 1 H), 3,30 (s, 3 H), 1,49 (d, *J* = 6,5 Hz, 3 H), 1,35 (s, 12 H).

Etap 2: Preparación de 3-bromo-5-yodo-2-[(1S)-1-metoxietil]piridina (intermediario A)

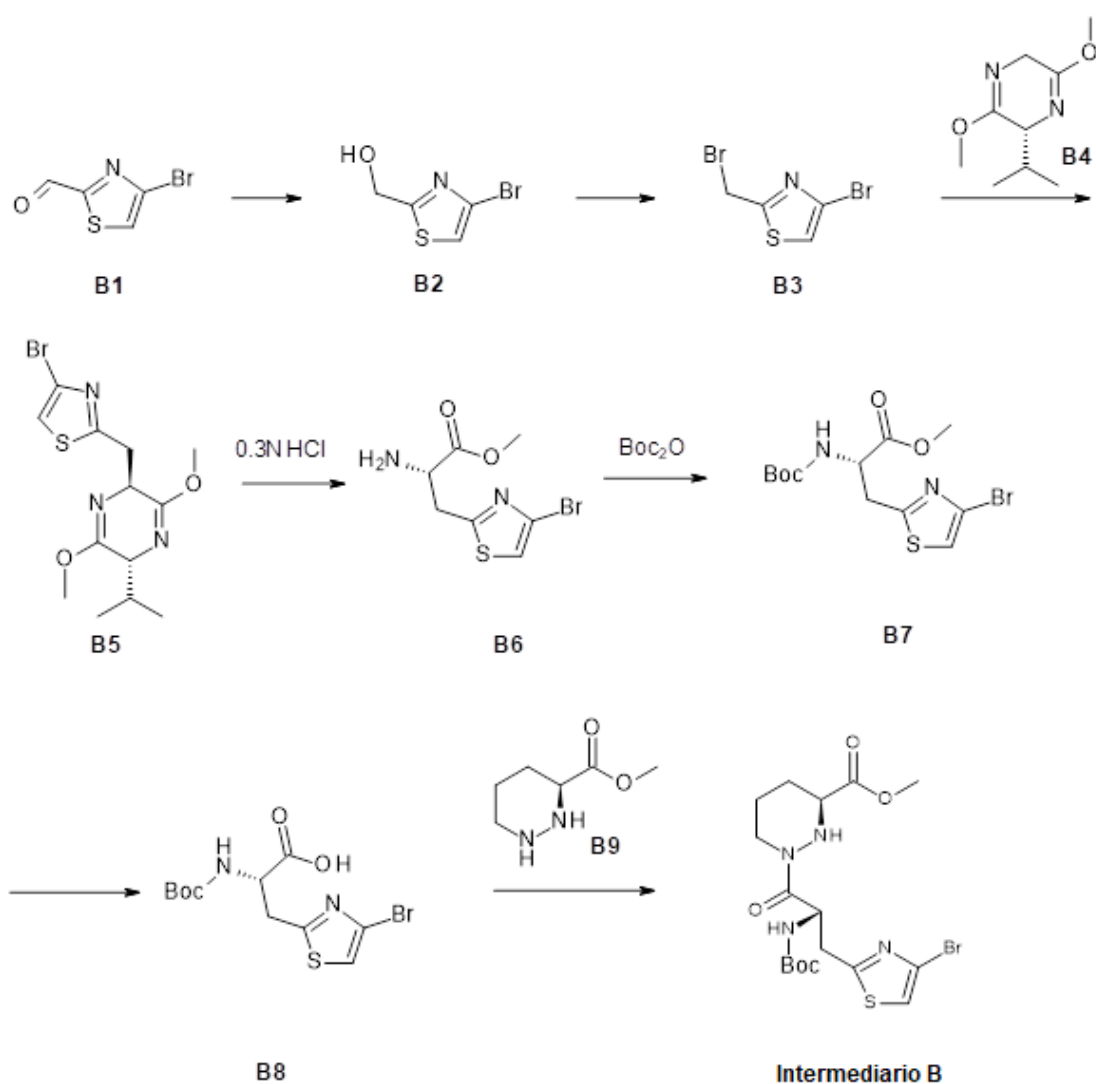
A una solución de 3-bromo-2-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (compuesto **A2**, 2,5 g, 7,3 mmol) en ACN (40 ml) se agregó N-yodosuccinimida (4,1 g, 18,27 mmol). La mezcla se agitó a 90 °C durante 40 h en protección de N₂. La reacción se inactivó con solución saturada de Na₂SO₃ (40 ml), y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (30 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 ml), se filtró, y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EA/PE: 0-20 %) para obtener 3-bromo-5-yodo-2-[(1S)-1-metoxietil]piridina (intermediario **A**, 660 mg) como aceite amarillo. MS calculada 342 (MH⁺), medida 341,8 (MH⁺).

Intermediario B

Metil (3S)-1-[(2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato



El intermediario **B** se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:



Etap 1: Preparación de (4-bromotiazol-2-il)metanol (compuesto B2)

- 5 A una solución de 4-bromotiazol-2-carboxaldehído (compuesto **B1**, 6,0 g, 31,25 mmol) en metanol (70 ml), se agregó borohidruro de sodio (1,7 g, 46,87 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 hora. La reacción se inactivó con agua (300 ml) a 0

°C y la mezcla de reacción se extrajo mediante acetato de etilo (200 ml, tres veces). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (150 ml, dos veces), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener (4-bromotiazol-2-il)metanol (compuesto **B2**, 6g) como un aceite incoloro.

5 **Etapla 2: Preparación de 4-bromo-2-(bromometil)tiazol (compuesto B3)**

A una solución de (4-bromotiazol-2-il)metanol (compuesto **B2**, 6,0 g, 30,92 mmol) en DCM (80 ml) se agregó CBr₄ (15,4 g, 46,38 mmol) y trifenilfosfina (12,1 g, 46,38 mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 25 °C durante 1 hora, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante columna de gel de sílice, que se eluyó con acetato de etilo en éter de petróleo (0~10 %) para obtener (4-bromotiazol-2-il)metanol (compuesto **B3**, 6,0 g) como aceite amarillo. MS calculada 255,9 (MH⁺), medida 255,9 (MH⁺).

Etapla 3: Preparación de 4-bromo-2-[[[(2S,5R)-5-isopropil-3,6-dimetoxi-2,5-dihidropirazin-2-il]metil]tiazol (compuesto B5)

15 A una mezcla de (*R*)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-2-isopropilpirazina (compuesto **B4**, 4,3 g, 23,45 mmol) en THF (60 ml) se agregó n-butilitio (10 ml, 25,22 mmol, 2,5 M) a -78 °C lentamente. Después de la adición, la mezcla se agitó durante 0,5 hora a -78 °C. Se agregó 4-bromo-2-(bromometil)tiazol (compuesto **B3**, 5,4 g, 21,02 mmol) a la mezcla anterior a -78 °C que se agitó durante otra hora. La reacción se inactivó con solución saturada de NH₄Cl (100 ml) y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (100 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (150 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa para obtener 4-bromo-2-[[[(2S,5R)-5-isopropil-3,6-dimetoxi-2,5-dihidropirazin-2-il]metil]tiazol (compuesto **B5**, 3,6 g) como aceite amarillo. MS calculada 360 (MH⁺), medida 359,9 (MH⁺).

Etapla 4: Preparación de metil (2S)-2-amino-3-(4-bromotiazol-2-il)propanoato (compuesto B6)

30 A una solución de 4-bromo-2-[[[(2S,5R)-5-isopropil-3,6-dimetoxi-2,5-dihidropirazin-2-il]metil]tiazol (compuesto **B5**, 3,6 g, 10 mmol) en ACN (20 ml) se agregó ácido clorhídrico (66,6 ml, 0,3 M). La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla se basificó mediante solución saturada de NaHCO₃ hasta pH=8. La mezcla se extrajo con EtOAc (80 ml, seis veces). La capa orgánica combinada se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener metil (2S)-2-amino-3-(4-bromotiazol-2-il)propanoato (compuesto **B6**, 3,1 g) como aceite amarillo. MS calculada 264,9 (MH⁺), medida 264,9 (MH⁺).

Etapas 5: Preparación de metil (2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoato (compuesto B7)

A una solución de metil (2S)-2-amino-3-(4-bromotiazol-2-il)propanoato (compuesto **B6**, 3,1 g, 11,69 mmol) en DCM (40 ml) se agregaron trietilamina (2,9 g, 29,23 mmol) y (Boc)₂O (3,8 g, 17,54 mmol). Después de agitarse a 30 °C durante 12 horas, la mezcla se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante columna de gel de sílice, que se eluyó con acetato de etilo en éter de petróleo (0~30 %) para obtener metil (2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoato (compuesto **B7**, 3,2 g) como aceite amarillo. MS calculada 387 (MNa⁺), medida 386,9 (MNa⁺).

Etapas 6: Preparación de ácido (2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-propanoico (compuesto B8)

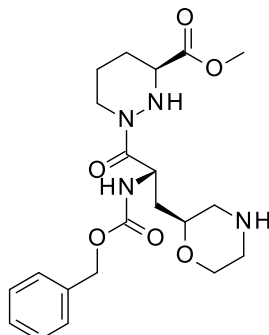
A una solución de metil (2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoato (compuesto **B7**, 3,2 g, 8,76 mmol) en THF (30 ml), metanol (2 ml) y agua (10 ml) se agregó hidróxido de litio (0,4 ml, 43,81 mmol). Después de agitarse a 25 °C durante 1 hora, la mezcla de reacción se acidificó mediante solución 1 M de HCl hasta pH=5. La mezcla se extrajo con EtOAc (40 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener ácido (2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoico (compuesto **B8**, 3,1 g) como aceite amarillo. MS calculada 373 (MNa⁺), medida 372,9 (MNa⁺).

Etapas 7: Preparación de metil (3S)-1-[(2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (intermediario B)

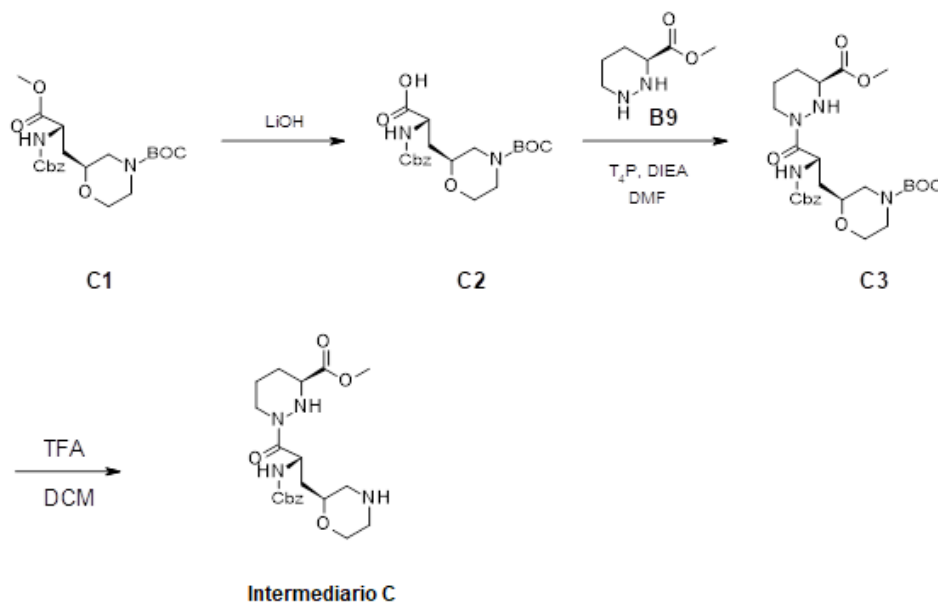
A una solución de ácido (2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoico (compuesto **B8**, 3,1 g, 8,83 mmol) en DCM (50 ml) se agregó metil (3S)-hexahidropiridazin-3-carboxilato; clorhidrato (compuesto **B9**, 2,4 g, 13,24 mmol), EDCI (3,4 g, 17,65 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (238,5 mg, 1,77 mmol) y NMM (9,92 ml, 88,26 mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 25 °C durante 1 hora, la mezcla de reacción se diluyó con agua (60 ml) y se extrajo con EtOAc (60 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante columna de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo en éter de petróleo (10~30 %) para obtener metil (3S)-1-[(2S)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (intermediario **B**, 2,4 g). MS calculada 477 (MH⁺), medida 476,9 (MH⁺).

Intermediario C

Metil (3S)-1-[(2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato



El compuesto se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:



5

Etapla 1: Preparación de ácido (2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-4-*ter*-butoxicarbonilmorfolin-2-il]propanoico (compuesto C2)

A una solución de *ter*-butil (2S)-2-[(2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-metoxi-3-oxo-propil]morfolin-4-carboxilato (CAS: 2641824-60-2, 20,0 g, 47,34 mmol) en THF (250 ml)/agua (50 ml) se agregó LiOH·H₂O (4,0 g, 94,68 mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 25 °C durante 1,5 h, la mezcla de reacción se acidificó mediante ácido cítrico acuoso hasta pH=6. La mezcla se extrajo con EtOAc (200 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (200 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener ácido (2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-4-*ter*-butoxicarbonilmorfolin-2-il]propanoico (compuesto **C2**, 20,0 g) como un sólido amarillo. MS calculada 409,2 (MH⁺), medida 409,2 (MH⁺).

Etapla 2: Preparación de *ter*-butil (2S)-2-[(2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(3S)-

**3-metoxycarbonilhexahidropiridazin-1-il]-3-oxo-propil]morfolin-4-carboxilato
(compuesto C3)**

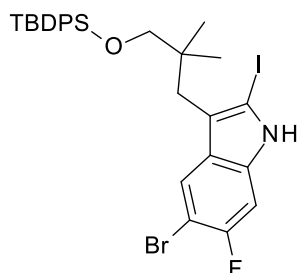
A una mezcla de ácido (2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-4-*ter*-
butoxicarbonilmorfolin-2-il]propanoico (compuesto **C2**, 20,0 g, 48,97 mmol) y metil
5 (3S)-hexahidropiridazin-3-carboxilato; diclorhidrato (compuesto **B9**, 21,3 g, 97,93
mmol,) en DMF (300 ml) se agregó DIEA (42,6 ml, 244,83 mmol) y T₄P (70,6 g, 97,93
mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 25 °C durante 0,5 h, la mezcla de reacción se
vertió en agua (300 ml) y se extrajo con EtOAc (150 ml, tres veces). La capa orgánica
combinada se lavó con salmuera (150 ml, tres veces), se secó en Na₂SO₄ anhidro, se
10 filtró y se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante
cromatografía en gel de sílice para obtener *ter*-butil (2S)-2-[(2S)-2-
(benciloxycarbonilamino)-3-[(3S)-3-metoxycarbonilhexahidropiridazin-1-il]-3-oxo-
propil]morfolin-4-carboxilato (compuesto **C3**, 22,7 g) como aceite amarillo. MS
calculada 535,3 (MH⁺), medida 535,3 (MH⁺).

15 **Etapas 3: Preparación de metil (3S)-1-[(2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-
morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (intermediario C)**

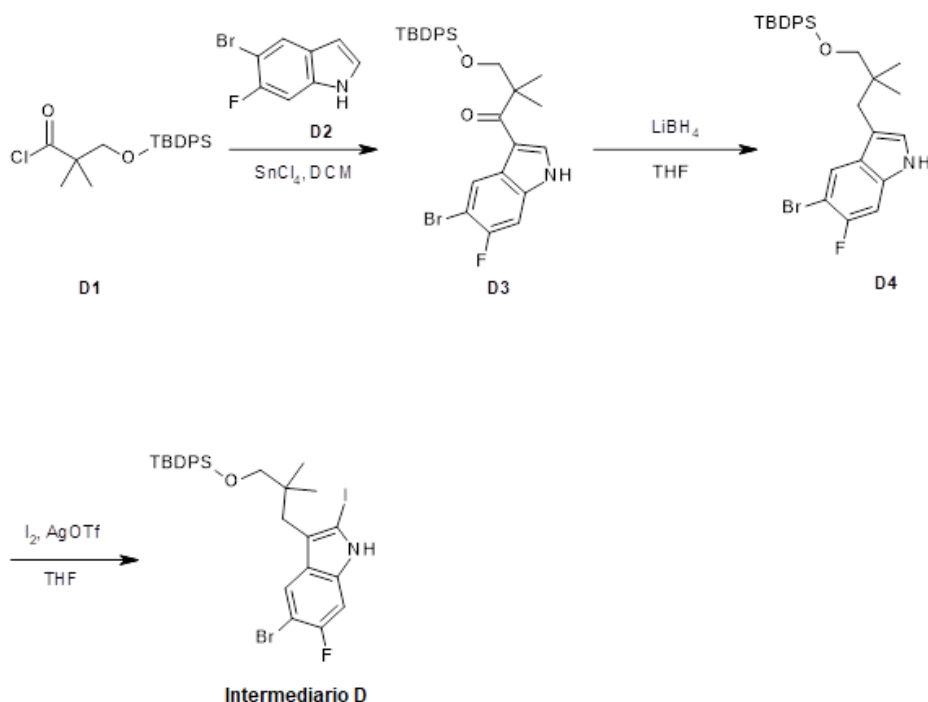
A una solución de *ter*-butil (2S)-2-[(2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(3S)-3-
metoxycarbonilhexahidropiridazin-1-il]-3-oxo-propil]morfolin-4-carboxilato (compuesto
C3, 5,0 g, 9,35 mmol) en DCM (20 ml) se agregó TFA (19,8 ml) a 0 °C. La mezcla se
20 agitó a 25 °C durante 1 hora. Después de que se completó la reacción, la mezcla de
reacción se concentró al vacío para obtener un residuo. Se agregó NaHCO₃ acuoso
saturado (20 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (30 ml, tres veces). La capa
orgánica combinada se lavó con salmuera (60 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro,
se filtró y se concentró al vacío para obtener metil (3S)-1-[(2S)-2-
25 (benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato
(intermediario **C**, 4,0 g) como un sólido marrón. MS calculada 435,2 (MH⁺), medida
435,2 (MH⁺).

Intermediario D

**[3-(5-bromo-6-fluoro-2-yodo-1*H*-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-
30 silano**



El compuesto se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:



Etapas 1: Preparación de 1-(5-bromo-6-fluoro-1H-indol-3-il)-3-((ter-butildifenilsilil)oxi)-2,2-dimetilpropan-1-ona (compuesto D3)

A una mezcla de 3-((ter-butildifenilsilil)oxi)-2,2-dimetilpropanoil cloruro (compuesto **D1**, 35,0 g, 116,8 mmol) en DCM (400 ml) a 0 °C se agregó una solución de SnCl₄ (97,2 ml, 121,5 mmol) lentamente. Después de que la mezcla se agitó a -40 °C durante 0,5 horas, 5-bromo-6-fluoro-1H-indol (compuesto **D2**, 25,0 g, 116,8 mmol) en DCM (200 ml) se agregó por goteo y la mezcla se agitó a -40 °C durante otros 15 min. Después de que se completó la reacción, se inactivó con NaHCO₃ acuoso saturado (800 ml), y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (900 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (700 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se trituroó en un solvente mixto (100 ml, éter de petróleo: acetato de etilo = 8:1) y se filtró. El sólido recolectado se secó al vacío para obtener 1-(5-bromo-6-fluoro-1H-indol-3-il)-3-((terbutildifenilsilil)oxi)-2,2-dimetilpropan-1-ona (compuesto **D3**, 50,0 g) como un sólido amarillo. MS calculada 552,1 (MH⁺), medida 552,1 (MH⁺).

Etapla 2: Preparación de [3-(5-bromo-6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto D4)

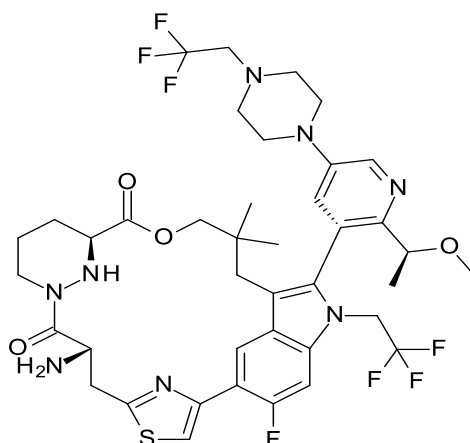
A una mezcla de 1-(5-bromo-6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-3-((*ter*butildifenilsilil)oxi)-2,2-dimetilpropan-1-ona (compuesto **D3**, 50,0 g, 90,49 mmol) en THF (600 ml) se agregó
5 LiBH₄ (48,4 ml, 193,49 mmol, 4 M en THF) por goteo a 0 °C. La mezcla se agitó a 70 °C durante 24 h en una atmósfera de nitrógeno. Después de que se completó la reacción, se inactivó mediante adición de agua (600 ml) a 0 °C lentamente, y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (600 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (600 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El
10 residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (EtOAc en PE = 20 % ~ 33 %) para obtener [3-(5-bromo-6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **D4**, 46,0 g) como un sólido blanco. MS calculada 538,1 (MH⁺), medida 538,2 (MH⁺).

Etapla 3: Preparación de [3-(5-bromo-6-fluoro-2-yodo-1*H*-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (intermediario D)

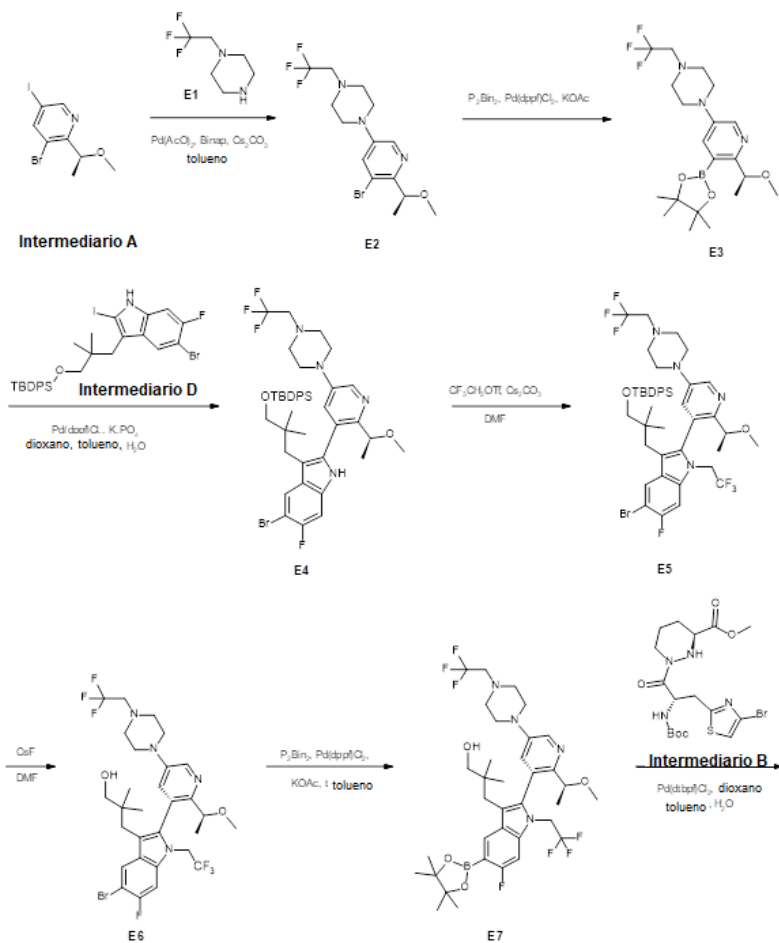
A una mezcla de [3-(5-bromo-6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **D4**, 35,4 g, 65,73 mmol) y yodo (18,4 g, 72,3 mmol) en THF (400 ml) se agregó trifluorometansulfonato de plata (20,3 g, 78,88 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 10 min. Después de que se completó la reacción, se inactivó
20 mediante Na₂SO₃ acuoso saturado (400 ml) y EtOAc (400 ml), y la mezcla de reacción se filtró. La capa orgánica se lavó con salmuera (100 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (EtOAc en PE = 0 % ~ 2,5 %) para obtener [3-(5-bromo-6-fluoro-2-yodo-1*H*-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (intermediario **D**, 43,0 g) como un sólido
25 amarillo. MS calculada 664,0 (MH⁺), medida 664,1 (MH⁺).

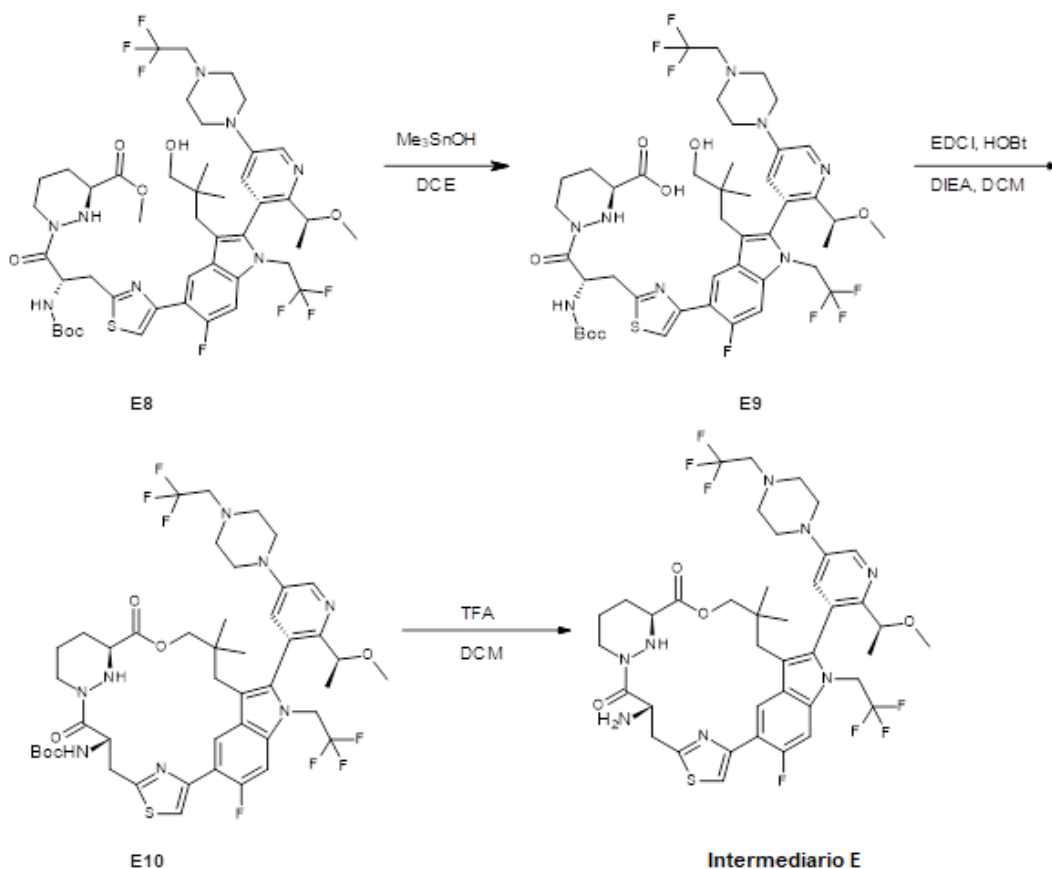
Intermediario E

(7*S*,13*S*)-7-amino-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]]octacosa-
30 **1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona**



El compuesto se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:





Etap 1: Preparación de 1-[5-bromo-6-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina (compuesto E2).

A una mezcla de 3-bromo-5-yodo-2-[(1S)-1-metoxietil]piridina (intermediario A, 2,03 g, 5,95 mmol) y 1-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina (compuesto E1, 1,0 g, 5,95 mmol) en tolueno (15 ml) se agregaron Cs₂CO₃ (4,85 g, 14,88 mmol), (R)-binap (92,6 mg, 0,15 mmol) y Pd(OAc)₂ (66,8 mg, 0,3 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó y se purgó con nitrógeno 3 veces, y la mezcla se agitó a 100 °C durante 12 h en una atmósfera de nitrógeno. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 1-[5-bromo-6-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina (compuesto E2, 2,0 g) como aceite amarillo. MS calculada 382,2 (MH⁺), medida 382,1 (MH⁺).

Etap 2: 1-[6-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil]-4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina (compuesto E3).

A una solución de 1-[5-bromo-6-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina (compuesto E2, 3,2 g, 8,37 mmol), bis(pinacolato)diboro (3,19 g,

12,56 mmol) y KOAc (2,1 g, 20,93 mmol) en tolueno (50 ml) se agregó Pd(dppf)Cl₂ (306,3 mg, 0,42 mmol). La mezcla se desgasificó y se purgó con nitrógeno 3 veces, y la mezcla se agitó a 90 °C durante 12 h en una atmósfera de nitrógeno. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró, el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo, que se purificó mediante columna de fase inversa para obtener 1-[6-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil]-4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina (compuesto **E3**, 1,9 g) como una goma amarilla. MS calculada 430,2 (MH⁺), medida 348,4 (M-C₆H₁₀+H⁺).

Etapas 3: Preparación de [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto E4).

A una solución de 1-[6-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil]-4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina (compuesto **E3**, 1,9 g, 4,41 mmol), [3-(5-bromo-6-fluoro-2-yodo-1H-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (intermediario **D**, 2,1 g, 3,15 mmol) en 1,4-dioxano (24 ml), agua (8 ml) y tolueno (8 ml) se agregó K₃PO₄ (2,1 g, 9,5 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (231 mg, 0,37 mmol). La mezcla se desgasificó y se purgó con nitrógeno, luego se agitó a 70 °C durante 12 h. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró. El filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc en PE : 30 % - 60 %) para obtener [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto **E4**, 960,0 mg) como una goma amarilla. MS calculada 839,3 (MH⁺), medida 839,3 (MH⁺).

Etapas 4: Preparación de [3-[5-bromo-6-fluoro-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto E5).

A una solución de [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto **E4**, 1 g, 1,14 mmol) en DMF (35 ml) se agregó Cs₂CO₃ (1,1 g, 3,44 mmol) y 2,2,2-trifluoroetil trifluorometansulfonato (2,7 g, 11,63 mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 20 °C durante 15 horas, la mezcla de reacción se vertió en agua (100 ml), y se extrajo con EtOAc (50 ml, tres veces). La orgánica combinada se lavó con salmuera (50 ml, tres veces), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc en PE: 30 % - 40 %) para obtener [3-[5-bromo-6-fluoro-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-[4-

(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **E5**, 640,0 mg, 0,69 mmol, eluido más rápido) como un sólido blanco. MS calculada 921,3 (MH⁺), medida 921,4 (MH⁺).

Etapla 5: Preparación de 3-[5-bromo-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **E6).**

A una solución de [3-[5-bromo-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **E5**, 640,0 mg, 0,69 mmol) en DMF (7 ml) se agregó fluoruro de cesio (421,8 mg, 2,78 mmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 16 h. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc en PE : 30 % - 60 %) para obtener 3-[5-bromo-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **E6**, 360,0 mg) como aceite amarillo. MS calculada 683,2 (MH⁺), medida 683,1 (MH⁺).

Etapla 6: Preparación de 3-[5-bromo-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **E7).**

A una solución de 3-[5-bromo-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **E6**, 360,0 mg, 0,53 mmol), bis(pinacolato)diboro (200,6 mg, 0,79 mmol) en tolueno (6 ml) se agregó acetato de potasio (129 mg, 1,32 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (40 mg, 0,1 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó mediante burbujeo de nitrógeno durante 5 min, luego se agitó a 80 °C durante 15 h. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc en PE : 30 % - 50 %) para obtener 3-[5-bromo-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **E7**, 300,0 mg) como goma amarilla. MS calculada 731,4 (MH⁺), medida 731,4 (MH⁺).

Etapla 7: Preparación de metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **E8).**

A una mezcla de 3-[5-bromo-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **E7**, 0,3 g, 0,41 mmol) y metil (3*S*)-1-[(2*S*)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (intermediario **B**, 196,7 mg, 0,41 mmol) en tolueno (3 ml), 1,4-dioxano (1 ml) y agua (1 ml) se agregaron K₃PO₄ (221,3 mg, 1,04 mmol) y Pd(dtbpf)Cl₂ (27,05 mg, 0,04 mmol). La mezcla se agitó a 70 °C durante 12 h en una atmósfera de nitrógeno. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc en PE : 60 % - 80 %) para obtener metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **E8**, 200,0 mg) como goma amarilla. MS calculada 1001,4 (MH⁺), medida 1001,4 (MH⁺).

15 Etapa 8: Preparación de ácido (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **E9).**

A una mezcla de metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **E8**, 200,0 mg, 0,2 mmol) en DCE (5 ml) se agregó Me₃SnOH (200,0 mg, 1,11 mmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 12 h y luego se concentró al vacío para obtener un residuo. Se agregaron EtOAc (10 ml) y agua (10 ml) al residuo y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (15 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener ácido (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **E9**, 188,0 mg) como un sólido marrón. MS calculada 987,4 (MH⁺), medida 987,4 (MH⁺).

35 Etapa 9: Preparación de *ter*-butil *N*-[(7*S*,13*S*)-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-

7-il]carbamato (compuesto E10).

A una mezcla de ácido (3S)-1-[(2S)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-1-(2,2,2-trifluoroetil)indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **E9**, 188,0 mg, 0,19 mmol) en DCM (20 ml) se agregaron DIEA (0,7 ml, 3,81 mmol), EDCI (550,0 mg, 2,87 mmol) y HOBt (65,0 mg, 0,48 mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 20 °C durante 12 horas, la mezcla de reacción se vertió en agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (30 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc en PE : 50 % - 70 %) para obtener *ter*-butil *N*-[(7*S*,13*S*)-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamato (compuesto **E10**, 110,0 mg) como un sólido amarillo. MS calculada 969,4 (MH⁺), medida 969,5 (MH⁺).

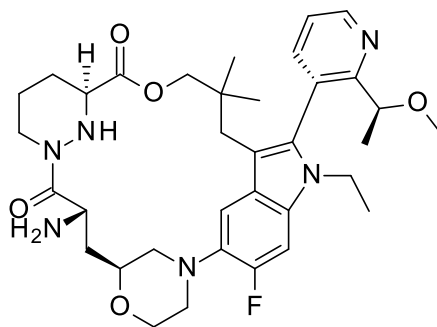
Etapas 10: Preparación de (7*S*,13*S*)-7-amino-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona (intermediario E).

A una solución de *ter*-butil *N*-[(7*S*,13*S*)-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamato (compuesto **E10**, 110,0 mg, 0,11 mmol) en DCM (1 ml) se agregó TFA (1,0 ml, 12,98 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h. Después de que se completó la reacción, la mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un residuo. Se agregó NaHCO₃ acuoso saturado (20 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (15 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener (7*S*,13*S*)-7-amino-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona (intermediario **E**, 98,0 mg) como un sólido amarillo. MS calculada 869,4 (MH⁺), medida 869,2 (MH⁺).

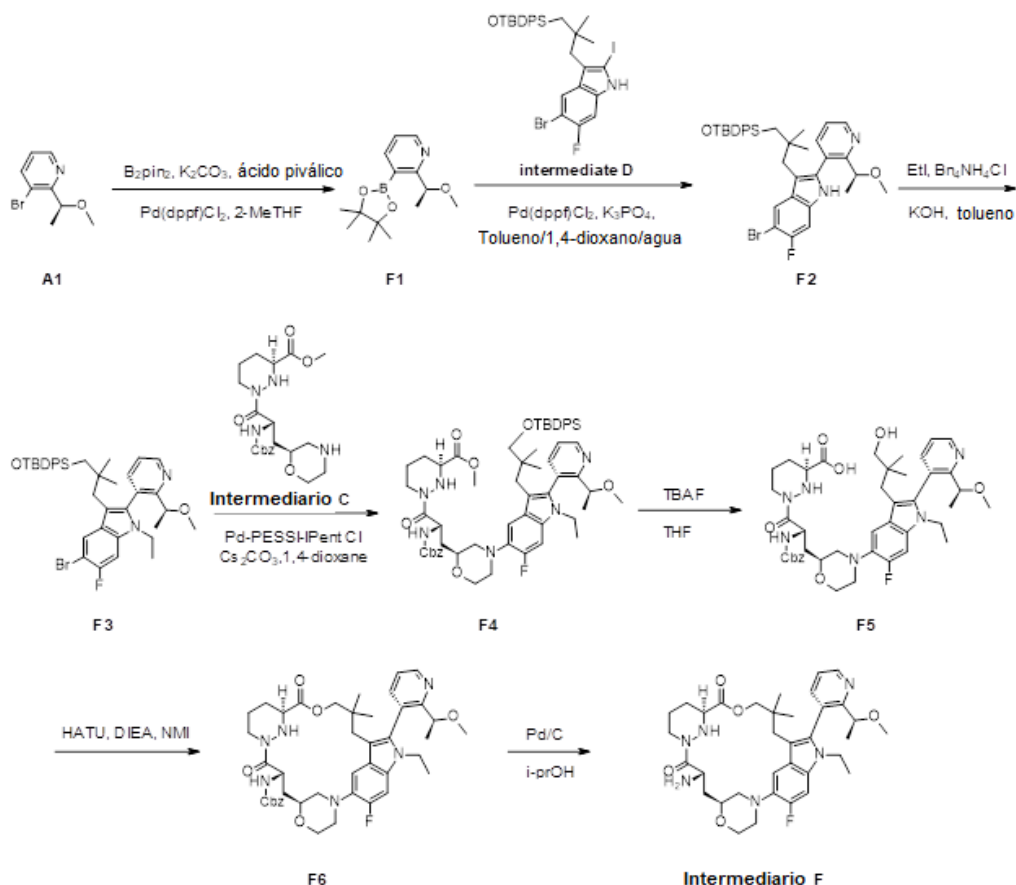
Intermediario F

(6S,8S,14S)-8-amino-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-9,15-diona

5



El compuesto se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:



Eta 1: Preparación de 2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (compuesto **F1**)

10

A una solución de 3-bromo-2-[(1*S*)-1-metoxietil]piridina (compuesto **A1**, 46,0 g, 212,88

mmol) y bis(pinacolato)diboro (108,1 g, 425,77 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (1 l) se agregaron carbonato de potasio (88,3 g, 638,65 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (15,6 g, 21,29 mmol) y ácido píválico (10,87 g, 106,44 mmol). Luego, la mezcla se desgasificó con N₂ (esta secuencia se repitió tres veces). Después de agitarse a 80 °C durante 3 h en N₂, la mezcla de reacción se filtró y el sólido recolectado se lavó con EtOAc (100 ml). El filtrado se vertió en agua (400 ml), se extrajo con EA (400 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (300 ml, dos veces), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener el producto crudo que se purificó mediante cromatografía de gel de sílice para obtener 2-[(1S)-1-metoxietil]-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (compuesto **F1**, 75,0 g) como aceite marrón. MS calculada 264,1 (MH⁺), medida 264,0 (MH⁺).

Etapla 2: Preparación de [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto F2)

A una mezcla de 2-[(1S)-1-metoxietil]-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (compuesto **F1**, 18,0 g, 30,78 mmol) y [3-(5-bromo-6-fluoro-2-yodo-1H-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (intermediario **D**, 20,5 g, 30,78 mmol) en 1,4-dioxano (200 ml)/agua (70 ml)/tolueno (70 ml) se agregó fosfato de potasio (19,6 g, 92,35 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (2,3 g, 3,08 mmol). La mezcla se agitó a 70 °C durante 16 h en N₂. Después de que se completó la reacción, la mezcla de reacción de enfriamiento se filtró y el filtrado se concentró al vacío para retirar el solvente. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (200 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml, dos veces), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto **F2**, 22,0 g) como un sólido marrón. MS calculada 674,7 (MH⁺), medida 675,3 (MH⁺).

Etapla 3: Preparación de [3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto F3)

A una solución de [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto **F2**, 7 g, 10,39 mmol), en tolueno (20 ml) se agregaron bencil(trietil)azanio;bromuro (5,6 g, 20,78 mmol), tamiz molecular (4Å) (7,5 g, 31,17 mmol) y KOH (1,2 g, 20,78 mmol). La mezcla de reacción se agregó con una solución de yodoetano (1,1 ml, 13,51 mmol) en tolueno (2 ml). Después de agitarse a 25 °C durante 6 h, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante NPLC (columna: Welch

Ultimate XB-SiOH 250 mm × 100 mm × 10 um, Hexano-EtOH) y se concentró para obtener [3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **F3**, 7,0 g) como aceite amarillo. MS calculada 702,8 (MH⁺), medida 703,2 (MH⁺).

5 **Eta** **p** **a** **4**: **P** **r** **e** **p** **a** **r** **a** **c** **i** **ó** **n** **d** **e** **m** **e** **t** **i** **l** **(** **3** **S** **)** **-** **1** **-** **[** **(** **2** **S** **)** **-** **2** **-** **(** **b** **e** **n** **c** **i** **l** **o** **x** **i** **c** **a** **r** **b** **o** **n** **i** **l** **a** **m** **i** **n** **o** **)** **-** **3** **-** **[** **(** **2** **S** **)** **-** **4** **-** **[** **3** **-** **[** ***ter*** **-** **b** **u** **t** **i** **l** **(** **d** **i** **f** **e** **n** **i** **l** **)** **s** **i** **l** **i** **l** **]** **o** **x** **i** **-** **2** **,2** **-** **d** **i** **m** **e** **t** **i** **l** **-** **p** **r** **o** **p** **i** **l** **]** **-** **1** **-** **e** **t** **i** **l** **-** **6** **-** **f** **l** **u** **o** **r** **o** **-** **(** **2** **M** **)** **-** **2** **-** **[** **(** **1** **S** **)** **-** **1** **-** **m** **e** **t** **o** **x** **i** **e** **t** **i** **l** **]** **-** **3** **-** **p** **i** **r** **i** **d** **i** **l** **]** **i** **n** **d** **o** **l** **-** **5** **-** **i** **l** **]** **m** **o** **r** **f** **o** **l** **i** **n** **-** **2** **-** **i** **l** **]** **p** **r** **o** **p** **a** **n** **o** **i** **l** **]** **h** **e** **x** **a** **h** **i** **d** **r** **o** **p** **i** **r** **i** **d** **a** **z** **i** **n** **-** **3** **-** **c** **a** **r** **b** **o** **x** **i** **l** **a** **t** **o** **(** **c** **o** **m** **p** **u** **e** **s** **t** **o** **F** **4** **)**

A la mezcla de [3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **F3**, 2,1 g, 2,99 mmol) en 1,4-dioxano (20 ml) se agregó metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2*S*)-morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (intermediario **C**, 1,6 g, 3,59 mmol), Pd-PESSI-IPent Cl (251,4 mg, 0,3 mmol) y carbonato de cesio (2,9 g, 8,98 mmol). La mezcla se agitó a 115 °C durante 16 h. La mezcla de reacción de enfriamiento se agregó con EtOAc (40 ml) y agua (40 ml) y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (30 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se purificó mediante cromatografía en columna para obtener metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2*S*)-4-[3-[3-[*ter*-butil(difenil)silil]oxi-2,2-dimetil-propil]-1-etil-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-5-il]morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **F4**, 1,0 g) como un sólido amarillo. MS calculada 1055,5 (MH⁺), medida 1055,6 (MH⁺).

25 **Eta** **p** **a** **5**: **P** **r** **e** **p** **a** **r** **a** **c** **i** **ó** **n** **d** **e** **á** **c** **i** **d** **o** **(** **3** **S** **)** **-** **1** **-** **[** **(** **2** **S** **)** **-** **2** **-** **(** **b** **e** **n** **c** **i** **l** **o** **x** **i** **c** **a** **r** **b** **o** **n** **i** **l** **a** **m** **i** **n** **o** **)** **-** **3** **-** **[** **(** **2** **S** **)** **-** **4** **-** **[** **1** **-** **e** **t** **i** **l** **-** **6** **-** **f** **l** **u** **o** **r** **o** **-** **3** **-** **(** **3** **-** **h** **i** **d** **r** **o** **x** **i** **-** **2** **,2** **-** **d** **i** **m** **e** **t** **i** **l** **-** **p** **r** **o** **p** **i** **l** **)]** **-** **(** **2** **M** **)** **-** **2** **-** **[** **(** **1** **S** **)** **-** **1** **-** **m** **e** **t** **o** **x** **i** **e** **t** **i** **l** **]** **-** **3** **-** **p** **i** **r** **i** **d** **i** **l** **] **i** **n** **d** **o** **l** **-** **5** **-** **i** **l** **]** **m** **o** **r** **f** **o** **l** **i** **n** **-** **2** **-** **i** **l** **]** **p** **r** **o** **p** **a** **n** **o** **i** **l** **]** **h** **e** **x** **a** **h** **i** **d** **r** **o** **p** **i** **r** **i** **d** **a** **z** **i** **n** **-** **3** **-** **c** **a** **r** **b** **o** **x** **i** **l** **i** **c** **o** **(** **c** **o** **m** **p** **u** **e** **s** **t** **o** **F** **5** **)****

Una solución de metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2*S*)-4-[3-[3-[*ter*-butil(difenil)silil]oxi-2,2-dimetil-propil]-1-etil-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-5-il]morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **F4**, 1,0 g, 0,95 mmol) en TBAF (7,6 ml, 7,6 mmol, 1 M en THF) se agitó a 40 °C durante 12 h. Después de que se completó la reacción, la mezcla se concentró al vacío para retirar la mayor parte del solvente. El residuo se diluyó con 1N de solución acuosa de HCl (15 ml) y se extrajo con EtOAc (50 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con NH₄Cl acuoso (30 ml, dos veces), salmuera (40 ml, dos veces), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener un producto

crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de fase inversa para obtener ácido (3S)-1-[(2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-5-il]morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **F5**, 500,0 mg) como un sólido amarillo. MS calculada 803,4 (MH⁺), medida 803,4 (MH⁺).

Etapas 6: Preparación de bencil N-[(6S,8S,14S)-22-etil-25-fluoro-(21M)-21-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamato (compuesto F6)

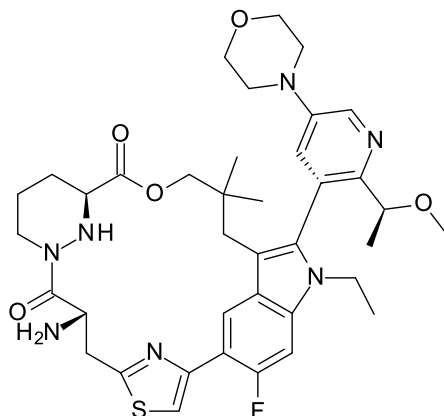
A una solución de ácido (3S)-1-[(2S)-2-(benciloxycarbonilamino)-3-[(2S)-4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-5-il]morfolin-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **F5**, 700,0 mg, 0,87 mmol) en DCM (70 ml) se agregaron DIEA (1,1 g, 8,72 mmol), HATU (1,7 g, 4,36 mmol) y 1-metilimidazol (715,8 mg, 8,72 mmol) a 25 °C. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía de fase inversa para obtener bencil N-[(6S,8S,14S)-22-etil-25-fluoro-(21M)-21-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamato (compuesto **F6**, 320,0 mg) como un sólido amarillo claro. MS calculada 785,5 (MH⁺), medida 785,4 (MH⁺).

Etapas 7: Preparación de (6S,8S,14S)-8-amino-22-etil-25-fluoro-(21M)-21-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-9,15-diona (intermediario F)

A una solución de bencil N-[(6S,8S,14S)-22-etil-25-fluoro-(21M)-21-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamato (compuesto **F6**, 300,0 mg, 0,38 mmol) en THF (3 ml) se agregó Pd(OH)₂ en carbón activado (200 mg). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener (6S,8S,14S)-8-amino-22-etil-25-fluoro-(21M)-21-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-9,15-diona (intermediario **F**, 270,0 mg) como un sólido amarillo. MS calculada 651,4 (MH⁺), medida 651,4 (MH⁺).

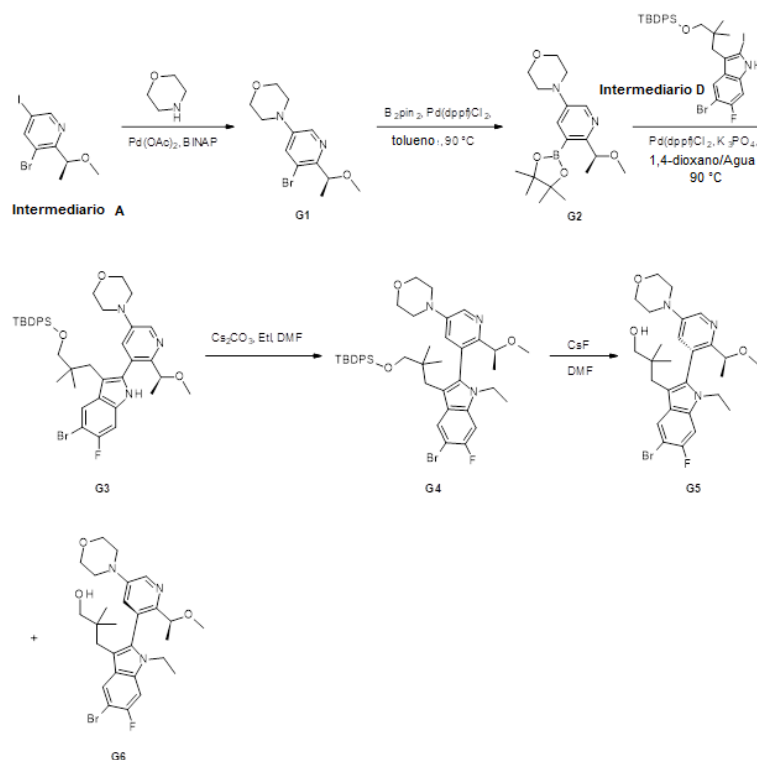
Intermediario G

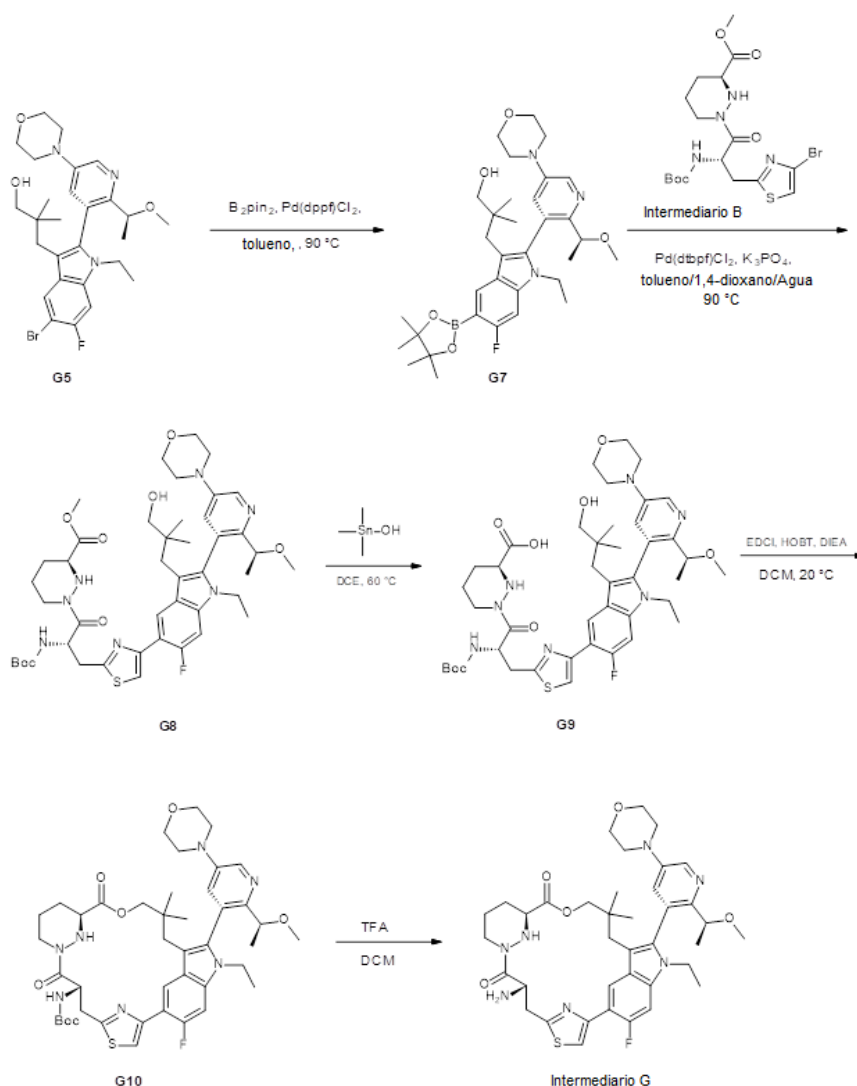
(7S,13S)-7-amino-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona



5

El compuesto se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:





Etap 1: Preparación de 4-[5-bromo-6-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]morfolina (compuesto G1)

A una mezcla de 3-bromo-5-yodo-2-[(1S)-1-metoxietil]piridina (intermediario **A**, 30 g, 87,73 mmol) y morfolina (7,6 g, 87,73 mmol) en tolueno (450 ml) se agregaron Cs₂CO₃ (57,2 g, 175,45 mmol), (*R*)-binap (2,7 g, 4,39 mmol) y Pd(OAc)₂ (0,98 g, 4,39 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó y se purgó con nitrógeno 3 veces, y la mezcla se agitó a 90 °C durante 12 h en una atmósfera de nitrógeno. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 4-[5-bromo-6-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]morfolina (compuesto **G1**, 21 g) como un aceite amarillo. MS calculada 301,1 (MH⁺), medida 301,1 (MH⁺).

Etap 2: Preparación de 4-[6-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-

dioxaborolan-2-il)-3-piridil]morfolina (compuesto G2)

A una solución de 4-[5-bromo-6-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]morfolina (compuesto **G1**, 21 g, 63,3 mmol), bis(pinacolato)diboro (24,0 g, 94,63 mmol) y KOAc (13,6 g, 138,79 mmol) en tolueno (500 ml) se agregó Pd(dppf)Cl₂ (4,4 g, 6,31 mmol). La mezcla se
5 desgasificó y se purgó con nitrógeno 3 veces, y la mezcla se agitó a 90 °C durante 12 h en una atmósfera de nitrógeno. Después de enfriarse hasta la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró, el filtrado se concentró al vacío para obtener el producto crudo 4-[6-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil]morfolina (compuesto **G2**, 45 g) como una goma amarilla, que se usó en la
10 siguiente etapa directamente. MS calculada 349,2 (MH⁺), medida 349,2 (MH⁺).

Etapas 3: Preparación de [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto G3)

A una solución de 4-[6-[(1S)-1-metoxietil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil]morfolina (compuesto **G2**, 40,6 g, 46,65 mmol), [3-(5-bromo-6-fluoro-2-yodo-1H-indol-3-il)-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (intermediario **C5**, 31 g, 46,65 mmol) en 1,4-dioxano (420 ml) y agua (80 ml) se agregó K₃PO₄ (29,7 g, 2,33 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (1,7 g, 0,29 mmol). La mezcla se desgasificó y se purgó con nitrógeno, y la
15 mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 18 h. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se extrajo con EA (200 ml, tres veces).
20 La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (200 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto **G3**, 17,2 g) como un aceite amarillo. MS calculada 758,3 (MH⁺), medida
25 758,3 (MH⁺).

Etapas 4: Preparación de [3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto G4)

A una solución de [3-[5-bromo-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-1H-indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-ter-butil-difenil-silano (compuesto **G3**, 15 g, 19,77 mmol) en DMF (300 ml) se agregó Cs₂CO₃ (19,3 g, 59,3 mmol) y yodoetano (6,16 g, 39,53 mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 20 °C durante 16 h, la mezcla de reacción se
30 vertió en agua (200 ml) y se extrajo con EtOAc (200 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (10 ml, tres veces), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se
35 concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante

cromatografía en columna para obtener 3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **G4**, 14,7 g) como un aceite amarillo. MS calculada 786,3 (MH⁺), medida 786,4 (MH⁺).

5 **Etapla 5: Preparación de 3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto G5) y 3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2P)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto G6)**

10 A una solución de 3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **G4**, 14,7 g, 18,68 mmol) en DMF (160 ml) se agregó fluoruro de cesio (14,2 g, 93,41 mmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 48 h. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, a la mezcla de reacción se agregaron EtOAc (300 ml) y agua (300 ml), y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (200 ml, tres veces). La capa
15 orgánica combinada se lavó con salmuera (200 ml, cuatro veces), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **G5**, 6 g, eluido más rápido) como una espuma incolora y 3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2P)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto
20 **G6**, 4,5 g, eluido más lento) como una espuma incolora. Compuesto **G5**: MS calculada 548,2 (MH⁺), medida 548,2 (MH⁺). ¹H RMN (400MHz, Metanol-*d*₄) δ = 8,41 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,92 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,37 - 7,33 (m, 2H), 4,58 (s, 1H), 4,05 - 3,98 (m, 2H), 3,87-3,82 (m, 5H), 3,27 - 3,23 (m, 4H), 3,15 - 3,13 (m, 1H), 3,00 (s, 3H), 2,75-2,71 (m,
25 1H), 2,24 - 2,22 (m, 1H), 1,42 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,22 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,76 (s, 3H), 0,76 (s, 3H).

Análisis cristalográfico de rayos X del compuesto G5

La estructura de configuración absoluta del compuesto **G5** se confirmó mediante análisis cristalográfico de rayos X de su único cristal (figura 1).

30 **Etapla 6: Preparación de 3-[1-etil-6-fluoro-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto G7)**

A una solución de 3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2M)-2-[2-[(1S)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **G5**, 6 g, 10,94 mmol),
35 bis(pinacolato)diboro (4,2 g, 16,41 mmol) en tolueno (60 ml) se agregó acetato de

potasio (2,7 g, 27,35 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (0,8 g, 1,09 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó mediante burbujeo de nitrógeno durante 5 min, luego se agitó a 90 °C durante 15 h. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 3-[1-etil-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **G7**, 4,5 g) como una goma incolora. MS calculada 596,4 (MH⁺), medida 596,4 (MH⁺).

Etapas 7: Preparación de metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-3-[4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **G8)**

A una mezcla de 3-[1-etil-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)indol-3-il]-2,2-dimetil-propan-1-ol (compuesto **G7**, 4,5 g, 7,56 mmol) y metil (3*S*)-1-[(2*S*)-3-(4-bromotiazol-2-il)-2-(ter-butoxicarbonilamino)propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (intermediario **B**, 3,6 g, 7,56 mmol) en tolueno (45 ml), 1,4-dioxano (15 ml) y agua (15 ml) se agregaron K₃PO₄ (4,0 g, 18,89 mmol) y Pd(dtbpf)Cl₂ (492,5 mg, 0,75 mmol). La mezcla se agitó a 70 °C durante 12 h en una atmósfera de nitrógeno. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-3-[4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **G8**, 3,8 g) como una goma incolora. MS calculada 866,4 (MH⁺), medida 866,4 (MH⁺).

Etapas 8: Preparación de ácido (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-3-[4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **G9)**

A una mezcla de metil (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-3-[4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxilato (compuesto **G8**, 3,8 g, 4,39 mmol) en DCE (76 ml) se agregó Me₃SnOH (3,2 g, 17,55 mmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 48 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un residuo. Se agregaron EtOAc (200 ml) y agua (100 ml) al residuo y las capas se

separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (150 ml, dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (200 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener ácido (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **G9**, 3,7 g) como un sólido marrón. MS calculada 852,4 (MH⁺), medida 852,4 (MH⁺).

Etapas 9: Preparación de *ter*-butil *N*-[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamato (compuesto **G10)**

A una mezcla de ácido (3*S*)-1-[(2*S*)-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-[4-[1-etil-6-fluoro-3-(3-hidroxi-2,2-dimetil-propil)-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-5-il]tiazol-2-il]propanoil]hexahidropiridazin-3-carboxílico (compuesto **G9**, 2,5 g, 2,93 mmol) en DCM (250 ml) se agregaron DIEA (7,58 ml, 58,68 mmol), EDCI (8,4 g, 44,01 mmol) y HOBt (991,2 mg, 0,91 mmol) a 0 °C. Después de agitarse a 20 °C durante 12 h, la mezcla de reacción se vertió en agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (100 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (30 ml), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna para obtener *ter*-butil *N*-[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamato (compuesto **G10**, 1,2 g) como un aceite amarillo. MS calculada 834,4 (MH⁺), medida 834,4 (MH⁺).

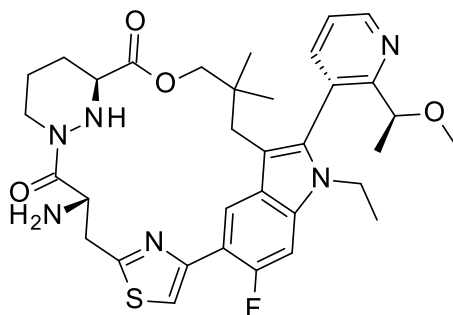
Etapas 10: Preparación de (7*S*,13*S*)-7-amino-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona (intermediario **G)**

A una solución de *ter*-butil *N*-[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamato (compuesto **G10**, 1,2 g, 1,44 mmol) en DCM (12 ml) se agregó TFA (6,0 ml). La mezcla se agitó a 20 °C durante 3 h. Después de que se completó la reacción, la mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un residuo. Se agregó NaHCO₃ acuoso (60 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (80 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó en sulfato de sodio

anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener (7*S*,13*S*)-7-amino-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona (intermediario **G**, 1 g) como un sólido amarillo. MS calculada 734,3 (MH⁺), medida 734,3 (MH⁺).

Intermediario H

(7*S*,13*S*)-7-amino-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-17,17-dimetil-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona



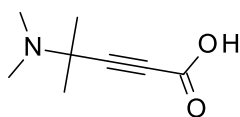
10

El compuesto del título se preparó de manera análoga a la preparación del intermediario **G** usando [3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-(2*M*)-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **F3**) en lugar de [3-[5-bromo-1-etil-6-fluoro-2-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]indol-3-il]-2,2-dimetil-propoxi]-*ter*-butil-difenil-silano (compuesto **G4**).

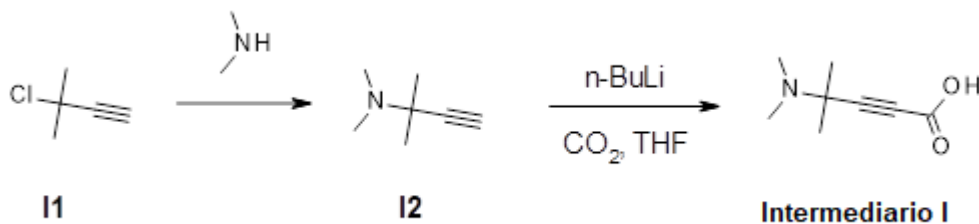
15

Intermediario I

Ácido 4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoico



El compuesto se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:



20

Etap 1: Preparación de *N,N*,2-trimetilbut-3-in-2-amina (compuesto **I2**)

Una mezcla de 3-cloro-3-metil-1-butin (20,0 g, 195,01 mmol) y dimetilamina (22,0 g,

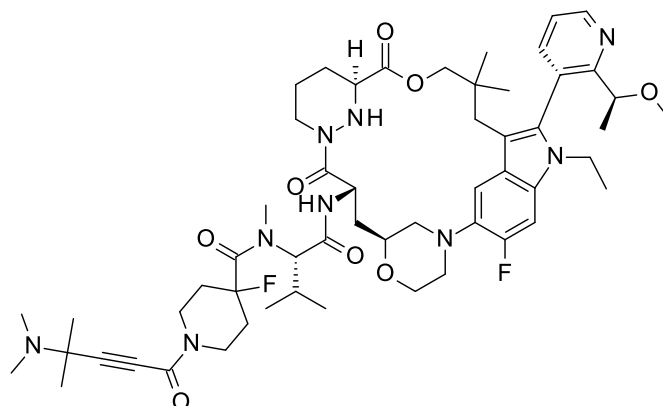
195,01 mmol) se agitó a 25 °C durante 12 h. Después de que se completó la reacción, la suspensión se filtró. El sólido recolectado se lavó con agua helada (50 ml, tres veces) y se disolvió en HCl frío (3 N, 10 ml). La solución ácida se extrajo con metil *ter*-butil éter (50 ml, dos veces). La fase acuosa resultante se enfrió a 0 °C y se volvió
5 fuertemente alcalina con NH₃.H₂O frío. El precipitado amarillo se recolectó, se lavó con NH₃.H₂O (50 ml, tres veces) y H₂O (50 ml, tres veces). El sólido recolectado se concentró al vacío para obtener *N,N*,2-trimetilbut-3-in-2-amina (compuesto **I2**, 4,0 g) como un sólido amarillo. MS calculada 112,1 (MH⁺), medida 112,1 (MH⁺).

10 **Etapas 2: Preparación de ácido 4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoico (intermediario I)**

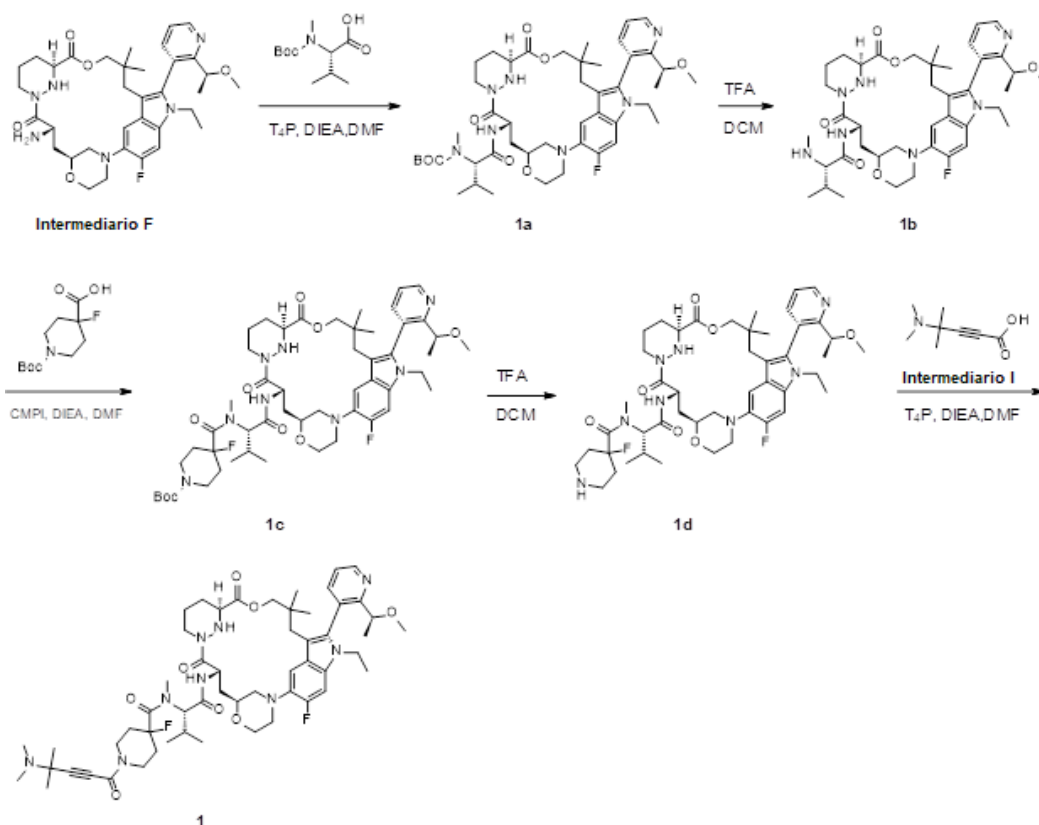
A una solución de *N,N*,2-trimetilbut-3-in-2-amina (compuesto **I2**, 3,2 g, 28,78 mmol) en THF (120 ml) se agregó por goteo *n*-BuLi (12,7 ml, 31,66 mmol, 2M en hexano) a -70 °C. Después de agitarse a -70 °C durante 5 min, la mezcla de reacción se calentó hasta 0 °C y se agitó durante otros 10 min. Después de enfriarse hasta -70 °C, la
15 mezcla de reacción se burbujeó con dióxido de carbono durante 30 min. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h. Después de que se completó la reacción, la mezcla de reacción se hidrolizó cuidadosamente a 0 °C con agua (40 ml). Dos fases se separaron y la capa acuosa se acidificó hasta pH 1-2 con 6N de HCl. La acuosa se concentró al vacío para obtener ácido 4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoico
20 (intermediario **I**, 4,3 g) como un sólido blanco, que se usó en la siguiente etapa sin purificación. MS calculada 156,1 (MH⁺), medida 156,1 (MH⁺). ¹H RMN (400 Mhz, ÓXIDO DE DEUTERIO-D₂O) δ = 2,99 - 2,91 (m, 6H), 1,77 - 1,68 (m, 6H).

Ejemplo 1

25 **1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxo-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida**



El compuesto se preparó de acuerdo con el siguiente esquema:



5 **Etapa 1: Preparación de *ter*-butil *N*-[[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-*N*-metil-carbamato (compuesto 1a)**

A una mezcla de (6*S*,8*S*,14*S*)-8-amino-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-5,16-dioxa-2,10,22,28-

10 tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-9,15-diona (intermediario **F**, 270,0 mg, 0,41 mmol) y ácido (2*S*)-2-[*ter*-

butoxicarbonil(metil)amino]-3-metil-butanoico (191,9 mg, 0,83 mmol) en DMF (3 ml) se agregaron DIEA (0,36 ml, 2,07 mmol) y T₄P (597,9 mg, 0,83 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1h. La mezcla se concentró al vacío para obtener un residuo, que se purificó mediante cromatografía de fase inversa para obtener *ter*-butil *N*-[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-*N*-metil-carbamato (compuesto **1a**, 210,0 mg) como un sólido marón. MS calculada 864,5 (MH⁺), medida 864,5 (MH⁺).

10 **Etapas 2: Preparación de (2*S*)-*N*-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]-3-metil-2-(metilamino)butanamida (compuesto **1b**)**

A una solución de *ter*-butil *N*-[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-*N*-metil-carbamato (compuesto **1a**, 210,0 mg, 0,24 mmol) en DCM (2 ml), se agregó TFA (1,0 ml, 12,98 mmol). La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. Después de que se completó la reacción, la mezcla se concentró al vacío para retirar la mayor parte del solvente, luego se vertió en NaHCO₃ acuoso saturado (5 ml) y se extrajo con EtOAc (30 ml, cinco veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener (2*S*)-*N*-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]-3-metil-2-(metilamino)butanamida (compuesto **1b**, 225,0 mg) como un sólido marrón. MS calculada 764,4 (MH⁺), medida 764,4 (MH⁺).

30 **Etapas 3: Preparación de *ter*-butil 4-[[[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]-4-fluoro-piperidin-1-carboxilato (compuesto **1c**)**

A una solución de (2*S*)-*N*-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]-3-

metil-2-(metilamino)butanamida (compuesto **1b**, 200,0 mg, 0,26 mmol) en DMF (2,5 ml) se agregaron DIEA (0,5 ml, 2,62 mmol), ácido 1-*ter*-butoxicarbonil-4-fluoro-piperidin-4-carboxílico (194,2 mg, 0,79 mmol) y CMPI (200,6 mg, 0,79 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla se vertió en agua (30 ml) y se extrajo con EtOAc (30 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (30 ml, dos veces), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa para obtener *ter*-butil 4-[[[(1*S*)-1-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]-4-fluoro-piperidin-1-carboxilato (compuesto **1c**, 200,0 mg) como un aceite amarillo. MS calculada 993,6 (MH⁺), medida 993,6 (MH⁺).

Etapas 4: Preparación de *N*-[(1*S*)-1-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida (compuesto **1d**)

A una solución de *ter*-butil 4-[[[(1*S*)-1-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]-4-fluoro-piperidin-1-carboxilato (compuesto **1c**, 200,0 mg, 0,2 mmol) en DCM (2 ml), se agregó TFA (1,1 ml, 14,35 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 hora. Después de que se completó la reacción, la mezcla se concentró al vacío para retirar la mayor parte del solvente, luego se vertió en NaHCO₃ acuoso saturado (5 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml, tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 ml), se secó en sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener *N*-[(1*S*)-1-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida (compuesto **1d**, 200,0 mg) como aceite amarillo. MS calculada 893,5 (MH⁺), medida 893,5 (MH⁺).

Etapas 5: Preparación de 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-

tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida (ejemplo 1)

A una mezcla de *N*-[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-

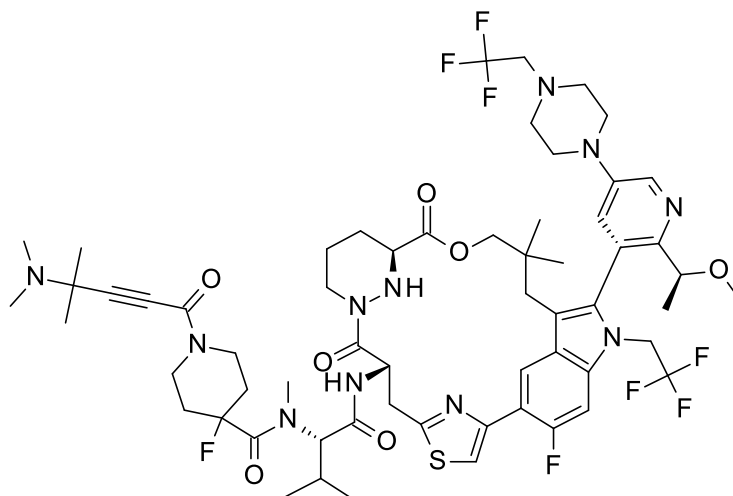
- 5 tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida (compuesto **1d**, 100,0 mg, 0,11 mmol) y ácido 4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoico (intermediario **I**, 34,7 mg, 0,22 mmol), en DMF (2 ml) se agregaron DIEA (0,1 ml, 0,56 mmol) y T₄P (161,4 mg, 0,22 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h, luego se
- 10 purificó mediante HPLC preparativa para obtener 1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[[[(6*S*,8*S*,14*S*)-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-9,15-dioxo-5,16-dioxa-2,10,22,28-
- tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-8-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida (ejemplo **1**, 45,0
- 15 mg) como un sólido amarillo. MS calculada 1030,6 (MH⁺), medida 1030,6 (MH⁺). ¹H RMN (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ = 8,82 (s, 1H), 8,25 - 8,13 (m, 1H), 7,75 - 7,65 (m, 1H), 7,33 - 7,23 (m, 2H), 5,74 - 5,64 (m, 1H), 4,65 - 4,60 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 4,55 - 4,44 (m, 1H), 4,40 - 4,30 (m, 1H), 4,30 - 4,17 (m, 2H), 4,16 - 4,06 (m, 1H), 3,98 - 3,89 (m, 2H), 3,89 - 3,84 (m, 1H), 3,80 (dd, *J* = 4,0, 11,2 Hz, 2H), 3,65-3,55 (m, 2H), 3,50 -
- 20 3,37 (m, 1H), 3,26 - 3,18 (m, 4H), 3,16 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,10 - 3,08 (m, 1H), 3,02 (s, 5H), 2,98 - 2,94 (m, 1H), 2,84 - 2,76 (m, 1H), 2,71 - 2,58 (m, 1H), 2,38 - 2,25 (m, 2H), 2,23 - 2,03 (m, 5H), 1,99 - 1,85 (m, 3H), 1,80 (s, 6H), 1,75 - 1,56 (m, 4H), 1,51 - 1,39 (m, 5H), 1,11-1,01 (m, 3H), 1,00 - 0,89 (m, 6H), 0,85 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H), 0,82 - 0,73 (m, 4H).

25 **Ejemplo 2**

1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-4-fluoro-*N*-[(1*S*)-1-[[[(7*S*,13*S*)-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-

tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-

30 **7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida**

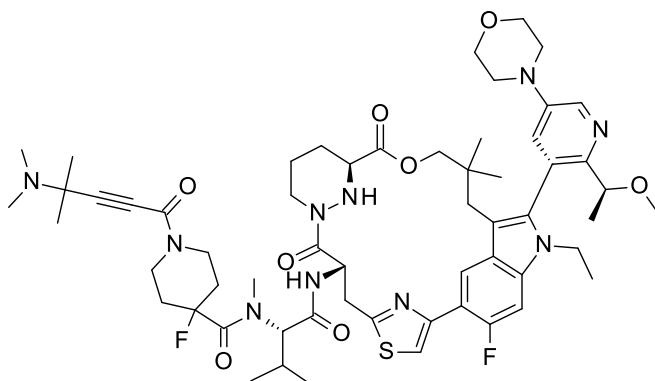


El compuesto del título se preparó de manera análoga a la preparación del ejemplo 1 usando (7*S*,13*S*)-7-amino-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-[4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il]-3-piridil]-17,17-dimetil-21-(2,2,2-trifluoroetil)-15-oxa-4-tia-

9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona (intermediario **E**) en lugar de (6*S*,8*S*,14*S*)-8-amino-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-9,15-diona (intermediario **F**). El ejemplo 2 (38,5 mg) se obtuvo como un sólido amarillo. MS calculada 1248,6 (MH⁺), medida 1248,6 (MH⁺). ¹H RMN (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ = 8,69 (dd, *J* = 2,0, 7,6 Hz, 1H), 8,51 - 8,45 (m, 1H), 8,42 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,68 - 7,66 (m, 1H), 7,52 - 7,44 (m, 1H), 5,78 - 5,67 (m, 1H), 5,22 - 5,12 (m, 1H), 4,76 (dd, *J* = 2,4, 11,2 Hz, 1H), 4,47 - 4,35 (m, 2H), 4,27 - 4,17 (m, 3H), 3,82 - 3,75 (m, 1H), 3,73 - 3,59 (m, 2H), 3,51 - 3,43 (m, 1H), 3,42 - 3,34 (m, 7H), 3,28 - 3,19 (m, 5H), 3,18 - 3,10 (m, 3H), 3,01 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H), 2,88 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 2,84 - 2,77 (m, 1H), 2,68 - 2,58 (m, 1H), 2,39 - 2,12 (m, 6H), 2,00 - 1,92 (m, 1H), 1,79 (d, *J* = 4,8 Hz, 7H), 1,71 - 1,58 (m, 1H), 1,45 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,15 - 1,04 (m, 1H), 1,03 - 0,94 (m, 6H), 0,89 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,47 (d, *J* = 6,0 Hz, 3H).

Ejemplo 3

1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2 inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida

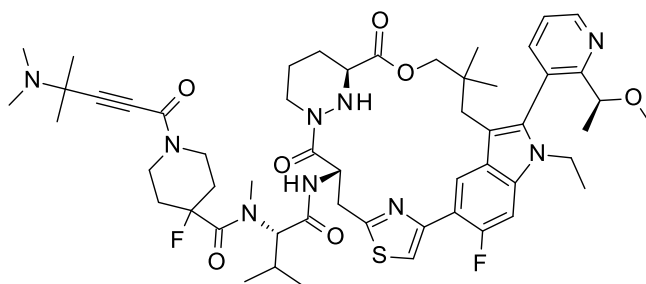


El compuesto del título se preparó de manera análoga a la preparación del ejemplo 1 usando (7*S*,13*S*)-7-amino-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-5-morfolino-3-piridil]-17,17-dimetil-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-

- 5 tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona (intermediario **G**) en lugar de (6*S*,8*S*,14*S*)-8-amino-22-etil-25-fluoro-(21*M*)-21-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-9,15-diona (intermediario **F**). El ejemplo 3 (16,5 mg) se obtuvo como un sólido blanco. MS calculada 1113,6 (MH⁺), medida 1113,6 (MH⁺). ¹H RMN (400 MHz, METANOL-*d*₄) δ = 8,66 (dd, *J* = 7,6 Hz, 3,2 Hz, 1H), 8,42 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 7,62 (dd, *J* = 12,4 Hz, 0,8 Hz, 1H), 7,39 - 7,28 (m, 2H), 5,84 - 5,66 (m, 1H), 4,80 - 4,75 (m, 1H), 4,49 - 4,32 (m, 3H), 4,30 - 4,14 (m, 4H), 3,88 (t, *J* = 4,4 Hz, 4H), 3,81 - 3,70 (m, 2H), 3,69 - 3,57 (m, 1H), 3,50 - 3,41 (m, 1H), 3,36 - 3,30 (m, 10H), 3,22 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H), 3,10 - 3,01 (m, 1H), 2,89 - 2,76 (m, 1H), 2,70 - 2,58 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,33 - 2,26 (m, 2H), 2,25 - 2,13 (m, 3H), 2,01 - 1,92 (m, 1H), 1,87 - 1,75 (m, 1H), 1,71 - 1,57 (m, 1H), 1,50 (s, 5H), 1,45 (d, *J* = 3,0 Hz, 3H), 1,38 - 1,27 (m, 1H), 1,07 - 0,93 (m, 9H), 0,89 (d, *J* = 3,2 Hz, 3H), 0,51 (d, *J* = 4,2 Hz, 3H).
- 10
- 15

Ejemplo 4

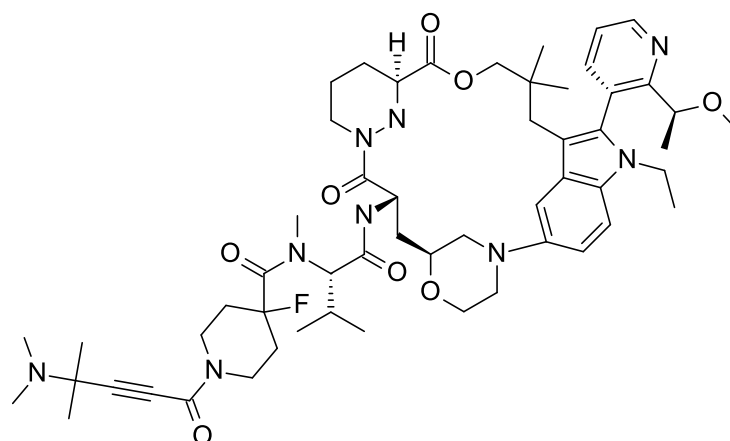
- 20 **1-[4-(dimetilamino)-4-metil-pent-2-inoil]-*N*-[(1*S*)-1-[(7*S*,13*S*)-21-etil-24-fluoro-(20*M*)-20-[2-[(1*S*)-1-metoxietil]-3-piridil]-17,17-dimetil-8,14-dioxo-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-7-il]carbamoil]-2-metil-propil]-4-fluoro-*N*-metil-piperidin-4-carboxamida**



El compuesto del título se preparó de manera análoga a la preparación del ejemplo 1 usando (7S,13S)-7-amino-21-etil-24-fluoro-(20M)-20-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-17,17-dimetil-15-oxa-4-tia-9,21,27,28-tetrazapentaciclo[17.5.2.1^{2,5}.1^{9,13}.0^{22,26}]octacosa-1(25),2,5(28),19,22(26),23-hexaen-8,14-diona (intermediario **H**) en lugar de (6S,8S,14S)-8-amino-22-etil-25-fluoro-(21M)-21-[2-[(1S)-1-metoxietil]-3-piridil]-18,18-dimetil-5,16-dioxa-2,10,22,28-tetrazapentaciclo[18.5.2.1^{2,6}.1^{10,14}.0^{23,27}]nonacosa-1(26),20,23(27),24-tetraen-9,15-diona (intermediario **F**). El ejemplo 4 (44,0 mg) se obtuvo como un sólido blanco. MS calculada 1028,5 (MH⁺), medida 1028,5 (MH⁺). ¹H RMN (400 MHz, METHANOL-*d*₄) δ = 8,75 (dd, *J* = 4,8 Hz, 1,6 Hz, 1H), 8,67 (dd, *J* = 7,2 Hz, 2,4 Hz, 1H), 7,85 (dd, *J* = 7,6 Hz, 1,2 Hz, 1H), 7,62 (dd, *J* = 12,8 Hz, 2,4 Hz, 1H), 7,55 (dd, *J* = 8,0 Hz, 5,2 Hz, 1H), 7,35 (dd, *J* = 11,6 Hz, 5,2 Hz, 1H), 5,80 - 5,65 (m, 1H), 4,99 - 4,93 (m, 1H), 4,81 - 4,73 (m, 1H), 4,49 - 4,31 (m, 4H), 4,28 - 4,10 (m, 3H), 3,80 - 3,70 (m, 2H), 3,68 - 3,57 (m, 1H), 3,49 - 3,40 (m, 1H), 3,39 - 3,34 (m, 3H), 3,30 - 3,25 (m, 1H), 3,23 - 3,18 (m, 3H), 3,10 - 3,02 (m, 1H), 2,89 - 2,77 (m, 1H), 2,66 - 2,55 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,33 - 2,27 (m, 2H), 2,27 - 2,11 (m, 4H), 2,01 - 1,90 (m, 1H), 1,87 - 1,74 (m, 1H), 1,69 - 1,59 (m, 1H), 1,53 - 1,41 (m, 9H), 1,04 - 0,83 (m, 12H), 0,48 (*d*, *J* = 6,8 Hz, 3H).

EJEMPLO BIOLÓGICO

El compuesto **A647** (página 176 de la tabla.1 o denominado “**RMC-6291**”) de WO2021091982 se citó como compuesto de referencia para esta invención.



(RMC-6291)

Ejemplo 5

Estudio de farmacocinética de dosis única (PK) en ratones hembra BALB/c

- 5 El objetivo de este estudio fue determinar la farmacocinética de compuestos seleccionados luego de la administración única por bolo intravenoso o sonda nasogástrica en ratones hembra BALB/c. Brevemente, dos grupos de ratones hembra BALB/c (disponibles de Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd) (N=3/grupo) se trataron con una dosis única de compuesto por vía intravenosa a 3 mg/kg (IV) u oral a
- 10 30 mg/kg (PO). Las muestras de sangre se recolectaron a los 5 min (solo por IV), 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h y 24 h después de la dosis. Las muestras de sangre se colocaron en hielo hasta la centrifugación para obtener muestras de plasma. La concentración de compuesto en muestras de plasma se determinó usando el método LC-MS/MS. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante análisis no
- 15 compartimental.

Tabla 1. Resultados de SDPK

Compuesto	3 mg/kg, iv	30 mg/kg, po	
	CL (ml/min/kg)	C _{máx} (ng/ml)	AUC _{0-último} (h×ng/ml)
RMC-6291	44,2	2706	4116
Ejemplo 1	8,4	9919	24959

- A partir de la tabla 1, se puede observar que el ejemplo 1 tiene excelentes propiedades farmacocinéticas en el modelo de ratón. Especialmente, el ejemplo 1 tiene las casi 3,7 veces de C_{máx}, 6 veces de AUC_{0-último} y una depuración
- 20 significativamente menor en comparación con el compuesto RMC-6291, lo cual hace

que el ejemplo 1 sea más adecuado para tratar tipos de cáncer con mutación de RAS como un ingrediente activo oralmente terapéutico en la clínica.

Ejemplo 6

Estudios de xenoinjerto *in vivo*

- 5 El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto tumoral mutado de KRAS difícil, NCI-H2122 que es un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), al examinar la supresión tumoral posterior a la administración del ejemplo 1 y RMC-6291.

10 Los estudios se llevaron a cabo en Wuxi AppTec (Nantong, China). Todos los estudios con ratones CDX y los procedimientos relacionados con la manipulación, el cuidado y el tratamiento animal se llevaron a cabo de acuerdo con todas las normas y directrices aplicables del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) relevante. Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, y se les proporcionó comida y agua *ad libitum*.

- 15 Para estos estudios se usaron ratones nude hembras BALB/c de 6-8 semanas de vida de Vital River Co., LTD. A fin de generar tumores de xenoinjerto subcutáneos, cada ratón se inoculó en el flanco derecho con células tumorales en 200 µl de PBS y matriz de matrigel al 50 % en el flanco posterior derecho con 5×10^6 células. La salud de los ratones se controló diariamente, y las mediciones de calibre empezaron cuando los tumores fueron palpables. Las mediciones del volumen tumoral se determinaron usando la fórmula $0,5 \times L \times W^2$ en la que L se refiere a la longitud y W se refiere al ancho de cada tumor. Cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral promedio de aproximadamente 350 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento. Los ratones se trataron por sonda nasogástrica a 10 mg/kg con un vehículo que
- 20 consiste en DMSO: Soluto HS15 : agua=10:10:80 (% v/v/v) o compuestos (ejemplo 1 o RMC-6291) en vehículo a dosis indicadas. Para los estudios de eficacia, se administró a los animales por vía oral diariamente, los volúmenes tumorales y pesos corporales se midieron 3 veces por semana. El día del estudio en los diagramas de eficacia indica el día después del que se inició el tratamiento.

- 30 $TGI \text{ (inhibición de crecimiento tumoral)}\% = \frac{\text{volumen tumoral final tratado} - \text{volumen tumoral inicial tratado}}{\text{volumen tumoral final tratado con vehículo} - \text{volumen tumoral inicial tratado con vehículo}} \times 100 \%$

Regresión tumoral = $(-100 \%) \times (1 - \frac{\text{volumen tumoral final tratado}}{\text{volumen tumoral inicial tratado}})$

- 35 Crecimiento tumoral = $100 \% \times (\text{volumen tumoral final tratado} - \text{volumen tumoral inicial})$

tratado)/(volumen tumoral inicial tratado)

- La administración diaria del ejemplo 1 a 100 mg/kg fue bien tolerada en función de los pesos corporales y produjo 108 % de inhibición media de crecimiento tumoral (TGI) o -32 % de regresión tumoral después del tratamiento de 21 días en comparación con
- 5 RMC-6291 que produce solo 92 % de TGI o 35 % de crecimiento tumoral no deseado en los mismos regímenes de dosis. (Figura 2)

Tabla 2. Síntesis de eficacia *in vivo* en estudio de xenoinjerto NCI-H2122

	Volumen tumoral (mm ³ , Media/SEM)		TGI (día 21)	Regresión tumoral (día 21)	Crecimiento tumoral (día 21)
	Día 0	Día 21			
Vehículo, QD	348±26	1799±223			
RMC-6291 100mpk,QD	348±29	470±49	92 %		35 %
Ejemplo 1 100mpk, QD	348±29	237±11	108 %	-32 %	

Ejemplo 7

Ensayo de viabilidad celular

- 10 El objetivo de este ensayo celular fue determinar los efectos de compuestos de prueba sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer humano de células NCI-H358 (ATCC-CRL5807) durante un período de tratamiento de 3 días al cuantificar la cantidad de NADPH presente en el criterio de valoración usando el kit de recuento de células 8.
- 15 Las células se sembraron a 5000 células/cavidad (NCI-H358) en placas de ensayo de 96 cavidades (Corning-3699) y se incubaron durante la noche. El día del ensayo, los compuestos diluidos se agregaron luego en una concentración final de 0,5 % de DMSO. Después de 72 h de incubación, se agregó un décimo del volumen del kit de recuento de células 8 (Dnjindo-CK04) en cada cavidad. Se leyó la señal (OD450
- 20 menos OD650) usando EnVision después de 2 h de incubación. IC₅₀ se determinó al ajustar un modelo de respuesta de concentración sigmoideal de 4 parámetros.

Tabla 3. Actividad de ejemplos y compuestos de la presente invención en ensayo de viabilidad celular de KRAS

Ejemplo	G12C IC50 (nM)
Ejemplo 1	0,42
Ejemplo 2	0,44
Ejemplo 3	0,62
Ejemplo 4	0,41

Ejemplo 8

Ensayo de interacción de KRAS-BRAF con CYP A (500 nM)

En este ejemplo, TR-FRET también se usó para medir el compuesto o la interrupción dependiente del compuesto CYP A del complejo KRAS G12C-BRAF. En un amortiguador de ensayo que contiene 25mM de HEPES PH=7,4 ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico, Thermo, 15630080), 0,002 % de Tween20, 0,1 % de BSA, 100 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 10 µM de GMPPNP (hidrato de sal trisódica de [β,γ-imido]trifosfato de 5' guanosina, Sigma, G0635), CYP A sin etiquetar, proteínas 6His-KRAS cargadas con GMPPNP y GST-BRAF^{RBD} se mezclaron en una cavidad de una placa de ensayo de 384 cavidades a concentraciones finales de 50 nM, 6,25 nM y 1nM, respectivamente. El compuesto estaba presente en cavidades de placa como una serie de dilución de 3 veces de 16 puntos empezando a una concentración final de 10 µM y se incubó durante 3 horas. Luego, se agregó una mezcla de MAb Anti-6His-XL665 (Cisbio, 61HISXLB) y criptato de Mab anti-GST-TB (Cisbio, 61GSTTLB) a una concentración final de 6,67 nM y 0,21 nM, respectivamente, y la placa se incubó durante 1,5 horas más. La señal de TR-FRET se leyó en un lector de microplacas PHERstar FSX (Ex320 nm, Em 665/615 nm). Los compuestos que facilitan la interrupción del complejo KRAS-BRAF se identificaron como aquellos que producen una disminución en la relación TR-FRET con respecto a las cavidades de control de DMSO.

Tabla 4. Actividad de ejemplos y compuestos de la presente invención en ensayo de interacción de KRAS-BRAF con CYP A (500 nM)

Ejemplo	G12C IC ₅₀ (nM)
Ejemplo 1	0,50
Ejemplo 2	0,60
Ejemplo 3	0,50
Ejemplo 4	0,70

Ejemplo 9

Ensayo de inhibición de pERK

- Este ensayo mide la capacidad de compuestos de prueba para inhibir la fosforilación de ERK, la señalización corriente abajo de KRAS G12C en células NCI-H358. Las células NCI-H358 (ATCC-CRL5807) se cultivaron y mantuvieron usando medio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de penicilina/estreptomicina. El día anterior a la adición de compuesto, las células se colocaron en placas de 96 cavidades tratadas con cultivo de tejido (Corning-3699) a una densidad de 30.000 células/cavidad para NCI-H358 respectivamente y se dejaron unir durante la noche. Luego, los compuestos diluidos se agregaron en una concentración final de 0,5 % de DMSO. Después de 4 horas de incubación, el medio se retiró, se agregaron 100 µl de 4 % de formaldehído, y las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, las placas se lavaron una vez con solución salina amortiguada con fosfato (PBS), y se permeabilizaron con 100 µl de metanol enfriado durante 10 minutos. Se bloqueó el anticuerpo no específico que se unía a las placas usando 50 µl de amortiguador de bloqueo 1X BSA (Thermo-37520, dilución de 10 veces mediante solución salina amortiguada con fosfato Tween (PBST) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente.
- La cantidad de fosfor-ERK se determinó usando un anticuerpo específico para forma fosforilada de ERK. El anticuerpo primario (pERK, CST-4370, Cell Signaling Technology) se diluyó 1:300 en amortiguador de bloqueo, con alícuotas de 50 µl en cada cavidad, y se incubó durante la noche a 4 °C. Las células se lavaron cinco veces durante 5 minutos con PBST. El anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo ligado a HRP, CST-7074, Cell Signaling Technology) se diluyó 1:1000 en amortiguador de bloqueo, y se agregaron 50 µl a cada cavidad y se incubó 1-2 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron 5 veces durante 5 minutos con PBST, se agregaron 100 µl de sustrato TMB ELISA (abcam-ab171523) y se agitaron suavemente durante

20 minutos. Se agregaron 50 µl de solución de detención (abcam-ab171529) y luego se leyó la señal (OD450) mediante EnVision.

IC₅₀ se determinó al ajustar un modelo de respuesta de concentración sigmoideal de 4 parámetros.

5 **Tabla 5. Actividad de los ejemplos y compuestos de la presente invención en ensayo de inhibición de KRAS pERK**

Ejemplo	G12C IC₅₀ (nM)
Ejemplo 1	1,54
Ejemplo 2	0,96
Ejemplo 3	2,31
Ejemplo 4	1,29