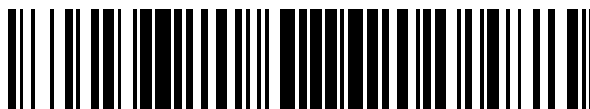


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 532**

51 Int. Cl.:

C07D 333/60 (2006.01)
C07D 409/12 (2006.01)
C07D 498/04 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01)
A61K 31/385 (2006.01)
A61K 31/424 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2017** **PCT/US2017/054688**
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018** **WO18067423**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2017** **E 17784507 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021** **EP 3523287**

54 Título: **Compuestos de benzo[b]tiofeno como agonistas de STING**

30 Prioridad:

04.10.2016 US 201662404062 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2022

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US

72 Inventor/es:

ALTMAN, MICHAEL, D.;
CASH, BRANDON, D.;
CHANG, WONSUK;
CUMMING, JARED, N.;
HAIDLE, ANDREW, M.;
HENDERSON, TIMOTHY, J.;
JEWELL, JAMES, P.;
LARSEN, MATTHEW, A.;
LIANG, RUI;
LIM, JONGWON;
LU, MIN;
OTTE, RYAN, D.;
SIU, TONY;
TROTTER, BENJAMIN WESLEY y
TYAGARAJAN, SRIRAM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 893 532 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de benzo[b]tiofeno como agonistas de STING

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a compuestos y derivados de los mismos que pueden ser útiles como agonistas de STING (estimulador de genes de interferón) que activan la ruta de STING. La presente divulgación también se refiere a procesos para la síntesis y usos de dichos compuestos.

10 REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO ELECTRÓNICAMENTE

El Listado de secuencias de la presente solicitud se envía electrónicamente a través de EFS-Web como un Listado de secuencias con formato ASCII, con el nombre de archivo "24170_SEQLIST-OCT2017", con fecha de creación del 24 de agosto de 2017, y un tamaño de 25 KB. Este Listado de secuencias enviado a través de EFS-Web forma parte de la memoria descriptiva y se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario ha evolucionado para reconocer y neutralizar diferentes tipos de amenazas con el fin de mantener la homeostasis del huésped, y generalmente se divide en dos grupos: adaptativo e innato. El sistema inmunitario adaptativo está especializado en reconocer como extraños aquellos antígenos que no se expresan de forma natural en el huésped y en organizar una respuesta antiantígeno a través de las acciones coordinadas de muchos subconjuntos de leucocitos. El sello distintivo de las respuestas inmunitarias adaptativas es su capacidad para proporcionar "memoria" o inmunidad duradera contra el antígeno encontrado. Si bien este efecto específico y duradero es fundamental para la salud y la supervivencia del huésped, la respuesta inmunitaria adaptativa requiere tiempo para generar una respuesta completa.

El sistema inmunitario innato compensa este retraso de tiempo y está especializado en actuar rápidamente contra diferentes insultos o señales de peligro. Proporciona la primera línea de defensa contra bacterias, virus, parásitos y otras amenazas infecciosas, pero también responde enérgicamente a determinadas señales de peligro asociadas con daños celulares o tisulares. El sistema inmunitario innato no tiene especificidad de antígenos, pero responde a diversos mecanismos efectores. La opsonización, la fagocitosis, la activación del sistema del complemento y la producción de moléculas bioactivas solubles tales como las citocinas o las quimiocinas son todos mecanismos mediante los cuales el sistema inmunitario innato media en su respuesta. Al responder a estos patrones moleculares asociados a daños (DAMP, por sus siglas en inglés) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) descritos anteriormente, el sistema inmunitario innato es capaz de proporcionar una amplia protección contra una amplia gama de amenazas al huésped.

El ADN y ARN citosólicos libres se encuentran entre estos PAMP y DAMP. Recientemente se ha demostrado que el principal sensor de ADN citosólico es cGAS (GMP-AMP sintasa cíclica). Tras el reconocimiento del ADN citosólico, cGAS cataliza la generación del dinucleótido cíclico 2'3'-cGAMP, un segundo mensajero atípico que se une fuertemente a la proteína adaptadora transmembrana del RE STING. STING unida a cGAMP experimenta un cambio conformacional, que se transloca a un compartimento perinuclear e induce la activación de los factores de transcripción críticos IRF-3 y NF-κB. Esto conduce a una fuerte inducción de interferones de tipo I y a la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-6, TNF-α e IFN-γ.

Se ha establecido muy bien la importancia de los interferones de tipo I y las citocinas proinflamatorias en diversas células del sistema inmunitario. En particular, estas moléculas potencian fuertemente la activación de linfocitos T mejorando la capacidad de las células dendríticas y los macrófagos para captar, procesar, presentar y presentar de forma cruzada antígenos contra los linfocitos T. La capacidad estimuladora de linfocitos T de estas células presentadoras de antígenos aumenta mediante la regulación positiva de moléculas coestimuladoras críticas, tales como CD80 o CD86. Finalmente, los interferones de tipo I pueden activar rápidamente sus receptores afines y desencadenar la activación de genes sensibles a interferón que pueden contribuir significativamente a la activación de las células inmunitarias adaptativas.

Desde una perspectiva terapéutica, se ha demostrado que los interferones de tipo I tienen actividades antivirales inhibiendo directamente el virus de la hepatitis B humana y la replicación del virus de la hepatitis C, y estimulando las respuestas inmunitarias a las células infectadas por virus. Los compuestos que pueden inducir la producción de interferón de tipo I se usan en vacunas, donde actúan como adyuvantes, mejorando las respuestas inmunitarias específicas a los antígenos y minimizando los efectos secundarios al reducir la dosis y ampliar la respuesta inmunitaria.

Además, los interferones y los compuestos que pueden inducir la producción de interferón tienen un uso potencial en el tratamiento de cánceres humanos. Dichas moléculas son potencialmente útiles como agentes anticancerosos con múltiples vías de actividad. Los interferones pueden inhibir la proliferación de células tumorales humanas directamente y pueden ser sinérgicos con diversos agentes quimioterapéuticos aprobados. Los interferones de tipo I pueden mejorar

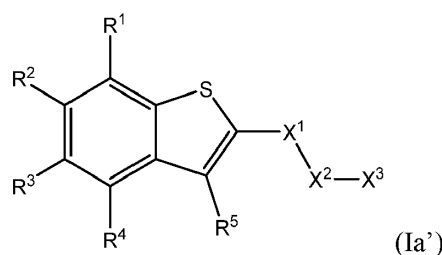
significativamente las respuestas inmunitarias antitumorales al inducir la activación de las células inmunitarias tanto adaptativas como innatas. Finalmente, los interferones pueden inhibir la invasividad tumoral al modular la expresión enzimática relacionada con la remodelación tisular.

En vista del potencial de los interferones de tipo I y los compuestos inductores de interferón de tipo I como agentes antivirales y anticancerosos, sigue existiendo la necesidad de nuevos agentes que puedan inducir una potente producción de interferón de tipo I. Con la creciente cantidad de datos que demuestran que la vía sensorial del ADN citosólico de cGAS-STING tiene una capacidad significativa para inducir interferones de tipo I, el desarrollo de agentes activadores de STING está ocupando rápidamente un lugar importante en el panorama actual de la terapia antitumoral.

El documento WO 2015/077354 desvela compuestos que son agonistas de STING.

Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere a compuestos novedosos de fórmula general (Ia'). En particular, la presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la fórmula estructural general (Ia'):



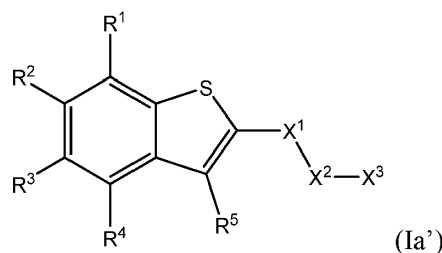
o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como se describe en el presente documento. Las realizaciones de la divulgación incluyen compuestos de fórmula general (Ia') y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, así como la síntesis y el aislamiento de compuestos de fórmula general (Ia') y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. También se desvelan los usos de compuestos de fórmula general (Ia').

Otras realizaciones, aspectos y características de la presente divulgación se describen adicionalmente o serán evidentes a partir de la siguiente descripción, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación incluye compuestos de fórmula general (Ia') y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Estos compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser útiles como agentes para inducir respuestas inmunitarias, para inducir la producción de interferón de tipo I dependiente de STING y/o para tratar un trastorno de proliferación celular.

Una primera realización se refiere a compuestos de fórmula general (Ia'):



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que

R¹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C₁-C₃ y haloalquilo C₁-C₃;

R² se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, Oalquilo C₁-C₃, Ohaloalquilo C₁-C₃, OH, alquenilo C₂-C₃, alquinilo C₂-C₃, N(alquilo C₁-C₃)₂, NH(alquilo C₁-C₃), Salquilo C₁-C₃;

R³ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, Oalquilo C₁-C₃, Ohaloalquilo C₁-C₃, OH, alquenilo C₂-C₃, alquinilo C₂-C₃, N(alquilo C₁-C₃)₂, NH(alquilo C₁-C₃), Salquilo C₁-C₃;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₃;

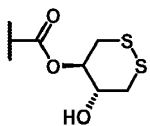
R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, OR^6 , alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 ;

cada R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 y haloalquilo C_1-C_4 ;

X^1 es $C(O)$;

X^2 es CHR^8CHR^8 ;

X^3 se selecciona del grupo que consiste en $COOR^6$,



SO_2R^6 y $C(O)N(R^9)_2$, donde cada R^9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, $COOR^6$ y SO_2R^6 ;

cada R^8 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 sustituido por OH, alquilo C_1-C_4 sustituido por Oalquilo C_1-C_3 y cicloalquilo C_3-C_6 , y donde opcionalmente 2 R^8 se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 a 6 miembros;

en la que, cuando $X^1-X^2-X^3$ es $X^1-CHR^8CH_2-X^3$, al menos uno de R^2 y R^3 no se selecciona del grupo que consiste en halógeno, Oalquilo C_1-C_3 , Ohaloalquilo C_1-C_3 , OH, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 .

En un primer aspecto de la primera realización, R^1 se selecciona del grupo que consiste en H y F. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior.

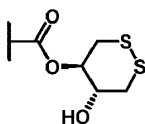
En un segundo aspecto de la primera realización, R^2 se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 y $NHCH_3$. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer aspecto descrito anteriormente.

En un tercer aspecto de la primera realización, R^3 se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 y $NHCH_3$. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer a segundo aspectos descritos anteriormente.

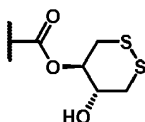
En un cuarto aspecto de la primera realización, R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 . En casos particulares de este aspecto, R^4 se selecciona del grupo que consiste en H y F. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer a tercer aspectos descritos anteriormente.

En un quinto aspecto de la primera realización, R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 . En casos particulares de este aspecto, R^5 se selecciona del grupo que consiste en H y Cl. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer a cuarto aspectos descritos anteriormente.

En un séptimo aspecto de la primera realización, X^3 se selecciona del grupo que consiste en $COOR^6$ y



En casos incluso más particulares de este aspecto, X^3 se selecciona del grupo que consiste en $COOH$, $COOC(CH_3)_3$ y



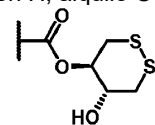
En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda

realización anterior o el primer a sexto aspectos descritos anteriormente.

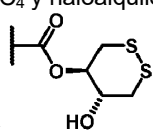
En un octavo aspecto de la primera realización, cada R^9 es independientemente H. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer a séptimo aspectos descritos anteriormente.

En un noveno aspecto de la primera realización, X^2 es CH_2CHR^8 , donde R^8 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 sustituido por OH, alquilo C_1-C_4 sustituido por Oalquilo C_1-C_4 y cicloalquilo C_3-C_6 . En apariciones particulares de este primer caso, X^2 es CH_2CHR^8 , en la que R^8 se selecciona del grupo que consiste en H, CH_3 , CH_2OH , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, CH_2OCH_3 y ciclopropilo. En un segundo caso de este aspecto, X^2 es CHR^8CHR^8 , donde R^8 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 sustituido por OH, alquilo C_1-C_4 sustituido por Oalquilo C_1-C_4 y cicloalquilo C_3-C_6 , y opcionalmente 2 R^8 se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 a 6 miembros. En apariciones particulares de este segundo caso, X^2 es CHR^8CHR^8 , donde R^8 se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C_1-C_4 , y opcionalmente 2 R^8 se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 a 6 miembros. En apariciones específicas de este segundo caso, X^2 es CHR^8CHR^8 , donde los 2 R^8 se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 miembros. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer a octavo aspectos descritos anteriormente.

En un décimo aspecto de la primera realización, R^1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 ; R^2 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_1-C_3 , haloalquilo C_1-C_3 , Oalquilo C_1-C_3 , Ohaloalquilo C_1-C_3 , OH, alqueno C_2-C_3 , alquino C_2-C_3 , $N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, $NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$ y Salquilo C_1-C_3 ; R^3 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_1-C_3 , haloalquilo C_1-C_3 , Oalquilo C_1-C_3 , Ohaloalquilo C_1-C_3 , OH, alqueno C_2-C_3 , alquino C_2-C_3 , $N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, $NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$ y Salquilo C_1-C_3 ; R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 ; R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 ; cada R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-

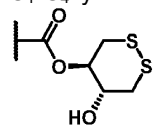


C_4 y haloalquilo C_1-C_4 ; X^1 es $C(O)$; X^2 es CH_2CHR^8 ; X^3 se selecciona del grupo que consiste en $COOR^6$, SO_2R^6 y $C(O)N(R^9)_2$, donde cada R^9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, $COOR^6$ y SO_2R^6 ; y R^8 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 sustituido por OH, alquilo C_1-C_4 sustituido por Oalquilo C_1-C_4 y cicloalquilo C_3-C_6 . En casos de este aspecto, R^1 se selecciona del grupo que consiste en H y F; R^2 se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 y $NHCH_3$; R^3 se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 y $NHCH_3$; R^4 se selecciona del grupo que consiste en H y F; R^5 se selecciona del grupo que consiste en H y Cl; cada R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 y haloalquilo C_1-C_4 ; X^1 es $C(O)$; X^2 es CH_2CHR^8 ; X^3 se selecciona del grupo



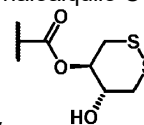
que consiste en $COOH$, $COOC(CH_3)_3$ y SO_2R^6 ; y R^8 se selecciona del grupo que consiste en H, CH_3 , CH_2OH , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, $CH(CH_3)_2$, CH_2OCH_3 y ciclopropilo. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior.

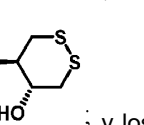
En un decimoprimer aspecto de la primera realización, R^1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 ; R^2 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_1-C_3 , haloalquilo C_1-C_3 , Oalquilo C_1-C_3 , Ohaloalquilo C_1-C_3 , OH, alqueno C_2-C_3 , alquino C_2-C_3 , $N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, $NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$ y Salquilo C_1-C_3 ; R^3 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_1-C_3 , haloalquilo C_1-C_3 , Oalquilo C_1-C_3 , Ohaloalquilo C_1-C_3 , OH, alqueno C_2-C_3 , alquino C_2-C_3 , $N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, $NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$ y Salquilo C_1-C_3 ; R^4 se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 ; R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, OR^6 , alquilo C_1-C_3 y haloalquilo C_1-C_3 ; cada R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 y haloalquilo C_1-C_4 ; X^1 es $C(O)$; X^2 es CHR^8CHR^8 ; X^3 se selecciona del grupo que consiste en $COOR^6$,

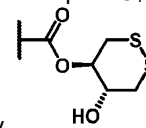


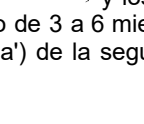
SO_2R^6 y $C(O)N(R^9)_2$, donde cada R^9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, $COOR^6$ y SO_2R^6 ; y cada R^8 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 sustituido por OH, alquilo C_1-C_4 sustituido por Oalquilo C_1-C_4 y cicloalquilo C_3-C_6 , y donde opcionalmente 2 R^8 se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 a 6 miembros. En casos de este aspecto, R^1 se selecciona del grupo que consiste en H y F; R^2 se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, CH_2CH_2F , $CH=CH_2$, $C\equiv CH$, OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , $OCHF_2$, SCH_3 y $NHCH_3$; R^3 se selecciona del grupo

que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C≡CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃; R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y F; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H y Cl; cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄; X¹ es C(O);

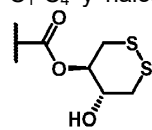


X² es CHR⁸CHR⁸; X³ se selecciona del grupo que consiste en COOH, COOC(CH₃)₃ y ; y cada R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₄. En casos adicionales de este aspecto, R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y F; R² se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C≡CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃; R³ se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C≡CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃; R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y F; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H y Cl; cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄; X¹ es C(O); X² es

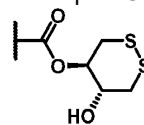


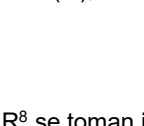
CHR⁸CHR⁸; X³ se selecciona del grupo que consiste en COOH, COOC(CH₃)₃ y ; y los 2 R⁸ se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 a 6 miembros. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior.

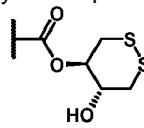
En un decimosegundo aspecto de la primera realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C₁-C₃ y haloalquilo C₁-C₃; R² se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, Oalquilo C₁-C₃, Ohaloalquilo C₁-C₃, OH, alqueno C₂-C₃, alquino C₂-C₃, N(alquilo C₁-C₃)₂, NH(alquilo C₁-C₃) y Salquilo C₁-C₃; R³ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, Oalquilo C₁-C₃, Ohaloalquilo C₁-C₃, OH, alqueno C₂-C₃, alquino C₂-C₃, N(alquilo C₁-C₃)₂, NH(alquilo C₁-C₃) y Salquilo C₁-C₃; R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C₁-C₃ y haloalquilo C₁-C₃; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, OR⁶, alquilo C₁-C₃ y haloalquilo C₁-C₃; cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄; X¹ es C(O); X² es CH₂C(R⁸)₂; X³ se selecciona del grupo que consiste en COOR⁶,

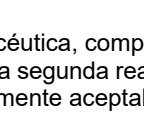


, SO₂R⁶ y C(O)N(R⁹)₂, donde cada R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, COOR⁶ y SO₂R⁶; y cada R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H, OH, alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ sustituido por OH, alquilo C₁-C₄ sustituido por Oalquilo C₁-C₄ y cicloalquilo C₃-C₆, y donde opcionalmente 2 R⁸ se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un espirociclo de 3 a 6 miembros. En casos de este aspecto, R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y F; R² se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C≡CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃; R³ se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C≡CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃; R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y F; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H y Cl; cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄; X¹ es C(O);



X² es CH₂C(R⁸)₂; X³ se selecciona del grupo que consiste en COOH, COOC(CH₃)₃ y ; y cada R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H, OH y CH₃. En casos adicionales de este aspecto, R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y F; R² se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C≡CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃; R³ se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C≡CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃; R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y F; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H y Cl; cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄; X¹ es C(O); X² es CH₂C(R⁸)₂; X³



se selecciona del grupo que consiste en COOH, COOC(CH₃)₃ y ; y los 2 R⁸ se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un espirociclo de 3 a 6 miembros. En este aspecto, todos los demás grupos son como se proporcionan en la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior.

Un decimotercer aspecto de la primera realización se refiere a una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición farmacéutica (a) un compuesto de acuerdo con la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer a decimosegundo aspectos descritos anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un decimocuarto aspecto de la primera realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula general (Ia') de la segunda realización anterior o el primer a decimosegundo aspectos descritos anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

5 Un decimoquinto aspecto de la primera realización se refiere a una composición de acuerdo con el decimotercer aspecto descrito anteriormente para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

10 Un decimosexto aspecto de la primera realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula general (Ia') de la primera realización anterior o el primer a decimosegundo aspectos descritos anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

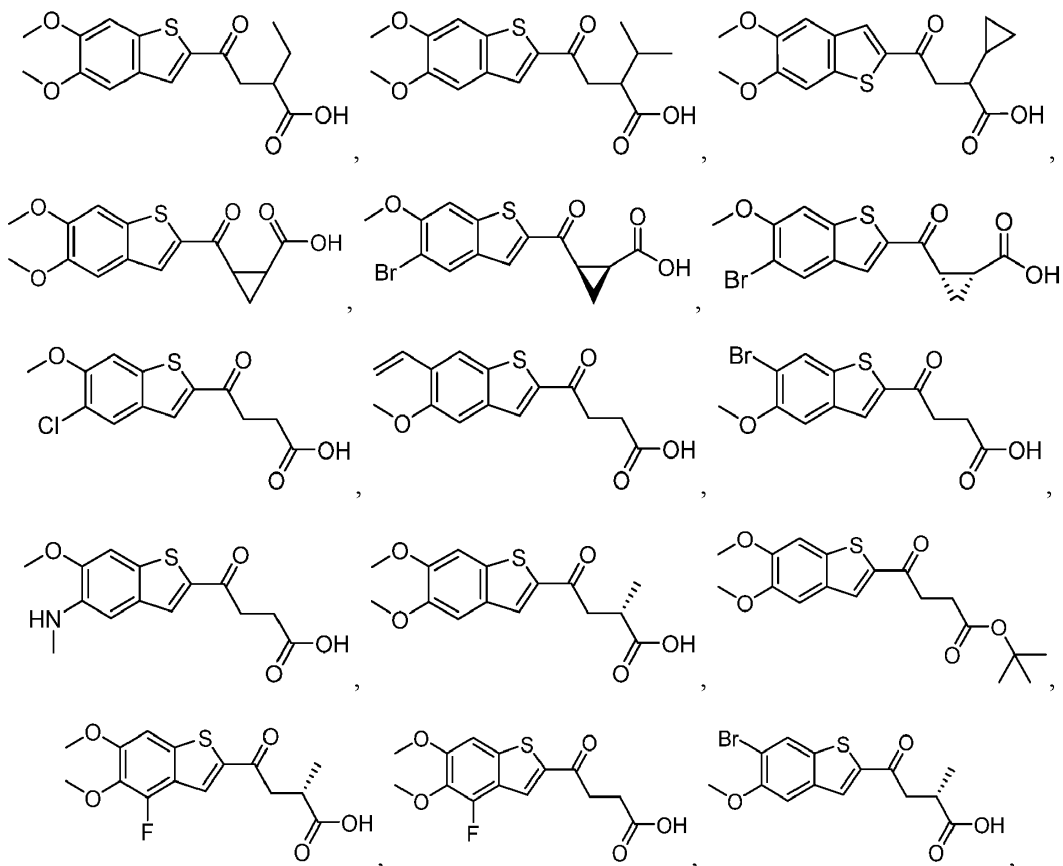
15 Un decimoséptimo aspecto de la primera realización se refiere a una composición de acuerdo con el decimotercer aspecto descrito anteriormente para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

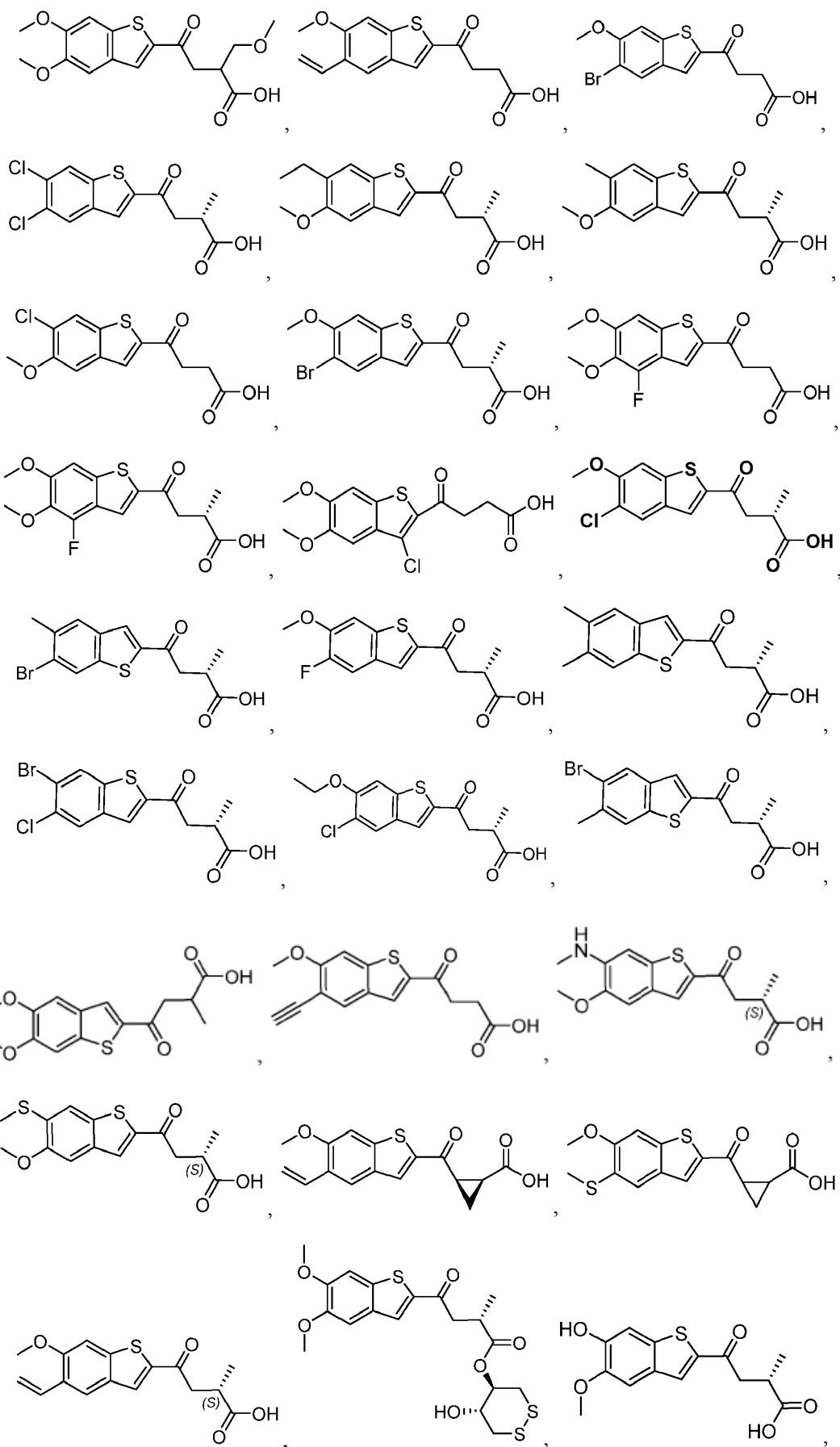
20 Un decimoctavo aspecto de la primera realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula general (Iaa) de la segunda realización anterior o el primer a decimosegundo aspectos descritos anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de citocinas dependiente de STING.

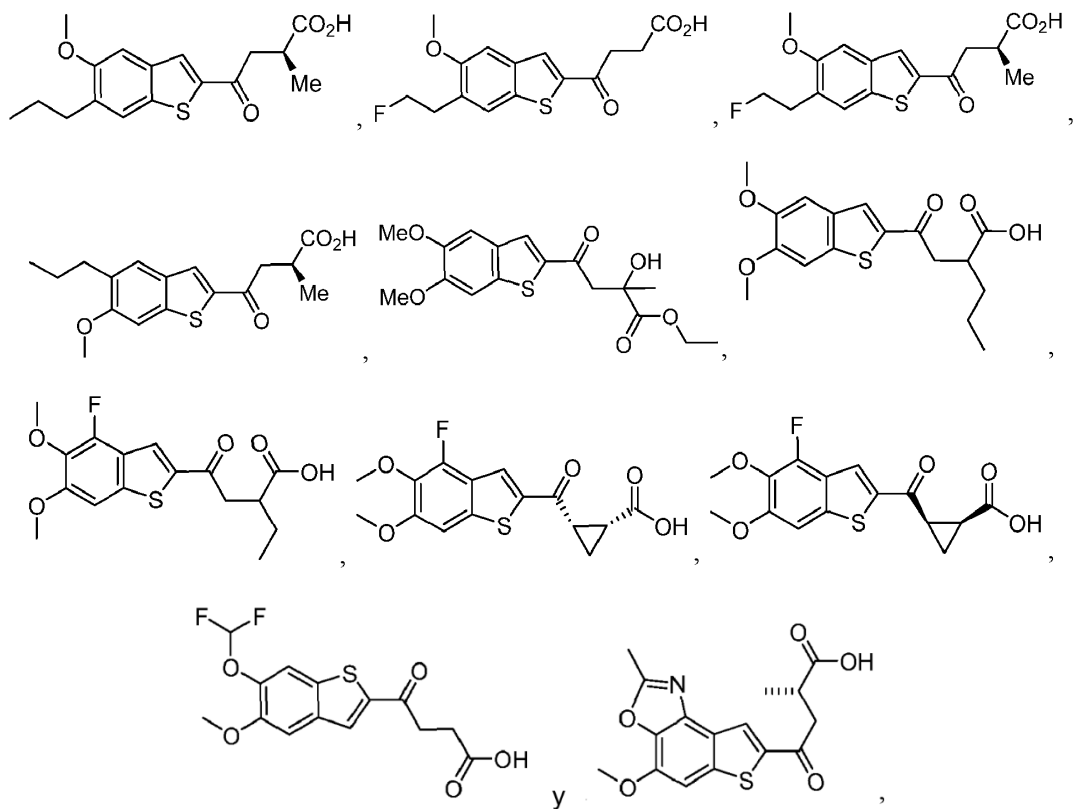
25 Un decimonoveno aspecto de la primera realización se refiere a una composición de acuerdo con el decimotercer aspecto descrito anteriormente para su uso en la inducción de la producción de citocinas dependiente de STING en un sujeto.

30 En cada aspecto de la primera realización descrita en el presente documento, las variables R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁸, R⁹, X¹, X² y X³ de fórmula general (Ia'), y los diversos aspectos y casos de los mismos, se seleccionan cada uno independientemente entre sí, con la condición de que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁸ y R⁹ no sea H.

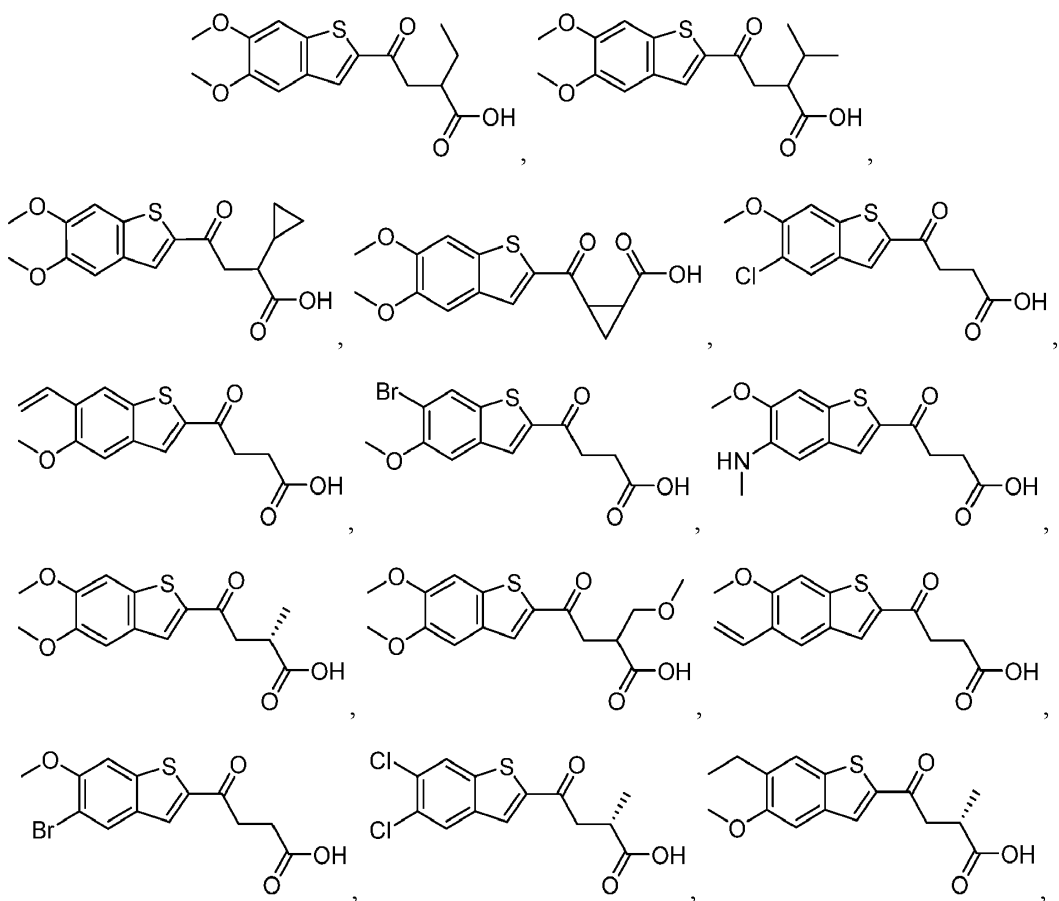
Una segunda realización se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

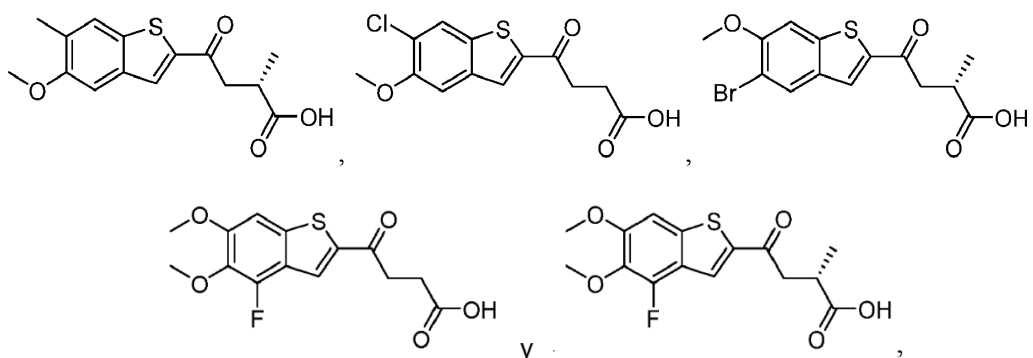




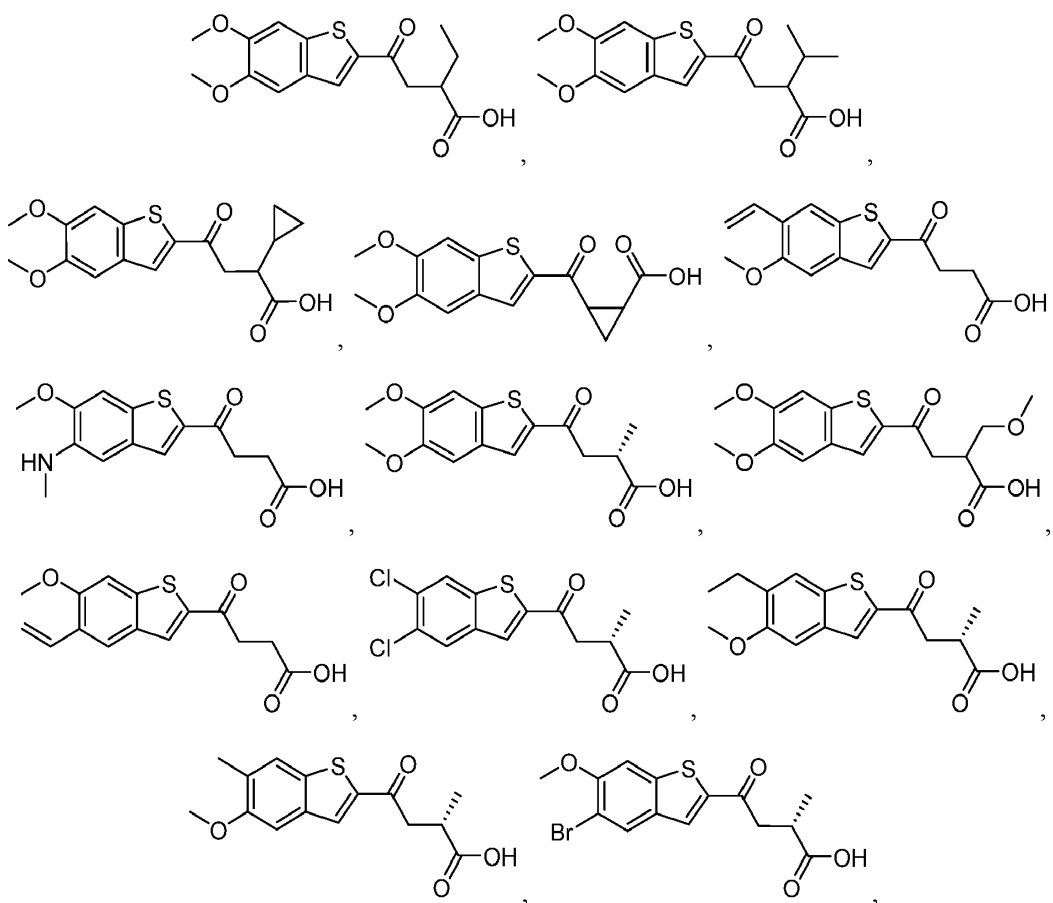


10 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En aspectos de esta séptima realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en

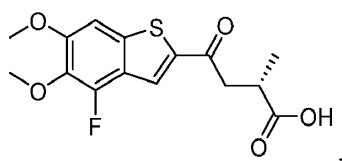




5 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En aspectos adicionales de esta realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en



20 y



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

25 Un primer aspecto de la segunda realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la segunda realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

Un segundo aspecto de la segunda realización se refiere a una composición que comprende un compuesto de acuerdo

con la segunda realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

Un tercer aspecto de la segunda realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la segunda realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

Un cuarto aspecto de la segunda realización se refiere a una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la segunda realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

Un quinto aspecto de la segunda realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la segunda realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de citocinas dependiente de STING.

Un sexto aspecto de la segunda realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la segunda realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de una producción de citocinas dependiente de STING.

Una tercera realización se refiere a un compuesto seleccionado de las especies de ejemplo representadas en los Ejemplos 1 a 54 que se muestran a continuación.

Un primer aspecto de la tercera realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la tercera realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

Un segundo aspecto de la tercera realización se refiere a una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la tercera realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

Un tercer aspecto de la tercera realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la tercera realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

Un cuarto aspecto de la tercera realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la tercera realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

Un quinto aspecto de la tercera realización se refiere a un compuesto de acuerdo con la tercera realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de citocinas dependiente de STING.

Un sexto aspecto de la tercera realización se refiere a una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la tercera realización anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de citocinas dependiente de STING.

Otras realizaciones de la presente divulgación incluyen lo siguiente:

(b) Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula general (Ia'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

(f) La composición farmacéutica del punto (b), que comprende además un principio activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos agonistas de STING, compuestos antivirales, antígenos, adyuvantes, antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1 y otros agentes inmunomoduladores, lípidos, liposomas, péptidos, agentes anticancerosos y quimioterapéuticos.

(j) Una combinación farmacéutica, es decir, (i) un compuesto de fórmula general (Ia'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (ii) un principio activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos agonistas de STING, compuestos antivirales, antígenos, adyuvantes, antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1 y otros agentes inmunomoduladores, lípidos, liposomas, péptidos, agentes anticancerosos y quimioterapéuticos; en la que el compuesto de fórmula general (Ia'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el principio activo se emplean cada uno en una cantidad que hace que la combinación sea eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en un paciente.

(n) Un compuesto de fórmula general (Ia'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

(t) Una composición del punto (b), una composición del punto (f), o una combinación del punto (j) para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

(x) Un compuesto de fórmula general (Ia'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

(d1) Una composición del punto (b), una composición del punto (f), o una combinación del punto (j) para su uso en la inducción de la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

(h1) Un compuesto de fórmula general (Ia'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inducción de la producción de citocinas dependiente de STING.

(n1) Una composición del punto (b), una composición del punto (f), o una combinación del punto (j) para su uso en la inducción de la producción de citocinas dependiente de STING.

(s1) Un compuesto de fórmula general (Ia'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el sujeto para su uso en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular;

(t1) El compuesto para su uso del punto (s1), en el que el trastorno de proliferación celular es cáncer.

(e2) Una composición del punto (b), una composición del punto (f), o una combinación del punto (j) para su uso en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular.

(f2) La realización del punto (e2), en la que el trastorno de proliferación celular es cáncer.

La presente divulgación también incluye un compuesto de la presente divulgación para uso (i) en, (ii) como medicamento para, o (iii) en la preparación de un medicamento para: (a) inducir una respuesta inmunitaria en un paciente, o (b) inducir la producción de citocinas dependiente de STING en un paciente. En estos usos, los compuestos de la presente divulgación se pueden emplear opcionalmente en combinación con uno o más principios activos seleccionados de compuestos agonistas de STING, compuestos antivirales, antígenos, adyuvantes, antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1 y otros agentes inmunomoduladores, lípidos, liposomas, péptidos, agentes anticancerosos y agentes quimioterapéuticos.

Las realizaciones adicionales de la divulgación incluyen las composiciones farmacéuticas, combinaciones y métodos expuestos en los puntos (a) a (j2) anteriores y los usos expuestos en el párrafo anterior, en las que el compuesto de la presente divulgación empleado en la misma es un compuesto de una de las realizaciones, aspectos, casos, apariciones o características de los compuestos descritos anteriormente. En todas estas realizaciones, el compuesto puede usarse opcionalmente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, según sea adecuado.

En las realizaciones del compuesto proporcionado anteriormente, debe entenderse que cada realización puede combinarse con una o más realizaciones diferentes, en la medida en que dicha combinación proporcione un compuesto estable y sea coherente con la descripción de las realizaciones. Debe entenderse además que las realizaciones de composiciones y métodos proporcionados como los puntos (a) a (j2) anteriores incluyen todas las realizaciones de los compuestos, incluyendo dichas realizaciones como resultado de combinaciones de realizaciones.

El término "sujeto" (como alternativa, "paciente"), como se usa en el presente documento, se refiere a un mamífero que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento. El mamífero puede ser macho o hembra. El mamífero puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en seres humanos, bovinos (por ejemplo, vacas), porcinos (por ejemplo, cerdos), ovinos (por ejemplo, ovejas), caprinos (por ejemplo, cabras), equinos (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros domésticos), felinos (por ejemplo, gatos domésticos), Lagomorpha (conejos), roedores (por ejemplo, ratas o ratones), Procyon lotor (por ejemplo, mapaches). En realizaciones particulares, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere a uno cualquiera o más de los siguientes: respuesta inmunitaria específica, respuesta inmunitaria no específica, respuesta tanto específica como no específica, respuesta innata, respuesta inmunitaria primaria, inmunidad adaptativa, respuesta inmunitaria secundaria, respuesta inmunitaria de memoria, activación de células inmunitarias, proliferación de células inmunitarias, diferenciación de células inmunitarias y expresión de citocinas. En determinadas realizaciones, un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, se administra junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales que incluyen compuestos antivirales, vacunas destinadas a estimular una respuesta inmunitaria en uno o más antígenos predeterminados, adyuvantes, antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1 y otros agentes inmunomoduladores, lípidos, liposomas, péptidos, agentes anticancerosos y agentes quimioterapéuticos, etc. En determinadas realizaciones, un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, se administra junto con una o más composiciones adicionales que incluyen compuestos antivirales, vacunas destinadas a estimular una respuesta inmunitaria en uno o más antígenos predeterminados, adyuvantes, antagonistas de la vía CTLA-4 y PD-1 y otros agentes inmunomoduladores, lípidos, liposomas, péptidos, agentes anticancerosos y agentes quimioterapéuticos, etc.

Compuestos

El término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarburo alifático saturado monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene varios átomos de carbono en el intervalo especificado. Por lo tanto, por ejemplo, "alquilo C₁₋₆" (o "alquilo C₁-C₆") se refiere a cualquiera de los isómeros de hexil alquilo y pentil alquilo, así como a n-, iso-, sec- y *terc*-butilo, n- e iso-propilo, etilo y metilo. Como otro ejemplo, "alquilo C₁₋₄" se refiere a n-, iso-, sec- y *terc*-butilo, n- e isopropilo, etilo y metilo.

Como se usa en el presente documento, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarburo alifático saturado bivalente de cadena lineal que tiene varios átomos de carbono en el intervalo especificado.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo alifático insaturado monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene varios átomos de carbono en el intervalo especificado y que incluye uno o más dobles enlaces.

- 10 Como se usa en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo alifático insaturado bivalente de cadena lineal que tiene varios átomos de carbono en el intervalo especificado y que incluye uno o más dobles enlaces.

- 15 Como se usa en el presente documento, el término "alquino" se refiere a un radical hidrocarburo alifático insaturado monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene varios átomos de carbono en el intervalo especificado y que incluye uno o más triples enlaces.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "alquino" se refiere a un radical hidrocarburo alifático insaturado bivalente de cadena lineal que tiene varios átomos de carbono en el intervalo especificado y que incluye uno o más triples enlaces.

El término "halógeno" (o "halo") se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo (como alternativa, denominados flúor, cloro, bromo y yodo o F, Cl, Br y I).

- 25 El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente en el que uno o más de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por un halógeno. Por lo tanto, por ejemplo, "haloalquilo C₁₋₆" (o "haloalquilo C_{1-C6}") se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado de C₁ a C₆ como se ha definido anteriormente con uno o más sustituyentes de halógeno. El término "fluoroalquilo" tiene un significado análogo excepto que los sustituyentes de halógeno están restringidos al flúor. Los fluoroalquilos adecuados incluyen la serie (CH₂)₀₋₄CF₃ (es decir, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 3,3,3-trifluoro-n-propilo, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "haloalqueno" se refiere a un grupo alqueno como se ha definido anteriormente en el que uno o más de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por un halógeno.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "haloalquino" se refiere a un grupo alquino como se ha definido anteriormente en el que uno o más de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por un halógeno.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxi", como se usa en el presente documento, en solitario o en combinación, incluye un grupo alquilo conectado al átomo de conexión a oxígeno. El término "alcoxi" también incluye grupos alquilo éter, donde el término "alquilo" se ha definido anteriormente, y "éter" significa dos grupos alquilo con un átomo de oxígeno entre ellos. Los ejemplos de grupos alcoxi adecuados incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, s-butoxi, t-butoxi, metoximetano (también denominado como "éter dimetilico") y metoxietano (también denominado como "etil metil éter").

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado que contiene un anillo que tiene un número especificado de átomos de carbono. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

- 50 Como se usa en el presente documento, el término "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico", como se usa en el presente documento, representa un monocíclico estable de 3 a 6 miembros que está saturado o insaturado, y que consta de átomos de carbono y de uno a dos heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O y S. El anillo heterocíclico puede estar unido a cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable. El término incluye restos heteroarilo. Los ejemplos de dichos elementos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, azepinilo, bencimidazolilo, benzoisoxazolilo, benzofurazanilo, benzopirranilo, benzotipirranilo, benzofurilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzoxazolilo, cromanilo, cinolinilo, dihidrobenzofurilo, dihidrobenzotienilo, dihidrobenzotipirranilo, dihidrobenzotipirranil sulfona, 1,3-dioxolanilo, furilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, indolinilo, indolilo, isocromanilo, isoindolinilo, isoquinolinilo, isotiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, morfolinilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, piperidilo, piperazinilo, piridilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, quinoxalinilo, tetrahidrofurilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tiamorfolinilo, sulfóxido de tiamorfolinilo, tiazolilo, tiazolinilo, tienofurilo, tienotienilo, triazolilo y tienilo.

- 65 Como se usa en el presente documento, la expresión "anillo condensado" se refiere a un grupo cíclico formado por sustituyentes en átomos separados en un alcano lineal o ramificado, o a un grupo cíclico formado por sustituyentes en átomos separados en otro anillo.

Como se usa en el presente documento, el término "espirociclo" o la expresión "anillo espirocíclico" se refieren a un

grupo cíclico colgante formado por sustituyentes en un solo átomo.

A menos que se indique expresamente lo contrario, todos los intervalos citados en el presente documento son inclusivos; es decir, el intervalo incluye los valores para los límites superior e inferior del intervalo, así como todos los valores entre ellos. Como ejemplo, los intervalos de temperatura, porcentajes, los intervalos de equivalentes y similares descritos en el presente documento incluyen los límites superior e inferior del intervalo y cualquier valor en el continuo entre ellos. Los valores numéricos proporcionados en el presente documento, y el uso del término "aproximadamente", pueden incluir variaciones de $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 15\%$ y $\pm 20\%$ y sus equivalentes numéricos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "uno o más" elementos incluye un solo elemento seleccionado de la lista, así como mezclas de dos o más elementos seleccionados de la lista.

En los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), y sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, los átomos pueden mostrar sus abundancias isotópicas naturales o uno o más de los átomos pueden estar artificialmente enriquecidos en un isótopo particular que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra predominantemente en la naturaleza. La presente divulgación pretende incluir todas las variaciones isotópicas adecuadas de los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), y sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores. Por ejemplo, las diferentes formas isotópicas del hidrógeno (H) incluyen protio (^1H), deuterio (^2H) y tritio (^3H). El protio es el isótopo del hidrógeno predominante en la naturaleza. El enriquecimiento en deuterio puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas, tales como aumentar la semivida *in vivo* o reducir los requisitos de dosificación, o puede proporcionar un compuesto útil como patrón para la caracterización de muestras biológicas. Los compuestos enriquecidos isotópicamente de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), y sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, pueden prepararse sin una experimentación excesiva mediante técnicas convencionales bien conocidas de los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos en los Esquemas y Ejemplos del presente documento usando reactivos y compuestos intermedios isotópicamente enriquecidos apropiados.

En realizaciones particulares de los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), y sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, los compuestos están enriquecidos isotópicamente con deuterio. En aspectos de estas realizaciones, uno o más de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^8 y R^9 pueden incluir deuterio.

Como se muestra en las fórmulas estructurales generales y las estructuras de compuestos específicos que se proporcionan en el presente documento, una línea recta en un centro quiral incluye tanto estereoisómeros (R) como (S) y mezclas de los mismos. Además, a menos que se especifique de otro modo (por ejemplo, compuesto purificado al 100 %), la referencia a una estereoquímica particular en una posición proporciona un compuesto que tiene la estereoquímica indicada pero no excluye la presencia de estereoisómeros que tengan una estereoquímica diferente en la posición indicada.

La mención o descripción de un compuesto específico en las reivindicaciones (es decir, una especie) sin una designación de estereoconfiguración específica, o con una designación de este tipo para menos de la totalidad de los centros quirales, pretende abarcar, para dichos centros quirales no designados, el racemato, mezclas racémicas, cada enantiómero individual, una mezcla diastereoisomérica y cada diastereómero individual del compuesto donde tales formas sean posibles debido a la presencia de uno o más centros asimétricos. La separación de una mezcla de estereoisómeros se puede realizar en una etapa intermedia durante la síntesis de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, o se puede hacer en un producto racémico final. La estereoquímica absoluta puede determinarse mediante cristalografía por rayos X de productos cristalinos o intermedios cristalinos, que se derivatizan, si es necesario, con un reactivo que contiene un centro estereogénico de configuración conocida. Como alternativa, la estereoquímica absoluta puede determinarse por análisis de espectroscopía de dicroísmo circular vibracional (VCD). La presente invención incluye todos estos isómeros, así como sales, solvatos (incluyendo hidratos) y sales solvatadas de dichos racematos, enantiómeros, diastereómeros, tautómeros y mezclas de los mismos.

La invención incluye todos los posibles enantiómeros y diastereómeros y mezclas de dos o más estereoisómeros, por ejemplo, mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros, en todas las proporciones. Por lo tanto, los enantiómeros son un objeto de la invención en forma enantioméricamente pura, tanto antípoda levógiras como dextrógiras, en forma de racematos y en forma de mezclas de los dos enantiómeros en todas las proporciones. En el caso de una isomería *cis/trans*, la invención incluye tanto la forma *cis* como la forma *trans*, así como mezclas de estas formas en todas las relaciones. La preparación de estereoisómeros individuales se puede realizar, si se desea, por separación de una

mezcla por métodos habituales, por ejemplo, mediante cromatografía o cristalización, mediante el uso de materiales de partida estereoquímicamente uniformes para la síntesis o mediante síntesis estereoselectiva. Opcionalmente, puede realizarse una derivatización antes de una separación de estereoisómeros. La separación de una mezcla de estereoisómeros se puede realizar en una etapa intermedia durante la síntesis de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, o se puede hacer en un producto racémico final. La estereoquímica absoluta puede determinarse por cristalografía por rayos X, de productos cristalinos o intermedios cristalinos que se derivatizan, si es necesario, con un reactivo que contiene un centro estereogénico de configuración conocida. A menos que se indique un isómero, sal, solvato (incluyendo hidratos) o una sal solvatada particular de dicho racemato, enantiómero o diastereoisómero, la presente invención incluye todos estos isómeros, así como sales, solvatos (incluyendo hidratos) y sales solvatadas de dichos racematos, enantiómeros, diastereómeros y mezclas de los mismos.

El término "compuesto" se refiere al compuesto y, en determinadas realizaciones, en la medida en que sean estables, cualquier hidrato o solvato del mismo. Un hidrato es el compuesto que forma un complejo con agua y un solvato es el compuesto que forma un complejo con un disolvente, que puede ser un disolvente orgánico o un disolvente inorgánico.

Un compuesto "estable" es un compuesto que se puede preparar y aislar y cuya estructura y propiedades permanecen o se puede hacer que permanezcan esencialmente sin cambios durante un período de tiempo suficiente para permitir el uso del compuesto para los fines descritos en este documento (por ejemplo, administración terapéutica a un sujeto). Los compuestos de la presente invención se limitan a compuestos estables abarcados por la fórmula general (Ia), la fórmula general (Ia'), la fórmula general (Ib), la fórmula general (Ib'), la fórmula general (I) y la fórmula general (I'), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Sales

Como se ha indicado anteriormente, los compuestos de la presente invención se pueden emplear en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Los expertos en la técnica reconocerán aquellos casos en los que los compuestos de la invención pueden formar sales. Los ejemplos de dichos compuestos se describen en el presente documento por referencia a posibles sales. Dicha referencia es solo para fines ilustrativos. Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables con compuestos para tratar pacientes. Sin embargo, las sales no farmacéuticas pueden ser útiles en la preparación de compuestos intermedios.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal (incluida una sal interna tal como un zwitterión) que posee una eficacia similar a la del compuesto precursor y que no es biológica o de otro modo indeseable (por ejemplo, no es tóxica ni perjudicial para el receptor de la misma). Por lo tanto, una realización de la invención proporciona sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención. El término "sal" o "sales", como se emplea en el presente documento, representa cualquiera de las siguientes: sales ácidas formadas con ácidos inorgánicos y/u orgánicos, así como sales básicas formadas con bases inorgánicas y/u orgánicas. Las sales de los compuestos de la invención se pueden formar por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto de la invención con una cantidad de un ácido o base, tal como una cantidad equivalente, en un medio tal como uno en el que la sal precipita o en un medio acuoso seguido de liofilización.

Las sales de adición de ácidos de ejemplo incluyen acetatos, ascorbatos, benzoatos, bencenosulfonatos, bisulfatos, boratos, butiratos, citratos, alcanforatos, alcanforsulfonatos, fumaratos, clorhidratos, bromhidratos, yodhidratos, lactatos, maleatos, metanosulfonatos ("mesilatos"), naftalenosulfonatos, nitratos, oxalatos, fosfatos, propionatos, salicilatos, succinatos, sulfatos, tartaratos, tiocianatos, toluenosulfonatos (también conocidos como tosilatos) y similares. Las sales adecuadas incluyen sales de adición de ácidos que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una solución de un compuesto con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético o ácido benzoico. Además, los ácidos que generalmente se consideran adecuados para la formación de sales farmacéuticamente útiles a partir de compuestos farmacéuticos básicos se analizan, por ejemplo, por P. Stahl et al, Camille G. (eds.), Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge et al, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66(1) 1-19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201-217; Anderson et al, The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, Nueva York; y en The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D.C. en su sitio web).

Las sales básicas de ejemplo incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio, litio y sales de potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y de magnesio, sales con bases orgánicas (por ejemplo, aminas orgánicas) tales como diciclohexilamina, *t*-butil amina, colina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares. Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, y butilo), sulfatos de dialquilo (por ejemplo, sulfatos de dimetilo, dietilo y dibutilo), haluros de cadena larga (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, y estearilo), haluros de aralquilo (por ejemplo, bromuros de bencilo y fenetilo) y otros. Los compuestos que llevan un resto ácido se pueden mezclar con sales farmacéuticamente aceptables adecuadas para proporcionar, por ejemplo, sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio o potasio), sales de metales

alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio o magnesio) y sales formadas con sales ligandos orgánicos adecuados tales como sales de amonio cuaternario. Además, en el caso de que esté presente un grupo ácido (-COOH) o alcohol, se pueden emplear ésteres farmacéuticamente aceptables para modificar las características de solubilidad o hidrólisis del compuesto.

Se pretende que la totalidad de dichas sales de ácidos y sales de bases sean sales farmacéuticamente aceptables dentro del alcance de la invención y todas las sales de ácidos y de bases se consideran equivalentes a las formas libres de los compuestos correspondientes para los fines de la invención.

Además, cuando un compuesto de la invención contiene un resto básico, tal como, pero sin limitación, una amina alifática primaria, secundaria, terciaria o cíclica, una amina aromática o heteroarilamina, piridina o imidazol, y un resto ácido, tal como, pero sin limitación, tetrazol o ácido carboxílico, se pueden formar zwitteriones ("sales internas") y se incluyen dentro de los términos "sal" o "sales" como se usan en el presente documento. Se entiende que determinados compuestos de la invención pueden existir en forma zwitteriónica, que tienen centros tanto aniónicos como catiónicos dentro del mismo compuesto y una carga neta neutra. Dichos zwitteriones se incluyen dentro de la invención.

Métodos de preparación de compuestos

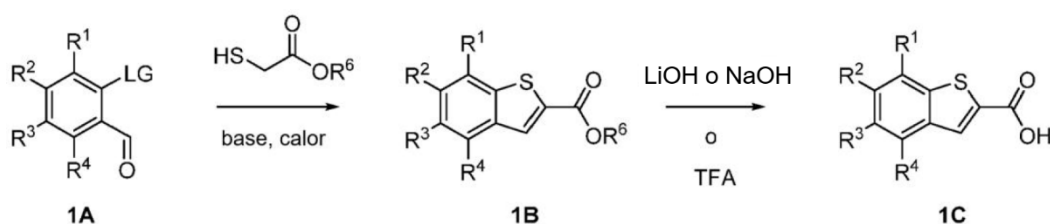
Varios métodos para preparar los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), y sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, se describen en los siguientes Esquemas y Ejemplos. Los materiales de partida y los intermedios se adquieren en fuentes comerciales, se fabrican a partir de procedimientos conocidos o se ilustran de otro modo. En algunos casos, el orden de realización de las etapas de los esquemas de reacción puede variarse para facilitar la reacción o para evitar productos de reacción no deseados.

En los siguientes Métodos y Esquemas, LG representa un grupo saliente, que puede ser un grupo haluro o triflato. Las variables R¹, R², R³, R⁴, R⁶, R⁸ y X², tienen el mismo significado que se ha proporcionado anteriormente.

Método 1

Los ácidos benzo[b]tiofeno 2-carboxílicos b, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se preparan normalmente a partir de *orto*-halo benzaldehídos. La secuencia comienza con el tratamiento con un éster de ácido alfa-tioacético en condiciones básicas. El éster del compuesto resultante se escindió en el ácido carboxílico en condiciones básicas para proporcionar el ácido benzo[b]tiofeno 2-carboxílico sustituido 1C deseado.

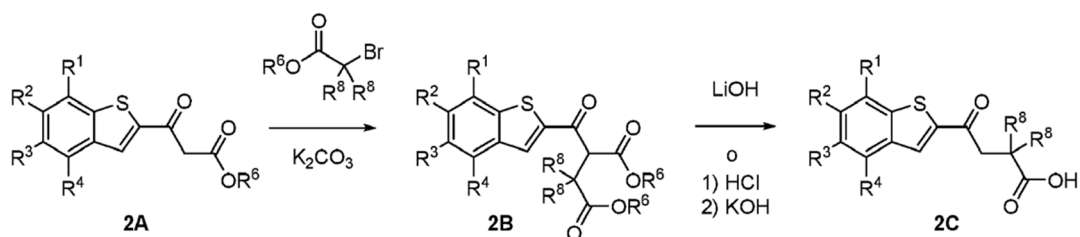
ESQUEMA 1



Método 2

Otro método para la preparación de ácidos benzo[b]tiofeno 2-carboxílicos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se detalla en el Esquema 2. La secuencia comienza con un benzo[b]tiofeno sustituido en la posición 2 con un grupo 1,3-dicarbonilo apropiado, tal como un beta-cetoéster. Se hizo reaccionar con un alfa-halo éster en condiciones básicas para producir la sustitución en la posición 2 de la cadena de alquilo. A continuación, ambos ésteres se hidrolizaron usando condiciones ácidas o básicas; tras una exposición adicional a las condiciones básicas, el ácido carboxílico correspondiente al éster en el material de partida se sometió a descarboxilación para dar el cetoácido benzo[b]tiofeno 2C deseado.

ESQUEMA 2

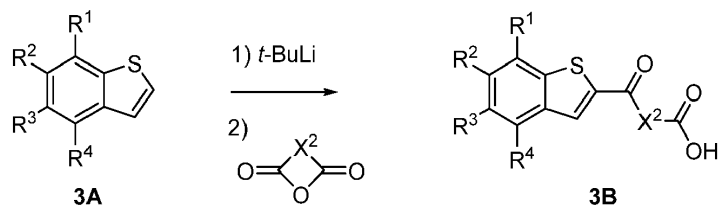


Método 3

- 5 Otro método para la preparación de ácidos benzo[b]tiofeno 2-carboxílicos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se detalla en el Esquema 3. La secuencia comienza con un benzo[b]tiofeno sin sustitución en la posición 2. Se trató con *tert*-butil litio seguido de un anhídrido de ácido cíclico para dar el producto 3B de ácido 4-cetocarboxílico deseado.

10

ESQUEMA 3



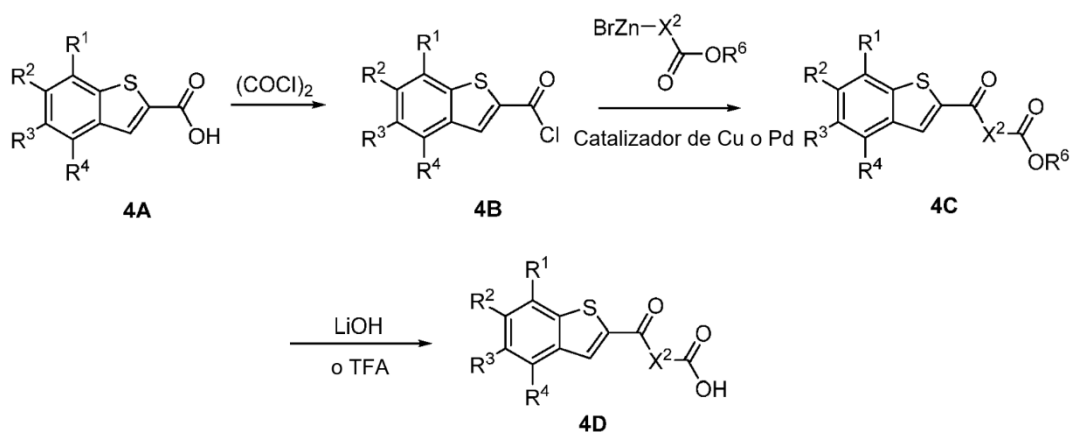
Método 4

15

Otro método para la preparación de ácidos benzo[b]tiofeno 2-carboxílicos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se detalla en el Esquema 4. La secuencia comienza con un benzo[b]tiofeno sustituido con un ácido carboxílico en la posición 2. Se trató con cloruro de oxalilo/diclorometano. El cloruro de ácido resultante se hizo reaccionar con un reactivo de alquil cinc, que normalmente contenía un éster, usando un metal de transición tal como cobre o paladio para mediar en el acoplamiento. A continuación, el éster se escindió en condiciones básicas o ácidas para proporcionar el gamma-cetoácido benzo[b]tiofeno 4D deseado.

20

ESQUEMA 4

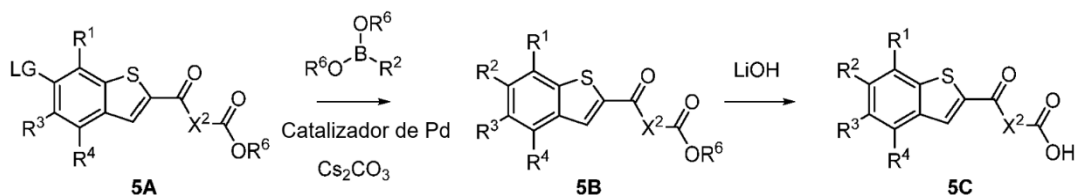


25

Método 5

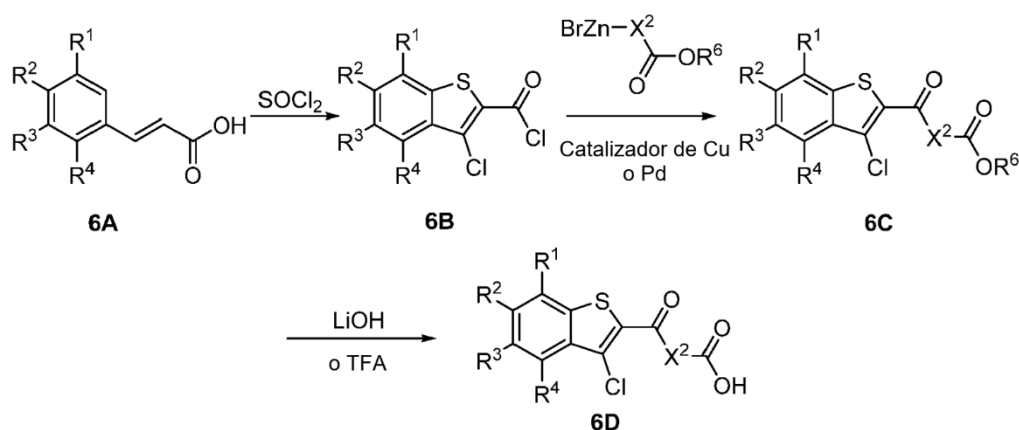
- 30 Otro método para la preparación de ácidos benzo[b]tiofeno 2-carboxílicos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se detalla en el Esquema 5. La secuencia comienza con un benzo[b]tiofeno sustituido en la posición 2 con un gamma-cetoéster y con un haluro o triflato en el benzo[b]tiofeno. Se trató con un éster borónico, ácido o sal de trifluoroborato y un catalizador de paladio en condiciones básicas acuosas. A continuación, el éster del compuesto resultante se escindió en el ácido carboxílico en condiciones básicas para proporcionar el benzo[b]tiofeno sustituido 5C deseado. El siguiente esquema representa la introducción del sustituyente R², pero este mismo par de métodos
- 35 generales trae determinados sustituyentes R³ también cuando se emplea un sustrato relacionado con un LG colocado apropiadamente.

ESQUEMA 5

5 Método 6

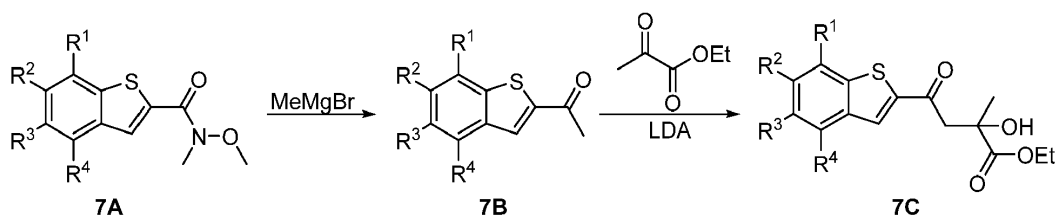
Otro método para la preparación de ácidos benzo[b]tiofeno 2-carboxílicos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, implica la ciclación de un ácido cinámico en presencia de cloruro de tionilo. El cloruro de ácido resultante se hizo reaccionar con un reactivo de alquil cinc, que normalmente contenía un éster, usando un metal de transición tal como cobre o paladio para mediar en el acoplamiento. A continuación, el éster se escindió en condiciones básicas o ácidas para proporcionar el gamma-cetoácido benzo[b]tiofeno 6D deseado.

ESQUEMA 6

15 Método 7

Otro método para la preparación de ácidos benzo[b]tiofeno 2-carboxílicos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se detalla en el Esquema 7. La secuencia comienza con una reacción de Grignard con la amida de Weinreb 7A para proporcionar la metilcetona 7B. La desprotonación de la cetona con LDA seguida de la adición de piruvato de etilo da 7C.

ESQUEMA 7



Métodos de uso

Los compuestos descritos en el presente documento que tienen aplicaciones terapéuticas, tales como los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), los compuestos de los Ejemplos 1 a 54, y las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, pueden administrarse a un paciente con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria, induciendo la producción de citocinas dependiente de STING y/o la inducción de actividad antitumoral. El término "administración" y variantes del mismo (por ejemplo, "administrar" un compuesto) significa proporcionar el compuesto al individuo que necesita tratamiento. Cuando se proporciona un compuesto en combinación con uno o más principios activos adicionales (por

ejemplo, agentes antivirales útiles para tratar una infección por VHC o agentes antitumorales para tratar cánceres), se entiende que "administración" y sus variantes incluyen cada uno el suministro simultáneo y secuencial del compuesto o sal y otros agentes.

Los compuestos desvelados en el presente documento pueden ser agonistas de STING. Estos compuestos son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen, pero sin limitación, trastornos de proliferación celular. Los trastornos de proliferación celular incluyen, pero sin limitación, cánceres, papilomatosis benigna, enfermedades trofoblásticas gestacionales y enfermedades neoplásicas benignas, tales como papiloma cutáneo (verrugas) y papiloma genital.

En realizaciones específicas, la enfermedad o trastorno a tratar es un trastorno de proliferación celular. En determinadas realizaciones, el trastorno de proliferación celular es cáncer. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona de cánceres de cerebro y columna, cánceres de cabeza y cuello, leucemia y cánceres de sangre, cánceres de piel, cánceres del sistema reproductor, cánceres del sistema gastrointestinal, cánceres de hígado y las vías biliares, cánceres de riñón y de vejiga, cánceres de huesos, cánceres de pulmón, mesotelioma maligno, sarcomas, linfomas, cánceres glandulares, cánceres de tiroides, tumores del corazón, tumores de células germinales, tumores neuroendocrinos (carcinoides) neoplásicos, cánceres del tracto medio y cánceres de origen primario desconocido (es decir, cánceres en los que se encuentra un cáncer con metástasis pero se desconoce el sitio original del cáncer). En realizaciones particulares, el cáncer está presente en un paciente adulto; en realizaciones adicionales, el cáncer está presente en un paciente pediátrico. En realizaciones particulares, el cáncer está relacionado con el SIDA.

En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de cerebro y de columna. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en astrocitomas anaplásicos, glioblastomas, astrocitomas y esteosioneuroblastomas (también conocidos como blastomas olfatorios). En realizaciones particulares, el cáncer de cerebro se selecciona del grupo que consiste en tumor astrocítico (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma subependimario de células gigantes, astrocitoma difuso, xantoastrocitoma pleomórfico, astrocitoma anaplásico, astrocitoma, glioblastoma de células gigantes, glioblastoma, glioblastoma secundario, glioblastoma primario en adultos y glioblastoma pediátrico primario), tumor oligodendroglioma (por ejemplo, oligodendroglioma y oligodendroglioma anaplásico), tumor oligoastrocítico (por ejemplo, oligoastrocitoma y oligoastrocitoma anaplásico), ependimoma (por ejemplo, ependimoma mixopapilar y ependimoma anaplásico); meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo, schwannoma, meningioma, meningioma atípico, meningioma anaplásico, adenoma hipofisario, glioma del tronco cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, glioma de las vías visuales e hipotalámico y linfoma primario del sistema nervioso central. En casos específicos de estas realizaciones, el cáncer de cerebro se selecciona del grupo que consiste en glioma, glioblastoma multiforme, paraganglioma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales (sPNET, por sus siglas en inglés).

En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de cabeza y cuello, incluyendo cánceres nasofaríngeos, cánceres de la cavidad nasal y de los senos paranasales, cánceres de hipofaringe, cánceres de la cavidad oral (por ejemplo, carcinomas de células escamosas, linfomas y sarcomas), cánceres de labio, cánceres de orofaringe, tumores de las glándulas salivales, cánceres de laringe (por ejemplo, carcinomas de células escamosas de laringe, rhabdomyosarcomas) y cánceres de ojo o cánceres oculares. En realizaciones particulares, el cáncer ocular se selecciona del grupo que consiste en melanoma intraocular y retinoblastoma.

En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de leucemia y cánceres de la sangre. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en neoplasias mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicos, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mielógena crónica (CML), neoplasia mieloproliferativa (MPN), AML post MPN, AML post MDS, MDS o AML de alto riesgo asociado a del(5q), leucemia mielógena crónica en fase blástica, linfoma angioinmunoblástico, leucemia linfoblástica aguda, histiocitosis de células de Langerhans, leucemia de células pilosas y neoplasias de células plasmáticas incluyendo plasmocitomas y mielomas múltiples. Las leucemias a las que se hace referencia en el presente documento pueden ser agudas o crónicas.

En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de piel. En realizaciones particulares, el cáncer de piel se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cánceres de células escamosas y cánceres de células basales.

En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres del sistema reproductor. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cánceres de mama, cánceres de cuello del útero, cánceres de vagina, cánceres de ovario, cánceres de próstata, cánceres de pene y cánceres testiculares. En casos específicos de estas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama seleccionado del grupo que consiste en carcinomas ductales y tumores filoides. En casos específicos de estas realizaciones, el cáncer de mama puede ser cáncer de mama masculino o cáncer de mama femenino. En casos específicos de estas realizaciones, el cáncer es un cáncer de cuello del útero seleccionado del grupo que consiste en carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. En casos específicos de estas realizaciones, el cáncer es un cáncer de ovario seleccionado del grupo que consiste en cánceres epiteliales.

- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres del sistema gastrointestinal. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cánceres de esófago, cánceres gástricos (también conocidos como cánceres de estómago), tumores carcinoides gastrointestinales, cánceres pancreáticos, cánceres de la vesícula biliar, cánceres colorrectales y cáncer anal. En casos de estas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas de células escamosas de esófago, adenocarcinomas de esófago, adenocarcinomas gástricos, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores estromales gastrointestinales, linfomas gástricos, linfomas gastrointestinales, tumores pseudopapilares sólidos del páncreas, pancreatoblastoma, tumores de células de los islotes, carcinomas pancreáticos incluyendo carcinomas de células acinares y adenocarcinomas ductales, adenocarcinomas de la vesícula biliar, adenocarcinomas colorrectales y carcinomas de células escamosas anales.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de hígado y de las vías biliares. En realizaciones particulares, el cáncer es cáncer de hígado (también conocido como carcinoma hepatocelular). En realizaciones particulares, el cáncer es cáncer de vías biliares (también conocido como colangiocarcinoma); en casos de estas realizaciones, el cáncer de las vías biliares se selecciona del grupo que consiste en colangiocarcinoma intrahepático y colangiocarcinoma extrahepático.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de riñón y vejiga. En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer de riñón seleccionado del grupo que consiste en cáncer de células renales, tumores de Wilms y cánceres de células de transición. En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer de vejiga seleccionado del grupo que consiste en carcinoma de urotelio (un carcinoma de células de transición), carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de huesos. En realizaciones particulares, el cáncer de hueso se selecciona del grupo que consiste en osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno de hueso, sarcoma de Ewing, cordoma (cáncer del hueso a lo largo de la columna).
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de pulmón. En realizaciones particulares, el cáncer de pulmón se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico, cánceres de pulmón microcítico, tumores bronquiales y blastomas pleuropulmonares.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de mesotelioma maligno. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma epitelial y sarcomatoides.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de sarcomas. En realizaciones particulares, el sarcoma se selecciona del grupo que consiste en condrosarcoma central, condroma central y perióstico, fibrosarcoma, sarcoma de células claras de vainas tendinosas y sarcoma de Kaposi.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de linfomas. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma de Hodgkin (por ejemplo, células de Reed-Sternberg), linfoma no Hodgkin (por ejemplo, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, micosis fungoide, síndrome de Sezary, linfoma primario del sistema nervioso central), linfomas cutáneos de linfocitos T, linfomas primarios del sistema nervioso central.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres glandulares. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de la corteza suprarrenal (también conocido como carcinoma de la corteza suprarrenal o carcinoma de la corteza suprarrenal), feocromocitomas, paragangliomas, tumores de hipófisis, timoma y carcinomas tímicos.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de cánceres de tiroides. En realizaciones particulares, el cáncer de tiroides se selecciona del grupo que consiste en carcinomas de tiroides medulares, carcinomas de tiroides papilares y carcinomas de tiroides foliculares.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de tumores de células germinales. En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en tumores neoplásicos de células germinales extracraneales y tumores neoplásicos de células germinales extragonadales. En casos específicos de estas realizaciones, los tumores neoplásicos de células germinales extragonadales se seleccionan del grupo que consiste en no seminomas y seminomas.
- En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de tumores de corazón. En realizaciones particulares, el tumor de corazón se selecciona del grupo que consiste en teratoma maligno, linfoma, rhabdomyosarcoma, angiosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma infantil y sarcoma sinovial.
- En realizaciones específicas, el trastorno de proliferación celular se selecciona de papilomatosis benigna, enfermedades neoplásicas benignas y enfermedades trofoblásticas gestacionales. En realizaciones particulares, la enfermedad neoplásica benigna se selecciona de papiloma cutáneo (verrugas) y papiloma genital. En realizaciones particulares, la enfermedad trofoblástica gestacional se selecciona del grupo que consiste en molas hidatiformes y

neoplasia trofoblástica gestacional (por ejemplo, molas invasoras, coriocarcinomas, tumores trofoblásticos del sitio placentario y tumores trofoblásticos epitelioides).

Como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren a todos los procesos en los que puede haber una ralentización, interrupción, detención, control o parada de la progresión de una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento. Los términos no indican necesariamente una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad o trastorno.

Debe entenderse que la expresión "administración de" y/o el término "administrar" un compuesto incluyen proporcionar un compuesto descrito en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y composiciones de lo anterior a un sujeto.

La cantidad de un compuesto administrado a un sujeto es una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria y/o para inducir la producción de interferón de tipo I dependiente de STING en el sujeto. En una realización, la cantidad de un compuesto puede ser una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz", de modo que el compuesto en cuestión se administre en una cantidad que provoque, respectivamente, una respuesta biológica o médica (es decir, destinado a tratar) de un tejido, sistema, animal o ser humano que persigue un investigador, veterinario, médico u otro personal sanitario. Una cantidad eficaz no incluye necesariamente consideraciones de toxicidad y seguridad relacionadas con la administración de un compuesto.

Una cantidad eficaz de un compuesto variará con el compuesto particular elegido (por ejemplo, considerando la potencia, eficacia y/o semivida del compuesto); la vía de administración elegida; la afección que se está tratando; la gravedad de la afección que se está tratando; la edad, el tamaño, el peso y el estado físico del sujeto que está siendo tratado; el historial médico del sujeto que está siendo tratado; la duración del tratamiento; la naturaleza de una terapia concurrente; el efecto terapéutico deseado; y factores similares, y puede determinarse de forma rutinaria por el experto en la técnica.

Los compuestos desvelados en el presente documento pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada, incluida la administración oral y parenteral. La administración parenteral es normalmente por inyección o infusión e incluye inyección o infusión intravenosa, intramuscular y subcutánea.

Los compuestos desvelados en el presente documento pueden administrarse una vez o de acuerdo con una pauta posológica en la que se administran varias dosis a intervalos de tiempo variables durante un período de tiempo determinado. Por ejemplo, las dosis pueden administrarse una, dos, tres o cuatro veces al día. Las dosis se pueden administrar hasta que se logre el efecto terapéutico deseado o indefinidamente para mantener el efecto terapéutico deseado. Las pautas posológicas adecuadas para un compuesto desvelado en el presente documento dependen de las propiedades farmacocinéticas de ese compuesto, tales como la absorción, la distribución y la semivida, que pueden determinarse por un experto en la técnica. Además, las pautas posológicas adecuadas, incluyendo la duración de la administración de dichas pautas, para un compuesto desvelado en el presente documento, dependen de la enfermedad o afección que se esté tratando, la gravedad de la enfermedad o afección, la edad y el estado físico del sujeto que se esté tratando, el historial médico del sujeto que está siendo tratado, la naturaleza de la terapia simultánea, el efecto terapéutico deseado y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del experto en la técnica. Además, los expertos en la técnica entenderán que las pautas posológicas adecuadas pueden requerir ajustes dada la respuesta individual de un sujeto a la pauta de dosificación o en el tiempo a medida que el sujeto individual necesite un cambio. Las dosis diarias típicas pueden variar dependiendo de la vía de administración elegida.

Una realización de la presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno de proliferación celular que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), y sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, a un sujeto que necesite tratamiento con los mismos. En las realizaciones, la enfermedad o trastorno a tratar es un trastorno de proliferación celular. En aspectos de estas realizaciones, el trastorno de proliferación celular es cáncer. En aspectos adicionales de estas realizaciones, el cáncer se selecciona de cánceres de cerebro y columna, cánceres de cabeza y cuello, leucemia y cánceres de sangre, cánceres de piel, cánceres del sistema reproductor, cánceres del sistema gastrointestinal, cánceres de hígado y las vías biliares, cánceres de riñón y de vejiga, cánceres de huesos, cánceres de pulmón, mesotelioma maligno, sarcomas, linfomas, cánceres glandulares, cánceres de tiroides, tumores del corazón, tumores de células germinales, tumores neuroendocrinos (carcinoides) neoplásicos, cánceres del tracto medio y cánceres de origen primario desconocido.

En una realización, en el presente documento se desvela el uso de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, en una terapia. El compuesto puede ser útil en un método para inducir una respuesta inmunitaria y/o inducir la producción de interferón de tipo I dependiente de STING en un sujeto, tal como un mamífero que necesita tal inhibición, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto al sujeto.

En una realización, en el presente documento se desvela una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (Ia), al menos un compuesto de fórmula general (Ia'), al menos un compuesto de fórmula general (Ib), al menos un compuesto de fórmula general (Ib'), al menos un compuesto de fórmula general (I), al menos un compuesto de fórmula general (I'), o al menos una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, para su uso en un tratamiento potencial para inducir una respuesta inmunitaria y/o para inducir la producción de interferón de tipo I dependiente de STING.

Una realización desvelada en el presente documento es el uso de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria y/o para inducir la producción de interferón de tipo I dependiente de STING. En las realizaciones, la enfermedad o trastorno a tratar es un trastorno de proliferación celular. En aspectos de estas realizaciones, el trastorno de proliferación celular es cáncer. En aspectos adicionales de estas realizaciones, el cáncer se selecciona de cánceres de cerebro y columna, cánceres de cabeza y cuello, leucemia y cánceres de sangre, cánceres de piel, cánceres del sistema reproductor, cánceres del sistema gastrointestinal, cánceres de hígado y las vías biliares, cánceres de riñón y de vejiga, cánceres de huesos, cánceres de pulmón, mesotelioma maligno, sarcomas, linfomas, cánceres glandulares, cánceres de tiroides, tumores del corazón, tumores de células germinales, tumores neuroendocrinos (carcinoides) neoplásicos, cánceres del tracto medio y cánceres de origen primario desconocido.

Composiciones

El término "composición", como se usa en el presente documento, pretende abarcar una forma de dosificación que comprende un compuesto especificado en una cantidad especificada, así como cualquier forma de dosificación que sea resultado, directa o indirectamente, de la combinación de un compuesto especificado en una cantidad especificada. Dicho término pretende abarcar una forma de dosificación que comprende un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por consiguiente, las composiciones de la presente divulgación abarcan cualquier composición preparada mezclando un compuesto de la presente divulgación y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende que los vehículos o excipientes son compatibles con el compuesto desvelado en el presente documento y con otros ingredientes de la composición.

Con el fin de inducir una respuesta inmunitaria y/o inducir la producción de interferón de tipo I dependiente de STING, los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, pueden administrarse por medios que produzcan el contacto del principio activo con el sitio de acción del agente. Los compuestos pueden administrarse por medios convencionales disponibles para su uso junto con productos farmacéuticos, como agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos. Los compuestos se pueden administrar en solitario, pero normalmente se administran con un vehículo farmacéutico seleccionado sobre la base de la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar.

En una realización, en el presente documento se desvela una composición que comprende un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición puede prepararse y empaquetarse en forma a granel en la que se puede extraer una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación y a continuación administrarse a un sujeto, tal como con polvos o jarabes. Como alternativa, la composición puede prepararse y empaquetarse en forma de dosificación unitaria en la que cada unidad físicamente discreta contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores.

Los compuestos desvelados en el presente documento y un vehículo o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables se formularán normalmente en una forma de dosificación adaptada para su administración a un sujeto mediante una vía de administración deseada. Por ejemplo, las formas de dosificación incluyen aquellas adaptadas para (1) administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, píldoras, trociscos, polvos, jarabes, elixires, suspensiones, soluciones, emulsiones, sobres y sellos; y (2) administración parenteral, tales como soluciones estériles, suspensiones y polvos estériles para reconstitución. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados variarán dependiendo de la forma de dosificación particular elegida. Además, los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados pueden elegirse para una función particular para la que pueden servir en la composición. Por ejemplo, determinados vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad para facilitar la producción de formas de dosificación

uniformes. Determinados vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad para facilitar la producción de formas de dosificación estables. Determinados vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad para facilitar el transporte de un compuesto desvelado en el presente documento, una vez administrado al sujeto, desde un órgano o parte del cuerpo a otro órgano u otra parte del cuerpo. Determinados vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad para potenciar el cumplimiento del paciente.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen los siguientes tipos de excipientes: diluyentes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, cargas, deslizantes, agentes de granulación, agentes de recubrimiento, agentes humectantes, disolventes, codisolventes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, agentes saporíferos, agentes enmascarantes del sabor, agentes colorantes, agentes antiaglomerantes, humectantes, agentes quelantes, plastificantes, agentes que aumentan la viscosidad, antioxidantes, conservantes, estabilizantes, tensioactivos y agentes tamponantes.

Un experto en la técnica posee el conocimiento y la habilidad en la técnica para seleccionar vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en cantidades apropiadas para el uso en las composiciones de la divulgación. Además, existen varios recursos disponibles para el experto en la técnica, que describen vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables y pueden ser útiles para seleccionar vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados. Los ejemplos incluyen REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company), THE HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL ADDITIVES (Gower Publishing Limited) y THE HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS (the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press).

Las composiciones de la divulgación se preparan usando técnicas y métodos conocidos por los expertos en la técnica. Algunos métodos comúnmente usados en la técnica se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company).

En una realización, la divulgación se dirige a una forma de dosificación oral sólida, tal como un comprimido o cápsula, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores y un diluyente o carga. Los diluyentes y cargas adecuados incluyen lactosa, sacarosa, dextrosa, manitol, sorbitol, almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata y almidón pregelatinizado), celulosa y sus derivados, (por ejemplo, celulosa microcristalina), sulfato de calcio y fosfato de calcio dibásico. La forma de dosificación oral sólida puede comprender además un aglutinante. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata y almidón pregelatinizado), gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, ácido algínico, tragacanto, goma guar, povidona y celulosa y sus derivados (por ejemplo, celulosa microcristalina). La forma de dosificación oral sólida puede comprender además un disgregante. Los disgregantes adecuados incluyen crospovidona, glicolato sódico de almidón, croscarmelosa, ácido algínico y carboximetilcelulosa de sodio. La forma de dosificación oral sólida puede comprender además un lubricante. Los lubricantes adecuados incluyen ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio y talco.

Cuando sea apropiado, las formulaciones en dosis unitaria para administración oral pueden estar microencapsuladas. La composición también se puede preparar para prolongar o mantener la liberación tal como, por ejemplo, revistiendo o incluyendo el material en forma de partículas en polímeros, cera o similares.

Los compuestos desvelados en el presente documento también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos farmacológicos direccionables. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, pirancopolímero, polihidroxipropilmetacrilamidafeol, polihidroxietilaspirtamidafeol o polietilenoóxido polilisina sustituidos con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos de la divulgación pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, polioritoésteres, poliacetales, polihidropiranos, policianacrilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.

En una realización, la divulgación se dirige a una forma de dosificación oral líquida. Se pueden preparar líquidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires en forma de unidad de dosificación de modo que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo desvelado en el presente documento. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto de la divulgación en una solución acuosa aromatizada adecuadamente; los elixires se preparan mediante el uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular dispersando un compuesto desvelado en el presente documento en un vehículo no tóxico. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de sorbitol polioxitileno, conservantes, aditivos aromatizantes tales como aceite de menta u otros edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales y similares.

En una realización, la divulgación se dirige a composiciones para administración parenteral. Las composiciones adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que

pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del destinatario previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en envases monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado), requiriendo solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos.

Combinaciones

Los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), y/o sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, se pueden administrar en combinación con uno o más principios activos adicionales. En las realizaciones, uno o más compuestos de fórmula general (Ia), uno o más compuestos de fórmula general (Ia'), uno o más compuestos de fórmula general (Ib), uno o más compuestos de fórmula general (Ib'), uno o más compuestos de fórmula general (I), uno o más compuestos de fórmula general (I'), o una o más sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, y el uno o más principios activos adicionales pueden administrarse conjuntamente. El uno o más principios activos adicionales pueden administrarse en una única forma de dosificación con el compuesto de fórmula general (Ia), el compuesto de fórmula general (Ia'), el compuesto de fórmula general (Ib), el compuesto de fórmula general (Ib'), el compuesto de fórmula general (I), el compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, o el uno o más principios activos adicionales pueden administrarse en una o más formas de dosificación separadas de la forma de dosificación que contiene el compuesto de fórmula general (Ia), el compuesto de fórmula general (Ia'), el compuesto de fórmula general (Ib), el compuesto de fórmula general (Ib'), el compuesto de fórmula general (I), el compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores.

El agente o principios activos adicionales se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

El uno o más principios activos adicionales pueden ser uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en compuestos agonistas de STING, compuestos antivirales, antígenos, adyuvantes, agentes antineoplásicos, antagonistas de la vía CTLA-4, LAG-3 y PD-1, lípidos, liposomas, péptidos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, líneas celulares inmunomoduladoras, inhibidores del punto de control, inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidores de topoisomerasa II, inhibidores de smoothen, agentes alquilantes, antibióticos antitumorales, antimetabolitos, retinoides y agentes inmunomoduladores que incluyen, pero sin limitación, vacunas contra el cáncer. Se entenderá que dicho uno o más principios activos adicionales pueden proporcionarse como una sal farmacéuticamente aceptable. Se entenderá que las descripciones de los principios activos adicionales anteriores pueden solaparse. También se entenderá que las combinaciones de tratamiento están sujetas a optimización, y se entiende que la mejor combinación de uso de los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I') o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, y uno o más principios activos adicionales se determinará basándose en las necesidades individuales del paciente.

Un compuesto desvelado en el presente documento puede usarse en combinación con uno o más de principios activos diferentes, incluyendo, pero sin limitación, otros agentes anticancerosos que se usan en la prevención, tratamiento, control, mejora o reducción del riesgo de una enfermedad o afección particular (por ejemplo, trastornos de proliferación celular). En una realización, un compuesto desvelado en el presente documento se combina con uno o más de otros agentes anticancerosos para su uso en la prevención, tratamiento, control, mejora o reducción del riesgo de una enfermedad o afección particular para la que los compuestos desvelados en el presente documento son útiles. Dichos otros principios activos se pueden administrar, por una vía y en una cantidad usada habitualmente para ello, de manera simultánea o secuencial con un compuesto de la presente divulgación.

Cuando un compuesto desvelado en el presente documento se usa simultáneamente con uno o más principios activos diferentes, se contempla una composición que contenga dichos otros principios activos además del compuesto desvelado en el presente documento. Por consiguiente, las composiciones de la presente divulgación incluyen aquellas que también contienen uno o más de otros principios activos, además de un compuesto desvelado en el presente documento. Un compuesto desvelado en el presente documento puede administrarse simultáneamente con, o antes o después, de uno o más principios activos diferentes. Un compuesto desvelado en el presente documento puede administrarse por separado, mediante la misma o diferente vía de administración, o juntos en la misma composición farmacéutica que el otro u otros agentes.

Los productos proporcionados como combinaciones pueden incluir una composición que comprende un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, y uno o más principios activos diferentes juntos en la misma

composición farmacéutica, o pueden incluir una composición que comprende un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, y una composición que comprende uno o más principios activos diferentes de forma separada, por ejemplo, en forma de un kit o en cualquier forma diseñada para permitir la administración separada, ya sea al mismo tiempo o en programas de dosificación separados.

La relación en peso de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, con respecto a un segundo principio activo puede variarse y dependerá de la dosis terapéuticamente eficaz de cada agente. Generalmente, se usará una dosis terapéuticamente eficaz de cada uno. Las combinaciones de un compuesto desvelado en el presente documento y otros principios activos generalmente también estarán dentro del intervalo mencionado anteriormente, pero en cada caso, debe usarse una dosis terapéuticamente eficaz de cada principio activo. En dichas combinaciones, el compuesto desvelado en el presente documento y otros principios activos se pueden administrar por separado o en conjunto. Además, la administración de un elemento puede ser antes, de manera concurrente o posterior a la administración de otro u otros agentes.

En una realización, esta divulgación proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, y al menos un principio activo diferente como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de un trastorno de proliferación celular, tal como cáncer.

En una realización, la divulgación proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores. En una realización, el kit comprende medios para retener por separado dichas composiciones, tal como un recipiente, botella dividida o paquete de papel de aluminio dividido. Un ejemplo de tal kit es un envase de tipo blíster, que se usa normalmente para el envasado de comprimidos, cápsulas y similares.

Puede usarse un kit de esta divulgación para la administración de diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral y parenteral, para la administración de las composiciones separadas a diferentes intervalos de dosificación, o para la valoración de las composiciones separadas entre sí. Para facilitar el cumplimiento, un kit de la divulgación normalmente comprende instrucciones para la administración.

En el presente documento se desvela un uso de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, para tratar un trastorno de proliferación celular, en el que el medicamento se prepara para su administración con otro principio activo. La divulgación también proporciona el uso de otro principio activo para tratar un trastorno de proliferación celular, en el que el medicamento se administra con un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores.

La divulgación también proporciona el uso de un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores, para tratar un trastorno de proliferación celular, en el que el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, en 24 horas) con otro principio activo. La divulgación también proporciona el uso de otro principio activo para tratar un trastorno de proliferación celular, en el que el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, en 24 horas) con un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ia'), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ib'), un compuesto de fórmula general (I), un compuesto de fórmula general (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable de los anteriores. El segundo agente puede administrarse una semana, varias semanas, un mes o varios meses después de la administración de un compuesto desvelado en el presente documento.

Los compuestos agonistas de STING que pueden usarse en combinación con los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, desvelados en el presente documento, incluyen, pero sin limitación, compuestos de dinucleótidos cíclicos.

Los compuestos antivirales que pueden usarse en combinación con los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'),

los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, desvelados en el presente documento, incluyen inhibidores del virus de la hepatitis B (VHB), inhibidores de la proteasa del virus de la hepatitis C (VHC), inhibidores de la polimerasa del VHC, inhibidores de NS4A del VHC, inhibidores de NS5A del VHC, inhibidores de NS5b del VHC e inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Dichos compuestos antivirales se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Los antígenos y adyuvantes que pueden usarse en combinación con los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, incluyen la molécula coestimuladora B7, interleucina-2, interferón- γ , GM-CSF, antagonistas de CTLA-4, ligando OX-40/OX-40, ligando CD40/CD40, sargramostim, levamisol, virus variolovacunal, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), liposomas, alumbre, adyuvante completo o incompleto de Freund, endotoxinas destoxificadas, aceites minerales, sustancias tensioactivas tales como lipolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos y emulsiones de aceite o hidrocarburos. Se pueden añadir adyuvantes, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, para aumentar la capacidad de la vacuna para desencadenar, potenciar o prolongar una respuesta inmunitaria. Materiales adicionales, tales como citocinas, quimiocinas y secuencias de ácidos nucleicos bacterianos, como CpG, un agonista del receptor de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) 9, así como agonistas adicionales para TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9, incluyendo lipoproteína, LPS, monofosforilípido A, ácido lipoteicoico, imiquimod, resiquimod y, además, agonistas del gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I, *Retinoic acid-Inducible Gene*) tales como poli I:C, usados por separado o junto con las composiciones descritas también son posibles adyuvantes. Dichos antígenos y adyuvantes pueden proporcionarse como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Las vías CTLA-4 y PD-1 son importantes reguladores negativos de la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T activados regulan positivamente CTLA-4, que se une a las células presentadoras de antígenos e inhibe la estimulación de linfocitos T, la expresión del gen de IL-2 y la proliferación de los linfocitos T; estos efectos antitumorales se han observado en modelos de ratón de carcinoma de colon, cáncer de próstata metastásico y melanoma metastásico. PD-1 se une a los linfocitos T activos y suprime la activación de los linfocitos T; los antagonistas de PD-1 también han demostrado efectos antitumorales. Los antagonistas de las vías CTLA-4 y PD-1 que pueden usarse en combinación con los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, desvelados en el presente documento, incluyen ipilimumab, tremelimumab, nivolumab, pembrolizumab, CT-011, AMP-224 y MDX-1106.

"Antagonista de PD-1" o "antagonista de la vía PD-1" significa cualquier compuesto químico o molécula biológica que bloquee la unión de PD-L1 expresada en una célula cancerosa a PD-1 expresada en una célula inmunitaria (linfocito T, linfocito B o linfocito NKT) y preferentemente también bloquee la unión de PD-L2 expresada en una célula cancerosa a la PD-1 expresada en células inmunitarias. Los nombres o sinónimos alternativos para PD-1 y sus ligandos incluyen: PDCD1, PD1, CD279 y SLEB2 para PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 y B7-H para PD-L1; y PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc y CD273 para PD-L2. En cualquiera de los métodos de tratamiento, medicamentos y usos de la presente divulgación en los que se está tratando a un individuo humano, el antagonista de PD-1 bloquee la unión de PD-L1 humano a PD-1 humana, y, preferentemente, bloquee la unión de PD-L1 y PD-L2 humanos a PD-1 humana. Las secuencias de aminoácidos de PD-1 humana se pueden encontrar en el locus de NCBI N.º: NP_005009. Las secuencias de aminoácidos de PD-L1 y PD-L2 humanos se pueden encontrar en el locus de NCBI N.º: NP_054862 y NP_079515, respectivamente.

Los antagonistas de PD-1 útiles en cualquiera de los métodos de tratamiento, medicamentos y usos de la presente divulgación incluyen un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés), o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 o PD-L1, y, preferentemente se une específicamente a PD-1 humana o PD-L1 humano. El mAb puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, y puede incluir una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en realizaciones preferidas, la región constante humana es una región constante de IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv y Fv.

Los ejemplos de mAb que se unen a PD-1 humana, y útiles en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente divulgación, se describen en las Patentes de EE.UU. US7488802, US7521051, US8008449, US8354509 y US8168757, las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional PCT WO2004/004771, WO2004/072286 y WO2004/056875, y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º US2011/0271358.

Los ejemplos de mAb que se unen a PD-L1 humano, y útiles en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente divulgación, se describen en las Solicitudes de patente internacional PCT N.º WO2013/019906 y WO2010/077634 A1 y en la Patente de EE.UU. US8383796. Los mAb específicos anti PD-L1 humano útiles como el antagonista de PD-1 en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente divulgación incluyen MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB0010718C y un anticuerpo que comprende las regiones variables de

cadena pesada y cadena ligera de SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 21, respectivamente, del documento WO2013/019906.

Otros antagonistas de PD-1 útiles en cualquiera de los métodos de tratamiento, medicamentos y usos de la presente divulgación incluyen una inmunoadhesión que se une específicamente a PD-1 o PD-L1, y preferentemente se une específicamente a PD-1 humana o PD-L1 humano, por ejemplo, una proteína de fusión que contiene la porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante, tal como una región Fc de una molécula de inmunoglobulina. Se describen ejemplos de moléculas de inmunoadhesión que se unen específicamente a PD-1 en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional PCT N.º WO2010/027827 y WO2011/066342. Las proteínas de fusión específicas útiles como antagonista de PD-1 en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente divulgación incluyen AMP-224 (también conocida como B7-DCIg), que es una proteína de fusión PD-L2-FC y se une a la PD-1 humana.

Los ejemplos de agentes citotóxicos que pueden usarse en combinación con los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, incluyen, pero sin limitación, trióxido de arsénico (vendido con el nombre comercial TRISENOX®), asparaginasa (también conocida como L-asparaginasa y Erwinia L-asparaginasa, comercializadas con los nombres comerciales ELSPAR® y KIDROLASE®).

Los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse en combinación con los compuestos de fórmula general (Ia), los compuestos de fórmula general (Ia'), los compuestos de fórmula general (Ib), los compuestos de fórmula general (Ib'), los compuestos de fórmula general (I), los compuestos de fórmula general (I'), o las sales farmacéuticamente aceptables de los anteriores, desvelados en el presente documento incluyen acetato de abiraterona, altretamina, anhidrovinblastina, auristatina, bexaroteno, bicalutamida, BMS 184476, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)benceno sulfonamida, bleomicina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolin-1-L-prolina-t-butilamida, cachectina, cemadotina, clorambucilo, ciclofosfamida, 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-8'-norvin-caleukoblastina, docetaxol, docetaxel, ciclofosfamida, carboplatino, carmustina, cisplatino, criptoficina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, daunorrubicina, decitabina dolastatina, doxorubicina (adriamicina), etopósido, 5-fluorouracilo, finasterida, flutamida, hidroxiaurea e hidroxiaurea y taxanos, ifosfamida, liarozol, lonidamina, lomustina (CCNU), MDV3100, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), melfalán, isetionato de mivobulina, rizoxina, sertenef, estreptozocina, mitomicina, metotrexato, taxanos, nilutamida, nivolumab, onapristona, paclitaxel, pembrolizumab, prednimustina, procarbazona, RPR109881, estramustina fosfato, tamoxifeno, tasonermina, taxol, tretinoína, vinblastina, vincristina, sulfato de vindesine y vinflunina. Dichos agentes quimioterapéuticos se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Los ejemplos de inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) incluyen, pero sin limitación, bevacizumab (comercializado con el nombre comercial AVASTIN por Genentech/Roche), axitinib (descrito en la Publicación de Patente Internacional PCT N.º WO01/002369), alaninato de brivanib ((S)-((R)-1-(4-(4-Fluoro-2-metil-1H-indol-5-ilo)-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-ilo)propan-2-il)2-aminopropanoato, también conocido como BMS-582664), motesanib (N-(2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-indol-6-il)-2-[(4-piridinilmetil)amino]-3-piridinacarboxamida y descrita en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT N.º WO02/068470), pasireotida (también conocida como SO 230, y descrita en la Publicación de Patente Internacional PCT N.º WO02/010192), y sorafenib (comercializado con el nombre comercial NEXAVAR). Dichos inhibidores se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Los ejemplos de inhibidores de topoisomerasa II incluyen, pero sin limitación, etopósido (también conocido como VP-16 y fosfato de etopósido, comercializado con los nombres comerciales TOPOSAR, VEPESID y ETOPOPHOS) y tenipósido (también conocido como VM-26, comercializado con el nombre comercial VUMON). Dichos inhibidores se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero sin limitación, 5-azacitidina (comercializada con el nombre comercial VIDAZA), decitabina (comercializada con el nombre comercial de DECOGEN), temozolomida (comercializada con los nombres comerciales TEMODAR y TEMODAL por Schering-Plough/Merck), dactinomicina (también conocida como actinomicina-D y comercializada con el nombre comercial COSMEGEN), melfalán (también conocida como L-PAM, L-sarcosina y mostaza fenilalanina, comercializada con el nombre comercial ALKERAN), altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), comercializada con el nombre comercial HEXALEN), carmustina (comercializada con el nombre comercial BCNU), bendamustina (comercializada con el nombre comercial TREANDA), busulfán (comercializado los nombres comerciales BUSULFEX® y MYLERAN®), carboplatino (comercializado con el nombre comercial PARAPLATIN®), lomustina (también conocido como CCNU, comercializado con el nombre comercial CEENU®), cisplatino (también conocido como CDDP, comercializado con los nombres comerciales PLATINOL® y PLATINOL®-AQ), clorambucilo (comercializado con el nombre comercial LEUKERAN®), ciclofosfamida (comercializado con los nombres comerciales CYTOXAN® y NEOSAR®), dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, comercializada con el nombre comercial DTIC-DOME®), altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM) comercializada con el nombre comercial HEXALEN®), ifosfamida (comercializada con el nombre comercial IFEX®), procarbazona (comercializada con el

nombre comercial MATULANE®), mecloretamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mustina y clorhidrato de mecloroetamina, comercializada con el nombre comercial MUSTARGEN®), estreptozocina (comercializada con el nombre comercial ZANOSAR®), tiotepa (también conocida como tiofosfo, TESPA y TSPA, y comercializada con el nombre comercial THIOPLEX®. Dichos agentes alquilantes se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Los ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen, pero sin limitación, doxorubicina (comercializada con los nombres comerciales ADRIAMYCIN® y RUBEX®), bleomicina (comercializada con el nombre comercial LENOXANE®), daunorrubicina (también conocida como clorhidrato de dauorrubicina, daunomicina y clorhidrato de rubidomicina, comercializada con el nombre comercial CERUBIDINE®), daunorrubicina liposomal (liposoma citrato de daunorubicina, comercializado con el nombre comercial DAUNOXOME®), mitoxantrona (también conocida como DHAD, comercializada con el nombre comercial NOVANTRONE®), epirubicina (comercializada con el nombre comercial ELLENCE™), idarrubicina (comercializada con los nombres comerciales IDAMYCIN®, IDAMYCIN PFS®) y mitomicina C (comercializada con el nombre comercial MUTAMYCIN®). Dichos antibióticos antitumorales se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Los ejemplos de antimetabolitos incluyen, pero sin limitación, claribina (2-clorodesoxiadenosina, comercializada con el nombre comercial LEUSTATIN®), 5-fluorouracilo (comercializado con el nombre comercial ADRUCIL®), 6-tioguanina (comercializada con el nombre comercial PURINETHOL®), pemetrexed (comercializado con el nombre comercial ALIMTA®), citarabina (también conocida como arabinosilcitosina (Ara-C), comercializada con el nombre comercial CYTOSAR-U®), citarabina liposomal (también conocida como Liposomal Ara-C, comercializada con el nombre comercial DEPOCYT™), decitabina (comercializada con el nombre comercial DACOGEN®), hidroxiurea y (comercializada con los nombres comerciales HYDREA®, DROXIA™ y MYLOCEL™), fludarabina (comercializada con el nombre comercial FLUDARA®), floxuridina (comercializada con el nombre comercial FUDR®), cladribina (también conocida como 2-clorodesoxiadenosina (2-CdA) comercializada con el nombre comercial LEUSTATIN™), metotrexato (también conocido como ametopterina, metotrexato sódico (MTX), comercializado con los nombres comerciales RHEUMATREX® y TREXALL™), y pentostatina (comercializada con el nombre comercial NIPENT®). Dichos antimetabolitos se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Los ejemplos de retinoides incluyen, pero sin limitación, alitretinoína (comercializada con el nombre comercial PANRETIN®), tretinoína (ácido retinoico todo-trans, también conocida como ATRA, comercializada con el nombre comercial VESANOID®), isotretinoína (ácido 13-c/s-retinoico, comercializada con los nombres comerciales ACCUTANE®, AMNESTEEM®, CLARA VIS®, CLARUS®, DECUTAN®, ISOTANE®, IZOTECH®, ORATANE®, ISOTRET® y SOTRET®), y bexaroteno (comercializado con el nombre comercial TARGRETIN®). Dichos compuestos se pueden proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado.

Actividad: Ensayo de competición de [3H]cGAMP bioquímico de STING

Los compuestos individuales descritos en los Ejemplos en el presente documento se definen como agonistas de STING por (i) la unión a la proteína STING como se evidencia por una reducción en la unión del ligando cGAMP tritiado a la proteína STING en al menos un 20 % a 20 uM (concentración de compuesto que se está ensayando) en un ensayo de competición de [3H]cGAMP bioquímico de STING y (ii) la demostración de la producción de interferón con una inducción del 6 % o más de la secreción de IFN-β a 30 uM en el ensayo de células THP1 (donde la inducción causada por cGAMP a 30 uM se estableció en el 100 %).

La capacidad de los compuestos para unirse a STING se cuantifica por la capacidad para competir con el ligando cGAMP tritiado por la membrana del receptor STING humano usando un ensayo de unión por filtración radiactivo. El ensayo de unión emplea el receptor STING obtenido de las membranas celulares Hi-Five que sobreexpresan HAQ STING de longitud completa preparado internamente y el ligando cGAMP tritiado también purificado internamente.

Los siguientes procedimientos experimentales detallan la preparación de ejemplos específicos de la presente divulgación. Los compuestos de los ejemplos se dibujan en sus formas neutras en los procedimientos y tablas siguientes. En algunos casos, los compuestos se aislaron como sales dependiendo del método usado para su purificación final y/o propiedades moleculares intrínsecas. Los ejemplos solo tienen fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación de modo alguno.

Ejemplos

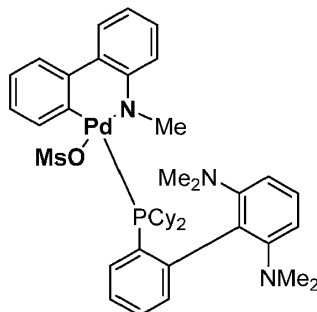
ABREVIATURAS

(COCl) ₂	Cloruro de oxalilo
¹⁹ F RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹⁹ F
¹ H RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (de protón) ¹ H
2',3'-cGAMP, cGAMP	guanosina monofosfato 2',3'-cíclica-adenosina monofosfato
ACN, MeCN, CH ₃ CN	Acetonitrilo
AcOH, HOAc	Ácido acético

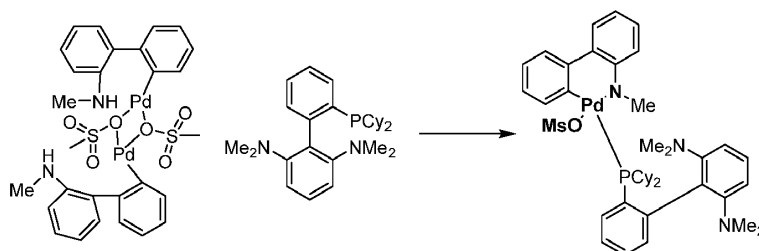
AlCl ₃	tricloruro de aluminio
AMP	Monofosfato de adenosina
Ac.	Acuoso
Ar	Argón
ATP	5'-Trifosfato de adenosina
BIIC	Célula de insecto infectada por baculovirus
A	Ancho
Br ₂	Bromo
Cat.	Catálogo número
CD ₃ OD	Alcohol metílico enriquecido con deuterio, metanol enriquecido con deuterio
CDCl ₃	Triclorometano deuterado
cGAMP	GMP-AMP sintasa cíclica
CH ₂ I ₂	Diyodometano
CH ₃ Cl	Clorometano, cloruro de metilo
CHCl ₃	Triclorometano
Ci	Curie, una unidad no estándar de radiactividad; 1Ci = 3,7×10 ¹⁰ Bq, en la que Bq es Becquerel, la unidad del SI de radiactividad, equivalente a 1 desintegración por segundo (dps)
CO ₂	Dióxido de carbono
CPhos Pd G4	Precatalizador de paladio CPhos de metanosulfonato de 2-aminobifenilpaladio (precatalizador de 4 ^a generación)
Cs ₂ CO ₃	Carbonato de cesio
Cu-Cl	Cloruro de cobre (I)
Cu-I	Yoduro de cobre (I)
Cy	Ciclohexilo
D	Doblete
DCE	1,2-Dicloroetano
DCM, CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Ddd	Doblete de doblete de dobletes
Ddt	Doblete de doblete de tripletes
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMEA	N,N-dimetil etil amina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTr	4,4'-dimetoxitritilo
DMTrCl	Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo
Dc	Doblete de cuádrupletes
CE ₅₀	concentración semimáxima eficaz; concentración de un fármaco, anticuerpo o tóxico que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición específico
EDC	Dicloruro de etileno
Equiv.	Equivalentes
ES	Electronebulización
Et	Etilo
Et ₂ O	Éter dietílico
Et ₂ Z	Dietilcinc
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Alcohol etílico, etanol
g	Gramo
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
h	Hora
H ₂	Hidrógeno (gas)
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAQ STING	Variante común de STING que contiene las tres mutaciones R71H-G230A-R293Q (construcción de ADN usada en el presente documento: STING(1-379)R71H,G230A,H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8/pBAC1)
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico, un agente tamponante químico orgánico zwitteriónico
Hept.	Heptuplete
Hex	Hexanos
HNO ₃	Ácido nítrico
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
Hz	Hercio

Cl ₅₀	Concentración inhibitoria semimáxima; concentración de un fármaco, anticuerpo o tóxico necesaria para una inhibición del 50 % de la respuesta o unión
Inh.	Inhibición
J	Constante de acoplamiento de RMN
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
KCl	Cloruro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
LCMS	Cromatografía líquida - espectroscopia de masas
LDA	Diisopropil amida de litio
LiOH	Hidróxido de litio
LiOH·H ₂ O	Hidróxido de litio monohidrato
M	Multiplete
M	Molar, moles por litro
m/z	Relación masa-carga
M+H	Masa protonada, medición de la masa producida por espectrometría de masas
Mci	Milicurie
Me	Metilo
MeB(OH) ₂	Ácido metil borónico
MeMgBr	Bromuro de metil magnesio
MeOH, CH ₃ OH	Metanol
Mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
MHz	Megahertzio
Min	Minuto(s)
ml, ml	Mililitro
Mm	Milimol por litro
Mmol	Milimol
MOI	Multiplicidad de infección
N ₂	Nitrógeno (gas)
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaHSO ₃	Bisulfito de sodio
NaHSO ₄	Bisulfato de sodio, hidrogenosulfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Ng	Nanogramo(s)
NH ₃	Amoníaco
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
nl	Nanolitro
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NMP	N-metil-2-pirrolidona
Pd(Ph ₃ P) ₄	Tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0)
Pd/C	Paladio sobre carbono
Pd ₂ (dba) ₃	Tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0)
EP	Éter de petróleo
Ufp	Unidad formadora de placas
HPLC prep.	Cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento
TLC prep.	Cromatografía líquida preparativa de capa fina
PSI	Libras por pulgada cuadrada
Py, py	Piridina
C	Cuadruplete
RPM, rpm	Revoluciones por minuto
TA, ta	Temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C
S	Singlete
Sat.	Saturado
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SiO ₂	Sílice, dióxido de silicio
SO ₂ Cl ₂	Cloruro de sulfurilo
SOCl ₂	Cloruro de tionilo
T	Triplete
<i>t</i> -BuLi	<i>t</i> -Butil litio, <i>terc</i> -butil litio
TFA	Ácido trifluoroacético

THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina
TMSCl	Cloruro de trimetilsililo
T _R	Tiempo de retención
TrisCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
v/v	Volumen/volumen
WT STING	La variante de tipo silvestre (más abundante) de STING en seres humanos (construcción de ADN usada en el presente documento: STING(1-379)H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8/pBAC1)
X-Phos	2-Diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo
λ _{em}	Longitud de onda de emisión
λ _{ex}	Longitud de onda de excitación
μg, ug	Microgramo
μl, ul, μl, ul	Microlitro
μM, uM	Micromolar
μm, um	Micrómetro

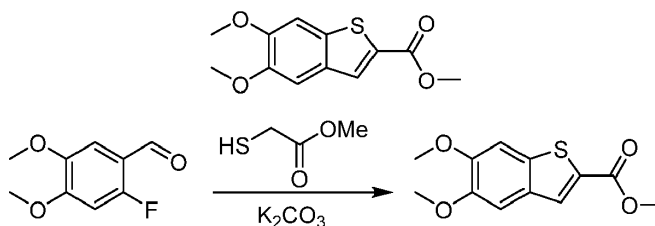
Preparación 1: CPhos Pd G4

5

Etapa 1: CPhos Pd G4

- 10 Una mezcla de dímero de (2'-metilamino-1,1'-bifenil-2-il)metanosulfonatopaldio (II) (439 mg, 0,573 mmol) y 2'-(diciclohexilfosfino)-N2,N2,N6,N6-tetrametil-[1,1'-bifenil]-2,6-diamina (500 mg, 1,15 mmol) en DCM (6 ml) se agitó a ta durante 2 h. A continuación, la solución se diluyó con Et₂O (30 ml). La solución se filtró y se concentró a presión reducida. A continuación, el residuo se suspendió en pentanos y se concentró de nuevo a presión reducida para proporcionar CPhos Pd G4. Véanse Bruno, N. C.; Niljianskul, N.; Buchwald, S. L. J. Org. Chem. 2014, 79, 4161.

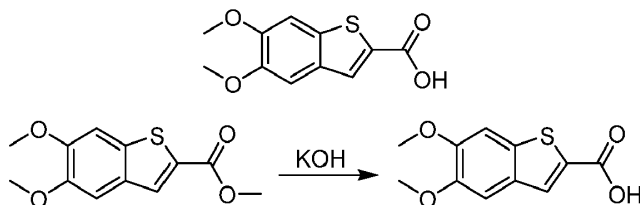
15

Preparación 2: 5,6-Dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo

- 20 A una solución agitada de 2-fluoro-4,5-dimetoxibenzaldehído (18,7 g, 102 mmol) en DMF (600 ml) se le añadieron 2-mercaptoacetato de metilo (11,9 g, 112 mmol) y K₂CO₃ (42,1 g, 305 mmol). A continuación, la mezcla resultante se calentó a 60 °C durante 15 h. Después del enfriamiento a ta, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo resultante se diluyó con H₂O (500 ml) y se extrajo con DCM (600 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo.

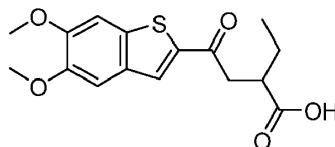
metilo. LCMS ($C_{12}H_{13}O_4S$) (ES, m/z): 253 $[M+H]^+$. 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,03 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 3,85 (s, 6H), 3,82 (s, 3H).

Preparación 3: Ácido 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico

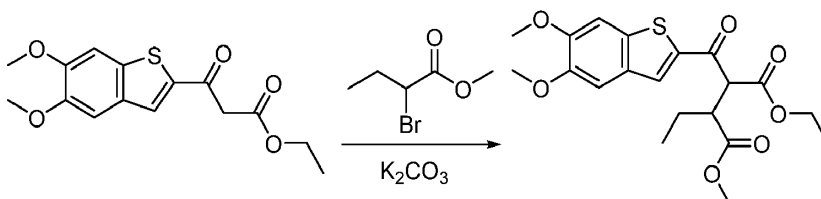


A una suspensión de 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo de la Preparación 2 (23 g, 91 mmol) en MeOH (200 ml), se añadieron THF (200 ml) y H_2O (200 ml) a KOH (51 g, 910 mmol). La suspensión resultante se calentó a 60 °C durante 30 min. Después del enfriamiento a ta, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se añadió H_2O (600 ml) al residuo resultante, y a continuación se añadió ácido cítrico a la solución para ajustar a pH 6. El material precipitado se recogió a través de filtración para proporcionar ácido 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico. 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7,94 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,82 (s, 3H).

Ejemplo 1: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-etil-4-oxobutanoico

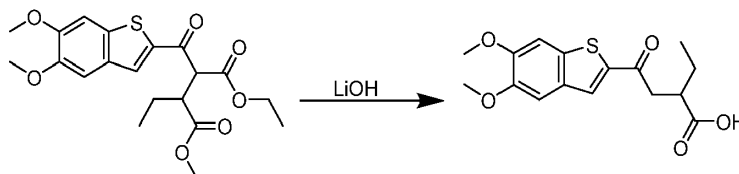


Etapas 1: 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-3-etilsuccinato de 1-etilo



A una solución en agitación de 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato (disponible comercialmente en SPECS, 0,10 g, 0,32 mmol) en DMF (1,6 ml) se le añadieron 2-bromobutirato de metilo (37 μ l, 0,32 mmol) y K_2CO_3 (54 mg, 0,39 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta y a continuación se diluyó con H_2O (3 ml) y DCM (6 ml). Las fases se separaron, y la capa ac. se lavó con más cantidad de DCM (3x6 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida y se secaron durante una noche a alto vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para dar 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-3-etilsuccinato de 1-etilo, que se usó sin purificación adicional. LCMS ($C_{20}H_{25}O_7S$) (ES, m/z): 409 $[M+H]^+$.

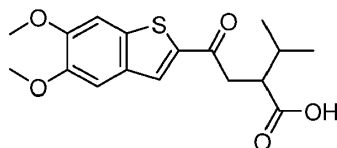
Etapas 2: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-etil-4-oxobutanoico



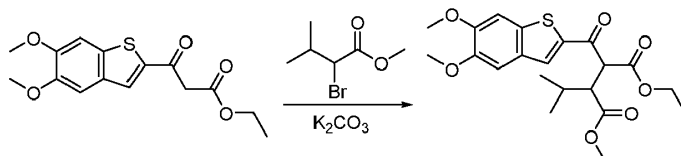
A una mezcla de 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-3-etilsuccinato de 1-etilo (83 mg, 0,20 mmol) en THF (1,8 ml) y H_2O (0,18 ml) se le añadió LiOH (39 mg, 1,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta antes de inactivar la mezcla con HCl ac. 2 M (0,30 ml, 0,59 mmol) y a continuación se diluyó con EtOAc y H_2O . La capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por HPLC prep. (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-etil-4-oxobutanoico. La mezcla racémica se resolvió por SFC quiral (CHIRACEL OJ-H (250 mm*21 mm), MeOH al 25 % (DMEA al +0,25 %) en CO_2), proporcionando dos compuestos con tiempos de retención de 3,65 min y 5,26 min. La concentración del primer pico de elución proporcionó el producto. LCMS ($C_{16}H_{19}O_5S$) (ES, m/z): 323 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8,15 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,35-3,27 (m, 1H),

3,00-2,94 (m, 1H), 2,73-2,67 (m, 1H), 1,58-1,50 (m, 2H), 0,85 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ejemplo 2: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-isopropil-4-oxobutanoico

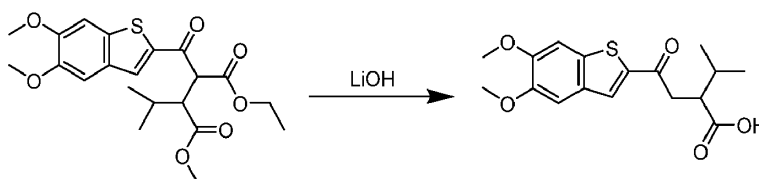


Etapas 1: 4-Metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)-3-isopropilsuccinato de 1-etilo



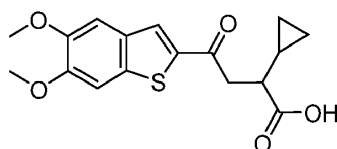
A una mezcla en agitación de 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de etilo (SPECS, 0,15 g, 0,49 mmol) en DMF (2,4 ml) se le añadieron 2-bromoisovalerato de metilo (73 μ l, 0,49 mmol) y K_2CO_3 (81 mg, 0,58 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta y a continuación se diluyó con H_2O (3,0 ml) y DCM (6,0 ml). Las fases se separaron, y la capa ac. se lavó con más cantidad de DCM (3x6,0 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida y se secaron durante una noche a alto vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en hexanos) para proporcionar 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)-3-isopropilsuccinato de 1-etilo, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. LCMS ($C_{21}H_{27}O_7S$) (ES, m/z): 423 $[M+H]^+$.

Etapas 2: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-isopropil-4-oxobutanoico

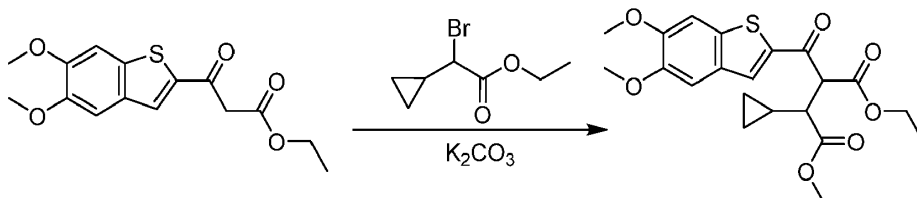


A una mezcla de 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)-3-isopropilsuccinato de 1-etilo (68 mg, 0,16 mmol) en THF (0,80 ml), MeOH (0,40 ml) y H_2O (0,18 ml) se le añadió LiOH (19 mg, 0,80 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a ta antes de inactivar la mezcla con HCl ac. 2 M (0,40 ml, 0,80 mmol) y a continuación se diluyó con EtOAc y H_2O . La capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-isopropil-4-oxobutanoico. La mezcla racémica se resolvió por SFC quiral (CHIRALPAK IC (250 mm*21 mm), MeOH al 40 % (DMEA al +0,25 %) en CO_2), proporcionando dos compuestos con tiempos de retención de 5,70 min y 7,05 min. La concentración del segundo pico de elución proporcionó el producto. LCMS ($C_{17}H_{21}O_5S$) (ES, m/z): 337 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8,17 (1H, s), 7,49 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,35-3,25 (m, 1H), 3,05-2,85 (m, 1H), 2,67-2,61 (m, 1H), 1,95-1,87 (m, 1H), 0,88-0,82 (m, 6H).

Ejemplo 3: Ácido 2-ciclopropil-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

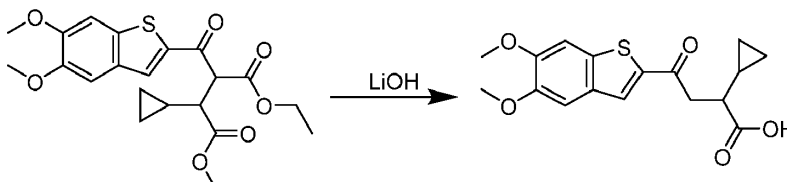


Etapas 1: 2-Ciclopropil-3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)succinato de dietilo



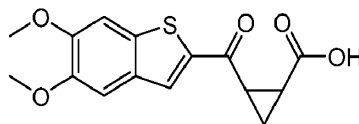
A una mezcla en agitación de 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de etilo (SPECS, 0,30 g, 0,97 mmol) en DMF (4,9 ml) se le añadieron 2-bromo-2-ciclopropilacetato de etilo (0,20 g, 0,97 mmol) y a continuación K_2CO_3 (0,16 g, 1,2 mmol) a ta. La mezcla se dejó en agitación durante una noche y a continuación se diluyó con H_2O (3,0 ml) y DCM (6,0 ml). Las fases se separaron, y la capa ac. se lavó con DCM (3x6 ml). Los productos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida y se secaron durante una noche a alto vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 2-ciclopropil-3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)succinato de dietilo. LCMS ($C_{22}H_{27}O_7S$) (ES, m/z): 435 $[M+H]^+$.

Etapla 2: Ácido 2-ciclopropil-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

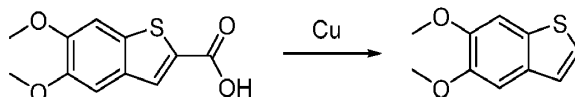


A una mezcla de 2-ciclopropil-3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)succinato de dietilo (90 mg, 0,21 mmol) en THF (1,0 ml), MeOH (0,50 ml) y H_2O (0,50 ml) se le añadió LiOH (25 mg, 1,0 mmol), y la mezcla se dejó en agitación durante 2 h a ta. Después de 2 h, la mezcla se acidificó con HCl 1 N (0,50 ml, 1,0 mmol) y a continuación se diluyó con EtOAc y H_2O . La capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en hexanos) para proporcionar ácido 2-ciclopropil-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico en forma de una mezcla racémica. La mezcla racémica se resolvió por SFC quiral (columna OJ-H, MeOH al 25 % (DMEA al +0,25 %) en CO_2), proporcionando dos compuestos con tiempos de retención de 5,3 min y 6,9 min. La concentración del primer pico de elución proporcionó el producto. LCMS ($C_{17}H_{19}O_5S$) (ES, m/z): 335 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,23 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,51-3,43 (m, 2H), 2,13-2,08 (m, 1H), 0,99-0,87 (m, 1H), 0,54-0,34 (m, 4H).

Ejemplo 4: Ácido 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropanocarboxílico

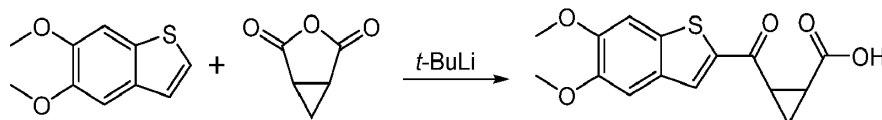


Etapla 1: 5,6-Dimetoxibenzo[b]tiofeno



A una solución en agitación de ácido 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (Preparación 3, 2,00 g, 8,39 mmol) en quinolina (20 ml) se le añadió cobra (0,907 g, 14,3 mmol) y a continuación la mezcla se calentó a 190 °C durante 2 h. Tras el enfriamiento a ta, la mezcla se diluyó con EtOAc y a continuación se lavó sucesivamente con HCl ac. (2 M), H_2O , $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para dar 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno. LCMS ($C_{10}H_{11}O_2S$) (ES, m/z): 195 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7,54 (s, 1H), 7,51 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,29 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,80 (s, 3H).

Etapla 2: Ácido 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano carboxílico



A una solución en agitación de 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno (500 mg, 2,57 mmol) en THF (12 ml) se le añadió gota a gota t -BuLi (3,0 ml, 3,9 mmol) (1,3 M en n -pentano) durante 5 min a -78 °C en una atmósfera de N_2 . La mezcla se agitó a -78 °C durante 1 h y a continuación se le añadió 3-oxabicyclo[3.1.0]hexano-2,4-diona (577 mg, 5,15 mmol) en THF (10 ml) durante 10 min. La mezcla se dejó calentar a ta y a continuación se agitó a ta durante 12 h en una atmósfera de N_2 . A la mezcla se le añadió H_2O (15 ml), y a continuación la mezcla se extrajo con EtOAc (10 ml). La capa ac. se extrajo con más cantidad de EtOAc (10 ml), a continuación se ajustó a pH = 5-6 con HCl ac. (1,0 M) y se extrajo adicionalmente con EtOAc (3x30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se

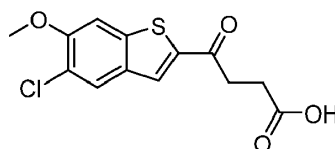
secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo resultante se purificó por HPLC prep. (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para dar ácido 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano carboxílico. La mezcla racémica se resolvió por SFC quiral (Columna AD (250 mm*30 mm), 40 % (1:1 de H_2O (NH_3 al +0,1 %) y EtOH) en CO_2), proporcionando dos compuestos con tiempos de retención de 5,61 min y 6,22 min. La concentración del primer pico de elución proporcionó el producto. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 307 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11,35 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 3,01 (s, 3H), 3,00 (s, 3H), 2,20 (m, 1H), 1,46-1,38 (m, 1H), 0,72-0,63 (m, 1H), 0,51-0,43 (m, 1H).

Los Ejemplos 5 y 6, como se muestran en la Tabla 1 a continuación, se prepararon o pueden prepararse de acuerdo con procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 4 anterior usando los materiales de partida apropiados, descritos como Preparaciones o como se obtienen a partir de fuentes comerciales.

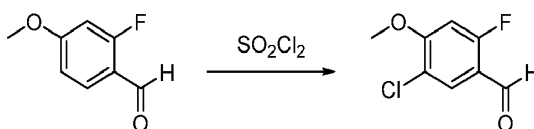
Tabla 1

Ej.	Estructura	Nombre	Masa $[\text{M}+\text{H}]^+$
5		Ácido 2-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico (Enantiómero individual)	355, 357
6		Ácido 2-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico (Enantiómero individual)	355, 357

Ejemplo 7: Ácido 4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

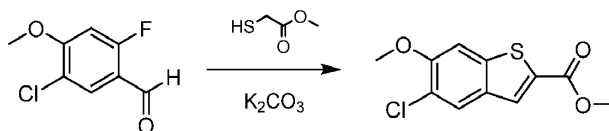


Etapas 1: 5-Cloro-2-fluoro-4-metoxibenzaldehído



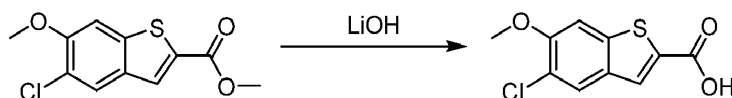
A una solución en agitación de 2-fluoro-4-metoxibenzaldehído (1,00 g, 6,49 mmol) en AcOH (2 ml) se le añadió SO_2Cl_2 (1,05 ml, 13,0 mmol). Después de agitar a ta durante 12 h, la reacción se completó. La mezcla de reacción se vertió en hielo-agua (50 ml). El precipitado resultante se recogió por filtración al vacío, se lavó con H_2O (3x20 ml) y se secó al aire para proporcionar 5-cloro-2-fluoro-4-metoxibenzaldehído. LCMS ($\text{C}_8\text{H}_7\text{ClFO}_2$) (ES, m/z): 189 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 10,18 (s, 1H), 7,88 (d, $J = 7,28$ Hz, 1H), 6,72 (d, $J = 11,69$ Hz, 1H), 3,99 (s, 3H). ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -119,91 (dd, $J = 7,15, 11,32$ Hz).

Etapas 2: 5-Cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo



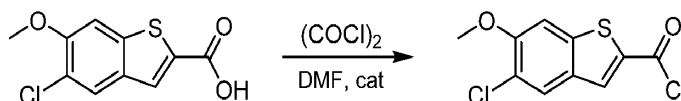
Una mezcla de 5-cloro-2-fluoro-4-metoxibenzaldehído (1,04 g, 5,51 mmol), 2-mercaptoacetato de metilo (0,740 ml, 8,27 mmol), K_2CO_3 (2,29 g, 16,5 mmol) y DMF (50 ml) se agitó durante 12 h a 80 °C. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se vertió en 500 ml de hielo-agua. Se añadió HCl ac. (1 M) para ajustar la mezcla a pH 5. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con H_2O (3x100 ml) y se secó a presión reducida para dar 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo, que se usó directamente en la siguiente etapa. LCMS ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClO}_3\text{S}$) (ES, m/z): 257 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Etapas 3: Ácido 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico



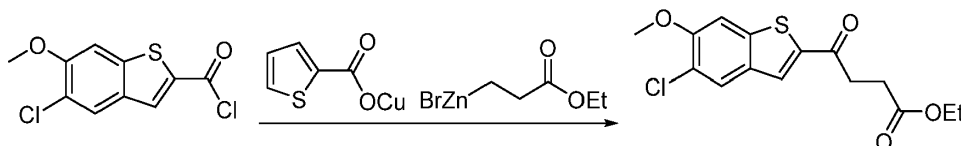
A una suspensión en agitación de 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo (1,15 g, 4,46 mmol) en H₂O (10 ml), THF (10 ml) y MeOH (10 ml) se le añadió LiOH·H₂O (0,562 g, 13,4 mmol). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 3 h. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a ta, y los disolventes orgánicos se eliminaron por destilación a presión reducida. El residuo se diluyó con H₂O (20 ml) y se lavó con DCM (3x10 ml). La capa ac. se acidificó con HCl ac. 1 M a pH 5, y el precipitado resultante se lavó con H₂O (3x10 ml). El sólido restante se secó a presión reducida para dar ácido 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico. LCMS (C₁₀H₈ClO₃S) (ES, m/z): 243 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13,43 (a, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,83 (s, 1H), 3,94 (s, 3H).

Etapa 4: Cloruro de 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo



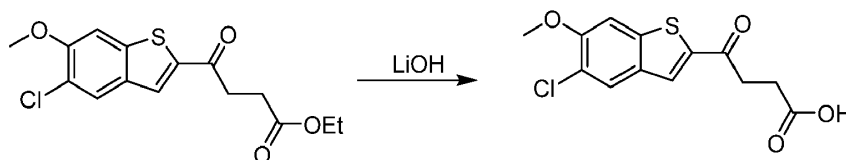
A una mezcla de ácido 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (215 mg, 0,886 mmol) y THF (10 ml) se le añadieron (COCl)₂ (0,4 ml, 4,73 mmol) y DMF (4 ul, 0,055 mmol) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 16 h y a continuación se enfrió a ta. La mezcla se diluyó con tolueno (20 ml) y se concentró a presión reducida. A continuación, la mezcla de reacción concentrada se disolvió de nuevo dos veces en tolueno (20 ml) y se concentró a presión reducida. La mezcla de reacción concentrada resultante se secó al vacío a 50 °C-80 °C durante 1 h y a continuación se cargó de nuevo con gas Ar para su almacenamiento. El cloruro de 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo resultante se usó en la siguiente etapa directamente.

Etapa 5: 4-(5-Cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



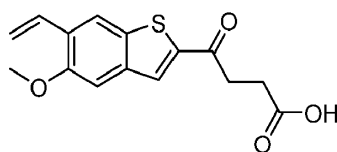
Un matraz Schlenk secado en estufa se cargó con una barra de agitación y ((tiofeno-2-carbonil)oxi)cobre (500 mg, 2,62 mmol) en un globo de Ar. El matraz se secó mientras se fijaba a una fuente de alto vacío mediante calentamiento con una pistola de calor durante 3 min. Después del enfriamiento a 0 °C, se añadió bromuro de (3-etoxi-3-oxopropil)cinc (II) (5,0 ml, 0,5 M en THF, 2,5 mmol) en el matraz a través de una jeringa para formar una mezcla. Después de agitar a 0 °C durante 40 min, a la mezcla se le añadió una solución de cloruro de 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo (272 mg, 0,885 mmol) en THF (5 ml). La mezcla resultante se calentó gradualmente a ta y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se inactivó con una solución ac. sat. de NH₄Cl (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3x30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución ac. sat. de Na₂CO₃ (2x15 ml) y salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para dar 4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS (C₁₅H₁₆ClO₄S) (ES, m/z): 327 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,87 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 4,16 (c, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,32 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,78 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,27 (t, *J* = 7,0 Hz, 5H).

Etapa 6: Ácido 4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

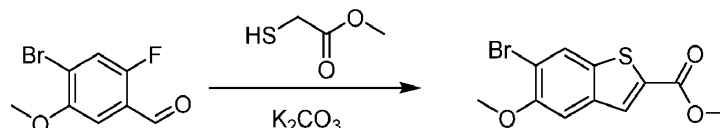


A una solución agitada de 4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (62 mg, 0,19 mmol) en MeOH (6 ml) y H₂O (3 ml) se le añadió LiOH·H₂O (0,12 g, 5,0 mmol). La mezcla se agitó a 45 °C durante 2 h, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en H₂O (15 ml) y se lavó con DCM (2x15 ml). La capa ac. se acidificó con HCl ac. concentrado a pH ~2 y a continuación se extrajo con DCM (5x10 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para dar ácido 4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₃H₁₂ClO₄S) (ES, m/z): 299 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ 8,10 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,37 - 3,33 (m, 2H), 2,73 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H).

Ejemplo 8: Ácido 4-(5-metoxi-6-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

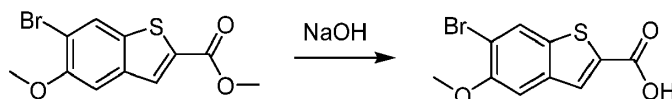


Etapla 1: 6-Bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo



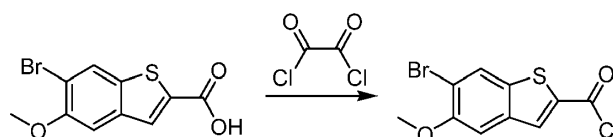
A una solución agitada de 4-bromo-2-fluoro-5-metoxibenzaldehído (5,00 g, 21,5 mmol) en DMF (100 ml) se le añadieron 2-mercaptoacetato de metilo (2,51 g, 23,6 mmol) y K_2CO_3 (8,90 g, 64,4 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó con N_2 3 veces. A continuación, la mezcla resultante se agitó a ta durante 15 h. Se añadieron EtOAc (500 ml) y H_2O (1200 ml) a la mezcla de reacción. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (2x200 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en PE) para dar 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo. LCMS ($C_{11}H_{10}BrO_3S$) (ES, m/z): 301, 303 $[M+H]^+$. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,01 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H).

Etapla 2: Ácido 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico



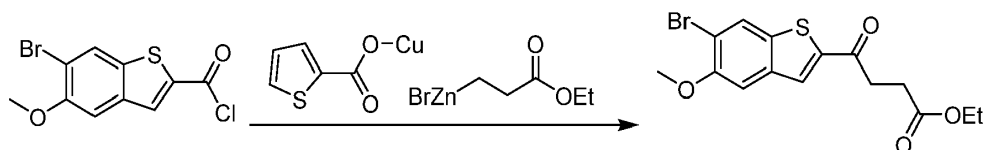
A una suspensión de 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo (1,45 g, 4,81 mmol) en MeOH (20 ml), THF (20 ml) y H_2O (20 ml) se le añadió NaOH (1,93 g, 48,1 mmol). La suspensión resultante se calentó a 50 °C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente. Al residuo se le añadió H_2O (200 ml), y se añadió ácido cítrico para ajustar la solución a pH = 6. La suspensión ac. restante se extrajo con EtOAc (3x50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar ácido 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico, que se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 13,52 (s a, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 3,90 (s, 3H).

Etapla 3: Cloruro de 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo



A una solución agitada de ácido 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (800 mg, 2,79 mmol) en THF anhidro (6 ml) se le añadió gota a gota $(COCl)_2$ (1,06 g, 8,36 mmol) a 0 °C. A continuación, la mezcla se calentó a 75 °C durante 15 h y a continuación se enfrió a ta. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el cloruro de 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo en bruto, que se usó directamente en la etapa siguiente sin purificación adicional.

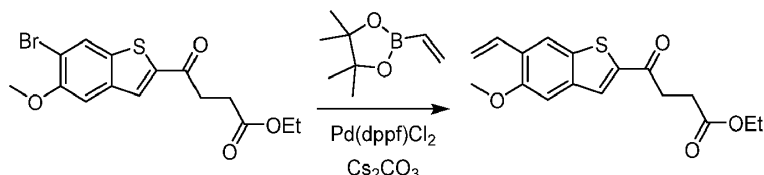
Etapla 4: 4-(6-Bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



Una solución de bromuro de (3-etoxi-3-oxopropil)cinc (II) (19,6 ml, 0,5 M en THF, 9,82 mmol) se añadió en un matraz secado en estufa que contenía ((tiofeno-2-carbonil)oxi)cobre (1,87 g, 9,82 mmol) en una atmósfera de Ar a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a 0 °C en una atmósfera de Ar. A continuación, a la mezcla de reacción se le añadió una solución desgasificada con Ar de cloruro de 6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo (1,00 g, 3,27 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C. La suspensión resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 3 h más. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se inactivó con una solución ac. sat. de NH_4Cl (50 ml). La mezcla

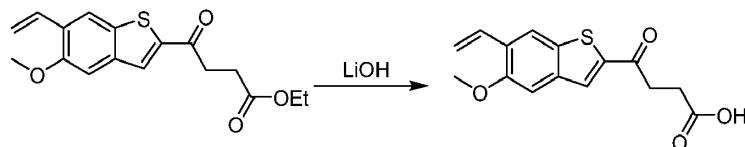
se dejó calentar a ta y se agitó durante 10 min. A continuación, la mezcla se filtró para eliminar cualquier sólido precipitado, y el filtrado se diluyó con EtOAc (50 ml) y salmuera (20 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con más cantidad de salmuera (50 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM en PE) para dar 4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrO}_4\text{S}$) (ES, m/z): 371, 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,05 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,30 (s, 1H), 4,18 (c, J = 7,2 Hz, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,34 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,80 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 1,28 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Etapas 5: 4-(5-Metoxi-6-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



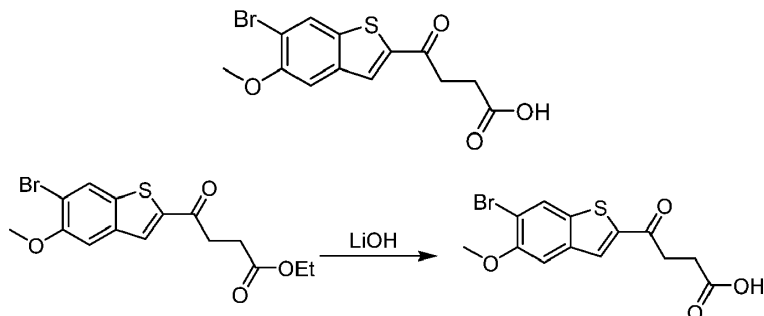
A una mezcla en agitación de 4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (40,0 mg, 0,108 mmol), 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (33,2 mg, 0,215 mmol) y Cs_2CO_3 (105 mg, 0,323 mmol) en 1,4-dioxano (1,0 ml) y H_2O (0,2 ml) se le añadió dicloruro de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (12 mg, 0,022 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó poniéndola a presión reducida y cargándose de nuevo con N_2 3 veces. La mezcla de reacción se agitó a 90 °C en una atmósfera de N_2 durante 2 h, se enfrió a ta y se filtró para eliminar cualquier sólido. El filtrado se diluyó con EtOAc (5 ml) y salmuera (5 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con más cantidad de salmuera (5 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar 4-(5-metoxi-6-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo, que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{S}$) (ES, m/z): 319 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Etapas 6: Ácido 4-(5-metoxi-6-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

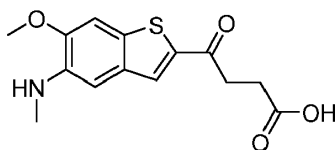
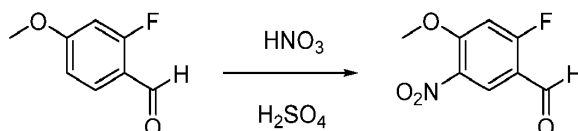


A una suspensión agitada de 4-(5-metoxi-6-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (25 mg, 0,079 mmol) en MeOH (0,5 ml), THF (0,5 ml) y H_2O (0,5 ml) se le añadió LiOH (18,8 mg, 0,785 mmol). La suspensión resultante se calentó a 50 °C durante 2 h y a continuación se enfrió a ta. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente, y el residuo se purificó por HPLC prep. (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para dar ácido 4-(5-metoxi-6-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{S}$) (ES, m/z): 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ = 8,10 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,09 (dd, J = 11,3; 17,8 Hz, 1H), 5,87 (d a, J = 17,4 Hz, 1H), 5,32 (d a, J = 11,2 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,37-3,32 (m, 2H), 2,71 (t a, J = 6,5 Hz, 2H).

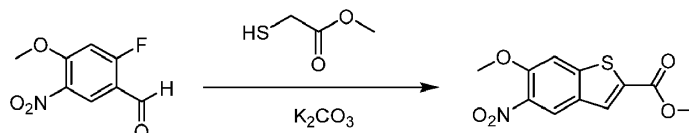
Ejemplo 9: Ácido 4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico



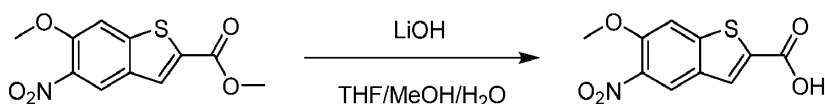
A una suspensión de 4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo del Ejemplo 8, etapa 4 (20 mg, 0,054 mmol) en MeOH (0,5 ml), THF (0,5 ml) y H_2O (0,5 ml) se le añadió LiOH (1,3 mg, 0,054 mmol). La suspensión resultante se calentó a 50 °C durante 2 h y a continuación se enfrió a ta. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente, y el residuo se purificó por HPLC prep. (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para dar ácido 4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{BrO}_4\text{S}$) (ES, m/z): 343, 345 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ = 8,12 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,36 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,74 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Ejemplo 10: Ácido 4-(6-metoxi-5-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico**5 Etapa 1: 2-Fluoro-4-metoxi-5-nitrobenzaldehído**

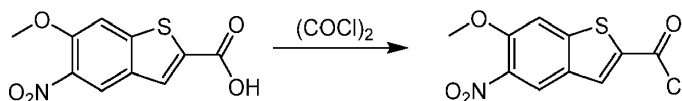
10 A una solución agitada de 2-fluoro-4-metoxibenzaldehído (1,00 g, 6,49 mmol) en H₂SO₄ concentrado (5,88 ml, 110 mmol) a -15 °C se le añadió gota a gota HNO₃ concentrado (0,414 ml, 6,49 mmol) en H₂SO₄ concentrado (0,795 ml, 14,9 mmol) durante 5 min. Después de 1 h de agitación por debajo de -10 °C, la mezcla de reacción se vertió en 50 ml de hielo-agua. El precipitado se recogió por filtración. La torta de filtro se lavó con H₂O (3x100 ml) y se secó a presión reducida para dar 2-fluoro-4-metoxi-5-nitrobenzaldehído, que se usó directamente en la siguiente etapa. LCMS (C₈H₇FO₄) (ES, m/z): 200 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 10,22 (s, 1H), 8,47 (d, J = 7,24 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 11,54 Hz, 1H), 4,07 (s, 3H).

Etapa 2: 6-Metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo

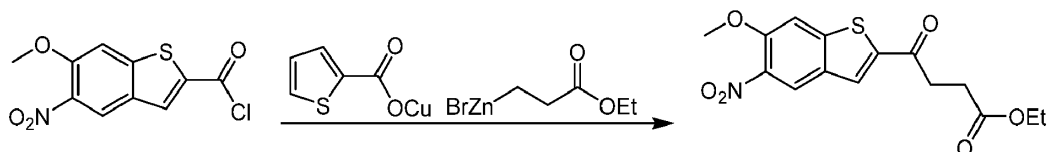
20 Una mezcla de 2-fluoro-4-metoxi-5-nitrobenzaldehído (1,14 g, 5,72 mmol), 2-mercaptoacetato de metilo (0,77 ml, 8,6 mmol) y K₂CO₃ (2,37 g, 17,2 mmol) en DMF (50 ml) se agitó durante 12 h a 60 °C. La mezcla de reacción se enfrió a ta y a continuación se vertió en 500 ml de hielo-agua. Se añadió HCl ac. (1 M) para ajustar a pH 5. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con H₂O (3x100 ml) y se secó a presión reducida para dar 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo, que se usó directamente en la siguiente etapa. LCMS (C₁₁H₁₀NO₅S) (ES, m/z): 268 [M+H]⁺.

Etapa 3: Ácido 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carboxílico

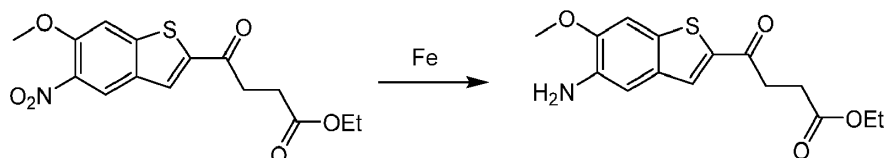
30 A una suspensión de 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo (1,50 g, 5,61 mmol) en H₂O (10 ml), THF (10 ml) y MeOH (10 ml) se le añadió LiOH·H₂O (0,707 g, 16,8 mmol). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 5 h y a continuación se enfrió a ta. El disolvente orgánico se eliminó a presión reducida, el residuo se diluyó con 20 ml H₂O, y la mezcla se extrajo con DCM (3x10 ml). La capa ac. se acidificó con una solución ac. de HCl (1 M) a pH 5. El precipitado se recogió por filtración y a continuación se lavó con H₂O (3x10 ml). El sólido resultante se secó a presión reducida para dar 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carboxílico, que se usó directamente en la siguiente etapa. LCMS (C₁₀H₈NO₅S) (ES, m/z): 254 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13,93-13,26 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 3,98 (s, 3H).

Etapa 4: Cloruro de 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carbonilo

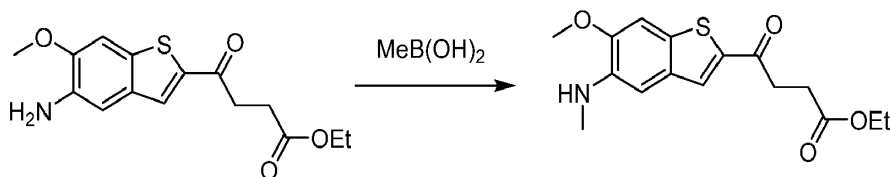
45 A una solución agitada de ácido 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (400 mg, 1,58 mmol) en THF anhidro (15 ml) se le añadió gota a gota (COCl)₂ (1,20 g, 9,48 mmol) a 0 °C. La mezcla se calentó a 75 °C durante 15 h y a continuación se enfrió a ta. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el cloruro de 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carbonilo en bruto, que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Etapas 5: 4-(6-Metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo

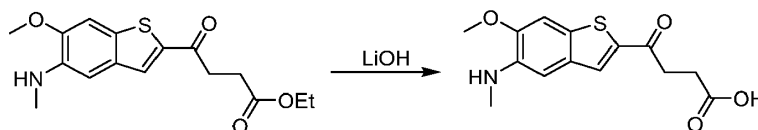
- 5 Una solución de bromuro de (3-etoxi-3-oxopropil)cinc (II) (17,7 ml, 0,5 M en THF, 8,83 mmol) se añadió en un matraz secado en estufa que contenía ((tiofeno-2-carbonil)oxi)cobre (1,69 g, 8,83 mmol) en una atmósfera de Ar a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a 0 °C en una atmósfera de Ar. A continuación, a la mezcla de reacción se le añadió una solución desgasificada con Ar de cloruro de 6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofeno-2-carbonilo (800 mg, 2,94 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C; la suspensión resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 8 h más. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se inactivó con una solución ac. sat. de NH₄Cl (30 ml). La mezcla se dejó calentar a ta y se agitó durante 10 min. La mezcla se filtró, y el filtrado se diluyó con EtOAc (50 ml) y salmuera (30 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con más cantidad de salmuera (50 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo se purificó por TLC prep. (SiO₂, DCM en PE) para dar 4-(6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS (C₁₅H₁₆NO₆S) (ES, m/z): 338 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,36 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 4,24-4,16 (m, 2H), 4,05 (s, 3H), 3,34 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,81 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 1,33-1,27 (m, 3H).

Etapas 6: 4-(5-Amino-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo

- 20 A una solución de 4-(6-metoxi-5-nitrobenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (140 mg, 0,415 mmol) en EtOH (2 ml), THF (2 ml) y H₂O (2 ml) se le añadieron Fe (116 mg, 2,08 mmol) y NH₄Cl (222 mg, 4,15 mmol). La mezcla se calentó a 80 °C durante 1 h, se enfrió a ta y se filtró. Al filtrado se le añadió H₂O (10 ml), y la capa ac. se extrajo con EtOAc (3x5 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron. El filtrado se concentró a presión reducida para dar 4-(5-amino-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo, que se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación. LCMS (C₁₅H₁₆NO₄S) (ES, m/z): 308 [M+H]⁺.

Etapas 7: 4-(6-Metoxi-5-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo

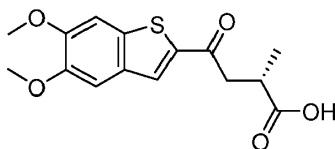
- 35 A una solución agitada de 4-(5-amino-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (55 mg, 0,18 mmol), MeB(OH)₂ (16,1 mg, 0,268 mmol) y py (56,6 mg, 0,716 mmol) en 1,4-dioxano (2,0 ml) se le añadió diacetoxicobre (48,8 mg, 0,268 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 2 h y a continuación se enfrió a ta. La mezcla se filtró, y el filtrado se diluyó con EtOAc (5,0 ml) y salmuera (5,0 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con más cantidad de salmuera (5 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida para dar 4-(6-metoxi-5-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo, que se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación. LCMS (C₁₆H₂₀NO₄S) (ES, m/z): 322 [M+H]⁺.

Etapas 8: Ácido 4-(6-metoxi-5-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

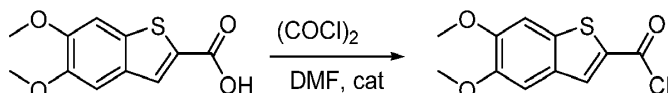
- 45 A una suspensión de 4-(6-metoxi-5-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (30 mg, 0,093 mmol) en MeOH (0,5 ml), THF (0,5 ml) y H₂O (0,5 ml) se le añadió LiOH (44,7 mg, 1,87 mmol). La suspensión resultante se calentó a 50 °C durante 2 h y a continuación se enfrió a ta. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente, y el residuo se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para dar ácido 4-(6-

metoxi-5-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS ($C_{14}H_{16}NO_4S$) (ES, m/z): 294 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ 8,07 (s, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,36-3,33 (m, 2H), 2,94 (s, 3H), 2,73 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H).

5 Ejemplo 11: Ácido (S)-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

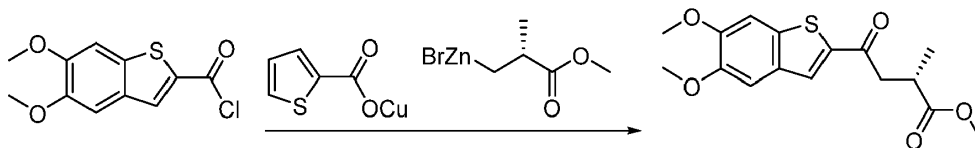


10 Etapa 1: Cloruro de 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonilo



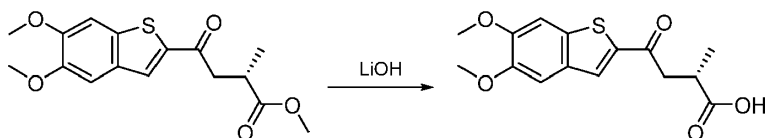
A una solución en agitación de ácido 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carboxílico de la Preparación 3 (5,0 g, 21 mmol) en THF (200 ml) a 0 °C en una atmósfera de Ar se le añadió (COCl)₂ (5,5 ml, 63 mmol) seguido de DMF (0,1 ml, 1,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h, a continuación se dejó calentar a ta y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el cloruro de 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonilo resultante se usó en la siguiente etapa sin purificación. ¹H RMN (600 MHz, CH₃CN-*d*₃): δ 8,25 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,88 (s, 3H).

20 Etapa 2: (S)-4-(5,6-Dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo



En un matraz de fondo redondo purgado con Ar secado a la estufa que contenía tiofen-2-carboxilato de sobre (I) (797 mg, 4,2 mmol) a 0 °C se le añadió gota a gota bromuro de (*R*)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (7,8 ml, 0,5 M en THF, 3,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 20 min. A la mezcla de reacción se le añadió gota a gota una suspensión de cloruro de 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonilo (777 mg, 3,0 mmol) en THF (15 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar a ta y se agitó durante 6 h. La mezcla de reacción se diluyó con una solución ac. sat. de NH₄Cl (15 ml), seguido de DCM (30 ml). Los precipitados se eliminaron por filtración antes de la extracción. Las capas se separaron, y la capa ac. se extrajo con DCM (3x30 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice ((EtOH al 25 % en EtOAc) en Hex) para proporcionar (S)-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo. LCMS ($C_{16}H_{19}O_5S$) (ES, m/z): 323 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, CHCl₃-*d*): δ 7,89 (s, 1H), 7,26 (s, 2H), 4,00 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,48 (dd, *J* = 16,9; 7,6 Hz, 1H), 3,22-3,16 (m, 1H), 3,05 (dd, *J* = 16,9; 6,0 Hz, 1H), 1,31 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H).

35 Etapa 3: Ácido (S)-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico



A una solución de (S)-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo (200 mg, 0,62 mmol) en H₂O (1,2 ml) y THF (5 ml) se le añadió LiOH (59 mg, 2,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta. La mezcla de reacción se ajustó a ~pH 2 usando más cantidad de HCl ac. 1 M. A la mezcla de reacción se le añadió DCM (15 ml), y las capas se separaron. La capa orgánica se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice ((EtOH al 25 % en EtOAc) en Hex) para proporcionar ácido (S)-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS ($C_{15}H_{17}O_5S$) (ES, m/z): 309 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, CH₃OH-*d*₄): δ 8,06 (s, 1H), 7,41 (s, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,46 (dd, *J* = 17,1; 8,3 Hz, 1H), 3,08 (dd, *J* = 17,2; 5,3 Hz, 1H), 3,04-2,98 (m, 1H), 1,26 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

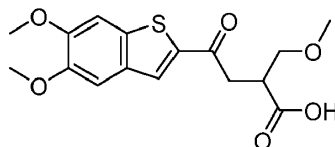
Los Ejemplos 12 a 16, como se muestran en la Tabla 2 a continuación, se prepararon o pueden prepararse de acuerdo con procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 11 anterior usando los materiales de partida apropiados,

descritos como Preparaciones o como se obtienen a partir de fuentes comerciales.

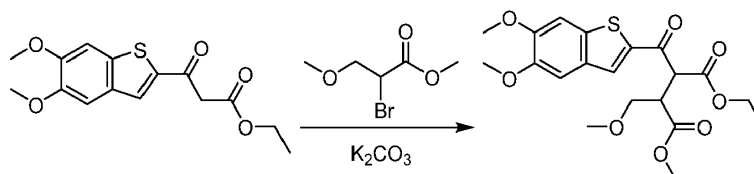
Tabla 2

Ej.	Estructura	Nombre	Masa [M+H] ⁺
12		4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de terc-butilo	295 [M - C ₄ H ₈]
13		Ácido (S)-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	327
14		Ácido 4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico	313
15		Ácido (S)-4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	357, 359
16		Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico	295

5 Ejemplo 17: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-(metoximetil)-4-oxobutanoico

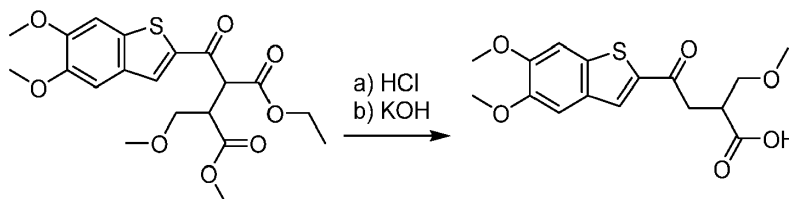


10 Etapa 1: 4-Metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-3-(metoximetil)succinato de 1-etilo



A una solución en agitación de 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tien-2-il)-3-oxopropanoato de etilo (SPECS, 231 mg, 0,75 mmol) en DMF (2,5 ml) se le añadió 2-bromo-3-metoxipropanoato de metilo (125 µl, 0,93 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con H₂O (3 ml) y DCM (6 ml). Las fases se separaron, y la capa ac. se lavó con DCM (3x6 ml). Los productos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida y se secaron durante una noche al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice ((EtOH al 25 % en EtOAc) en Hex) para dar 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-3-(metoximetil)succinato de 1-etilo, que se usó sin purificación adicional. LCMS (C₂₀H₂₅O₈S) (ES, m/z): 425 [M+H]⁺.

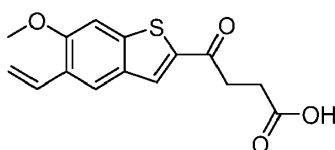
Etapa 2: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-(metoximetil)-4-oxobutanoico



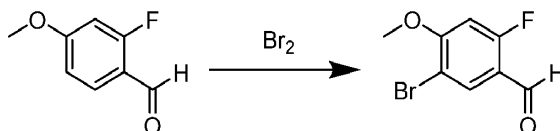
A una solución en agitación de 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-3-(metoximetil)succinato de 1-etilo (200 mg, 0,5 mmol) en EtOH (3 ml) se le añadió una solución ac. de HCl (490 µl, 6 M, 2,9 mmol) a ta. La mezcla de

reacción se calentó a 100 °C en un vial para microondas sellado durante 2 h. Tras el enfriamiento, se añadió una solución ac. de KOH (490 µl, 10 M, 4,9 mmol) a la mezcla de reacción en agitación, y la mezcla de reacción se volvió a calentar a 100 °C durante 1 h. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a ~2 con una solución ac. de HCl (1 M) según lo indicado por las tiras reactivas de pH. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el EtOH, a continuación se diluyó con DCM (10 ml). Las capas se separaron, y la capa ac. se extrajo con DCM (3x10 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílice ((EtOH al 25 % en EtOAc) en Hex). Las fracciones que contenían producto se concentraron a presión reducida para dar ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-(metoximetil)-4-oxobutanoico. La mezcla racémica se resolvió por SFC quiral (CHIRACEL OJ-H (250 mm*21 mm), MeOH al 25 % (DMEA al +0,25 %) en CO₂), proporcionando dos compuestos con tiempos de retención de 3,12 min y 3,96 min. La concentración del primer pico de elución proporcionó el producto. LCMS (C₁₆H₁₉O₆S) (ES, m/z): 339 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆): δ 12,32 (1H, s), 8,18 (1H, s), 7,56 (1H, s), 7,44 (1H, s), 3,83 (3H, s), 3,80 (3H, s), 3,58-3,51 (2H, m), 3,46-3,40 (1H, m), 3,22 (3H, s), 3,09-3,07 (2H, m).

Ejemplo 18: Ácido 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

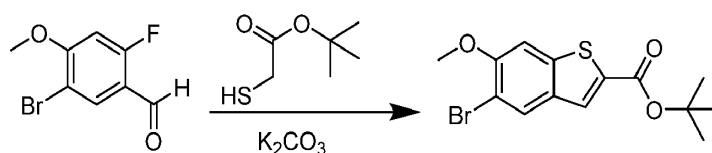


Etapas 1: 5-Bromo-2-fluoro-4-metoxibenzaldehído



Se añadió lentamente (en porciones) 2-fluoro-4-metoxibenzaldehído (9,0 g, 58 mmol) a una solución de Br₂ (6,0 ml, 120 mmol) en MeOH (40 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h. Una solución de NaHSO₃ (24,3 g, 234 mmol) en H₂O (300 ml) se añadió lentamente a la mezcla de reacción a 0 °C. A continuación la suspensión resultante se agitó durante 30 min a 0 °C. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se lavó con más cantidad de H₂O (3x25 ml). A continuación, el filtrado se secó a presión reducida para proporcionar 5-bromo-2-fluoro-4-metoxibenzaldehído. El producto se usó sin purificación. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10,02 (s, 1H), 7,98 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,26 (d, J = 13,0 Hz, 1H), 3,97 (s, 3H).

Etapas 2: 5-Bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de terc-butilo



Se añadió lentamente (en porciones) K₂CO₃ (19,0 g, 137 mmol) a una solución de 5-bromo-2-fluoro-4-metoxibenzaldehído (10,7 g, 45,8 mmol) y 2-mercaptoacetato de *terc*-butilo (6,65 ml, 45,8 mmol) en DMF (50 ml) a 20 °C en una atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se agitó y se calentó a 100 °C durante 16 h. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a ta y se diluyó con Et₂O (1000 ml). A continuación, la mezcla se lavó con H₂O (500 ml, a continuación 2x250 ml), y las capas ac. combinadas se extrajeron con Et₂O (2x200 ml). A continuación, las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de *terc*-butilo. El producto se usó sin purificación. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8,26 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 3,92 (s, 3H), 1,55 (s, 9H).

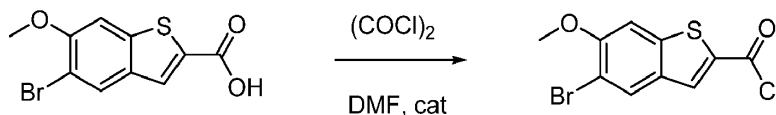
Etapas 3: Ácido 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico



Se añadió HCl (56 ml, 4,0 M en 1,4-dioxano, 230 mmol) a una solución de 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de *terc*-butilo (15,5 g, 45,0 mmol) en DCM (200 ml) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 3 días. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó mediante la adición gota a gota de Hex (500 ml). La suspensión

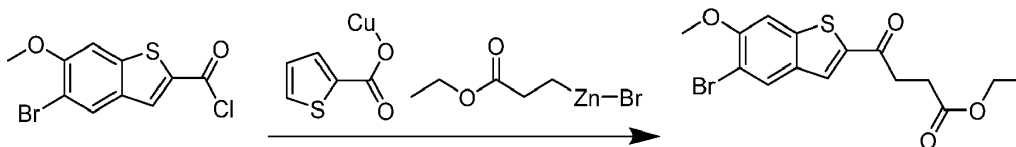
resultante se agitó durante 2 h más después de la adición a ta. La mezcla de reacción se filtró, y los sólidos recogidos se lavaron con Hex (2x50 ml) y se secaron a presión reducida para proporcionar ácido 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico, que se usó sin purificación. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 13,42 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 3,93 (s, 3H).

Etapas 4: Cloruro de 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo



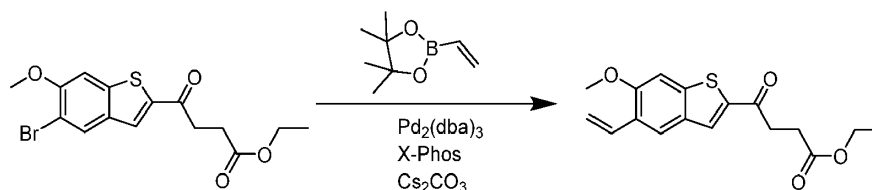
Se añadió lentamente (gota a gota) DMF (0,049 ml, 0,63 mmol) a una solución de ácido 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (6,0 g, 21 mmol) y $(\text{COCl})_2$ (5,5 ml, 63 mmol) en THF (100 ml) a 0 °C en una atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h y a continuación se dejó calentar a ta. La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a ta. A continuación, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar cloruro de 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo. El producto se usó sin purificación.

Etapas 5: 4-(5-Bromo-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



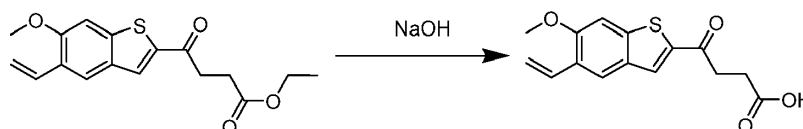
Una solución de bromuro de (3-etoxi-3-oxopropil)cinc (II) (13,8 ml, 0,50 M en THF, 6,9 mmol) se añadió en un matraz secado a la estufa que contenía ((tiofeno-2-carbonil)oxi)cobre (1,31 g, 6,87 mmol) en una atmósfera de Ar a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a 0 °C en una atmósfera de Ar. A continuación, se añadió una solución desgasificada con Ar de cloruro de 5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo (1,52 g, 4,98 mmol) en THF (25,0 ml) a través de una cánula a la mezcla de reacción a 0 °C; la suspensión resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 3 h más. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se inactivó con NH_4Cl ac. sat. (50 ml). La mezcla se dejó calentar a ta y se agitó durante 10 min más. La mezcla se filtró, y el filtrado se diluyó con EtOAc (500 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con más cantidad de salmuera (25 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en DCM) para proporcionar 4-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrO}_4\text{S}$) (ES, m/z): 371, 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8,27 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,81 (s, 1H), 4,07-4,02 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,35-3,25 (m, 2H), 2,68-2,64 (m, 2H), 1,20-1,14 (m, 3H).

Etapas 6: 4-(6-Metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



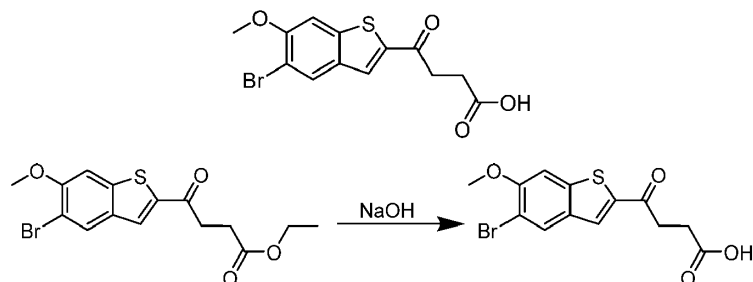
A una mezcla desgasificada con Ar de 4-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (100 mg, 0,269 mmol), 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (50 mg, 0,32 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (12 mg, 0,013 mmol), X-phos (13 mg, 0,027 mmol) y Cs_2CO_3 (263 mg, 0,808 mmol) se le añadieron 1,4-dioxano (3 ml) y H_2O (0,3 ml) a ta mientras se desgasificaba con Ar. La mezcla de reacción se agitó durante 5 min mientras se desgasificaba con Ar (pulverización subsuperficial), después de lo cual la mezcla se calentó a 90 °C en una atmósfera de Ar durante 2 h. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a ta y se diluyó con EtOAc (20 ml). La suspensión resultante se filtró a través de una frita que contenía MgSO_4 . La capa orgánica (filtrado) se concentró a presión reducida. El residuo de producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en DCM) para proporcionar 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{S}$) (ES, m/z): 319 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Etapas 7: Ácido 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico



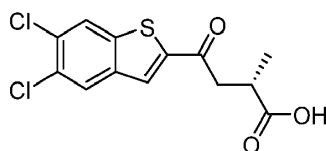
Se añadió una solución ac. de NaOH (0,33 ml, 1,0 M, 0,33 mmol) a una solución de 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (21 mg, 0,066 mmol) en MeOH (4,0 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 18 h. La mezcla de reacción se inactivó con una solución ac. de HCl (0,33 ml, 1,0 M, 0,33 mmol) y a continuación se concentró a presión reducida. El residuo de producto en bruto se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₅H₁₅O₄S) (ES, m/z): 291 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,21 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,00 (dd, *J* = 17,5; 11,5 Hz, 1H), 5,87 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 5,33 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,30-3,24 (m, 2H), 2,63-2,56 (m, 2H).

Ejemplo 19: Ácido 4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

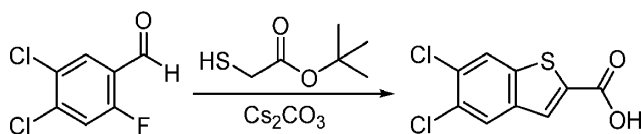


Se añadió una solución ac. de NaOH (0,54 ml, 1,0 M, 0,54 mmol) a una solución de 4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo del Ejemplo 17, etapa 5 (40 mg, 0,11 mmol) en MeOH (2,0 ml). La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 24 h. La mezcla de reacción se inactivó con una solución ac. de HCl (0,54 ml, 1,0 M, 0,54 mmol). A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido 4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₃H₁₂BrO₄S) (ES, m/z): 343, 345 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,23 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,81 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,29-3,24 (m, 2H), 2,62-2,57 (m, 2H).

Ejemplo 20: Ácido 4-((*S*)-4-(5,6-diclorobenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

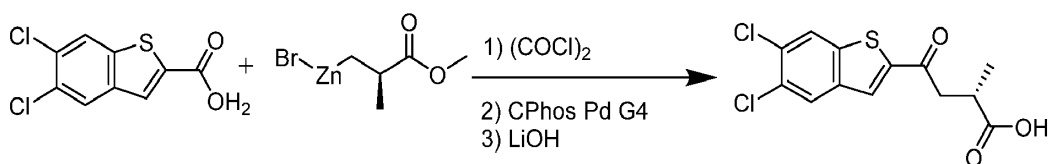


Etapla 1: Ácido 5,6-diclorobenzo[*b*]tiofen-2-carboxílico



A una solución de 4,5-dicloro-2-fluorobenzaldehído (V-Pharma, 386 mg, 2,00 mmol), 2-mercaptoacetato de *tert*-butilo (356 mg, 2,40 mmol) y tolueno (5 ml) se le añadió Cs₂CO₃ (1,30 g, 4,00 mmol), y la reacción se calentó a reflujo durante 2 h. A continuación, la mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se lavó con tolueno (5 ml). A continuación, al filtrado se le añadió TFA (10 ml), y la mezcla se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con tolueno y hexanos y se secó a presión reducida para proporcionar ácido 5,6-diclorobenzo[*b*]tiofen-2-carboxílico. LCMS (C₉H₃Cl₂O₂S) (ES, m/z): 245 [M-H]⁻.

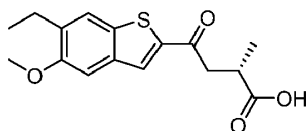
Etapla 2: Ácido (*S*)-4-(5,6-diclorobenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico



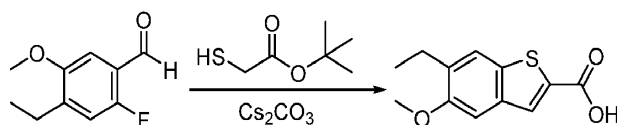
A una mezcla de ácido 5,6-diclorobenzo[*b*]tiofen-2-carboxílico (0,049 g, 0,20 mmol) y DCM (2 ml) se le añadió DMF (4 ul, 0,055 mmol). A continuación, se añadió (COCl)₂ (0,175 ml, 2,00 mmol), y la reacción se agitó a ta durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en THF (2,0 ml), se añadió CPhos Pd G4

de la Preparación 1 (0,033 g, 0,040 mmol), y la mezcla se agitó mientras se añadía bromuro de (*R*)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (0,40 ml, 0,5 M en THF, 0,20 mmol) todo a la vez. La reacción se agitó durante 2 h, y a continuación se añadieron LiOH (0,048 g, 2,0 mmol), H₂O (1 ml) y MeOH (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h más, y a continuación el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó a través de HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (*S*)-4-(5,6-diclorobenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₃H₁₁Cl₂O₃S) (ES, *m/z*): 317 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,45 (s, 1 H), 8,31 (s, 1 H), 8,28 (s, 1 H), 3,38 (dd, *J* = 17,4; 8,5 Hz, 1H), 3,10 (dd, *J* = 17,6; 5,0 Hz, 1H), 2,90-2,84 (m, 1H), 1,16 (d, 3H).

Ejemplo 21: Ácido (*S*)-4-(6-etil-5-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

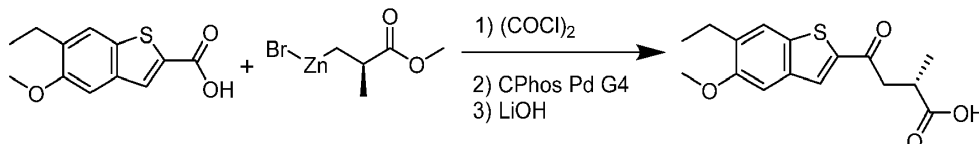


Etapas 1: Ácido 6-etil-5-metoxibenzo[*b*]tiofeno-2-carboxílico



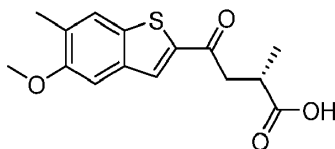
A una solución agitada de 4-etil-2-fluoro-5-metoxibenzaldehído (Biogene Organics, 364 mg, 2,00 mmol), 2-mercaptoacetato de *tert*-butilo (356 mg, 2,40 mmol) y tolueno (5 ml) se le añadió Cs₂CO₃ (1,30 g, 4,00 mmol), y la reacción se calentó a reflujo durante 2 h. A continuación, la mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se lavó con tolueno (5 ml). A continuación, al filtrado se le añadió TFA (10 ml), y la mezcla se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con tolueno y Hex y se secó a presión reducida para proporcionar ácido 6-etil-5-metoxibenzo[*b*]tiofeno-2-carboxílico. LCMS (C₁₂H₁₁O₃S) (ES, *m/z*): 236 [M-H]⁻.

Etapas 2: Ácido (*S*)-4-(6-etil-5-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

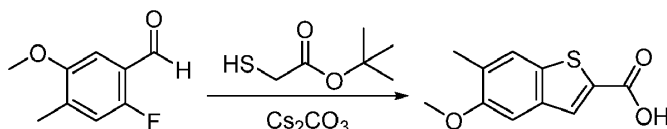


A una mezcla de ácido 6-etil-5-metoxibenzo[*b*]tiofeno-2-carboxílico (0,047 g, 0,20 mmol) y DCM (2 ml) se le añadió DMF (4 ul, 0,055 mmol). A continuación, se añadió (COCl)₂ (0,175 ml, 2,00 mmol), y la reacción se agitó a ta durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en THF (2,0 ml), se añadió CPhos Pd G4 de la Preparación 1 (0,033 g, 0,040 mmol), y la mezcla se agitó mientras se añadía bromuro de (*R*)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (0,40 ml, 0,5 M en THF, 0,20 mmol) todo a la vez. La reacción se agitó durante 2 h, y a continuación se añadieron LiOH (48 mg, 2,0 mmol), H₂O (1 ml) y MeOH (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h más, y a continuación el disolvente se eliminó a presión reducida. A continuación, el residuo se purificó a través de HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (*S*)-4-(6-etil-5-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₆H₁₉O₄S) (ES, *m/z*): 307 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,21 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,43 (s, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,38 (dd, *J* = 17,4; 8,5 Hz, 1H), 3,07 (dd, *J* = 17,4; 5,1 Hz, 1H), 2,87-2,84 (m, 1H), 2,65 (c, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,16-1,14 (m, 6H).

Ejemplo 22: Ácido (*S*)-4-(5-metoxi-6-metilbenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

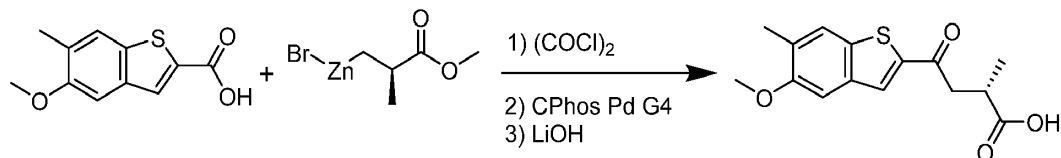


Etapas 1: Ácido 5-metoxi-6-metilbenzo[*b*]tiofeno-2-carboxílico



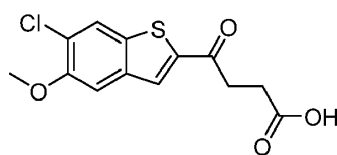
A una solución agitada de 2-fluoro-5-metoxi-4-metilbenzaldehído (Biogene Organics, 336 mg, 2,00 mmol), 2-mercaptoacetato de *tert*-butilo (356 mg, 2,40 mmol) y tolueno (5 ml) se le añadió Cs₂CO₃ (1,30 g, 4,00 mmol), y la reacción se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se lavó con tolueno (5 ml). A continuación, al filtrado se le añadió TFA (10 ml), y la mezcla se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con tolueno y Hex y se secó a presión reducida para proporcionar ácido 5-metoxi-6-metilbenzo[b]tiofeno-2-carboxílico. LCMS (C₁₁H₉O₃S) (ES, m/z): 221 [M-H]⁻.

Etapas 2: Ácido (S)-4-(5-metoxi-6-metilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

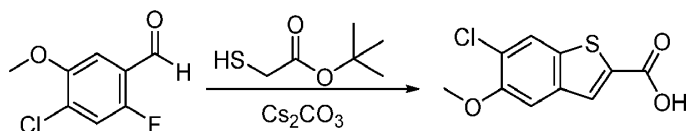


A una mezcla de ácido 5-metoxi-6-metilbenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (0,044 g, 0,20 mmol) y DCM (2 ml) se le añadió DMF (4 µl, 0,055 mmol). A continuación, se añadió (COCl)₂ (0,175 ml, 2,00 mmol), y la reacción se agitó a ta durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en THF (2,0 ml), se añadió CPhos Pd G4 (0,033 g, 0,040 mmol), y la mezcla se agitó mientras se añadía bromuro de (*R*)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (0,40 ml, 0,5 M en THF, 0,20 mmol) todo a la vez. La reacción se agitó durante 2 h, y a continuación se añadieron LiOH (48 mg, 2,0 mmol), H₂O (1 ml) y MeOH (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h más, y a continuación el disolvente se eliminó a presión reducida. A continuación, el residuo se purificó a través de HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (S)-4-(5-metoxi-6-metilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₅H₁₇O₄S) (ES, m/z): 293 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,21 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,38 (dd, *J* = 17,4; 8,5 Hz, 1H), 3,06 (dd, *J* = 17,4; 5,2 Hz, 1H), 2,88-2,83 (m, 1H), 2,24 (s, 3H), 1,15 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H).

Ejemplo 23: Ácido 4-(6-cloro-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

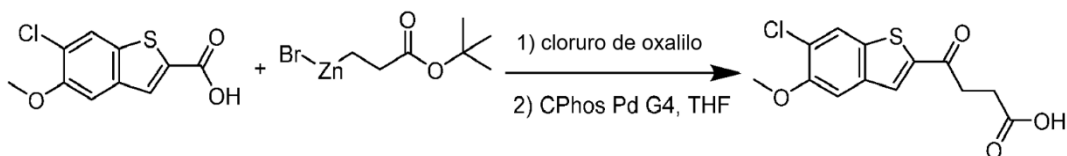


Etapas 1: Ácido 6-cloro-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico



A una solución agitada de 4-cloro-2-fluoro-5-metoxibenzaldehído (38 mg, 0,20 mmol), 2-mercaptoacetato de *tert*-butilo (54 mg, 0,30 mmol) y 1,4-dioxano (2 ml) se le añadió Cs₂CO₃ (326 mg, 1,00 mmol), y la reacción se calentó a reflujo durante 4 h. A continuación, la mezcla de reacción se filtró, se lavó con 1,4-dioxano (2 ml) y se concentró a presión reducida. El concentrado se suspendió en DCM (1 ml) y se añadió TFA (1 ml). A continuación, la reacción se agitó a ta durante 2 h. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar ácido 6-cloro-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico. LCMS (C₁₀H₆ClO₃S) (ES, m/z): 241 [M-H]⁻.

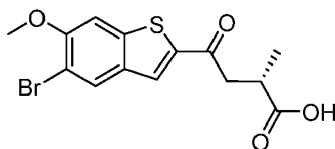
Etapas 2: Ácido 4-(6-cloro-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico



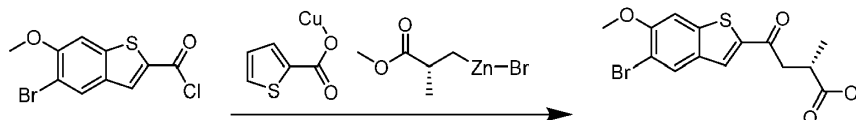
A una mezcla de ácido 6-cloro-5-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (0,045 g, 0,20 mmol) y DCM (2 ml) se le añadió DMF (4 µl, 0,055 mmol). A continuación, se añadió (COCl)₂ (0,175 ml, 2,00 mmol). La reacción se agitó a ta durante 1 h, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en THF (2,0 ml), se añadió CPhos Pd G4 de la Preparación 1 (0,033 g, 0,040 mmol), y la mezcla se agitó mientras se añadía bromuro de 3-*tert*-butoxi-3-oxopropilcinc (0,40 ml, 0,5 M en THF, 0,20 mmol) todo a la vez. La reacción se agitó durante 2 h, y a continuación el disolvente se eliminó a presión reducida. A continuación, se añadieron DCM (1 ml) y TFA (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h más, y a continuación el disolvente se eliminó a presión reducida. A continuación, el

residuo se purificó a través de HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido 4-(6-cloro-5-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₃H₁₂ClO₄S) (ES, m/z): 299 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,23 (s, 1 H), 8,18 (s, 1 H), 7,65 (s, 1 H), 3,89 (s, 3 H), 3,23 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H), 2,52 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H).

5 Ejemplo 24: Ácido (S)-4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

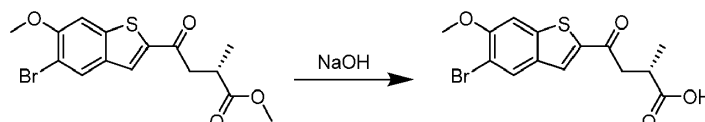


10 Etapa 1: (S)-4-(5-Bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo



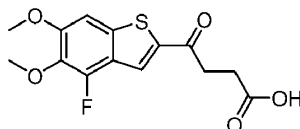
Se añadió una solución de bromuro de (*R*)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (57,7 ml, 0,50 M) en THF (28,9 mmol) en un matraz secado a la estufa que contenía ((tiofeno-2-carbonil)oxi)cobre (5,50 g, 28,9 mmol) en una atmósfera de Ar a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a 0 °C en una atmósfera de Ar. A continuación, se añadió una solución desgasificada con Ar de cloruro de 5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofeno-2-carbonilo del Ejemplo 18, etapa 4 (6,39 g, 20,9 mmol) en THF (100 ml) a través de una cánula a la mezcla de reacción a 0 °C. La suspensión resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 3 h más. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió a través de una cánula a una mezcla en agitación de NH₄Cl ac. sat. (300 ml) y EtOAc (500 ml). La mezcla se dejó calentar a ta y se agitó durante 16 h más. La mezcla se filtró, y el filtrado se diluyó con EtOAc (1000 ml) y salmuera (100 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con más cantidad de salmuera (50 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en DCM) para proporcionar (S)-4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo. LCMS (C₁₅H₁₆BrO₄S) (ES, m/z): 371, 373 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,27-8,24 (m, 2H), 7,80 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,46-3,39 (m, 1H), 3,23-3,16 (m, 1H), 3,01-2,93 (m, 1H), 1,19 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H).

25 Etapa 2: Ácido (S)-4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

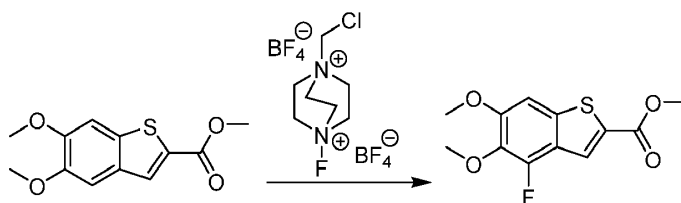


Se añadió una solución ac. de NaOH (0,61 ml, 1,0 M, 0,61 mmol) a una solución de (S)-4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo (50 mg, 0,14 mmol) en THF (4,0 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 18 h. La mezcla de reacción se inactivó con una solución ac. de HCl (0,61 ml, 1,0 M, 0,61 mmol). A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto, que se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (S)-4-(5-bromo-6-metoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₄H₁₄BrO₄S) (ES, m/z): 357, 359 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,22 (s, 1H), 8,27-8,24 (m, 2H), 7,81 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,44-3,35 (m, 1H), 3,14-3,06 (m, 1H), 2,94-2,85 (m, 1H), 1,18 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H).

40 Ejemplo 25: Ácido 4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

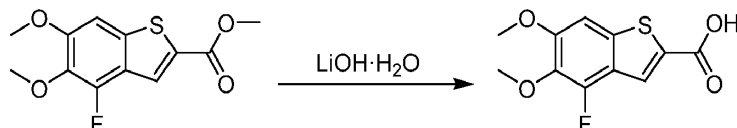


45 Etapa 1: 4-Fluoro-5,6-dimetoxibenzo[*b*]tiofeno-2-carboxilato de metilo



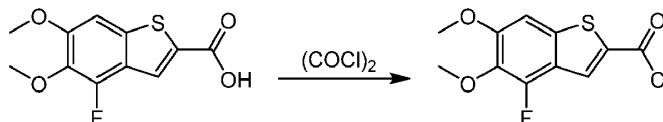
Se añadió 1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octanobis(tetrafluoroborato) (SELECTFLUOR™, 77 mg, 0,22 mmol) a una mezcla de 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo de la Preparación 2 (50 mg, 0,20 mmol) en ACN (1 ml) a ta. La mezcla resultante se agitó a 45 °C durante 15 h. La mezcla se enfrió a ta, se diluyó con NaHCO₃ ac. sat. (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3x10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por TLC prep. (SiO₂, EtOAc en PE) para dar 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo. LCMS (C₁₂H₁₂FO₄S) (ES, m/z): 293 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,05 (s, 1H), 7,08 (s, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,94 (s, 3H).

Etapas 2: Ácido 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico



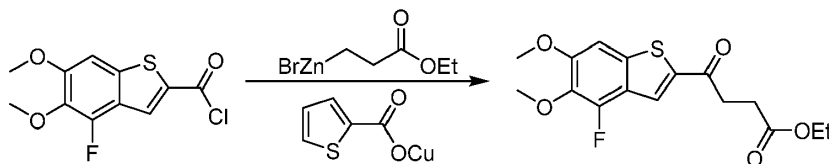
Se añadió en porciones LiOH·H₂O (71,4 mg, 1,70 mmol) a una mezcla de 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de metilo (46 mg, 0,170 mmol) en THF (3 ml), MeOH (1 ml) y H₂O (1 ml) a ta. A continuación, la mezcla se agitó durante 15 h. La mezcla se ajustó a pH = 5 con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc (3x10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para dar ácido 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico. LCMS (C₁₁H₉FO₄S) (ES, m/z): 257 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,12 (s, 1H), 7,09 (s, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,97 (s, 3H).

Etapas 3: Cloruro de 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo

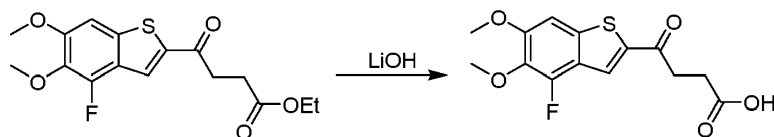


A una solución agitada de ácido 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (153 mg, 0,60 mmol) en THF anhidro (5 ml) se le añadió gota a gota (COCl)₂ (0,21 ml, 2,40 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y a continuación a ta durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar cloruro de 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo, que se usó sin purificación adicional.

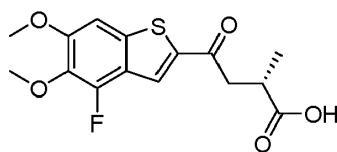
Etapas 4: 4-(4-Fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



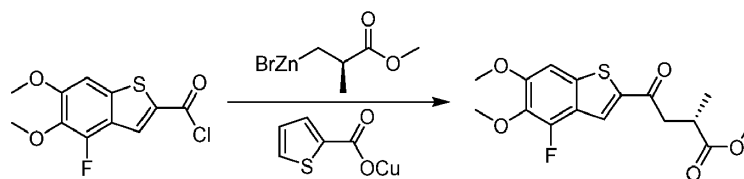
Una suspensión de tiofeno-2-carboxilato de cobre (I) (125 mg, 0,65 mmol) se pulverizó con N₂ durante 5 min y a continuación se enfrió a 0 °C. Se añadió una solución de bromuro de (3-etoxi-3-oxopropil)cinc (II) (17,7 ml, 0,5 M en THF, 8,83 mmol) en una atmósfera de N₂ a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó durante 20 min a 0 °C. A continuación se añadió una solución pulverizada con N₂ de cloruro de 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo (130 mg, 0,47 mmol) en THF (3 ml) a la mezcla de reacción a 0 °C. La suspensión resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 8 h más. La mezcla de reacción se vertió en NH₄Cl ac. sat. (20 ml) con agitación. La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O y salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para dar 4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS (C₁₆H₁₈FO₅S) (ES, m/z): 341 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,02 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,10 (t, J = 1,0 Hz, 1H), 4,19 (c, J = 7,2 Hz, 2H), 4,05-3,97 (m, 6H), 3,36 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,81 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 1,29 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Etapa 5: Ácido 4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

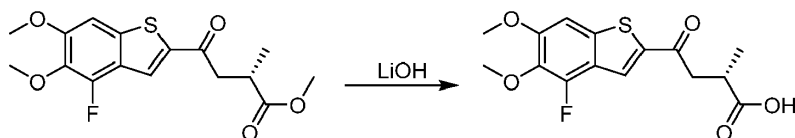
- 5 A una solución de 4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (124 mg, 0,36 mmol) en MeOH (1,5 ml) y THF (1,5 ml) se le añadió LiOH ac. 1 N (1,5 ml, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se añadió HCl ac. 1 N (1,5 ml, 1,5 mmol). El precipitado resultante se recogió por filtración con succión y se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido 4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₄H₁₄FO₅S) (ES, m/z): 313 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,19 (s, 1H), 8,33 (d, *J* = 0,7 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,35-3,28 (m, 2H), 2,64-2,57 (m, 2H).

Ejemplo 26: Ácido (S)-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

15

Etapa 1: (S)-4-(4-Fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo

- 20 Una suspensión de tiofeno-2-carboxilato de cobre (I) (125 mg, 0,65 mmol) se pulverizó con N₂ durante 5 min y a continuación se enfrió a 0 °C. Se añadió una solución de bromuro de (*R*)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (1,21 ml, 0,5 M en THF, 0,606 mmol) en una atmósfera de N₂, y la mezcla de reacción se agitó durante 20 min a 0 °C. A continuación se añadió una solución pulverizada con N₂ de cloruro de 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo del Ejemplo 25, etapa 3 (130 mg, 0,47 mmol) en THF (3 ml), y la suspensión resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 8 h más. La mezcla de reacción se vertió en NH₄Cl ac. sat. (20 ml) con agitación y a continuación se extrajo con EtOAc (2x20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O y salmera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para dar (S)-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo. LCMS (C₁₆H₁₈FO₅S) (ES, m/z): 341 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (d, *J* = 0,7 Hz, 1H), 7,09 (t, *J* = 1,0 Hz, 1H), 4,04-3,95 (m, 6H), 3,72 (s, 3H), 3,50 (dd, *J* = 17,0; 7,9 Hz, 1H), 3,23-3,12 (m, 1H), 3,06 (dd, *J* = 17,0; 5,7 Hz, 1H), 1,32 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H).

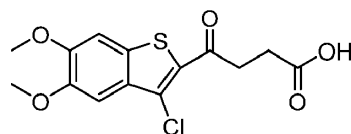
Etapa 2: Ácido (S)-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

35

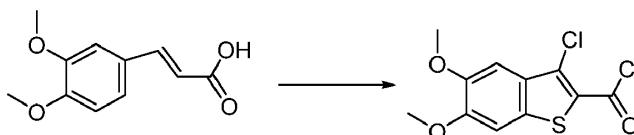
- A una solución de (S)-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo (90 mg, 0,26 mmol) en MeOH (1,5 ml) y THF (1,5 ml) se le añadió LiOH ac. 1 N (1,5 ml, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 1 h, y a continuación se añadió HCl ac. 1 N (1,5 ml, 1,5 mmol). El precipitado resultante se recogió por filtración con succión y se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (S)-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₅H₁₆FO₅S) (ES, m/z): 327 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,21 (s, 1H), 8,33 (d, *J* = 0,7 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,48 (dd, *J* = 17,6; 8,7 Hz, 1H), 3,14 (dd, *J* = 17,6; 5,0 Hz, 1H), 2,95-2,84 (m, 1H), 1,19 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 27: Ácido 4-(3-cloro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

45

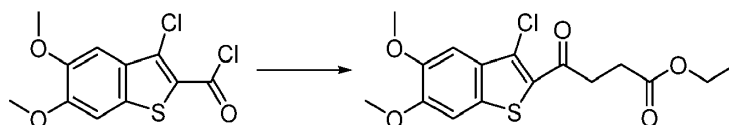


Etapla 1: Cloruro de 3-cloro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo



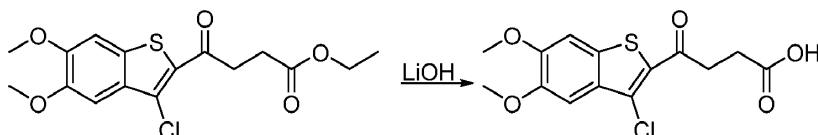
A una mezcla de reacción de ácido (E)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrílico (5,7 g, 27 mmol) en clorobenceno (40 ml) se le añadió lentamente SOCl_2 (9,0 ml, 120 mmol). Después de 30 min a ta, se añadió lentamente py (0,58 ml, 7,1 mmol). A continuación, la mezcla se calentó a reflujo durante 24 h. Tras el enfriamiento a ta, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar cloruro de 3-cloro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo que se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapla 2: 4-(3-cloro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



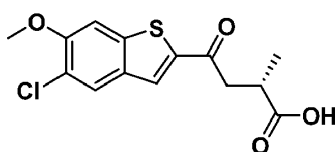
En un matraz de fondo redondo secado a la estufa se añadió Cu-Cl (510 mg, 5,2 mmol). El matraz de reacción se purgó con Ar. Se añadió bromuro de (3-etoxi-3-oxopropil)cinc (II) (0,5 M en THF, 12 ml, 6,2 mmol) a ta. Después de 30 min a ta, se añadió una mezcla de cloruro de 3-cloro-5,6-dimetoxibenzo [b]tiofeno-2-carbonilo (1,5 g, 5,2 mmol) en THF (10 ml). Después de 30 min, la mezcla se inactivó con NH_4Cl sat. (6,0 ml) y se diluyó con EtOAc. La capa orgánica se separó y a continuación se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para dar 4-(3-cloro-5,6-dimetoxibenzo [b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClO}_5\text{S}$) (ES, m/z): 357 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, Acetona- d_6) δ 7,56 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 4,13 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,47 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,75 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 1,24 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Etapla 3: Ácido 4-(3-cloro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

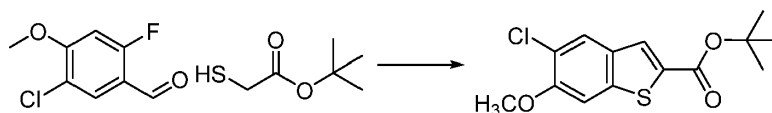


Una mezcla de 4-(3-cloro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (58 mg, 0,16 mmol) y LiOH (23 mg, 0,98 mmol) en THF (1,5 ml), H_2O (0,40 ml) y MeOH (1,0 ml) se dejó en agitación a ta durante 1,5 h. La mezcla de reacción se ajustó a un pH entre 3 y 4 con HCl (1,0 N en H_2O) y a continuación se diluyó con DCM. La capa orgánica se separó, y a continuación la capa de H_2O se extrajo de nuevo con DCM (2X20 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por HPLC prep. (ACN/ H_2O en TFA al 0,1 %). Las fracciones líquidas que contenían producto puro se combinaron y a continuación se liofilizaron con un liofilizador para producir ácido 4-(3-cloro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClO}_5\text{S}$) (ES, m/z): 329 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,22 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,34 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 2,62 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H).

Ejemplo 28: Ácido (S)-4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

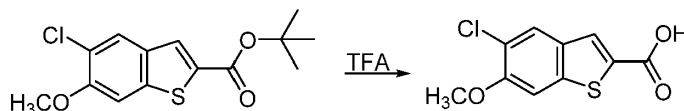


Etapla 1: 5-Cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de terc-butilo



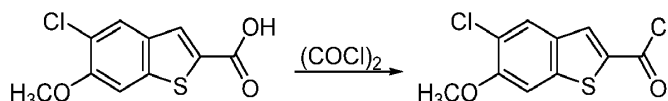
A una mezcla de 5-cloro-2-fluoro-4-metoxibenzaldehído (0,055 g, 0,3 mmol), Cs_2CO_3 (0,49 g, 1,5 mmol) y dioxano (1,5 ml) se le añadió 2-mercaptoacetato de *tert*-butilo (0,053 g, 0,36 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante 6 h. Después de 6 h, la mezcla se dejó enfriar a *ta* y a continuación se diluyó con dioxano (2,0 ml). Se añadió isocianato unido a poliestireno macroporoso (1,59 mmol/g-0,50 g), y la reacción se agitó a *ta* durante 1 h. Después de 1 h, la mezcla se filtró, se lavó con dioxano y se concentró a presión reducida para proporcionar una mezcla en bruto que contenía 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de *tert*-butilo que se llevó a la siguiente etapa sin purificación ni caracterización adicional.

Etapa 2: Ácido 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico



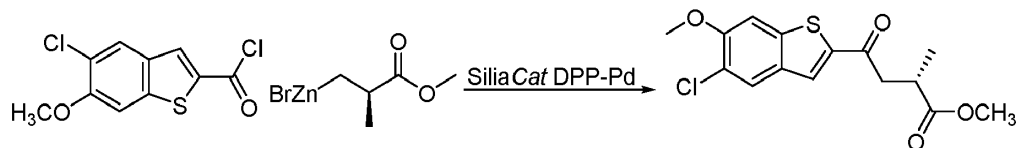
Al residuo en bruto que contenía 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxilato de *tert*-butilo se le añadieron DCM (1,0 ml) y TFA (1,0 ml). Después de 1 h, la mezcla se diluyó con Hex (2,0 ml) y a continuación se concentró a presión reducida para proporcionar ácido 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico que se llevó a la siguiente etapa sin purificación ni caracterización adicional.

Etapa 3: Cloruro de 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo



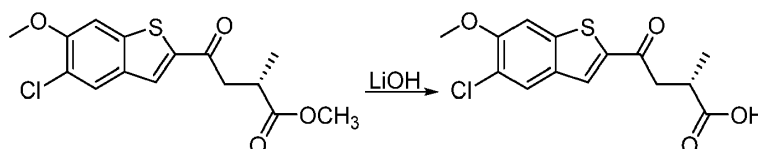
Al residuo en bruto que contenía ácido 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico se le añadió una mezcla de DMF en DCM (0,05 M DMF en DCM, 1,5 ml). Se añadió lentamente $(\text{COCl})_2$ (0,13 ml, 1,5 mmol) a la mezcla de reacción, y la mezcla se dejó en agitación durante 1 h. Después de 1 h, la mezcla se diluyó con Hex y a continuación se concentró a presión reducida para proporcionar cloruro de 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo que se llevó a la siguiente etapa sin purificación ni caracterización adicional.

Etapa 4: (S)-4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo



Al residuo en bruto que contenía cloruro de 5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonilo y bromuro de (R)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (0,5 M en THF, 1,2 ml, 0,60 mmol) se le añadió un catalizador de difenilfosfina-Pd(II) unido a una matriz de organosilíce $([\text{O}_3\text{Si}]_n(\text{CH}_2)_y\text{DPP-Pd})$, disponible comercialmente como SILIACAT® DPP-Pd R390-100, en Silicycle, 0,25 mmol/g, 0,23 g, 0,060 mmol), y la reacción se agitó a *ta* durante 18 h. A continuación, la mezcla se diluyó con THF (4 ml) y se añadió N,N-dietanolaminometilo poliestireno (1,6 mmol/g, 0,50 g). La mezcla se dejó en agitación durante 1 h. Después de 1 h, la mezcla se filtró, los sólidos se lavaron con THF (3,5 ml), y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar (S)-4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo que se llevó a la siguiente etapa sin purificación ni caracterización adicional.

Etapa 5: Ácido (S)-4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico



A la mezcla de reacción en bruto que contenía (S)-4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo se le añadieron THF (1,0 ml), MeOH (0,30 ml) y LiOH ac. (1,0 M en H_2O , 1,0 ml, 1,0 mmol). Después de 3 h a *ta*, la mezcla se inactivó con AcOH (0,20 ml), y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se recogió en

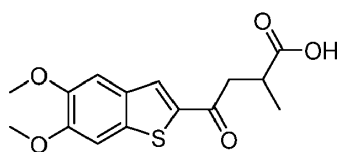
DMSO (1,5 ml), y la mezcla se purificó por HPLC de fase inversa (ACN/H₂O TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (S)-4-(5-cloro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₄H₁₃ClO₄S) (ES, m/z): 313 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,26 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,41 (dd, J = 17,2, 8,4 Hz, 1H), 3,09 (dd, J = 17,4; 5,0 Hz, 1H), 2,94 - 2,85 (m, 1H), 1,19 (d, J = 7,2 Hz, 3H).

Los Ejemplos 29 a 34, como se muestran en la Tabla 3 a continuación, se prepararon o pueden prepararse de acuerdo con procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 28 anterior usando los materiales de partida apropiados, descritos como Preparaciones o como se obtienen a partir de fuentes comerciales.

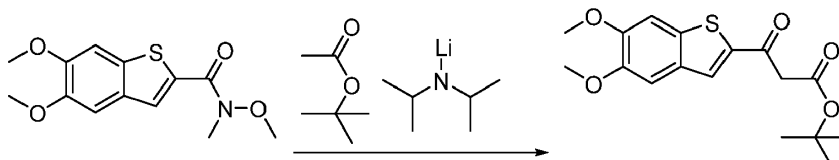
Tabla 3

Ej.	Estructura	Nombre	Masa [M+H] ⁺
29		Ácido (S)-4-(6-bromo-5-metilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	341, 343
30		Ácido (S)-4-(5-fluoro-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	297
31		Ácido (S)-4-(5,6-dimetilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	337
32		Ácido (S)-4-(6-bromo-5-clorobenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	361, 363
33		Ácido (S)-4-(5-cloro-6-etoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	327
34		Ácido (S)-4-(5-bromo-6-metilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	341, 343

Ejemplo 35: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico



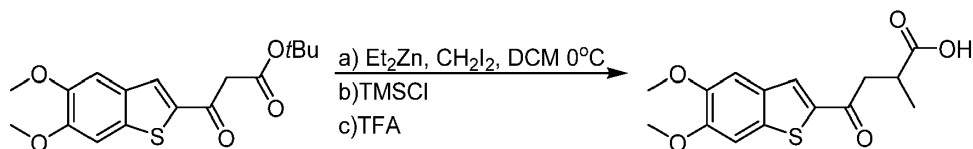
Etapas 1: 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de terc-butilo



En un matraz que contenía THF (10 ml) a -78 °C se añadió LDA (2,0 M en THF/heptano/benceno, 4,2 ml, 8,4 mmol). Se añadió gota a gota acetato de terc-butilo (1,1 ml, 8,3 mmol). Después de que se completara la adición, la mezcla se dejó en agitación a -78 °C durante 15 min. Se añadió gota a gota una mezcla de N,5,6-trimetoxi-N-metilbenzo[b]tiofeno-2-carboxamida (1,9 g, 6,9 mmol) en THF (15 ml). Después de que se completara la adición, la mezcla se dejó en agitación a -78 °C durante 1 h. A continuación, la mezcla se dejó calentar a ta. Después del calentamiento a ta, la mezcla se enfrió a 5 °C y a continuación se inactivó con HCl ac. (1 N) hasta pH = 2. La mezcla se extrajo con acetato de isopropilo (2x20 ml). Los productos orgánicos combinados se lavaron con NaHCO₃ ac. sat.

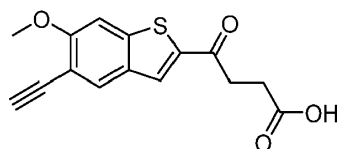
y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de *tert*-butilo. LCMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{S} - \text{C}_4\text{H}_8$) (ES, m/z): 281 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,12 (s, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,44 (s, 1H), 4,00 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 1,36 (s, 9H).

Etapla 2: Ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

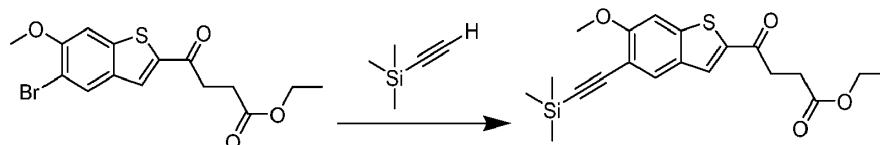


- 10 Se añadió Et_2Zn (1,0 M en Hex, 6,0 ml, 6,0 mmol) a DCM (20 ml) a 0 °C en una atmósfera de N_2 . A continuación, se añadió gota a gota CH_2I_2 (0,50 ml, 6,0 mmol). Después de dejar la mezcla en agitación a 0 °C durante 10 min, se añadió 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de *tert*-butilo (0,50 g, 1,5 mmol) seguido de TMSCl (20 μl , 0,15 mmol). La mezcla se dejó calentar a t_a y a continuación se agitó durante 18 h. A continuación, la mezcla de reacción se inactivó con NH_4Cl ac. sat. y se extrajo con DCM (3x20 ml). Los extractos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida. El residuo se reconstituyó en DCM (30 ml), y se añadió TFA (0,50 ml, 6,0 mmol). Después de agitar la mezcla de reacción durante 20 min, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El producto se purificó por HPLC prep. de fase inversa (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 309 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (CD_3OD , 600 MHz): δ 8,06 (s, 1H), 7,43-7,40 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,46 (dd, $J = 17$; 8 Hz, 1H), 3,08 (dd, $J = 17$; 5 Hz, 1H), 3,02 (sextup., $J = 7,0$ Hz, 1H), 1,26 (d, $J = 7$ Hz, 3H)

Ejemplo 36: Ácido 4-(5-etinil-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

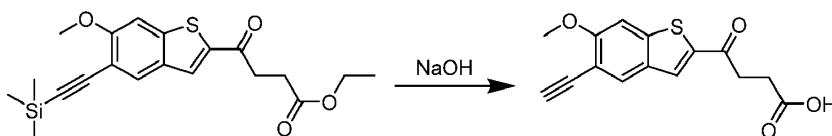


Etapla 1: 4-(6-metoxi-5-((trimetilsilil)etinil)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo



- 30 A una mezcla desgasificada con Ar de 4-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (100 mg, 0,269 mmol), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (78 mg, 0,067 mmol) y Cu-I (51 mg, 0,27 mmol) se le añadió DMF (1,0 ml) seguido de trietilamina (0,188 ml, 1,35 mmol) y etiniltrimetilsilano (0,192 l, 1,35 mmol) a t_a mientras se desgasificó con Ar. La mezcla se agitó durante 5 min mientras se desgasificó con Ar (pulverización subsuperficial), después de lo cual la mezcla se agitó en una atmósfera de Ar a 20 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y se filtró a través de CELITE. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 4-(6-metoxi-5-((trimetilsilil)etinil)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SSi}$) (ES, m/z): 389 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,25 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,72 (s, 1H), 4,06 (c, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,34-3,30 (m, 2H), 2,68-2,64 (m, 2H), 1,17 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), 0,24 (s, 9H).

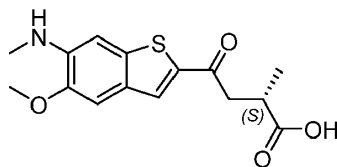
Etapla 2: Ácido 4-(5-etinil-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico



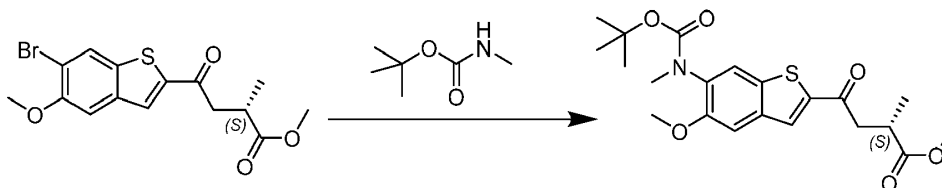
- 45 Se añadió NaOH (1,0 M en H_2O , 1,0 ml, 1,0 mmol) a una suspensión de 4-(6-metoxi-5-((trimetilsilil)etinil)benzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (61 mg, 0,16 mmol) en MeOH (5,0 ml). La suspensión resultante se agitó a 20 °C durante 2,5 h. La mezcla de reacción se inactivó con HCl (37 % en H_2O , 0,083 ml, 1,0 mmol). A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por HPLC prep. (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido

4-(5-etinil-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS ($C_{15}H_{13}O_4S$) (ES, m/z): 289 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 12,22 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 4,33 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,30-3,24 (m, 2H), 2,63-2,57 (m, 2H).

5 **Ejemplo 37: Ácido (S)-4-(5-metoxi-6-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico**

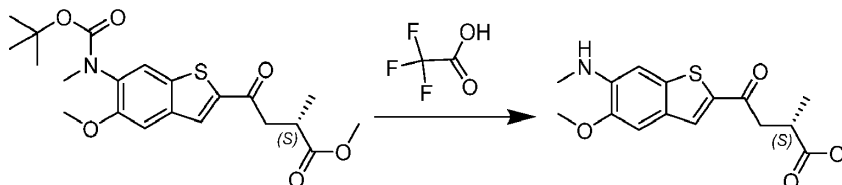


10 **Etapla 1: 4-(6-((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo**



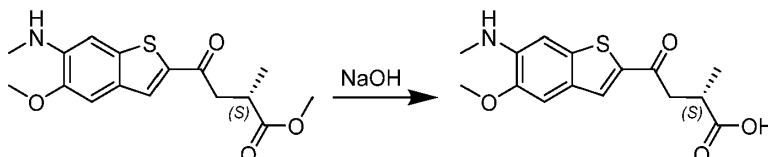
A una mezcla desgasificada con Ar de 4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (40 mg, 0,11 mmol), metilcarbamato de *terc*-butilo (21 mg, 0,16 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (5 mg, 5 μ mol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (XANTPHOS, 9 mg, 0,02 mmol) y Cs_2CO_3 (70 mg, 0,22 mmol) se le añadió dioxano (0,50 ml) a ta mientras se desgasificó con Ar. La mezcla se agitó durante 5 min mientras se desgasificaba con Ar (pulverización subsuperficial), después de lo cual la mezcla se calentó a 95 °C en una atmósfera de Ar durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se diluyó con EtOAc (20 ml). La suspensión resultante se filtró a través de una frita que contenía CELITE. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 4-(6-((*terc*-butoxicarbonil)(metil)amino)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo. LCMS ($C_{21}H_{28}NO_6S$) (ES, m/z): 422 $[M+H]^+$.

25 **Etapla 2: 4-(5-metoxi-6-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo**



Se añadió TFA (0,34 ml, 4,4 mmol) a una mezcla de 4-(6-((*terc*-butoxicarbonil)(metil)amino)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (37 mg, 0,088 mmol) en DCM (2,0 ml) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar 4-(5-metoxi-6-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo en forma del residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se usó sin tratamiento ni purificación en la etapa posterior. LCMS ($C_{16}H_{20}NO_4S$) (ES, m/z): 322 $[M+H]^+$.

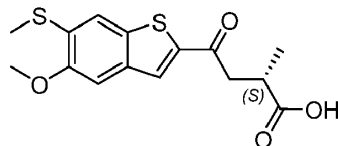
35 **Etapla 3: Ácido (S)-4-(5-metoxi-6-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico**



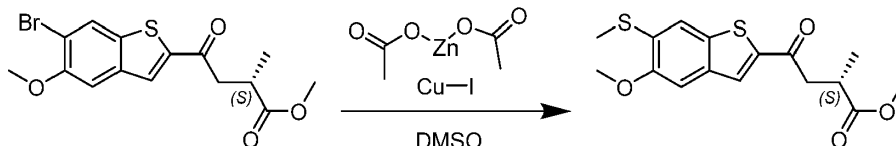
Se añadió NaOH (2,0 M en H_2O , 0,35 ml, 0,70 mmol) a una mezcla de 4-(5-metoxi-6-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (28 mg, 0,087 mmol) en DMSO (0,50 ml) y MeOH (2,0 ml) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se inactivó con HCl (0,057 ml, 37 % en H_2O , 0,70 mmol) y a continuación se diluyó con más cantidad de DMSO (1,0 ml). El residuo de producto en bruto se purificó por HPLC prep. de fase inversa (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (S)-4-(5-metoxi-6-(metilamino)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS ($C_{15}H_{18}NO_4S$) (ES, m/z): 308 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8,07 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,34-3,29 (m, 1H), 3,04-2,96 (m, 1H),

2,90-2,82 (m, 1H), 2,79 (s, 3H), 1,16 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H).

Ejemplo 38: Ácido (S)-4-(5-metoxi-6-(metiltio)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

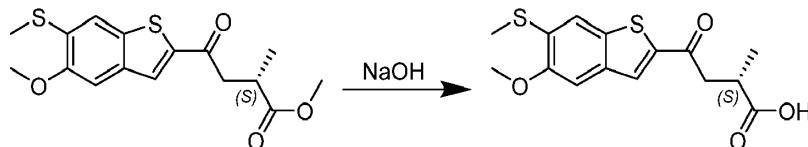


Etapas 1: 4-(5-metoxi-6-(metiltio)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo



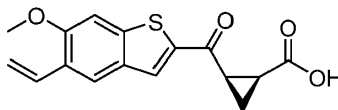
Se añadió DMSO (1,00 ml) a una mezcla de 4-(6-bromo-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (95 mg, 0,26 mmol), Cu-I (12 mg, 0,064 mmol) y acetato de cinc (94 mg, 0,51 mmol). La mezcla resultante se calentó a 120 °C durante 20 h en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se enfrió a ta, se diluyó con EtOAc (50 ml) y a continuación se filtró a través de CELITE. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar 4-(5-metoxi-6-(metiltio)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo. LCMS (C₁₆H₁₉O₄S₂) (ES, m/z): 339 [M+H]⁺.

Etapas 2: Ácido (S)-4-(5-metoxi-6-(metiltio)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

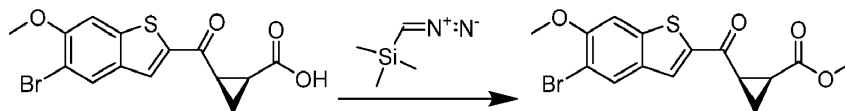


Se añadió NaOH (2,0 M en H₂O, 0,19 ml, 0,38 mmol) a una solución de 4-(5-metoxi-6-(metiltio)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (32 mg, 0,095 mmol) en DMSO (1,00 ml) a 20 °C. La mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 15 min en una atmósfera de N₂. A continuación, la mezcla de reacción se inactivó con HCl (0,035 ml, 37 % en H₂O, 0,43 mmol). La mezcla de reacción se filtró y se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (S)-4-(5-metoxi-6-(metiltio)benzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₅H₁₇O₄S₂) (ES, m/z): 325 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,23 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,45-3,37 (m, 1H), 3,13-3,07 (m, 1H), 2,91-2,88 (m, 1H), 2,47 (s, 3H), 1,18 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H).

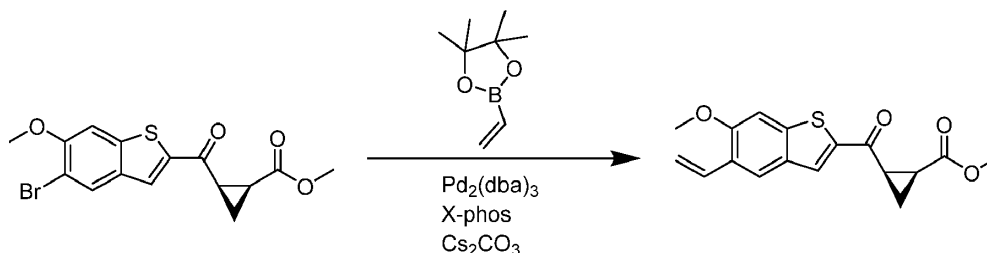
Ejemplo 39: Ácido (1S,2R)-2-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico



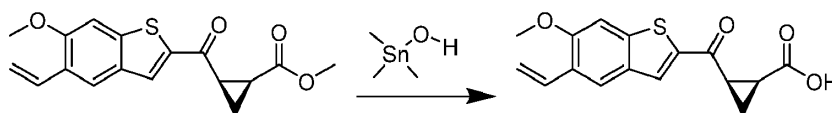
Etapas 1: 2-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil) ciclopropanocarboxilato de (1S,2R)-metilo



Se añadió TMS-diazometano (2,0 M en Hex, 1,4 ml, 2,8 mmol) a una mezcla de ácido (1S,2R)-2-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropanocarboxílico (891 mg, 2,51 mmol) en DCM (20 ml) y MeOH (20 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 2-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil) ciclopropanocarboxilato de (1S,2R)-metilo. LCMS (C₁₅H₁₄BrO₄S) (ES, m/z): 369, 371 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,30 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,81 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,18-3,12 (m, 1H), 2,44-2,39 (m, 1H), 1,60-1,57 (m, 1H), 1,42-1,39 (m, 1H).

Etapla 2: 2-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofeno-2-carbonil) ciclopropanocarboxilato de (1S,2R)-metilo

- 5 A una mezcla desgasificada con Ar de 2-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropanocarboxilato de (1S,2R)-metilo (100 mg, 0,271 mmol), 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (50 mg, 0,33 mmol), Pd₂(dba)₃ (12 mg, 0,014 mmol), X-Phos (12 mg, 0,027 mmol) y Cs₂CO₃ (176 mg, 0,542 mmol) se le añadieron dioxano (1,50 ml) y H₂O (0,2 ml) a ta mientras se desgasificó con Ar. La mezcla se agitó durante 5 min mientras se desgasificaba con Ar (pulverización subsuperficial), después de lo cual la mezcla se calentó a 90 °C en una atmósfera de Ar durante
- 10 16 h. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se diluyó con EtOAc (20 ml). La suspensión resultante se filtró a través de una frita que contenía MgSO₄. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 2-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropanocarboxilato de (1S,2R)-metilo. LCMS (C₁₇H₁₇O₄S) (ES, m/z): 317 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,31 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,05-6,97
- 15 (m, 1H), 5,88 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,20-3,13 (m, 1H), 2,46-2,38 (m, 1H), 1,62-1,56 (m, 1H), 1,44-1,36 (m, 1H).

Etapla 3: Ácido (1S,2R)-2-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico

- 20 Se añadió hidróxido de trimetilestaño (34 mg, 0,19 mmol) a una mezcla de 2-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropanocarboxilato de (1S,2R)-metilo (30 mg, 0,095 mmol) en 1,2-dicloroetano (2,0 ml) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó y se calentó a 85 °C durante 2 días. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se inactivó con NaHSO₄ (2,0 M en H₂O, 0,19 ml, 0,378 mmol) y a continuación se diluyó con EtOAc (100 ml) y H₂O (25 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1%) para proporcionar ácido (1S,2R)-2-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico. LCMS (C₁₆H₁₅O₄S) (ES, m/z): 303 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,22
- 25 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,05-6,96 (m, 1H), 5,88 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 5,33 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,10-3,02 (m, 1H), 2,30-2,25 (m, 1H), 1,56-1,50 (m, 1H), 1,34-1,30 (m, 1H).
- 30

El Ejemplo 40, como se muestra en la Tabla 4 a continuación, se preparó o puede prepararse de acuerdo con procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 39 anterior usando los materiales de partida apropiados,

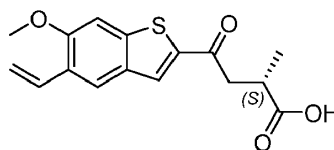
35 descritos como Preparaciones o como se obtienen a partir de fuentes comerciales.

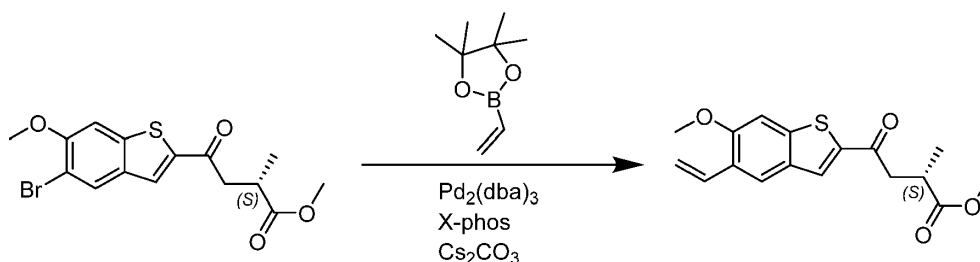
Tabla 4

Ej.	Estructura	Nombre	Masa [M+H] ⁺
40		Ácido 2-(6-metoxi-5-(metiltio)benzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico	323

Ejemplo 41: Ácido (S)-4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

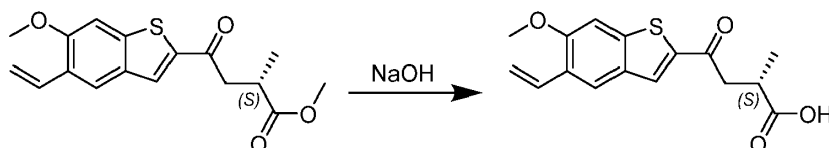
40

**Etapla 1: 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo**



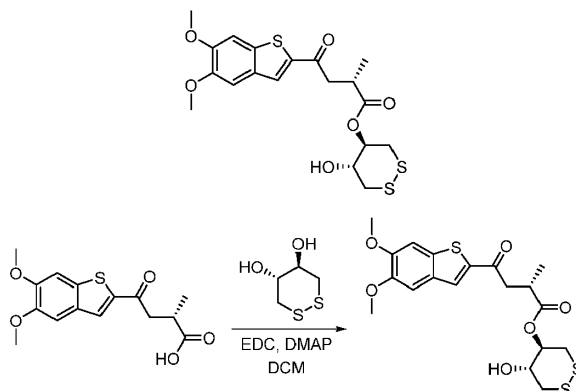
A una mezcla desgasificada con Ar de 4-(5-bromo-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (122 mg, 0,329 mmol), 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (61 mg, 0,39 mmol), Pd₂(dba)₃ (15 mg, 0,016 mmol), X-Phos (15 mg, 0,033 mmol) y Cs₂CO₃ (321 mg, 0,986 mmol) se le añadieron dioxano (3,0 ml) y H₂O (0,30 ml) a ta mientras se desgasificó con Ar. La mezcla se agitó durante 5 min mientras se desgasificaba con Ar (pulverización subsuperficial), después de lo cual la mezcla se calentó a 90 °C en una atmósfera de Ar durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se diluyó con EtOAc (20 ml). La suspensión resultante se filtró a través de una frita que contenía MgSO₄. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b] tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo. LCMS (C₁₇H₁₉O₄S) (ES, m/z): 319 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,28 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,05-6,96 (m, 1H), 5,86 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 5,34 (d, J = 11,5 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,47-3,40 (m, 1H), 3,24-3,16 (m, 1H), 3,00-2,93 (m, 1H), 1,19 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

Etapla 2: Ácido (S)-4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico



Se añadió NaOH (1,0 M en H₂O, 0,41 ml, 0,41 mmol) a una solución de 4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (26 mg, 0,082 mmol) en THF (3,0 ml). La suspensión resultante se agitó a 20 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se inactivó con HCl (1,0 M en H₂O, 0,41 ml, 0,41 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el residuo de producto en bruto. El residuo de producto en bruto se purificó por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (S)-4-(6-metoxi-5-vinilbenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₆H₁₇O₄S) (ES, m/z): 305 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,21 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,06-6,96 (m, 1H), 5,92-5,81 (m, 1H), 5,38-5,30 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,44-3,36 (m, 1H), 3,14-3,05 (m, 1H), 2,93-2,85 (m, 1H), 1,18 (s a, 3H).

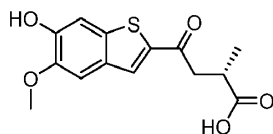
Ejemplo 42: 4-(5,6-Dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-(4R,5R)-5-hidroxi-1,2-ditiano-4-ilo



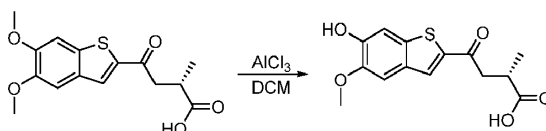
A una solución agitada de ácido (S)-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico (81 mg, 0,26 mmol) y EDC (50 mg, 0,26 mmol) en DCM (2,0 ml) se le añadieron (4R,5R)-1,2-ditiano-4,5-diol (30 mg, 0,20 mmol) y DMAP (1,6 mg, 0,013 mmol). La solución se dejó en agitación durante 3 días y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex). Las fracciones deseadas se combinaron, se concentraron y se purificaron de nuevo por HPLC prep. (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-(4R,5R)-5-hidroxi-1,2-ditiano-4-ilo. LCMS (C₁₉H₂₃O₆S₃) (ES, m/z): 443 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,22 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 5,49 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 4,66 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,60 (m, 1H), 3,40 (dd, J = 17,3, 8,3 Hz, 1H), 3,22 (dd, J = 17,3; 5,1 Hz, 1H), 3,15-3,09 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 2,89-

2,83 (m, 2H), 1,21 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Ejemplo 43: Ácido (S)-4-(6-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

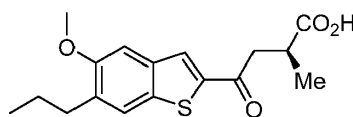


Etapas 1: Ácido (S)-4-(6-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

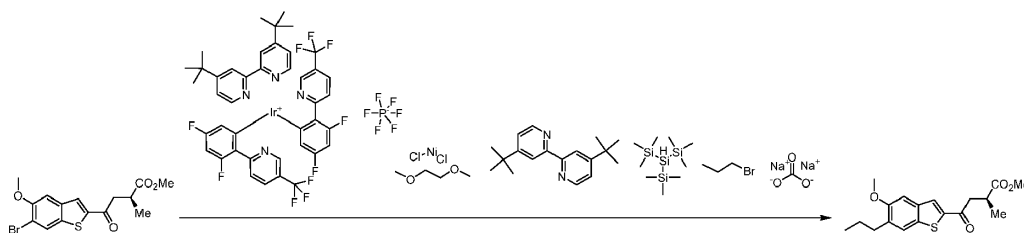


A una solución agitada de ácido (S)-4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico (47 mg, 0,15 mmol) en DCM (2,0 ml) se le añadió AlCl_3 (140 mg, 1,10 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 h, se concentró y se purificó por HPLC prep. (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %). La mezcla de ácido (S)-4-(6-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico y ácido (S)-4-(5-hidroxi-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico se purificó de nuevo por SFC quiral (Columna AD-H (21x250 mm), MeOH al 40 % con DMEA al 0,25 % en CO_2) para proporcionar el producto (tiempo de retención 6,2 min) en forma de la sal de DMEA. La sal se disolvió en H_2O y se acidificó con HCl 1 N a pH de 2. El precipitado se filtró, se lavó con H_2O y se secó a alto vacío para proporcionar el producto. LCMS ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 295 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,19 (s, 1H), 9,88 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,30 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,37 (m, 1H), 3,05 (dd, $J = 17,1; 5,1$ Hz, 1H), 2,88 (m, 1H), 1,17 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Ejemplo 44: Ácido (2S)-4-(5-metoxi-6-propil-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico



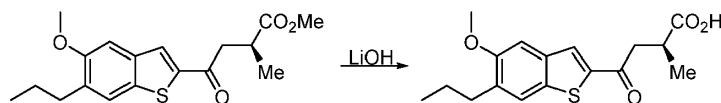
Etapas 1: (2S)-4-(5-metoxi-6-propil-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo



Se calentó Na_2CO_3 anhidro (16 mg, 0,15 mmol) a 125°C a alto vacío en un vial para microondas tapado durante 1 h antes de su uso. Este vial se movió dentro de una caja de guantes. Dentro de la caja de guantes, se añadió dimetoxietano desgasificado (7,0 ml) en un vial de 2 dram que contenía complejo de cloruro de níquel (II)-etilenglicol dimetil éter (5,8 mg) y 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-bipiridina (8,0 mg). La mezcla resultante se agitó durante 25 min a ta para preparar la Solución A.

En un segundo vial, se añadió dimetoxietano desgasificado (2,4 ml) a $\text{Ir}(\text{2-(2,4-difluorofenil)-5-(trifluorometil)piridina})_2(4,4'\text{-di-}i\text{-tert-butil-2,2'-bipiridina})\text{PF}_6$ (7,2 mg). La mezcla resultante se agitó durante 10 min a ta para preparar la Solución B.

En un tercer vial, se añadió dimetoxietano desgasificado (0,38 ml) a una mezcla de (2S)-4-(6-bromo-5-metoxi-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo (28 mg, 0,075 mmol) y tris(trimetilsilil)silano (23 μl , 0,075 mmol). A este vial se le añadió la Solución A (101 μl), la Solución B (280 μl), 1-bromopropano (28 mg, 0,23 mmol) y Na_2CO_3 (16 mg, 0,15 mmol). El vial se tapó y se selló con una película de parafina (PARAFILM). La mezcla de reacción se sacó de la caja de guantes, se agitó y se irradió con dos lámparas LED de luz azul de 34 W durante 4 h. Cabe apreciar que las lámparas se situaron a una distancia apropiada del recipiente de reacción para proporcionar irradiación sin calentar la mezcla de reacción significativamente por encima de la ta. La mezcla de reacción en bruto que contenía (2S)-4-(5-metoxi-6-propil-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo se usó en la siguiente etapa sin purificación ni caracterización adicional.

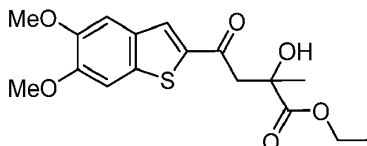
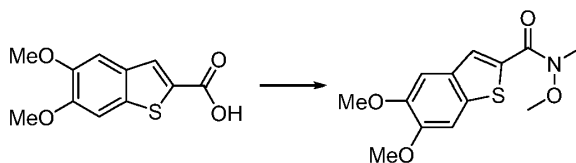
Etapa 2: Ácido (2S)-4-(5-metoxi-6-propil-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico

A la mezcla en bruto de (2S)-4-(5-metoxi-6-propil-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo en dimetoxietano (0,76 ml) se le añadieron MeOH (0,76 ml), H₂O (0,19 ml) y LiOH (22 mg, 0,91 mmol) a ta. La mezcla resultante se agitó durante 1,5 h a ta, y a continuación se ajustó a pH = 5 con HCl ac. (2,0 N) y se filtró. El filtrado se purificó por HPLC prep. de fase inversa (ACN/H₂O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido (2S)-4-(5-metoxi-6-propil-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₇H₂₁O₄S) (ES, m/z): 321 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,25 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,45-3,39 (m, 1H), 3,12-3,07 (m, 1H), 2,92-2,87 (m, 1H), 2,65 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,60 (sextup., *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,18 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H), 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

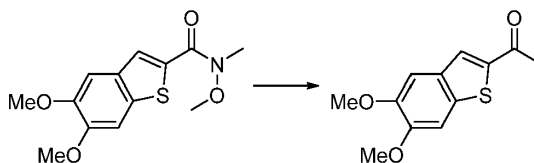
Los Ejemplos 45 a 47, como se muestran en la Tabla 5 a continuación, se prepararon o pueden prepararse de acuerdo con procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 44 anterior usando los materiales de partida apropiados, descritos como Preparaciones o como se obtienen a partir de fuentes comerciales.

Tabla 5

Ej.	Estructura	Nombre	Masa [M+H] ⁺
45		Ácido 4-[6-(2-fluoroetil)-5-metoxi-1-benzotiofen-2-il]-4-oxobutanoico	311
46		Ácido (2S)-4-[6-(2-fluoroetil)-5-metoxi-1-benzotiofen-2-il]-2-metil-4-oxobutanoico	325
47		Ácido (2S)-4-(6-metoxi-5-propil-1-benzotiofen-2-il)-2-metil-4-oxobutanoico	321

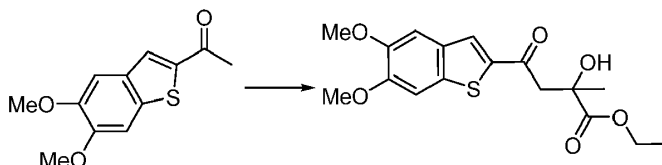
Ejemplo 48: 4-(5,6-Dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-hidroxi-2-metil-4-oxobutanoato de etiloEtapa 1: N,5,6-trimetoxi-N-metilbenzo[b]tiofeno-2-carboxamida

A una mezcla de ácido 5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (2,0 g, 8,4 mmol) en THF (17 ml) a 0 °C se le añadieron clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (1,6 g, 17 mmol), EDC (3,2 g, 17 mmol) y a continuación base de Hunig (5,9 ml, 34 mmol). La mezcla se dejó calentar a ta y se agitó durante 18 h. A continuación, la mezcla se diluyó con EtOAc y H₂O. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar el producto deseado. LCMS (C₁₃H₁₆NO₄S) (ES, m/z): 282 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,05 (s, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,30 (s, 3H).

Etapa 2: 1-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)etan-1-ona

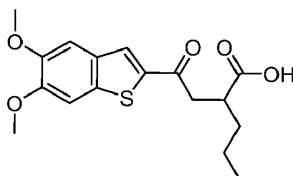
A una mezcla de N,5,6-trimetoxi-N-metilbenzo[b]tiofeno-2-carboxamida (0,20 g, 0,71 mmol) en THF (3,6 ml) a 0 °C se le añadió lentamente MeMgBr (3,0 M en THF, 0,36 ml, 1,1 mmol). Después de 30 min a 0 °C, se añadió más cantidad de MeMgBr (3,0 M en THF, 0,10 ml, 0,28 mmol). Después de 15 min a 0 °C, se añadió más cantidad de MeMgBr (3,0 M en THF, 0,19 ml, 0,57 mmol). Después de 45 min a 0 °C, la mezcla se inactivó lentamente con NH₄Cl ac. sat. y a continuación se diluyó con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar el producto deseado. LCMS (C₁₂H₁₃O₃S) (ES, m/z): 237 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,15 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 2,58 (s, 3H).

Etapas 3: 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-hidroxi-2-metil-4-oxobutanoato de etilo

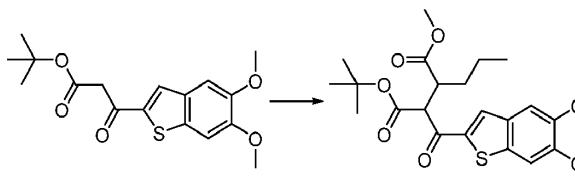


A una mezcla de 1-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)etanona (50 mg, 0,21 mmol) en THF (4,2 ml) a -78 °C se le añadió LDA (2,0 M en THF/heptano/benceno, 0,50 ml, 1,0 mmol). Después de 45 min a -78 °C, se añadió piruvato de etilo (78 µl, 0,70 mmol), y la mezcla se agitó durante 30 min a -78 °C. Después de 30 min, la mezcla se inactivó con NH₄Cl ac. sat. y se dejó calentar a ta. Se añadió EtOAc, y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar el producto deseado en forma de una mezcla racémica. A continuación, la mezcla racémica purificada se purificó por SFC quiral (ES Industries, ChromegaChiral CCC, columna de 21x250 mm, MeOH al 40 % (DMEA al +0,25 %) en CO₂), proporcionando dos compuestos con tiempos de retención de 3,9 min y 6,3 min. La concentración del primer pico de elución proporcionó el producto. LCMS (C₁₇H₂₁O₆S) (ES, m/z): 353 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,16 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 5,39 (s, 1H), 4,08 (c, J = 6,8 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,47 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 3,35 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 1,40 (s, 3H), 1,16 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Ejemplo 49: Ácido 2-(2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-oxoetil)pentanoico

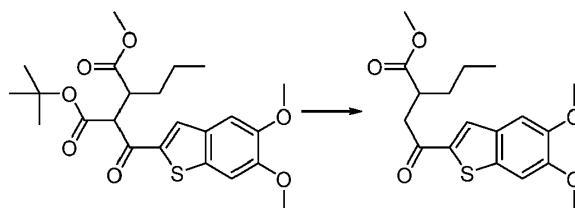


Etapas 1: 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)-3-propilsuccinato de 1-(terc-butilo)



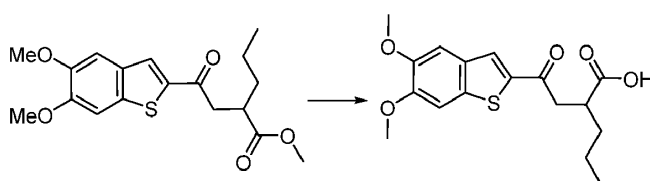
A una mezcla de 3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de *terc*-butilo (0,15 g, 0,45 mmol) en DMF (4,5 ml) se le añadió Cs₂CO₃ (0,29 g, 0,89 mmol), y la mezcla se agitó durante 20 min. Después de 20 min, se añadió 2-bromopentanoato de metilo (0,17 g, 0,89 mmol), y la mezcla se agitó durante 30 min. Después de 30 min, la mezcla se diluyó con EtOAc y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para proporcionar 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-carbonil)-3-propilsuccinato de 1-(*terc*-butilo) en forma de una mezcla de isómeros. LCMS (C₂₃H₃₁O₇S) (ES, m/z): 451 [M+H]⁺.

Etapas 2: 2-(2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-oxoetil)pentanoato de metilo



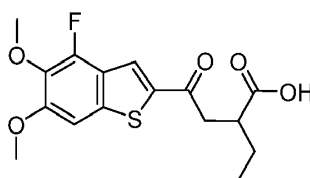
A 4-metil 2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)-3-propilsuccinato de 1-terc-butilo (0,16 g, 0,35 mmol) en CH₂Cl₂ (0,94 ml) se le añadió TFA (0,47 ml), y la mezcla se agitó durante una noche a ta. La mezcla se diluyó con EtOAc y NaHCO₃ sat. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para proporcionar 2-(2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-oxoetil)pentanoato de metilo. LCMS (C₁₈H₂₃O₅S) (ES, m/z): 351 [M+H]⁺.

Etapas 3: Ácido 2-(2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-oxoetil)pentanoico

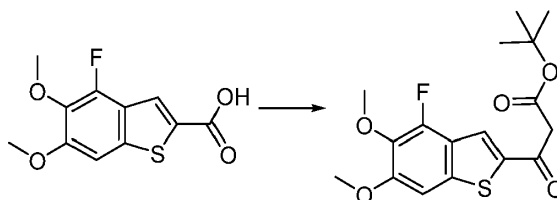


A una mezcla de 2-(2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-oxoetil)pentanoato de metilo (69 mg, 0,20 mmol) en THF (1,0 ml), MeOH (0,50 ml) y H₂O (0,50 ml) se le añadió LiOH (24 mg, 0,99 mmol), y la mezcla se agitó durante 2 h a ta. Después de 2 h, la mezcla se inactivó con HCl ac. (2,0 N, 0,50 ml, 1,0 mmol) y a continuación se diluyó con EtOAc y H₂O. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por SFC quiral (CHIRALCEL, OJ-H, 21X250 mm, MeOH al 20 % (DMEA al +0,25 %) en CO₂) para proporcionar los enantiómeros separados con tiempos de retención de 4,2 min y 6,7 min. Las fracciones que contenían el primer pico se combinaron y se concentraron a presión reducida. A continuación, el residuo se recogió en H₂O y se liofilizó a través de liofilización para proporcionar ácido 2-(2-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-2-oxoetil)pentanoico. LCMS (C₁₇H₂₁O₅S) (ES, m/z): 337 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,02 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,36-3,31 (m, 1H), 3,04 (dd, *J* = 17,2; 4,3 Hz, 1H), 2,82-2,76 (m, 1H), 1,59-1,51 (m, 1H), 1,51-1,42 (m, 1H), 1,36-1,26 (m, 2H), 0,85 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

Ejemplo 50: Ácido 2-etil-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

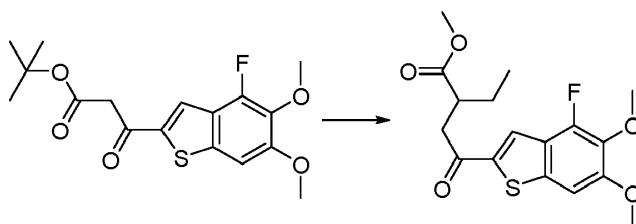


Etapas 1: 3-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de terc-butilo



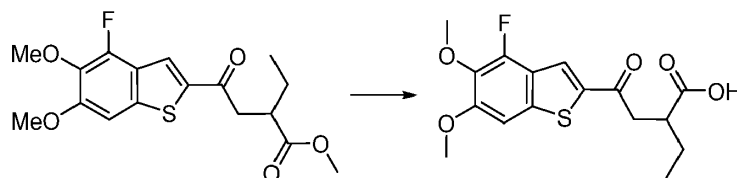
A una mezcla de ácido 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (290 mg, 1,1 mmol) en 7,5 ml de THF se le añadió 1,1'-carbonildiimidazol (220 mg, 1,4 mmol). Después de 2 h, se añadió 3-(terc-butoxi)-3-oxopropanoato de magnesio (0,58 g, 1,7 mmol), y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 18 h. A continuación, la mezcla se diluyó con EtOAc y H₂O. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 3-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de terc-butilo. LCMS (C₁₇H₂₀FO₅S-C₄H₈) (ES, m/z): 299 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,32 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 4,13 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 1,40 (s, 9H).

Etapas 2: 2-etil-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de metilo



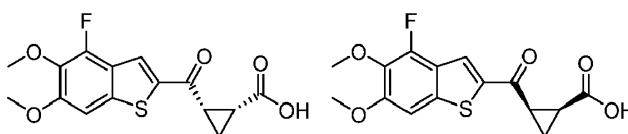
A una mezcla de 3-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-3-oxopropanoato de *terc*-butilo (0,12 g, 0,34 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadió Cs_2CO_3 (0,22 g, 0,68 mmol), y la mezcla se agitó durante 20 min. A continuación, se añadió 2-bromobutirato de metilo (78 μl , 0,68 mmol), y la mezcla se dejó en agitación durante 3 h a ta. Después de 3 h, la mezcla se diluyó con EtOAc y H_2O . La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. Al residuo en bruto se le añadieron CH_2Cl_2 (1,7 ml) y TFA (0,85 ml), y la mezcla se calentó a 50 °C durante 4 h. Tras el enfriamiento a ta, la mezcla se diluyó con EtOAc y NaHCO_3 ac. sat. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 2-etil-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de metilo. LCMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{FO}_5\text{S}$) (ES, m/z): 355 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Etapas 3: Ácido 2-etil-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

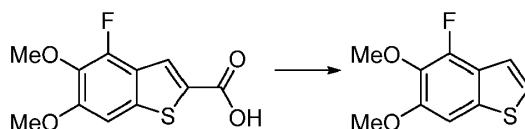


A una mezcla de 2-etil-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de metilo (57 mg, 0,16 mmol) en THF (1,0 ml), MeOH (0,50 ml) y H_2O (0,50 ml) se le añadió LiOH (19 mg, 0,80 mmol), y la mezcla se agitó durante 2 h a 40 °C. Después de 2 h, la mezcla se enfrió a ta y a continuación se inactivó con HCl ac. (2,0 M, 0,40 ml, 0,80 mmol) y a continuación se diluyó con EtOAc y H_2O . La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por SFC quiral (Lux-4, 21x250 mm, MeOH al 45 % (DMEA al +0,25 %) en CO_2) para proporcionar los enantiómeros separados con tiempos de retención de 2,8 min y 5,3 min. Las fracciones que contenían el segundo pico se combinaron y se concentraron. A continuación, el residuo se recogió en H_2O y se liofilizó a través de liofilización para proporcionar ácido 2-etil-4-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FO}_5\text{S}$) (ES, m/z): 341 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11,97 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,57 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,52-3,42 (m, 1H), 3,15-3,07 (m, 1H), 2,81-2,71 (m, 1H), 1,68-1,55 (m, 2H), 0,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

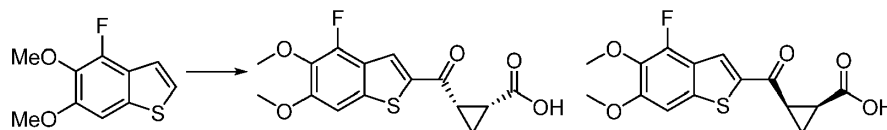
Ejemplo 51 y 52: Ácido (1R,2S)-2-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico y ácido (1S,2R)-2-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico



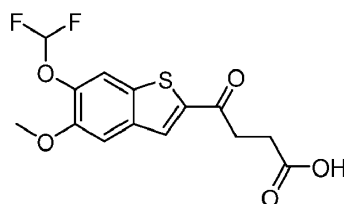
Etapas 1: 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno



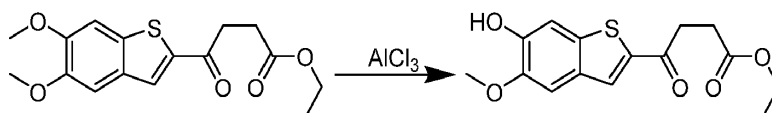
A una mezcla de ácido 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (0,090 g, 0,35 mmol) en quinolina (0,83 ml, 7,0 mmol) se le añadió cobre (0,038 g, 0,60 mmol), y la mezcla se calentó a 190 °C durante 2 h. Después de 2 h, la mezcla se dejó enfriar a ta y a continuación se diluyó con EtOAc y HCl 2 N. La mezcla se filtró, y a continuación la capa orgánica se separó. A continuación, la capa orgánica se lavó sucesivamente con H_2O , NaHCO_3 ac. sat. y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. La mezcla se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno. LCMS ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{FO}_2\text{S}$) (ES, m/z): 213 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, Cloroformo- d) δ 7,33 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,27 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 7,14 (s, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,95 (s, 3H).

Etapla 2: Ácido 2-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico

- 5 A una mezcla de 4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno (45 mg, 0,21 mmol) en CH_2Cl_2 (2,0 ml) a 0 °C se le añadió AlCl_3 (37 mg, 0,28 mmol) y a continuación 3-oxabicyclo[3.1.0] hexano-2,4-diona (48 mg, 0,42 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h a 0 °C y a continuación se dejó calentar a ta y se agitó durante 18 h. Después de 18 h, la mezcla se diluyó con EtOAc y H_2O . La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar una
- 10 mezcla racémica del producto deseado. A continuación, los enantiómeros se separaron por SFC quiral (Lux-4, 21x250 mm, MeOH al 45 % (DMEA al +0,25 %) en CO_2) para proporcionar ácido (1R,2S)-2-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico y ácido (1S,2R)-2-(4-fluoro-5,6-dimetoxibenzo[b]tiofeno-2-carbonil)ciclopropano-1-carboxílico con tiempos de retención de 4,0 min y 4,9 min. Las fracciones que contenían el primer pico (tiempo de retención 4,0 min) se combinaron y se concentraron. El residuo se
- 15 recogió en H_2O y se liofilizó a través de liofilización para proporcionar uno de los enantiómeros puros. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FO}_5\text{S}$) (ES, m/z): 325 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,31 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,15 (c, $J = 8,0$ Hz, 1H), 2,33-2,28 (m, 1H), 1,58-1,48 (m, 1H), 1,34-1,27 (m, 1H). Las fracciones que contenían el segundo pico (tiempo de retención 4,9 min) se combinaron y se concentraron. El residuo se recogió en H_2O y se liofilizó a través de liofilización para proporcionar uno de los enantiómeros puros. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FO}_5\text{S}$) (ES, m/z): 325
- 20 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,18 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,14 (c, $J = 7,9$ Hz, 1H), 2,29 (c, $J = 8,0$ Hz, 1H), 1,57-1,49 (m, 1H), 1,34-1,27 (m, 1H).

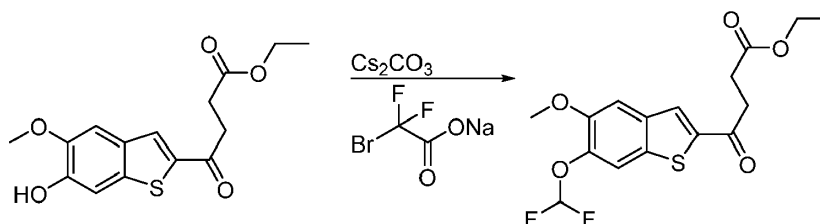
Ejemplo 53: Ácido 4-(6-(difluorometoxi)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

25

Etapla 1: 4-(6-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo

30

- A una mezcla de 4-(5,6-dimetoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (0,45 g, 1,4 mmol) y DCM (12 ml) se le añadió AlCl_3 (0,56 g, 4,2 mmol) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 h. Después de 15 h, se añadió más cantidad de AlCl_3 (1,0 g, 7,5 mmol) a la mezcla. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 16 h. Después de 16 h, la mezcla se inactivó con HCl ac. (1,0 N, 20 ml, 20 mm) y se extrajo con DCM (3x30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en PE) para dar 4-(6-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo en bruto. A continuación, el producto en
- 35 bruto se purificó por SFC quiral para proporcionar 4-(6-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 309. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,88 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,08 (s, 1H), 4,17 (c, $J = 7,3$ Hz, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,31 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,78 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,27 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H).
- 40

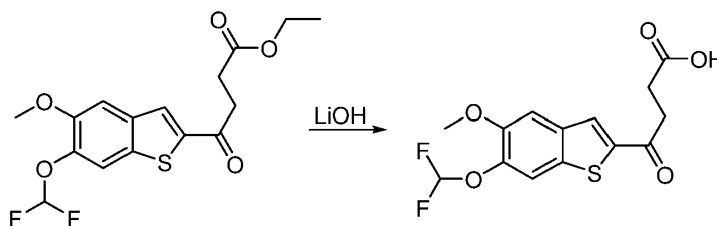
Etapla 2: 4-(6-(difluorometoxi)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo

45

A una mezcla de 4-(6-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (25 mg, 0,081 mmol) en DMF

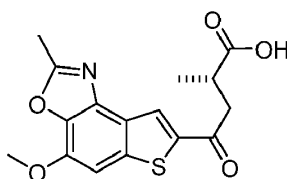
(1,5 ml) se le añadieron 2-bromo-2,2-difluoroacetato de sodio (48 mg, 0,24 mmol) y Cs_2CO_3 (79 mg, 0,24 mmol) a 30 °C. La mezcla resultante se calentó a 100 °C durante 3 h. Tras el enfriamiento a ta, la mezcla se diluyó con H_2O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3x10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H_2O (20 ml) y salmuera (20 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un producto en bruto. El producto en bruto se purificó por HPLC prep. de fase inversa (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para proporcionar 4-(6-(difluorometoxi)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo. LCMS ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 359 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,90 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,60 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 4,15 (c, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,31 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 1,25 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

Etapas 3: Ácido 4-(6-(difluorometoxi)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico

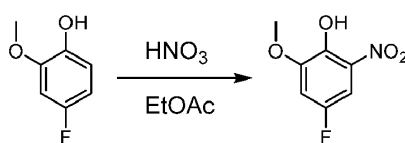


A una mezcla de 4-(6-(difluorometoxi)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoato de etilo (5,0 mg, 0,014 mmol) en MeOH (0,50 ml), THF (0,50 ml) y H_2O (0,50 ml) se le añadió LiOH (3,3 mg, 0,14 mmol). La mezcla se calentó a 50 °C durante 2 h. Después de 2 h, la mezcla se dejó enfriar a ta y se añadió HCl ac. (1,0 M) hasta que la mezcla tuvo un pH = 6. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en DMF (2 ml) y se purificó por HPLC prep. de fase inversa (ACN/ H_2O con TFA al 0,1 %) para proporcionar ácido 4-(6-(difluorometoxi)-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)-4-oxobutanoico. LCMS ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{O}_5\text{S}$) (ES, m/z): 331 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,15 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 6,83 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,36 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,73 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H).

Ejemplo 54: Ácido (S)-4-(4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-il)-2-metil-4-oxobutanoico

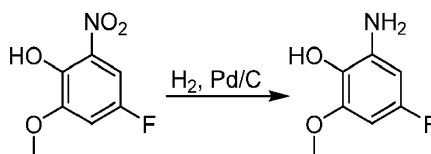


Etapas 1: 4-fluoro-2-metoxi-6-nitrofenol



En un matraz de fondo redondo de 50 ml se añadieron 4-fluoro-2-metoxifenol (3,7 ml, 32 mmol) y EtOAc (90 ml). La mezcla se enfrió a 0 °C y se agitó. A la mezcla en agitación se le añadió gota a gota ácido nítrico (2,1 ml, 33 mmol) durante 5 min. La reacción se agitó a esta temperatura durante 30 min. La mezcla se diluyó con EtOAc (30 ml), se lavó con H_2O (100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para dar 4-fluoro-2-metoxi-6-nitrofenol. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 10,60 (s, 1H), 7,41 (dd, $J = 8,4$; 2,7 Hz, 1H), 6,94 (dd, $J = 9,2$; 2,4 Hz, 1H), 3,97 (s, 3H).

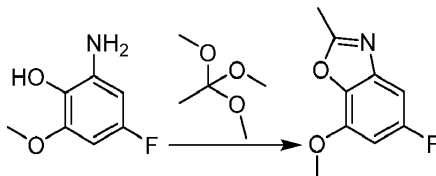
Etapas 2: 2-amino-4-fluoro-6-metoxifenol



En un matraz de fondo redondo de 100 ml se añadieron 4-fluoro-2-metoxi-6-nitrofenol (826 mg, 4,41 mmol), Pd/C (235 mg, 0,221 mmol) y EtOAc (30 ml). La mezcla se agitó. La mezcla se desgasificó con N_2 y a continuación se puso en una atmósfera de H_2 . Después de agitar durante 16 h, la reacción se filtró a través de CELITE, y la torta de filtro se lavó con EtOAc. Los filtrados combinados se concentraron a presión reducida para proporcionar 2-amino-4-fluoro-6-

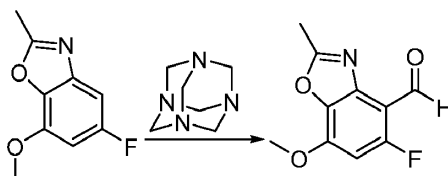
metoxifenol que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS ($C_7H_9FNO_2$) (ES, m/z): 158 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 6,23-6,01 (m, 2H), 3,85 (s, 3H).

Etapas 3: 5-fluoro-7-metoxi-2-metilbenzo[d]oxazol



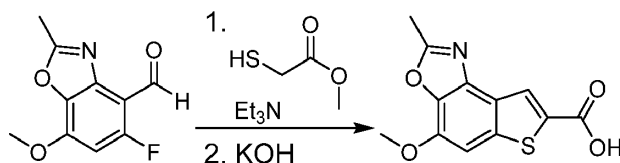
En un vial de 20 ml se añadieron 2-amino-4-fluoro-6-metoxifenol (0,58 g, 3,7 mmol) y 1,1,1-trimetoxietano (4,0 ml, 31 mmol). La mezcla se agitó y se calentó a 70 °C. Después de 10 min, la mezcla se dejó enfriar a ta, y los disolventes se evaporaron a presión reducida para proporcionar un residuo en bruto que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 5-fluoro-7-metoxi-2-metilbenzo[d]oxazol. LCMS ($C_9H_9FNO_2$) (ES, m/z): 182 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,05 - 6,90 (m, 1H), 6,61 (d, J = 11,1 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H), 2,66 (s, 3H).

Etapas 4: 5-fluoro-7-metoxi-2-metilbenzo[d]oxazol-4-carbaldehído



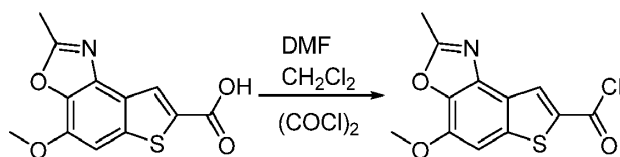
En un vial de 20 ml se añadieron 5-fluoro-7-metoxi-2-metilbenzo[d]oxazol (423 mg, 2,33 mmol), 1,3,5,7-tetraazaadamantano (556 mg, 3,97 mmol) y TFA (0,50 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 90 °C durante 3 h. La reacción se dejó enfriar a ta, se diluyó con EtOAc (40 ml) y se repartió con $NaHCO_3$ ac. sat. (100 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo en bruto que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar 5-fluoro-7-metoxi-2-metilbenzo[d]oxazol-4-carbaldehído. LCMS ($C_{10}H_9FNO_3$) (ES, m/z): 210 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 10,42 (s, 1H), 6,60 (d, J = 12,7 Hz, 1H), 4,05 (s, 3H), 2,68 (s, 3H).

Etapas 5: Ácido 4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-carboxílico

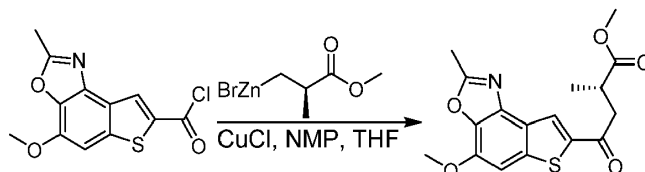


En un vial de 4 ml se añadieron 5-fluoro-7-metoxi-2-metilbenzo[d]oxazol-4-carbaldehído (185 mg, 0,884 mmol) y DMSO (4,0 ml). La mezcla se agitó. A la mezcla se le añadieron Et_3N (1,2 ml, 8,8 mmol) y 2-mercaptoacetato de metilo (0,79 ml, 8,8 mmol). La mezcla se calentó a 100 °C durante 15 min. La mezcla se dejó enfriar a ta. Se añadió KOH ac. (10 M, 1,8 ml, 18 mmol), y la mezcla se agitó durante 10 min. La reacción se acidificó a pH 3 con HCl ac. (6 M). El precipitado se recogió por filtración, se lavó con H_2O (2x20 ml) y a continuación con MeOH (2x2 ml), produciendo ácido 4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-carboxílico. LCMS ($C_{12}H_{10}NO_4S$) (ES, m/z): 264 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,05 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,47 (s, 3H).

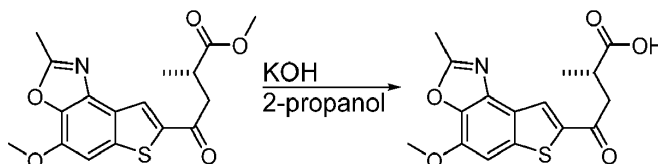
Etapas 6: Cloruro de 4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-carbonilo



En un vial de 20 ml se añadieron ácido 4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-carboxílico (106 mg, 0,404 mmol), CH_2Cl_2 (1,0 ml) y DMF (6,3 μ l, 0,081 mmol). La mezcla se agitó y se enfrió a 0 °C. Se añadió $(COCl)_2$ (0,074 ml, 0,85 mmol). Después de 5 min, la reacción se calentó a ta y se agitó durante 35 min. La reacción se concentró a presión reducida para proporcionar cloruro de 4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6] benzo[1,2-d]oxazol-7-carbonilo en bruto que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapas 7: (S)-4-(4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo

En un vial de 20 ml se añadió Cu-Cl (14 mg, 0,15 mmol). El vial se evacuó y a continuación se recargó con N₂ 3 veces. En el vial se añadió THF (0,25 ml). La mezcla se enfrió a 0 °C. A la mezcla en agitación se le añadió gota a gota bromuro de (R)-(3-metoxi-2-metil-3-oxopropil)cinc (II) (0,5 M en THF, 1,5 ml, 0,73 mmol) durante 2 min. A continuación, la mezcla se agitó durante 10 min. A la mezcla se le añadió gota a gota cloruro de 4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-carbonilo (41 mg, 0,15 mmol) en forma de una solución en NMP (2,0 ml) durante 2 min. La mezcla se agitó durante 20 min. La reacción se diluyó con EtOAc (15 ml) y se lavó con NH₄OH ac. (3 M, 30 ml, 90 mmol). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc en Hex) para proporcionar (S)-4-(4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-il)-2-metil-4-oxobutanoato de metilo. LCMS (C₁₇H₁₈NO₅S) (ES, m/z): 348 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8,36 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 4,11 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,54 (dd, J = 16,6; 7,5 Hz, 1H), 3,20-3,09 (m, 2H), 2,78 (s, 3H), 1,32 (d, J = 7,0 Hz, 3H).

Etapas 8: Ácido (S)-4-(4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-il)-2-metil-4-oxobutanoico

En un vial de 4 ml se añadieron 4-(4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-il)-2-metil-4-oxobutanoato de (S)-metilo (48 mg, 0,14 mmol), KOH ac. (0,5 M, 0,55 ml, 0,28 mmol) y 2-propanol (1,4 ml) a ta. Después de 30 min, la mezcla se acidificó a pH 3 con HCl ac. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con H₂O (2x5 ml) y MeOH (2 ml). El precipitado se purificó adicionalmente por cromatografía sobre gel de sílice (MeOH en DCM) proporcionando ácido (S)-4-(4-metoxi-2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-d]oxazol-7-il)-2-metil-4-oxobutanoico. LCMS (C₁₆H₁₆NO₅S) (ES, m/z): 334 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12,20 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 4,04 (s, 3H), 3,51 (dd, J = 17,4; 8,6 Hz, 1H), 3,18 (dd, J = 17,5; 4,9 Hz, 1H), 2,95-2,85 (m, 1H), 2,71 (s, 3H), 1,20 (d, J = 7,2 Hz, 3H).

EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Los compuestos individuales descritos en los Ejemplos en el presente documento se definen como agonistas de STING por (i) la unión a la proteína STING como se evidencia por una reducción en la unión del ligando cGAMP tritado a la proteína STING en al menos un 20 % a 20 uM (concentración de compuesto que se está ensayando) en un ensayo de competición de [³H]cGAMP bioquímico de STING y (ii) la demostración de la producción de interferón con una inducción del 6 % o más de la secreción de IFN-β a 30 uM en el ensayo de células THP1 (donde la inducción causada por cGAMP a 30 uM se estableció en el 100 %).

Síntesis de [³H]-cGAMP

Se añadieron 2,3 ml de solución de tampón que contenía TrisCl 80 mM, MgCl₂ 200 mM y NaCl 20 mM seguido de 0,32 ml de una solución ac. 10 mM de GTP a un tubo AMICON de plástico de 50 ml. A continuación, se añadió una solución de [³H]ATP (21 Ci/mmol, 45 mCi) en 0,5 ml de H₂O seguido de 1 ml de una solución de 1 mg/ml de ADN (ADN activador testicular de Herring, Sigma, N.º D6898) y 53 ul de una solución 47 mM de enzima cGAS. Se añadió más cantidad de H₂O para llevar el volumen total a 10 ml.

La reacción se agitó durante 2 h a 37 °C y a continuación se añadió directamente a un tubo de centrifuga Amicon Ultra-15 10K y se centrifugó durante 1 h a 4.000 g. A continuación, la solución recogida se purificó en una columna Mono Q semipreparada usando las siguientes fases móviles:

- A: TrisCl 0,05 M a pH 8,5 ajustado con NaOH 1 M
- B: TrisCl 0,05 M, NaCl 0,5 M a pH 8,5 ajustado con NaOH 1 M

Gradiente: 100 % de A durante 5 min seguido de un gradiente lineal a 50:50 (A:B) durante 25 min, 3 ml/min, 254 nm.

Las fracciones de producto recogidas se combinaron y ajustaron a un volumen total de 30 ml con el tampón A. Se

aisló un rendimiento total de 15,5 mCi de [³H]cGAMP con una pureza radioquímica del 98,0 % a una actividad específica de 21,5 Ci/mmol.

Enzima cGAS

Se sintetizó químicamente un vector de ADN recombinante para expresar la enzima cGAS humana truncada (residuos 161-522). Para facilitar la expresión y la purificación, el extremo amino contiene una etiqueta de hexahistidina, una etiqueta SUMO y un sitio de escisión de TEV. La enzima recombinante se sobreexpresó en células competentes ROSETTA™ 2(DE3) Single (Novagen). La purificación por afinidad se realizó usando gel de afinidad a níquel HIS-Select HF (Sigma) seguido de cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna de calidad prep. Hi-Load 26/60 SUPERDEX200 (GE Healthcare). Las fracciones se agruparon, se concentraron, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se necesitaron.

Ejemplo 55: Ensayo de unión por filtración a ³H-cGAMP (HAQ STING)

La capacidad de los compuestos para unirse a STING se cuantifica por su capacidad para competir con el ligando cGAMP tritiado por la membrana del receptor STING humano usando un ensayo de unión por filtración radiactivo. El ensayo de unión emplea el receptor STING obtenido de las membranas celulares de *Trichoplusia ni* (*T.ni*; Expression Systems, cat. N.º 94-002F, www.expressionsystems.com) que sobreexpresan HAQ STING de longitud completa y el ligando cGAMP tritiado.

El protocolo básico del ensayo de filtración a HAQ STING es de la siguiente manera:

Los compuestos se valoraron en serie por el Hamilton STARPlus CORE en una placa de 96 pocillos (Greiner, N.º 651201) usando un formato de respuesta a la dosis de diez puntos 1:3. Después de la preparación del compuesto, se preparó una concentración de trabajo de 2,2 µg/ml de membrana STING (SEQ. ID. No. 1) diluyendo la membrana concentrada en tampón de ensayo (1x PBS; Invitrogen N.º SH30028.02) y homogeneizando 7 veces usando un homogeneizador de tejidos manual (Wheaton, N.º 357546). A continuación, se añadieron manualmente 148 µl de membrana preparada a cada pocillo de una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos (Fisher Scientific, N.º 12-566-121). Después de la adición de la membrana, se añadieron 2 µl de compuesto de prueba titulado, DMSO de control (Sigma N.º 276855) o cGAMP de control frío a los pocillos apropiados usando un BIOMEK FX. A continuación, el compuesto y la membrana se preincubaron durante 60 min a TA para permitir que se equilibrara la unión del compuesto. Después del equilibrio, se preparó un ligando [³H] c-GAMP 8 nM por dilución en tampón de ensayo y a continuación se añadieron manualmente 50 µl de esta solución madre de trabajo a cada pocillo de la placa de ensayo. A continuación, las placas se incubaron a TA durante 60 min y a continuación el contenido de cada placa de ensayo se filtró a través de una placa de filtro GF/B de 96 pocillos (PerkinElmer, N.º 6005250) usando un recolector de células TOMTEC MACH III equipado con un tampón HEPES 20 mM (Fisher Scientific, N.º BP299500). A continuación, las placas de filtro se secaron a 55 °C durante 30 min usando una estufa presurizada antes de añadir 30 µl de centelleo ULTIMA GOLD F a cada pocillo. A continuación, se midieron los niveles de tritio para cada pocillo de reacción usando un lector de placas PerkinElmer TopCount.

Después de la normalización con respecto a los controles, se calculó el porcentaje de actividad para cada concentración de compuesto midiendo la cantidad de radiactividad restante. El gráfico del porcentaje de actividad frente al logaritmo de la concentración de compuesto se ajustó con una ecuación de respuesta a la dosis de 4 parámetros para calcular los valores de CE₅₀.

Las condiciones de reacción finales fueron:

Componente	Volumen (µl)	Concentración final
Membrana STING	148	1,5 µg/ml
³ H-cGAMP	50	2,0 nM
Control bajo (cGAMP frío)	2	10 µM
Compuesto de ensayo/DMSO	2	10 µM

Las concentraciones de compuesto ensayadas fueron 20,000, 637,00, 2,200, 0,740, 0,247, 0,082, 0,027, 0,009, 0,003 y 0,001 µM con DMSO residual al 1,0 %.

Generación del virus STING (HAQ) de longitud completa

El virus STING se generó usando un sistema de baculovirus de células de insecto. Se diluyeron células de *Spodoptera frugiperda* Sf21 (Kempbio, Inc.) con respecto a 5e5 células/ml en medio SFM Sf-900II (Life Technologies N.º 10902088) sin antibióticos. La suspensión celular se añadió a cada pocillo de una placa de 6 pocillos tratada (2 ml por pocillo, 1e6 células en total) y se dejó que las células se adhirieran durante al menos 30 min. Mientras tanto, se ensambló una mezcla de cotransfección de 1 ml combinando 500 ng de ADN de HAQ STING [STING(1-379)R71H,G230A,H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8/pBAC1] (síntesis personalizada de Genewiz) con 1 ml de medio SFM Sf-900II que contenía 10 µl de reactivo Cellfectin® II (Invitrogen N.º 10362100) y 100 ng de la cadena principal viral BestBac 2.0, ADN de baculovirus lineal eliminado de v-cath/chiA (Expression Systems N.º 91-002). Las

mezclas de transfección se dejaron incubar durante 30 min. Después de la incubación, se eliminó retiró suavemente el medio de las células adheridas en la placa de 6 pocillos, se añadieron las mezclas de transfección de 1 ml (1 ml por pocillo) y la placa se colocó en una incubadora humidificada a 27 °C. Al día siguiente, se añadió 1 ml de medio SFM Sf-900II (sin antibióticos) a cada pocillo de la placa de 6 pocillos. Después de la adición del medio, las células se dejaron incubar con ADN (SEQ. ID. No. 2) a 27 °C durante 5-7 días para generar la reserva viral P0. Para generar las reservas virales P1, se añadieron 0,5 ml de sobrenadante viral P0 a 50 ml de células *Sf21* no infectadas (sembradas el día anterior a la infección a una densidad de 5×10^5 células/ml para permitir una duplicación durante una noche) en medio SFM Sf-900II que contenía 5 µg/ml de gentamicina (Invitrogen N.º 15710072). A continuación, las células infectadas se incubaron a 27 °C durante 3 días mientras se agitaban a 110 rpm (ATR Biotech Multitron Infors HT N.º AJ118). El día 3, los cultivos P1 se contaron usando un ViCell XR (Beckman Coulter Life Sciences N.º 383556) para confirmar que se había producido la infección (tamaño de las células ≥ 3 µm más grande que las células no infectadas y viabilidad de aproximadamente el 85-95 %). Los cultivos se recogieron en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a 2000xg durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes virales P1 se vertieron en tubos de centrifuga limpios de 50 ml y los sedimentos celulares P1 restantes se usaron para generar células de insecto infectadas por baculovirus (BIIC, por sus siglas en inglés). Se preparó medio de criopreservación que contenía medio SFM Sf-900II con FBS inactivado por calor al 10 %, DMSO al 10 % (Sigma N.º D2650) y 5 µg/ml de gentamicina y se esterilizó a través de un filtro de 0,22 µm inmediatamente antes de su uso. Los sedimentos celulares P1 se resuspendieron hasta una densidad de 2×10^7 células/ml y se dividieron en alícuotas en crioviales (1 ml por vial). Los crioviales se pusieron en congeladores de células MR. FROSTY™ durante una noche a -80 °C y se transfirieron a nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo al día siguiente. Para generar la reserva viral P2, se añadieron 0,5 ml de sobrenadante viral P1 a 50 ml de células *Sf21* no infectadas (sembradas el día anterior a la infección a una densidad de 5×10^5 células/ml para permitir una duplicación durante una noche) en medio SFM Sf-900II que contenía 5 µg/ml de gentamicina. Estas células se incubaron a 27 °C durante 3 días mientras se agitaban a 110 rpm antes de recoger la reserva P2 con centrifugación a 2000xg durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes virales P2 se vertieron y se descartaron, mientras que los sedimentos celulares P2 se usaron para generar BIIC P2 siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. El protocolo de generación de baculovirus se ha validado para producir BIIC P1/P2 de forma constante con títulos de 2×10^9 ufp/ml (2×10^7 células/ml x 100 ufp/célula).

Expresión de STING (HAQ) de longitud completa

Para generar membranas STING, los BIIC P1/P2 se amplificaron durante una noche añadiendo BIIC descongelados a las células *Sf21* sembradas a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml. El volumen de BIIC usado para infectar el cultivo se calculó usando un título de BIIC asumido de 2×10^9 ufp/ml para lograr una MOI de 10 en la amplificación durante una noche. Después del cultivo durante una noche, las células se contaron en un ViCell XR para confirmar que se había producido la infección (tamaño de las células ≥ 3 µm más grande que las células no infectadas y viabilidad de aproximadamente el 80-90 %). El volumen de células *Sf21* infectadas de la amplificación durante una noche usada para infectar la expresión a gran escala de *Trichoplusia ni* (*T.ni*; Expression Systems, cat. N.º 94-002F, www.expressionsystems.com) que se sembró a una densidad de $1,0 \times 10^6$ en medio celular (ESF921 SFM que contenía 5 µg/ml de gentamicina) a MOI = 2,0 se calculó basándose en (100 ufp/célula *Sf21* infectada). Se dejó que las células se expresaran durante 48 h a 27 °C antes de recoger el sedimento celular, mediante centrifugación a 3.400xg durante 10 min a 4 °C. Se contaron las células *T. ni* en un ViCell XR para confirmar que se había producido la infección (tamaño de las células ≥ 3 µm más grande que las células no infectadas y viabilidad de aproximadamente el 80-90 %) antes de la recogida.

Generación de membranas STING (HAQ) de longitud completa

Reactivos de reserva de tampón:

- 1) HEPES 1 M a pH 7,5, Teknova, Cat. N.º H1035
- 2) NaCl 5 M, Sigma Aldrich, Cat. N.º S5150-1L
- 3) KCl, Sigma Aldrich, Cat. N.º 319309-500ML
- 4) Tabletas de inhibidor de proteasa sin EDTA Complete, Roche Diagnostics, Cat. N.º 11873580001
- 5) Benzonasa, Universal Nuclease, Pierce, Cat. N.º 88702

Se añadió tampón de lisis [HEPES 25 mM a pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, (Benzonasa 1:5000, tableta de inhibidor de proteasa Complete/50 ml)] al sedimento de células que expresan STING (HAQ) de longitud completa preparado anteriormente a 5 ml de tampón de lisis por g de sedimento celular. El sedimento se resuspendió y se homogeneizó veinte veces usando un homogeneizador Wheaton Dounce para romper la membrana celular. A continuación, el lisado homogeneizado se pasó a través del microfluidizador EMULSIFLEX-C5 a una presión cercana a 5000 PSI. El sedimento resuspendido se centrifugó a 36.000 rpm (100.000xg) en una centrifuga de velocidad ultrarrápida de rotor 45Ti durante 45 min, 4 °C. El sobrenadante se eliminó. A continuación, el sedimento se resuspendió en tampón de lavado [(HEPES 25 mM a pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, KCl 20 mM, NaCl 1 M (tableta de inhibidor de proteasa Complete/50 ml)] a un volumen de 50 ml de sedimento/tubo de centrifuga. A continuación, la mezcla de sedimento/tampón de lavado se homogeneizó, usando un homogeneizador de vidrio en hielo (20 carreras) seguido de centrifugación a 36.000 rpm durante 45 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó. Se repitió la etapa de lavado una vez más. La membrana resultante se resuspendió en HEPES 20 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 10 %, inhibidores

de proteasa sin EDTA (1 tableta/50 ml). La concentración de proteína se midió mediante el ensayo de Bradford (ensayo de proteínas Bio-Rad, Cat. N.º 500-0006), y el enriquecimiento de proteínas se determinó mediante SDS-PAGE y se confirmó por transferencia de Western. Las membranas resuspendidas se almacenaron a -80 °C.

- 5 *Secuencia de aminoácidos de HAQ STING de longitud completa [STING(1-379)R71H,G230A,H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8]:*

MPHSSLHPSIPCRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLL
LNGVCSLAEELHHHSRYRGSYWRTVRACLGCP LRRGALLLLSIYFYSLPNAVGPFFT
WMLALLGLSQA L NILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNV AHGLAWSYYIGYLRLLPELQA
RIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNLSMADPNIRFLDKLPQQTADRAGIK
DRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCQTL
EDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAPSTST
MSQEPPELLISGMEKPLPLRTDFSGGGLNDIFEAQKIEWHEGSLEVL FQGP HHHHHHHH
(SEQ. ID. No. 1)

- 10 *Secuencia de ADN plasmídico de HAQ de longitud completa [STING(1-379)R71H,G230A,H232R,R293Q-GG-AviTag-GS-HRV3C-HIS8/pBAC1]:*

GGAACGGCTCCGCCCACTATTAATGAAATTA AAAATTCCAATTTTAAAAAACGCAG
CAAGAGAAACATTTGTATGAAAGAATGCGTAGAAGGAAAGAAAAATGTCGTCGAC
ATGCTGAACAACAAGATTAATATGCCTCCGTGTATAAAAAAATATTGAACGATTTG
AAAGAAAACAATGTACCGCGCGGCGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACTAAACTG
TTACATTGCAAACGTGGTTTCGTGTGCCAAGTGTGAAAACCGATGTTTAATCAAGGC
TCTGACGCATTTCTACAACCACGACTCCAAGTGTGTGGGTGAAGTCATGCATCTTTT

AATCAAATCCCAAGATGTGTATAAACCACCAAACCTGCCAAAAAATGAAAACCTGTCG
 ACAAGCTCTGTCCGTTTGCTGGCAACTGCAAGGGTCTCAATCCTATTTGTAATTATTG
 AATAATAAAACAATTATAAATGCTAAATTTGTTTTTTATTAACGATACAAACCAAAC
 GCAACAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAATTGAAAACGCGTAGTTATAATCGCTG
 AGGTAATATTTAAAATCATTTTCAAATGATTCACAGTTAATTTGCGACAATATAATT
 TTATTTTCACATAAACTAGACGCCTTGTCGTCTTCTTCTTCGTATTCCTTCTCTTTTC
 ATTTTCTCTTCATAAAAATTAACATAGTTATTATCGTATCCATATATGTATCTATCG
 TATAGAGTAAATTTTTGTTGTCATAAATATATATGTCTTTTTTAATGGGGTGTATAG
 TACCGCTGCGCATAGTTTTCTGTAATTTACAACAGTGCTATTTCTGGTAGTTCTTC
 GGAGTGTGTTGCTTTAATTATTAAATTTATATAATCAATGAATTTGGGATCGTCGGTT
 TTGTACAATATGTTGCCGGCATAGTACGCAGCTTCTTCTAGTTCAATTACACCATTTT
 TTAGCAGCACCGGATTAACATAACTTTCCAAAATGTTGTACGAACCGTTAAACAAAA
 ACAGTTCACCTCCCTTTTCTATACTATTGTCTGCGAGCAGTTGTTTGTGTTAAAAAT
 AACAGCCATTGTAATGAGACGCACAACTAATATCACAACTGGAAATGTCTATCA
 ATATATAGTTGCTGATCAGATCTGATCATGGAGATAATTAATAATGATAACCATCTCG
 CAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAA
 ATATAGGATCCATGCCCCACTCCAGCCTGCATCCATCCATCCCGTGTCCCAGGGGTC
 ACGGGGCCCAGAAGGCAGCCTTGTTCTGCTGAGTGCTGCCTGGTGACCCCTTGCGG
 GGCTAGGAGAGCCACCAGAGCACACTCTCCGGTACCTGGTGCTCCACCTAGCCTCCC
 TGCAGCTGGGACTGCTGTTAAACGGGGTCTGCAGCCTGGCTGAGGAGCTGCACCAC
 ATCCACTCCAGGTACCGGGGCAGCTACTGGAGGACTGTGCGGGCCTGCCTGGGCTG
 CCCCCCTCCGCGTGCGGGCCCTGTTGCTGCTGTCCATCTATTTCTACTACTCCCTCCCA
 AATGCGGTGCGGCCCGCCCTTCACTTGATGCTTGCCCTCCTGGGCCTCTCGCAGGCA
 CTGAACATCCTCCTGGGCCTCAAGGGCCTGGCCCCAGCTGAGATCTCTGCAGTGTGT
 GAAAAAGGGAATTTCAACGTGGCCCATGGGCTGGCATGGTCATATTACATCGGATA
 TCTGCGGCTGATCCTGCCAGAGCTCCAGGCCCCGATTTCGAACTTACAATCAGCATT
 CAACAACCTGCTACGGGGTGCAGTGAGCCAGCGGCTGTATATTCTCCTCCATTGGA
 CTGTGGGGTGCTGATAACCTGAGTATGGCTGACCCCAACATTCGCTTCCTGGATAA
 ACTGCCCCAGCAGACCGCTGACCGTGCTGGCATCAAGGATCGGGTTTACAGCAACA
 GCATCTATGAGCTTCTGGAGAACGGGCAGCGGGCGGGCACCTGTGTCTTGAGTAC
 GCCACCCCTTGACAGACTTTGTTTGCCATGTCACAATACAGTCAAGCTGGCTTTAGC
 CGGGAGGATAGGCTTGAGCAGGCCAACTCTTCTGCCAGACACTTGAGGACATCCT
 GGCAGATGCCCCTGAGTCTCAGAACAACCTGCCGCCTCATTGCCTACCAGGAACCTGC

AGATGACAGCAGCTTCTCGCTGTCCCAGGAGGTTCTCCGGCACCTGCGGCAGGAGG
 AAAAGGAAGAGGTTACTGTGGGCAGCTTGAAGACCTCAGCGGTGCCCAGTACCTCC
 ACGATGTCCCAAGAGCCTGAGCTCCTCATCAGTGGAATGGAAAAGCCCCCTCCCTCTC
 CGCACGGATTTCTCTGGCGGTGGCCTGAACGACATCTTCGAAGCCCAGAAAATCGA
 ATGGCATGAAGGCAGCCTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCACACCACCATCATCACC
 ATCACCATTAATGAGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTAACCTAGG
 TAGCTGAGCGCATGCAAGCTGATCCGGGTTATTAGTACATTTATTAAGCGCTAGATT
 CTGTGCGTTGTTGATTTACAGACAATTGTTGTACGTATTTTAATAATTCATTAAATTT
 ATAATCTTTAGGGTGGTATGTTAGAGCGAAAATCAAATGATTTTCAGCGTCTTTATA
 TCTGAATTTAAATATTAAATCCTCAATAGATTTGTAAAATAGGTTTCGATTAGTTTCA
 AACAAGGGTTGTTTTTCCGAACCGATGGCTGGACTATCTAATGGATTTTCGCTCAAC
 GCCACAAAACCTTGCCAAATCTTGTAGCAGCAATCTAGCTTTGTTCGATATTCGTTTGT
 GTTTTGTTTTGTAATAAAGGTTTCGACGTCGTTCAAAATATTATGCGCTTTTGTATTTT
 TTTTCATCACTGTCGTTAGTGTACAATTGACTCGACGTAAACACGTTAAATAGAGCTT
 GGACATATTTAACATCGGGCGTGTTAGCTTTATTAGGCCGATTATCGTCGTCGTCCC
 AACCTTCGTCGTTAGAAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCCATAGCCACACGACGCC
 TATTAATTGTGTCGGCTAACACGTCCGCGATCAAATTTGTAGTTGAGCTTTTTGGAAT
 TATTTCTGATTGCGGGCGTTTTTGGGCGGGTTTCAATCTAACTGTGCCCCGATTTTAAT
 TCAGACAACACGTTAGAAAGCGATGGTGCAGGCGGTGGTAACATTTTCAGACGGCAA
 ATCTACTAATGGCGGCGGTGGTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGGCG
 CAGGCGGGGCTGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGTGGTGGCGGTGATGCAGACGG
 CGGTTTAGGCTCAAATGTCTCTTTAGGCAACACAGTCGGCACCTCAACTATTGTACT
 GGTTCGGGCGCCGTTTTTGGTTTGACCGGTCTGAGACGAGTGCGATTTTTTTTCGTTT
 CTAATAGCTTCCAACAATTGTTGTCTGTCTCTAAAGGTGCAGCGGGTTGAGGTTCC
 GTCGGCATTGGTGGAGCGGGCGGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGTGGTGG
 AGGCGCTGGAATGTTAGGCACGGGAGAAGGTGGTGGCGGCGGTGCCGCCGGTATAA
 TTTGTTCTGGTTTAGTTTGTTCGCGCACGATTGTGGGCACCGGCGCAGGCGCCGCTG
 GCTGCACAACGGAAGGTCGTCTGCTTCGAGGCAGCGCTTGGGGTGGTGGCAATTCA
 ATATTATAATTGGAATACAAATCGTAAAAATCTGCTATAAGCATTGTAATTTTCGCTA
 TCGTTTACCGTGCCGATATTAAACAACCGCTCAATGTAAGCAATTGTATTGTAAAGA
 GATTGTCTCAAGCTCGGATCGATCCCGCACGCCGATAACAAGCCTTTTCATTTTTACT
 ACAGCATTGTAGTGGCGAGACACTTCGCTGTCGTCGAGGTTTAAACGCTTCCTCGCT
 CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA

GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
TGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTC
GGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT
CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGC
CTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT
GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCT
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCA
GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
GGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
ACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATC
TGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATAC
GGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
TGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG
AGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT
CGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCA
AGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCT
CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
CTGCATAATTCTTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGT
ACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGG
CGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTG
GAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACACGCGT
TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCG
ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCG

CATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC
 GCCCTAGCGCCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTT
 TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACG
 GCACCTCGACCCCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCC
 CTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTC
 TTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAG
 GGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTA
 ACGCGAATTTTAACAAAAATATTAACGTTTACAATTTCCCATTCGCCATTCAGGCTGC
 GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA

(SEQ. ID. No. 2)

Determinados compuestos de la divulgación se evaluaron en un ensayo de unión *in vitro* a HAQ STING como se ha descrito anteriormente. La siguiente tabla representa los datos biológicos de estos compuestos como valores de CE₅₀.

5

Tabla 6: Ensayo de unión por filtración a ³H-cGAMP para HAQ STING

Compuesto	CE ₅₀ (nM)	Compuesto	CE ₅₀ (nM)	Compuesto	CE ₅₀ (nM)
Ejemplo 1	3405	Ejemplo 19	9705	Ejemplo 37	5612
Ejemplo 2	9587	Ejemplo 20	10720	Ejemplo 38	1926
Ejemplo 3	10640	Ejemplo 21	6341	Ejemplo 39	1146
Ejemplo 4	1903	Ejemplo 22	8808	Ejemplo 40	3938
Ejemplo 5	1143	Ejemplo 23	6054	Ejemplo 41	5700
Ejemplo 6	703	Ejemplo 24	2636	Ejemplo 42	759
Ejemplo 7	9335	Ejemplo 25	4073	Ejemplo 43	1197
Ejemplo 8	6773	Ejemplo 26	1375	Ejemplo 44	15740
Ejemplo 9	2575	Ejemplo 27	13170	Ejemplo 45	14670
Ejemplo 10	13980	Ejemplo 28	1952	Ejemplo 46	7454
Ejemplo 11	2735	Ejemplo 29	13760	Ejemplo 47	5056
Ejemplo 12	5990	Ejemplo 30	5050	Ejemplo 48	19250
Ejemplo 13	1375	Ejemplo 31	5943	Ejemplo 49	2718
Ejemplo 14	4073	Ejemplo 32	3627	Ejemplo 50	890
Ejemplo 15	894	Ejemplo 33	6461	Ejemplo 51	17840
Ejemplo 16	1720	Ejemplo 34	10420	Ejemplo 52	599
Ejemplo 17	5865	Ejemplo 35	5547	Ejemplo 53	13670
Ejemplo 18	12500	Ejemplo 36	14430	Ejemplo 54	531

Ejemplo 56: Ensayo de unión por filtración a ³H-cGAMP (WT STING)

10 La capacidad de los compuestos para unirse a STING se cuantifica por su capacidad para competir con el ligando cGAMP tritiado por la membrana del receptor STING humano usando un ensayo de unión por filtración radiactivo. El ensayo de unión emplea el receptor STING obtenido de las membranas celulares de *Trichoplusia ni* (*T.ni*; Expression Systems, cat. N.º 94-002F, www.expressionsystems.com) que sobreexpresan WT STING de longitud completa y el ligando cGAMP tritiado.

15

El protocolo básico del ensayo de filtración a WT STING es de la siguiente manera:

Se preparó un ligando [³H] c-GAMP 16 nM por dilución en tampón de ensayo y se añadieron manualmente 50 ul de esta solución madre de trabajo a cada pocillo de la placa de ensayo. Después de la adición del ligando, se añadieron 2 ul de compuesto de prueba titulado, DMSO de control (Sigma N.º 276855) o cGAMP de control frío a los pocillos apropiados usando un BIOMEK FX. El compuesto titulado en serie se preparó en un Hamilton STARPlus CORE en una placa de 96 pocillos (Greiner, N.º 651201) usando un formato de respuesta a la dosis de diez puntos 1:3. Después de la adición del compuesto, se preparó una concentración de trabajo de 2,2 ug/ml de membrana STING (SEQ. ID. No. 3) diluyendo la membrana concentrada en tampón de ensayo (1x PBS; Invitrogen N.º SH30028.02) y homogeneizando 7 veces usando un homogeneizador de tejidos manual (Wheaton, N.º 357546). A continuación, se añadieron manualmente 148 ul de esta membrana preparada a cada pocillo de una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos (Fisher Scientific, N.º 12-566-121). A continuación, el compuesto, el ligando y la membrana se incubaron durante 60 min a TA antes de filtrar el contenido de cada placa de ensayo a través de una placa de filtro GF/B de 96 pocillos (PerkinElmer, N.º 6005250) usando un recolector de células TOMTEC MACH III equipado con un tampón HEPES 20 mM (Fisher Scientific, N.º BP299500). A continuación, las placas de filtro se secaron a 55 °C durante 30 min usando una estufa VWR presurizada antes de añadir 30 ul de centelleo ULTIMA GOLD F a cada

30

pocillo. A continuación, se midieron los niveles de tritio para cada pocillo de reacción usando un lector de placas PerkinElmer TopCount.

Después de la normalización con respecto a los controles, se calculó el porcentaje de actividad para cada concentración de compuesto midiendo la cantidad de radiactividad restante. El gráfico del porcentaje de actividad frente al logaritmo de la concentración de compuesto se ajustó con una ecuación de respuesta a la dosis de 4 parámetros para calcular los valores de CE_{50} .

Las condiciones de reacción finales fueron:

Componente	Volumen (ul)	Concentración final
Membrana STING	148	1,5 ug/ml
3H -cGAMP	50	4,0 nM
Control bajo (cGAMP frío)	2	10 uM
Compuesto de ensayo/DMSO	2	10 uM

Las concentraciones de compuesto ensayadas fueron 20,000, 637,00, 2,200, 0,740, 0,247, 0,082, 0,027, 0,009, 0,003 y 0,001 μM con DMSO residual al 1,0 %.

15 Generación del virus STING (WT) de longitud completa

El virus STING se generó usando un sistema de baculovirus de células de insecto. Se diluyeron células de *Spodoptera frugiperda* Sf21 (Kempbio, Inc.) con respecto a 5×10^5 células/ml en medio SFM Sf-900II (Life Technologies N.º 10902088) sin antibióticos. La suspensión celular se añadió a cada pocillo de una placa de 6 pocillos tratada (2 ml por pocillo, 1×10^6 células en total) y se dejó que las células se adhirieran durante al menos 30 min. Mientras tanto, se ensambló una mezcla de cotransfección de 1 ml combinando 500 ng de WT STING[STING(1-379)H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8/pBAC1] (síntesis personalizada de Genewiz) con 1 ml de medio SFM Sf-900II que contenía 10 μl de reactivo CELLFECTIN® II (Invitrogen N.º 10362100) y 100 ng de la cadena principal viral BestBac 2.0, ADN de baculovirus lineal eliminado de v-cath/chiA (Expression Systems N.º 91-002). Las mezclas de transfección se dejaron incubar durante 30 min. Después de la incubación, se eliminó retiró suavemente el medio de las células adheridas en la placa de 6 pocillos, se añadieron las mezclas de transfección de 1 ml (1 ml por pocillo) y la placa se colocó en una incubadora humidificada a 27 °C. Al día siguiente, se añadió 1 ml de medio SFM Sf-900II (sin antibióticos) a cada pocillo de la placa de 6 pocillos. Después de la adición del medio, las células se dejaron incubar con ADN [(SEQ. ID. No. 4) y la cadena principal viral linealizada BestBac 2.0] a 27 °C durante 5-7 días para generar la reserva viral P0. Para generar las reservas virales P1, se añadieron 0,5 ml de sobrenadante viral P0 a 50 ml de células Sf21 no infectadas (sembradas el día anterior a la infección a una densidad de 5×10^5 células/ml para permitir una duplicación durante una noche) en medio SFM Sf-900II que contenía 5 $\mu g/ml$ de gentamicina (Invitrogen N.º 15710072). A continuación, las células infectadas se incubaron a 27 °C durante 3 días mientras se agitaban a 110 rpm (ATR Biotech Multitron Infors HT N.º AJ118). El día 3, los cultivos P1 se contaron usando un ViCell XR (Beckman Coulter Life Sciences N.º 383556) para confirmar que se había producido la infección (tamaño de las células $\geq 3 \mu m$ más grande que las células no infectadas y viabilidad de aproximadamente el 85-95 %). Los cultivos se recogieron en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a 2000xg durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes virales P1 se vertieron en tubos de centrifuga limpios de 50 ml y los sedimentos celulares P1 restantes se usaron para generar células de insecto infectadas por baculovirus (BIIC, por sus siglas en inglés). Se preparó medio de críoconservación que contenía medio SFM Sf-900II con FBS inactivado por calor al 10 %, DMSO al 10 % (Sigma N.º D2650) y 5 $\mu g/ml$ de gentamicina y se esterilizó a través de un filtro de 0,22 μm inmediatamente antes de su uso. Los sedimentos celulares P1 se resuspendieron hasta una densidad de 2×10^7 células/ml y se dividieron en alícuotas en crioviales (1 ml por vial). Los crioviales se pusieron en congeladores de células MR. FROSTY™ durante una noche a -80 °C y se transfirieron a nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo al día siguiente. Para generar la reserva viral P2, se añadieron 0,5 ml de sobrenadante viral P1 a 50 ml de células Sf21 no infectadas (sembradas el día anterior a la infección a una densidad de 5×10^5 células/ml para permitir una duplicación durante una noche) en medio SFM Sf-900II que contenía 5 $\mu g/ml$ de gentamicina. Estas células se incubaron a 27 °C durante 3 días mientras se agitaban a 110 rpm antes de recoger la reserva P2 con centrifugación a 2000xg durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes virales P2 se vertieron y se descartaron, mientras que los sedimentos celulares P2 se usaron para generar BIIC P2 siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. El protocolo de generación de baculovirus se ha validado para producir BIIC P1/P2 de forma constante con títulos de 2×10^9 ufp/ml (2×10^7 células/ml x 100 ufp/célula).

Expresión de STING (WT) de longitud completa

Para generar membranas STING, los BIIC P1/P2 se amplificaron durante una noche añadiendo BIIC descongelados a las células Sf21 sembradas a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml. El volumen de BIIC usado para infectar el cultivo se calculó usando un título de BIIC asumido de 2×10^9 ufp/ml para lograr una MOI de 10 en la amplificación durante una noche. Después del cultivo durante una noche, las células se contaron en un ViCell XR para confirmar que se había producido la infección (tamaño de las células $\geq 3 \mu m$ más grande que las células no infectadas y viabilidad de aproximadamente el 80-90 %). El volumen de células Sf21 infectadas de la amplificación durante una noche usada para infectar la expresión a gran escala de *Trichoplusia ni* (T.ni; Expression Systems, cat. N.º 94-002F,

www.expressionsystems.com) que se sembró a una densidad de $1,0 \times 10^6$ en medio celular (ESF921 SFM que contenía 5 µg/ml de gentamicina) a MOI = 2,0 se calculó basándose en (100 ufp/célula Sf21 infectada). Se dejó que las células se expresaran durante 48 h a 27 °C antes de recoger el sedimento celular, mediante centrifugación a 3.400xg durante 10 min a 4 °C. Se contaron las células *T. ni* en un ViCell XR para confirmar que se había producido la infección (tamaño de las células ≥ 3 µm más grande que las células no infectadas y viabilidad de aproximadamente el 80-90 %) antes de la recogida.

Generación de membranas STING (WT) de longitud completa

10 Reactivos de reserva de tampón:

1) HEPES 1 M a pH 7,5, Teknova, Cat. N.º H1035

2) NaCl 5 M, Sigma Aldrich, Cat. N.º S5150-1L

3) KCl, Sigma Aldrich, Cat. N.º 319309-500ML

15 4) Tabletas de inhibidor de proteasa sin EDTA Complete, Roche Diagnostics, Cat. N.º 11873580001

5) Benzonasa, Universal Nuclease, Pierce, Cat. N.º 88702

Se añadió tampón de lisis [HEPES 25 mM a pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, (Benzonasa 1:5000, tableta de inhibidor de proteasa Complete/50 ml)] al sedimento de células que expresan STING (WT) de longitud completa preparado anteriormente a 5 ml de tampón de lisis por g de sedimento celular. El sedimento se resuspendió y se homogeneizó veinte veces usando un homogeneizador Wheaton Dounce para romper la membrana celular. A continuación, el lisado homogeneizado se pasó a través del microfluidizador emulsiflex-C5 a una presión cercana a 5000 PSI. El sedimento resuspendido se centrifugó a 36.000 rpm (100.000xg) en una centrifuga de velocidad ultrarrápida de rotor 45Ti durante 45 min, 4 °C. El sobrenadante se eliminó. A continuación, el sedimento se resuspendió en tampón de lavado [(HEPES 25 mM a pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, KCl 20 mM, NaCl 1 M (tableta de inhibidor de proteasa Complete/50 ml)] a un volumen de 50 ml de sedimento/tubo de centrifuga. A continuación, la mezcla de sedimento/tampón de lavado se homogeneizó, usando un homogeneizador de vidrio en hielo (20 carreras) seguido de centrifugación a 36.000 rpm durante 45 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó. Se repitió la etapa de lavado una vez más. La membrana resultante se resuspendió en HEPES 20 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 10 %, inhibidores de proteasa sin EDTA (1 tableta/50 ml). La concentración de proteína se midió mediante el ensayo de Bradford (ensayo de proteínas Bio-Rad, Cat. N.º 500-0006), y el enriquecimiento de proteínas se determinó mediante SDS-PAGE y se confirmó por transferencia de Western. Las membranas resuspendidas se almacenaron a -80 °C.

35 *Secuencia de aminoácidos de STING WT de longitud completa [STING(1-379)H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8]:*

MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLL
LNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCP LRRGALLLSIYFYYSLPNAVGPFFT
WMLALLGLSQUALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNV AHGLAWSYYIGYLRLLPELQA
RIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIK
DRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTL
EDILADAPESQNNCRLIA YQEPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAPSTST
MSQEPPELLISGMEKPLPLRTDFSGGGLNDIFEAQKIEWHEGSLEVLFQGP HHHHHHHH
(SEQ. ID. No. 3)

40 *Secuencia plasmídica de WTSTING de longitud completa [STING(1-379)H232R-gg-AviTag-gs-HRV3C-HIS8/pBAC1]:*

GGAACGGCTCCGCCACTATTAATGAAATTAATAATTTCAATTTTAAAAACGCAG
 CAAGAGAAACATTTGTATGAAAGAATGCGTAGAAGGAAAGAAAAATGTCGTCGAC
 ATGCTGAACAACAAGATTAATATGCCTCCGTGTATAAAAAAATATTGAACGATTTG
 AAAGAAAACAATGTACCGCGCGGGCGGTATGTACAGGAAGAGGTTTATACTAACTG
 TTACATTGCAAACGTGGTTTCGTGTGCCAAGTGTGAAAACCGATGTTAATCAAGGC
 TCTGACGCATTTCTACAACCACGACTCCAAGTGTGTGGGTGAAGTCATGCATCTTTT
 AATCAAATCCCAAGATGTGTATAAACCACCAAACCTGCCAAAAAATGAAAACGTGCG
 ACAAGCTCTGTCCGTTTGCTGGCAACTGCAAGGGTCTCAATCCTATTTGTAATTATTG
 AATAATAAAACAATTATAAATGTCAAATTTGTTTTTTATTAACGATACAAACCAAAC
 GCAACAAGAACATTTGTAGTATTATCTATAATTGAAAACGCGTAGTTATAATCGCTG
 AGGTAATATTTAAAATCATTTTCAAATGATTCACAGTTAATTTGCGACAATATAATT
 TTATTTTCACATAAACTAGACGCCTTGTCGTCTTCTTCTTCGTATTCCTTCTCTTTTC
 ATTTTCTCTTCATAAAAATTAACATAGTTATTATCGTATCCATATATGTATCTATCG
 TATAGAGTAAATTTTTTGTGTGCATAAATATATATGTCTTTTTTAATGGGGTGTATAG
 TACCGCTGCGCATAGTTTTTCTGTAATTTACAACAGTGCTATTTTCTGGTAGTTCTTC
 GGAGTGTGTTGCTTTAATTATTAAATTTATATAATCAATGAATTTGGGATCGTCGGTT
 TTGTACAATATGTTGCCGGCATAGTACGCAGCTTCTTCTAGTTCAATTACACCATTTT
 TTAGCAGCACCGGATTAACATAACTTTCCAAAATGTTGTACGAACCGTTAAACAAAA
 ACAGTTCACCTCCCTTTTCTATACTATTGTCTGCGAGCAGTTGTTTGTGTGTTAAAAAT
 AACAGCCATTGTAATGAGACGCACAACTAATATCACAACTGGAAATGTCTATCA
 ATATATAGTTGCTGATCAGATCTGATCATGGAGATAATTAATAATGATAACCATCTCG
 CAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTTGTAATAAAAAAACCTATAA
 ATATAGGATCCATGCCCCACTCCAGCCTGCATCCATCCATCCCGTGTCCAGGGGTC
 ACGGGGCCCAGAAGGCAGCCTTGTTCTGCTGAGTGCTGCCTGGTGACCCTTTGGG
 GGCTAGGAGAGCCACCAGAGCACACTCTCCGGTACCTGGTGCTCCACCTAGCCTCCC
 TGCAGCTGGGACTGCTGTAAACGGGGTCTGCAGCCTGGCTGAGGAGCTGCGCCAC
 ATCCACTCCAGGTACCGGGGCAGCTACTGGAGGACTGTGCGGGCCTGCCTGGGCTG
 CCCCCTCCGCGTGGGGCCCTGTTGCTGCTGTCCATCTATTTCTACTACTCCCTCCA
 AATGCGGTGCGCCCGCCCTTCACTTGGATGCTTGCCCTCCTGGGCCTCTCGCAGGCA
 CTGAACATCCTCCTGGGCCTCAAGGGCCTGGCCCCAGCTGAGATCTCTGCAGTGTGT
 GAAAAAGGGAATTTCAACGTGGCCCATGGGCTGGCATGGTCATATTACATCGGATA

TCTGCGGCTGATCCTGCCAGAGCTCCAGGCCCGGATTTCGAACTTACAATCAGCATTACAA
CAACAACCTGCTACGGGGTGCAAGTGAGCCAGCGGCTGTATATTCTCCTCCCATTTGGA
CTGTGGGGTGCCCTGATAACCTGAGTATGGCTGACCCCAACATTCGCTTCCTGGATAA
ACTGCCCCAGCAGACCGGTGACCGTGCTGGCATCAAGGATCGGGTTTACAGCAACA
GCATCTATGAGCTTCTGGAGAACGGGCAGCGGGCGGGCACCTGTGTCTTGGAGTAC
GCCACCCCTTGACAGACTTTGTTTGCCATGTCACAATACAGTCAAGCTGGCTTTAGC
CGGGAGGATAGGCTTGAGCAGGCCAACTCTTCTGCCGGACACTTGAGGACATCCT
GGCAGATGCCCCTGAGTCTCAGAACAACCTGCCGCCTCATTGCCTACCAGGAACCTGC
AGATGACAGCAGCTTCTCGCTGTCCCAGGAGGTTCTCCGGCACCTGCGGCAGGAGG
AAAAGGAAGAGGTTACTGTGGGCAGCTTGAAGACCTCAGCGGTGCCAGTACCTCC
ACGATGTCCCAAGAGCCTGAGCTCCTCATCAGTGGAAATGGAAAAGCCCTCCCTCTC
CGCACGGATTTCTCTGGCGGTGGCCTGAACGACATCTTCGAAGCCAGAAAATCGA
ATGGCATGAAGGCAGCCTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCACACCACCATCATCACC
ATCACCATTAATGAGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTAACCTAGG
TAGCTGAGCGCATGCAAGCTGATCCGGGTTATTAGTACATTTATTAAGCGCTAGATT
CTGTGCGTTGTTGATTTACAGACAATTGTTGTACGTATTTTAATAATTCATTAAATTT
ATAATCTTTAGGGTGGTATGTTAGAGCGAAAATCAAATGATTTTCAGCGTCTTTATA
TCTGAATTTAAATATTAATCCTCAATAGATTTGTAAAATAGGTTTCGATTAGTTTCA
AACAAGGGTTGTTTTTCCGAACCGATGGCTGGACTATCTAATGGATTTTCGCTCAAC
GCCACAAAACCTTGCCAAATCTTGATAGCAGCAATCTAGCTTTGTGATATTTCGTTTGT
GTTTTGTTTTGTAATAAAGGTTTCGACGTCGTTCAAATATTATGCGCTTTTGTATTTC
TTTCATCACTGTCGTTAGTGTACAATTGACTCGACGTAAACACGTTAAATAGAGCTT
GGACATATTTAACATCGGGCGTGTTAGCTTTATTAGGCCGATTATCGTCGTCGTCCTCC
AACCCTCGTCGTTAGAAGTTGCTTCCGAAGACGATTTTGCCATAGCCACACGACGCC
TATTAATTGTGTCGGCTAACACGTCCGCGATCAAATTTGTAGTTGAGCTTTTTTGGAAT
TATTTCTGATTGCGGGCGTTTTTGGGCGGGTTTCAATCTAACTGTGCCCCGATTTTAAT
TCAGACAACACGTTAGAAAGCGATGGTGCAGGCGGTGGTAACATTTTCAGACGGCAA
ATCTACTAATGGCGGCGGTGGTGGAGCTGATGATAAATCTACCATCGGTGGAGGCG
CAGGCGGGGCTGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGTGGTGGCGGTGATGCAGACGG
CGGTTTAGGCTCAAATGTCTCTTTAGGCAACACAGTCGGCACCTCAACTATTGTACT
GGTTTCGGGCGCCGTTTTTGGTTTTGACCGGTCTGAGACGAGTGCGATTTTTTTTCGTTT
CTAATAGCTTCCAACAATTGTTGTCTGTCTCTAAAGGTGCAGCGGGTTGAGGTTCC
GTCGGCATTGGTGGAGCGGGCGGCAATTCAGACATCGATGGTGGTGGTGGTGGTGG

AGGCGCTGGAATGTTAGGCACGGGAGAAGGTGGTGGCGGCGGTGCCGCCGGTATAA
 TTTGTTCTGGTTTAGTTTGTTCGCGCACGATTGTGGGCACCGGCGCAGGCGCCGCTG
 GCTGCACAACGGAAGGTCGTCTGCTTCGAGGCAGCGCTTGGGGTGGTGGCAATTCA
 ATATTATAATTGGAATACAAATCGTAAAAATCTGCTATAAGCATTGTAATTTGCTA
 TCGTTTACCGTGCCGATATTTAACAACCGCTCAATGTAAGCAATTGTATTGTAAAGA
 GATTGTCTCAAGCTCGGATCGATCCCGCACGCCGATAACAAGCCTTTTCATTTTTACT
 ACAGCATTGTAGTGGCGAGACACTTCGCTGTCGTCGAGGTTTAAACGCTTCCTCGCT
 CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA
 GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
 CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
 CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
 GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
 TCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTC
 GGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT
 CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGC
 CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT
 GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
 AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCT
 GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
 AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCA
 GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
 GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
 ACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
 TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATC
 TGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATAC
 GGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
 CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
 TGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG
 AGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT
 CGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGGTTCCCAACGATCA
 AGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCT
 CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
 CTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGT

ACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGG
 CGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTG
 GAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
 CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGT
 TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCG
 ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
 AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
 TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCG
 CATTAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC
 GCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCTTTCTTCGTCGACGTTGCGCGGCTT
 TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACG
 GCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCC
 CTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTC
 TTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAG
 GGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTA
 ACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCCCATTCGCCATTCAGGCTGC
 GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA

(SEQ. ID. No. 4)

Determinados compuestos de la divulgación se evaluaron en un ensayo de unión *in vitro* a WT STING como se ha descrito anteriormente. La siguiente tabla representa los datos biológicos de estos compuestos como valores de CE₅₀.

5

Tabla 7: Ensayo de unión por filtración a ³H-cGAMP para WT STING

Compuesto	CE ₅₀ (nM)	Compuesto	CE ₅₀ (nM)	Compuesto	CE ₅₀ (nM)
Ejemplo 1	5172	Ejemplo 18	21 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 32	17030
Ejemplo 2	11210	Ejemplo 19	30 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 33	30 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 3	41 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 20	33 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 34	18 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 4	1145	Ejemplo 21	14290	Ejemplo 35	7671
Ejemplo 7	20 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 22	17100	Ejemplo 36	9 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 8	15520	Ejemplo 23	37 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 41	14690
Ejemplo 9	10890	Ejemplo 24	8540	Ejemplo 43	4108
Ejemplo 10	31 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 25	8644	Ejemplo 46	24 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 11	3873	Ejemplo 26	2081	Ejemplo 48	23 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 13	2081	Ejemplo 27	19 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 50	2144
Ejemplo 14	8644	Ejemplo 28	9259	Ejemplo 51	3 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 15	894	Ejemplo 29	16 % de inh. a 20 uM	Ejemplo 52	101 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 16	2480	Ejemplo 30	18670	Ejemplo 53	7 % de inh. a 20 uM
Ejemplo 17	14750	Ejemplo 31	10 % de inh. a 20 uM		

Ejemplo 57: Secreción de IFN-β en cultivo de células THP1 (5 h)

- 10 La capacidad de los compuestos para estimular la secreción de interferón-beta de las células THP1 se midió usando un kit de IFN-β AlphaLISA humano (Perkin Elmer, Cat. N.º AL265F). El protocolo básico es el siguiente:
 Se usó un dispensador acústico Labcyte Echo 550 para transferir 120 nl de compuesto disuelto en DMSO a los pocillos de una microplaca de 384 pocillos estéril y vacía (Corning, Cat. N.º 3712). Las células THP1 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Cat. N.º TIB202) previamente congeladas en medio de recuperación (Life Technologies, Cat. N.º 12648-010) se descongelaron e inmediatamente se diluyeron 10 veces en medio de ensayo a 37 °C (RPMI 1640 + L-Glutamina y rojo fenol, Life Technologies, Cat. N.º 11875-085; suero bovino fetal inactivado por calor al 0,5 %, Sigma Aldrich, Cat. N.º F4135; Piruvato de sodio 1 mM, Life Technologies, Cat. N.º 11360-070; aminoácidos no esenciales 1x; Life Technologies, Cat. 11140-050). La viabilidad celular y el recuento se determinaron usando un contador de células Beckman Coulter V-Cell XR. La suspensión celular se centrifugó a 200xg durante 5 min a TA. Las células se resuspendieron hasta una densidad de 0,8 x 10⁶/ml en medio de ensayo a 37 °C. Las transferencias de líquidos posteriores se realizaron usando una pipeta multicanal electrónica Matrix o una plataforma de manipulación de líquidos
- 15
- 20

automatizada Agilent Bravo.

El ensayo se inició dispensando 40 µl de la suspensión celular previamente preparada en los pocillos de la placa que contenía compuestos. Después de 5 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % en una atmósfera humidificada, la placa de células y compuestos se centrifugó a 200xg durante 5 min a TA. De cada pocillo, se transfirieron 5 µl de sobrenadante a los pocillos correspondientes de una placa de color blanco de 384 pocillos (Perkin Elmer, Cat. N.º 6005620). En estos pocillos que contenían sobrenadante se añadieron 10 µl de perlas de aceptor anti-analito 5x (50 µg/ml de tampón AlphaLISA HiBlock) y se incubaron durante 30 min a TA mientras se agitaban en un agitador de placa orbital. A cada pocillo se le añadieron 10 µl de anticuerpo biotinilado antianalito 5x (5 nM en tampón AlphaLISA HiBlock) y se incubaron en un agitador de placa orbital durante 60 min a TA o durante una noche a 4 °C. A cada pocillo se le añadieron 25 µl de perlas SA-Donante 2x (80 µg/ml en tampón AlphaLISA HiBlock) y se incubaron durante 30-45 min a TA en la oscuridad mientras se agitaban en un agitador de placa orbital. A continuación, la placa se leyó en un Perkin Elmer Envision (λ_{ex} = 680 nm, λ_{em} = 570 nm). El efecto porcentual de la señal AlphaLISA a cada concentración de compuesto se calculó basándose en controles positivos de cGAMP 30 µM y controles negativos de DMSO al 0,3 %. El gráfico del efecto porcentual frente al logaritmo de la concentración de compuesto se ajustó con una ecuación de respuesta a la concentración de 4 parámetros para calcular los valores de CE₅₀. Los compuestos de prueba se ensayaron a concentraciones 30000, 10000, 3333, 1111, 370,4, 123,4, 41,2, 13,7, 4,6 y 1,5 nM con DMSO residual al 0,3 %. El compuesto de control, cGAMP se ensayó a concentraciones 100000, 33333, 11111, 3704, 1235, 412, 137, 46 y 15 nM con DMSO residual al 0,3 %.

Se evaluó la secreción de IFN-β en los compuestos de la divulgación en un cultivo de células THP1 como se ha descrito anteriormente. La siguiente tabla representa los datos biológicos para estos compuestos como porcentaje de activación con respecto a 2'3'-cGAMP a la concentración de 30 µM.

Tabla 8: Secreción de IFN-β en cultivo de células THP1 (5 h)

Compuesto	% de efecto a 30 µM con respecto a 2'3'-cGAMP	Compuesto	% de efecto a 30 µM con respecto a 2'3'-cGAMP	Compuesto	% de efecto a 30 µM con respecto a 2'3'-cGAMP
Ejemplo 1	144	Ejemplo 19	153	Ejemplo 37	42
Ejemplo 2	149	Ejemplo 20	47	Ejemplo 38	154
Ejemplo 3	59	Ejemplo 21	162	Ejemplo 39	193
Ejemplo 4	34	Ejemplo 22	43	Ejemplo 40	93
Ejemplo 5	77	Ejemplo 23	191	Ejemplo 41	312
Ejemplo 6	130	Ejemplo 24	214	Ejemplo 42	6
Ejemplo 7	290	Ejemplo 25	394	Ejemplo 43	56
Ejemplo 8	260	Ejemplo 26	228	Ejemplo 44	20
Ejemplo 9	298	Ejemplo 27	14	Ejemplo 45	104
Ejemplo 10	182	Ejemplo 28	86	Ejemplo 46	205
Ejemplo 11	132	Ejemplo 29	9	Ejemplo 47	90
Ejemplo 12	16	Ejemplo 30	15	Ejemplo 48	71
Ejemplo 13	228	Ejemplo 31	24	Ejemplo 49	111
Ejemplo 14	394	Ejemplo 32	24	Ejemplo 50	115
Ejemplo 15	115	Ejemplo 33	25	Ejemplo 51	31
Ejemplo 16	129	Ejemplo 34	34	Ejemplo 52	142
Ejemplo 17	21	Ejemplo 35	57	Ejemplo 53	182
Ejemplo 18	273	Ejemplo 36	11	Ejemplo 54	66

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MERCK SHARP & DOHME CORP.

Altman, Michael D.

Cash, Brandon D.

Chang, Wonsuk

Cumming, Jared N.

Haidle, Andrew M.

Henderson, Timothy J.

Jewell, James P.

Larsen, Matthew A.

Liang, Rui

Lim, Jongwon

Lu, Min
 Otte, Ryan D.
 Siu, Tony
 Trotter, Benjamin Wesley
 Tyagarajan, Sriram

<120> COMPUESTOS DE BENZO[b]TIOFENO COMO AGONISTAS DE STING

<130> 24170

<150> 62/404, 062

<151> 04/10/2016

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1 5 10 15

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
 20 25 30

Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
 35 40 45

Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
 50 55 60

Ser Leu Ala Glu Glu Leu His His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
 65 70 75 80

Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
 85 90 95

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
 100 105 110

ES 2 893 532 T3

Val	Gly	Pro	Pro	Phe	Thr	Trp	Met	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Gln	115	120	125
Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Leu	Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Ile	130	135	140
Ser	Ala	Val	Cys	Glu	Lys	Gly	Asn	Phe	Asn	Val	Ala	His	Gly	Leu	Ala	145	150	155
Trp	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Pro	Glu	Leu	Gln	165	170	175
Ala	Arg	Ile	Arg	Thr	Tyr	Asn	Gln	His	Tyr	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Gly	180	185	190
Ala	Val	Ser	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ile	Leu	Leu	Pro	Leu	Asp	Cys	Gly	Val	195	200	205
Pro	Asp	Asn	Leu	Ser	Met	Ala	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Phe	Leu	Asp	Lys	210	215	220
Leu	Pro	Gln	Gln	Thr	Ala	Asp	Arg	Ala	Gly	Ile	Lys	Asp	Arg	Val	Tyr	225	230	235
Ser	Asn	Ser	Ile	Tyr	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Gly	Gln	Arg	Ala	Gly	Thr	245	250	255
Cys	Val	Leu	Glu	Tyr	Ala	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr	Leu	Phe	Ala	Met	Ser	260	265	270
Gln	Tyr	Ser	Gln	Ala	Gly	Phe	Ser	Arg	Glu	Asp	Arg	Leu	Glu	Gln	Ala	275	280	285
Lys	Leu	Phe	Cys	Gln	Thr	Leu	Glu	Asp	Ile	Leu	Ala	Asp	Ala	Pro	Glu	290	295	300
Ser	Gln	Asn	Asn	Cys	Arg	Leu	Ile	Ala	Tyr	Gln	Glu	Pro	Ala	Asp	Asp	305	310	315
Ser	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Val	Leu	Arg	His	Leu	Arg	Gln	Glu	325	330	335
Glu	Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Val	Gly	Ser	Leu	Lys	Thr	Ser	Ala	Val	Pro	340	345	350
Ser	Thr	Ser	Thr	Met	Ser	Gln	Glu	Pro	Glu	Leu	Leu	Ile	Ser	Gly	Met			

ES 2 893 532 T3

355

360

365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser Gly Gly Gly Leu Asn
370 375 380

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Gly Ser Leu Glu
385 390 395 400

Val Leu Phe Gln Gly Pro His His His His His His His His
405 410

<210> 2
<211> 6482
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

```

ggaacggctc cgccactat taatgaaatt aaaaattcca attttaaaaa acgcagcaag      60
agaaacattt gtatgaaaga atgcgtagaa ggaaagaaaa atgtcgtcga catgctgaac      120
aacaagatta atatgcctcc gtgtataaaa aaaatattga acgatttgaa agaaaacaat      180
gtaccgcgcg gcggtatgta caggaagagg tttatactaa actggtacat tgcaaactgt      240
gtttcgtgtg ccaagtgtga aaaccgatgt ttaatcaagg ctctgacgca tttctacaac      300
cacgactcca agtgtgtggg tgaagtcatg catcttttaa tcaaattcca agatgtgtat      360
aaaccaccaa actgccaaaa aatgaaaact gtcgacaagc tctgtccgtt tgctggcaac      420
tgcaagggtc tcaatcctat ttgtaattat tgaataataa aacaattata aatgctaaat      480
ttgtttttta ttaacgatac aaaccaaacg caacaagaac atttgtagta ttatctataa      540
ttgaaaacgc gtagttataa tcgctgaggt aatattttaa atcattttca aatgattcac      600
agttaatttg cgacaatata attttatttt cacataaact agacgccttg tcgtcttctt      660
cttcgtattc cttctctttt tcatttttct cttcataaaa attaacatag ttattatcgt      720
atccatatat gtatctatcg tatagagtaa attttttggt gtcataaata tatatgtctt      780
ttttaatggg gtgtatagta ccgctgcgca tagtttttct gtaatttaca acagtgttat      840
tttctggtag ttcttcggag tgtgttgctt taattattaa atttatataa tcaatgaatt      900
tgggatcgtc ggttttgtac aatatgttgc cgccatagta cgcagcttct tctagttcaa      960
ttacaccatt ttttagcagc accggattaa cataactttc caaatgttg tacgaaccgt     1020
taaacaaaaa cagttcacct cccttttcta tactattgtc tgcgagcagt tgtttgttgt     1080
taaaaataac agccattgta atgagacgca caaactaata tcacaaactg gaaatgtcta     1140
tcaatatata gttgctgatc agatctgatc atggagataa ttaaatgat aaccatctcg     1200
caaataaata agtattttac tgttttcgta acagttttgt aataaaaaaa cctataaata     1260

```

ES 2 893 532 T3

taggatccat gccccactcc agcctgcac ccatccatccc gtgtcccagg ggtcacgggg	1320
cccagaaggc agccttggtt ctgctgagtg cctgcctggt gacccttttg gggctaggag	1380
agccaccaga gcacactctc cggtacctgg tgctccacct agcctccctg cagctgggac	1440
tgctgttaaa cggggtctgc agcctggctg aggagctgca ccacatccac tccaggtacc	1500
ggggcagcta ctggaggact gtgcgggcct gcctgggctg cccctccgc cgtggggccc	1560
tgttgctgct gtccatctat ttctactact ccctcccaa tgcggtcggc ccgcccttca	1620
cttggtgct tgcctcctg ggctctcgc aggcactgaa catcctcctg ggcctcaagg	1680
gcctggcccc agctgagatc tctgcagtgt gtgaaaaagg gaatttcaac gtggcccatg	1740
ggctggcatg gtcataattac atcgatatc tgcggtgat cctgccagag ctccaggccc	1800
ggattcgaac ttacaatcag cattacaaca acctgctacg ggtgagtg agccagcggc	1860
tgtatattct cctccattg gactgtggg tgctgataa cctgagtatg gctgaccca	1920
acattcgctt cctggataaa ctgcccagc agacgcgtga ccgtgctggc atcaaggatc	1980
gggtttacag caacagcatc tatgagcttc tggagaacgg gcagcggcg ggcacctgtg	2040
tcctggagta cgccaccccc ttgcagactt tgtttgccat gtcacaatac agtcaagctg	2100
gctttagccg ggaggatagg ctgagcagg ccaaactctt ctgccagaca cttgaggaca	2160
tcctggcaga tgccctgag tctcagaaca actgccgcct cattgcctac caggaacctg	2220
cagatgacag cagcttctcg ctgtcccagg aggttctccg gcacctgcg caggagggaa	2280
aggaagaggt tactgtgggc agcttgaaga cctcagcggg gccagtagc tccacgatgt	2340
ccaagagcc tgagctctc atcagtggaa tggaaaagcc cctccctctc cgcacggatt	2400
tctctggcgg tggcctgaac gacatcttcg aagcccagaa aatcgaatgg catgaaggca	2460
gcctggaagt gctgttccag ggcccacacc accatcatca ccatcaccat taatgagcgg	2520
ccgcactcga gcaccaccac caccaccact aacctaggta gctgagcgca tgcaagctga	2580
tccgggttat tagtacattt attaaagcgt agattctgtg cgttggtgat ttacagacaa	2640
ttgtgttacg tattttaata attcattaaa ttataatct ttaggggtgt atgttagagc	2700
gaaaatcaaa tgattttcag cgtctttata tctgaattta aatattaaat cctcaataga	2760
tttgtaaaat aggtttcgat tagtttcaaa caagggttgt tttccgaac cgatggctgg	2820
actatctaata ggattttcgc tcaacgccac aaaacttgcc aaatcttgta gcagcaatct	2880
agctttgtcg atattcggtt gtgttttgtt ttgtaataaa ggttcgacgt cgttcaaaat	2940
attatgcgct tttgtatttc ttcatcact gtcgttagtg tacaattgac tcgacgtaaa	3000
cacgttaaat agagcttgga catatttaac atcgggcgtg ttagctttat taggccgatt	3060
atcgtcgtcg tcccaacct cgtcgtaga agttgcttcc gaagacgatt ttgccatagc	3120
cacacgacgc ctattaattg tgcggctaa cagtcgcgc atcaaatttg tagttgagct	3180

ES 2 893 532 T3

ttttggaatt atttctgatt gcgggcggtt ttgggcgggt ttcaatctaa ctgtgcccga	3240
ttttaattca gacaacacgt tagaaagcga tgggtgcaggc ggtggtaaca tttcagacgg	3300
caaatctact aatggcggcg gtggtggagc tgatgataaa tctaccatcg gtggaggcgc	3360
aggcggggct ggcggcggag gcggaggcgg aggtgggtggc ggtgatgcag acggcggttt	3420
aggctcaaat gtctcttttag gcaacacagt cggcacctca actattgtac tggtttcggg	3480
cgccgttttt ggtttgaccg gtctgagacg agtgcgattt ttttcgtttc taatagcttc	3540
caacaattgt tgtctgtcgt cttaaaggcgc agcgggttga ggttccgtcg gcattggtgg	3600
agcgggcggc aattcagaca tcgatggtgg tgggtgggtgg ggaggcgctg gaatgttagg	3660
cacgggagaa ggtggtggcg gcggtgccgc cggtataatt tgttctggtt tagtttgttc	3720
gcgcacgatt gtgggcaccg gcgcaggcgc cgctggctgc acaacggaag gtcgtctgct	3780
tcgaggcagc gcttgggggtg gtggcaattc aatattataa ttggaatata aatcgtaaaa	3840
atctgctata agcattgtaa tttcgctatc gtttaccgtg ccgatattta acaaccgctc	3900
aatgtaagca attgtattgt aaagagattg tctcaagctc ggatcgatcc cgcacgccga	3960
taacaagcct tttcatTTTT actacagcat tgtagtggcg agacacttcg ctgtcgtcga	4020
ggttttaaagc cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg	4080
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	4140
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg	4200
gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag	4260
agggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc	4320
gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg	4380
ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggg ttaggtcggt	4440
cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc	4500
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	4560
actggtaaca ggattagcag agcagaggtat gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg	4620
tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca	4680
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc	4740
ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	4800
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt	4860
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt	4920
tttaaataca tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc	4980
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc	5040

ES 2 893 532 T3

```

gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata      5100
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg      5160
gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattggtgc      5220
cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct      5280
acaggcatcg tgggtgtcacg ctcgctggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa      5340
cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcggt      5400
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca      5460
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac      5520
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta      5580
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt      5640
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc      5700
actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca      5760
aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata      5820
ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc      5880
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc      5940
cgaaaagtgc cacctgacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt      6000
acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc      6060
ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggtccct      6120
ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctgcacccca aaaaacttga ttaggggtgat      6180
ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acgggttttc gccctttgac gttggagtcc      6240
acgttcttta atagtggact ctgtttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc      6300
tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attgggttaa aaatgagctg      6360
atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttcccattcg      6420
ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggtg gggcctcttc gctattacgc      6480
ca                                                                 6482

```

<210> 3
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 3

```

Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr

```

ES 2 893 532 T3

20					25					30					
Leu	Trp	Gly	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro	Glu	His	Thr	Leu	Arg	Tyr	Leu	Val
		35					40					45			
Leu	His	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Val	Cys
	50					55					60				
Ser	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Arg	His	Ile	His	Ser	Arg	Tyr	Arg	Gly	Ser
65					70					75					80
Tyr	Trp	Arg	Thr	Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Gly	Cys	Pro	Leu	Arg	Arg	Gly
				85					90					95	
Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Pro	Asn	Ala
			100					105					110		
Val	Gly	Pro	Pro	Phe	Thr	Trp	Met	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Gln
		115					120					125			
Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Leu	Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Ile
	130					135					140				
Ser	Ala	Val	Cys	Glu	Lys	Gly	Asn	Phe	Asn	Val	Ala	His	Gly	Leu	Ala
145					150					155					160
Trp	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Pro	Glu	Leu	Gln
				165					170					175	
Ala	Arg	Ile	Arg	Thr	Tyr	Asn	Gln	His	Tyr	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Gly
			180					185					190		
Ala	Val	Ser	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ile	Leu	Leu	Pro	Leu	Asp	Cys	Gly	Val
		195					200					205			
Pro	Asp	Asn	Leu	Ser	Met	Ala	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Phe	Leu	Asp	Lys
	210					215					220				
Leu	Pro	Gln	Gln	Thr	Gly	Asp	Arg	Ala	Gly	Ile	Lys	Asp	Arg	Val	Tyr
225					230					235					240
Ser	Asn	Ser	Ile	Tyr	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Gly	Gln	Arg	Ala	Gly	Thr
				245					250					255	
Cys	Val	Leu	Glu	Tyr	Ala	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr	Leu	Phe	Ala	Met	Ser
			260					265					270		

ES 2 893 532 T3

Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285

Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300

Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335

Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
340 345 350

Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365

Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser Gly Gly Gly Leu Asn
370 375 380

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Gly Ser Leu Glu
385 390 395 400

Val Leu Phe Gln Gly Pro His His His His His His His His
405 410

<210> 4
<211> 6482
<212> ADN
<213> HOMO SAPIENS

<400> 4

ggaacggctc cgccactat taatgaaatt aaaaattcca attttaaaaa acgcagcaag	60
agaaacatttt gtatgaaaga atgcgtagaa ggaaagaaaa atgtcgtcga catgctgaac	120
aacaagatta atatgcctcc gtgtataaaaa aaaatattga acgatttgaa agaaaaacaat	180
gtaccgcgcg gcggtatgta caggaagagg tttatactaa actgttacat tgcaaactgtg	240
gtttcgtgtg ccaagtgtga aaaccgatgt ttaatcaagg ctctgacgca tttctacaac	300
cacgactcca agtgtgtggg tgaagtcatg catcttttaa tcaaattcca agatgtgtat	360
aaaccaccaa actgccaaaa aatgaaaact gtcgacaagc tctgtccgtt tgctggcaac	420
tgcaagggtc tcaatcctat ttgtaattat tgaataataa aacaattata aatgtcaa	480
ttgttttttta ttaacgatac aaaccaaacg caacaagaac atttgtagta ttatctataa	540
ttgaaaacgc gtagttataa tcgctgaggt aatattttaa atcattttca aatgattcac	600
agttaatttg cgacaatata attttatttt cacataaact agacgccttg tcgtcttctt	660

cttcgtatctt	cttctctttt	tcatttttct	cttcataaaa	attaacatag	ttattatcgt	720
atccatatat	gtatctatcg	tatagagtaa	atTTTTtgtt	gtcataaata	tatatgtctt	780
ttttaatggg	gtgtatagta	ccgctgcgca	tagtttttct	gtaatttaca	acagtgcctat	840
tttctggtag	ttcttcggag	tgtgttgctt	taattattaa	atTTatataa	tcaatgaatt	900
tgggatcgtc	ggttttgtac	aatatgttgc	cggcatagta	cgcagcttct	tctagttcaa	960
ttacaccatt	tttttagcagc	accggattaa	cataactttc	caaaatgttg	tacgaaccgt	1020
taaacaaaaa	cagttcacct	cccttttcta	tactattgtc	tgcgagcagt	tgtttgttgt	1080
taaaaataac	agccattgta	atgagacgca	caaactaata	tcacaaactg	gaaatgtcta	1140
tcaatatata	gttgctgata	agatctgata	atggagataa	ttaaaatgat	aaccatctcg	1200
caaataaata	agtattttac	tgttttcgta	acagttttgt	aataaaaaaa	cctataaata	1260
taggatccat	gccccactcc	agcctgcata	catccatccc	gtgtcccagg	ggcacgggg	1320
cccagaaggc	agccttggtt	ctgctgagtg	cctgcctggg	gaccctttgg	gggctaggag	1380
agccaccaga	gcacactctc	cggtaacctg	tgtccacct	agcctccctg	cagctgggac	1440
tgtgtttaa	cgggggtctgc	agcctggctg	aggagctgcg	ccacatccac	tccaggtacc	1500
ggggcagcta	ctggaggact	gtgcgggcct	gcctgggctg	ccccctccgc	cgtggggccc	1560
tgttgctgct	gtccatctat	ttctactact	ccctcccaaa	tgcggtcggc	ccgcccttca	1620
cttggtatgct	tgcctcctg	ggcctctcgc	aggcactgaa	catcctcctg	ggcctcaagg	1680
gcctggcccc	agctgagata	tctgcagtgt	gtgaaaaagg	gaatttcaac	gtggcccatg	1740
ggctggcatg	gtcatattac	atcggatata	tgcggctgat	cctgccagag	ctccaggccc	1800
ggattcgaac	ttacaatcag	cattacaaca	acctgctacg	gggtgcagtg	agccagcggc	1860
tgtatattct	cctcccattg	gactgtgggg	tgcctgataa	cctgagtatg	gctgacccca	1920
acattcgctt	cctggataaa	ctgccccagc	agaccgggtga	ccgtgctggc	atcaaggatc	1980
gggtttacag	caacagcata	tatgagcttc	tggagaacgg	gcagcggggc	ggcacctgtg	2040
tcctggagta	cgccaccccc	ttgcagactt	tgtttgccat	gtcacaatac	agtcaagctg	2100
gcttttagccg	ggaggatagg	cttgagcagg	ccaaactctt	ctgccggaca	cttgaggaca	2160
tcctggcaga	tgcccttgag	tctcagaaca	actgccgcct	cattgcctac	caggaacctg	2220
cagatgacag	cagcttctcg	ctgtcccagg	aggttctccg	gcacctgcgg	caggaggaaa	2280
aggaagaggt	tactgtgggc	agcttgaaga	cctcagcggg	gccagtagcc	tccacgatgt	2340
cccaagagcc	tgagctcctc	atcagtggaa	tggaaaagcc	cctccctctc	cgcacggatt	2400
tctctggcgg	tggcctgaac	gacatcttcg	aagcccagaa	aatcgaatgg	catgaaggca	2460
gcctggaagt	gctgttccag	ggcccacacc	accatcatca	ccatcaccat	taatgagcgg	2520

ccgcactoga	gcaccaccac	caccaccact	aacctaggta	gctgagcgca	tgcaagctga	2580	
tccgggttat	tagtacattt	attaagcgct	agattctgtg	cgttgttgat	ttacagacaa	2640	
ttgttgtagc	tattttaata	attcattaaa	tttataatct	ttagggtggt	atgttagagc	2700	
gaaaatcaaa	tgattttcag	cgtctttata	tctgaattta	aatattaaat	cctcaataga	2760	
tttgtaaaat	aggtttcgat	tagtttcaaa	caagggttgt	ttttccgaac	cgatggctgg	2820	
actatcta	at	ggattttcgc	tcaacgccac	aaaacttgcc	aaatcttgta	gcagcaatct	2880
agctttgtcg	atattcgttt	gtgttttgtt	ttgtaataaa	ggttcgacgt	cgttcaaaat	2940	
attatgcgct	tttgtagttc	tttcatcact	gtcgtagtg	tacaattgac	tcgacgtaaa	3000	
cacgttaaat	agagcttgga	catatttaac	atcgggcggtg	ttagctttat	taggccgatt	3060	
atcgctcgctg	tcccaaccct	cgctcgtaga	agttgcttcc	gaagacgatt	ttgccatagc	3120	
cacacgacgc	ctattaattg	tgtcggctaa	cacgtccgcg	atcaaatttg	tagttgagct	3180	
ttttggaatt	atctctgatt	gcgggcgttt	ttgggcgggt	ttcaatctaa	ctgtgccga	3240	
ttttaattca	gacaacacgt	tagaaagcga	tggtgcaggc	ggtaggtaaca	tttcagacgg	3300	
caaactact	aatggcgggc	gtggtaggagc	tgatgataaa	tctaccatcg	gtggaggcgc	3360	
aggcggggct	ggcggcgagg	gcggaggcgg	aggtgggtggc	ggtagtgagc	acggcggttt	3420	
aggctcaaat	gtctctttag	gcaacacagt	cggcacctca	actattgtac	tggtttcggg	3480	
cgccgttttt	ggtttgaccg	gtctgagacg	agtgcgattt	ttttcgtttc	taatagcttc	3540	
caacaattgt	tgtctgtcgt	ctaaagggtgc	agcgggttga	ggttccgctg	gcattggtgg	3600	
agcgggcggc	aattcagaca	tcgatggtgg	tggtgggtgg	ggaggcgctg	gaatgttagg	3660	
cacgggagaa	ggtaggtggc	gcggtgccgc	cggtataatt	tgttctggtt	tagtttgttc	3720	
gcgcacgatt	gtgggcaccg	gcgcaggcgc	cgctggctgc	acaacggaag	gtcgtctgct	3780	
tcgaggcagc	gcttgggggtg	gtggcaattc	aatattataa	ttggaataca	aatcgtaaaa	3840	
atctgctata	agcattgtaa	tttcgctatc	gtttaccgtg	ccgatattta	acaaccgctc	3900	
aatgtaagca	attgtattgt	aaagagattg	tctcaagctc	ggatcgatcc	cgcacgccga	3960	
taacaagcct	tttcattttt	actacagcat	tgtagtggcg	agacacttcg	ctgtcgtcga	4020	
ggtttaaacg	cttcctcgct	cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	4080	
gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	4140	
aagaacatgt	gagcaaaagg	ccagcaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	4200	
gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	4260	
aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	4320	
gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	4380	
ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcggt	4440	

ES 2 893 532 T3

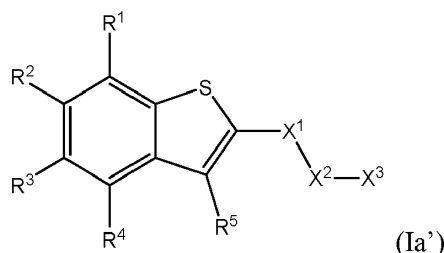
cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc	4500
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggtta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	4560
actggtaaca ggattagcag agcgaggatg gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg	4620
tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtta tctgcgctct gctgaagcca	4680
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc	4740
ggtgggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	4800
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt	4860
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt	4920
tttaaatacaa tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg acagttacca atgcttaatc	4980
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc	5040
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata	5100
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg	5160
gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc	5220
cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct	5280
acaggcatcg tgggtgtcacg ctcgctggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa	5340
cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggtagc ctccttcggt	5400
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggg tatggcagca	5460
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac	5520
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca	5580
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt	5640
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc	5700
actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca	5760
aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata	5820
ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc	5880
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc	5940
cgaaaagtgc cacctgacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt	6000
acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc	6060
ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggtccct	6120
ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttaggggtgat	6180
ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acgggttttc gccctttgac gttggagtcc	6240
acgttccttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc	6300

ES 2 893 532 T3

tattcttttg atttataagg gatcttgccg atttcggcct attgggttaa aaatgagctg	6360
atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttcccattcg	6420
ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggtg gggcctcttc gctattacgc	6480
ca	6482

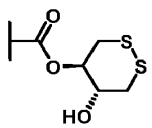
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (Ia'):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que;

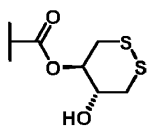
- R¹ se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C₁-C₃ y haloalquilo C₁-C₃;
 R² se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, Oalquilo C₁-C₃, Ohaloalquilo C₁-C₃, OH, alquenilo C₂-C₃, alquinilo C₂-C₃, N(alquilo C₁-C₃)₂, NH(alquilo C₁-C₃), Salquilo C₁-C₃;
 R³ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, Oalquilo C₁-C₃, Ohaloalquilo C₁-C₃, OH, alquenilo C₂-C₃, alquinilo C₂-C₃, N(alquilo C₁-C₃)₂, NH(alquilo C₁-C₃), Salquilo C₁-C₃;
 R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H, F, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₃;
 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, OR⁶, alquilo C₁-C₃ y haloalquilo C₁-C₃;
 cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄;
 X¹ es C(O);
 X² es CHR⁸CHR⁸;
 X³ se selecciona del grupo que consiste en COOR⁶,



- SO₂R⁶ y C(O)N(R⁹)₂, donde cada R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, COOR⁶ y SO₂R⁶;
 cada R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ sustituido por OH, alquilo C₁-C₄ sustituido por Oalquilo C₁-C₃ y cicloalquilo C₃-C₆, y donde opcionalmente 2 R⁸ se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 a 6 miembros;
 en donde, cuando X¹-X²-X³ es X¹-CHR⁸CH₂-X³, al menos uno de R² y R³ no se selecciona del grupo que consiste en halógeno, Oalquilo C₁-C₃, Ohaloalquilo C₁-C₃, OH, alquilo C₁-C₃ y haloalquilo C₁-C₃.

2. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde;

- R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y F;
 R² se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C=CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃;
 R³ se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C=CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃;
 R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y F;
 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H y Cl;
 cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄;
 X¹ es C(O);
 X² es CHR⁸CHR⁸;
 X³ se selecciona del grupo que consiste en COOH, COOC(CH₃)₃ y



- y;
 cada R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₄.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde;

R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y F;

R² se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C=CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃;

R³ se selecciona del grupo que consiste en Br, Cl, F, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂F, CH=CH₂, C=CH, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, OCHF₂, SCH₃ y NHCH₃;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y F;

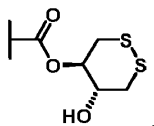
R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H y Cl;

cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ y haloalquilo C₁-C₄;

X¹ es C(O);

X² es CHR⁸CHR⁸;

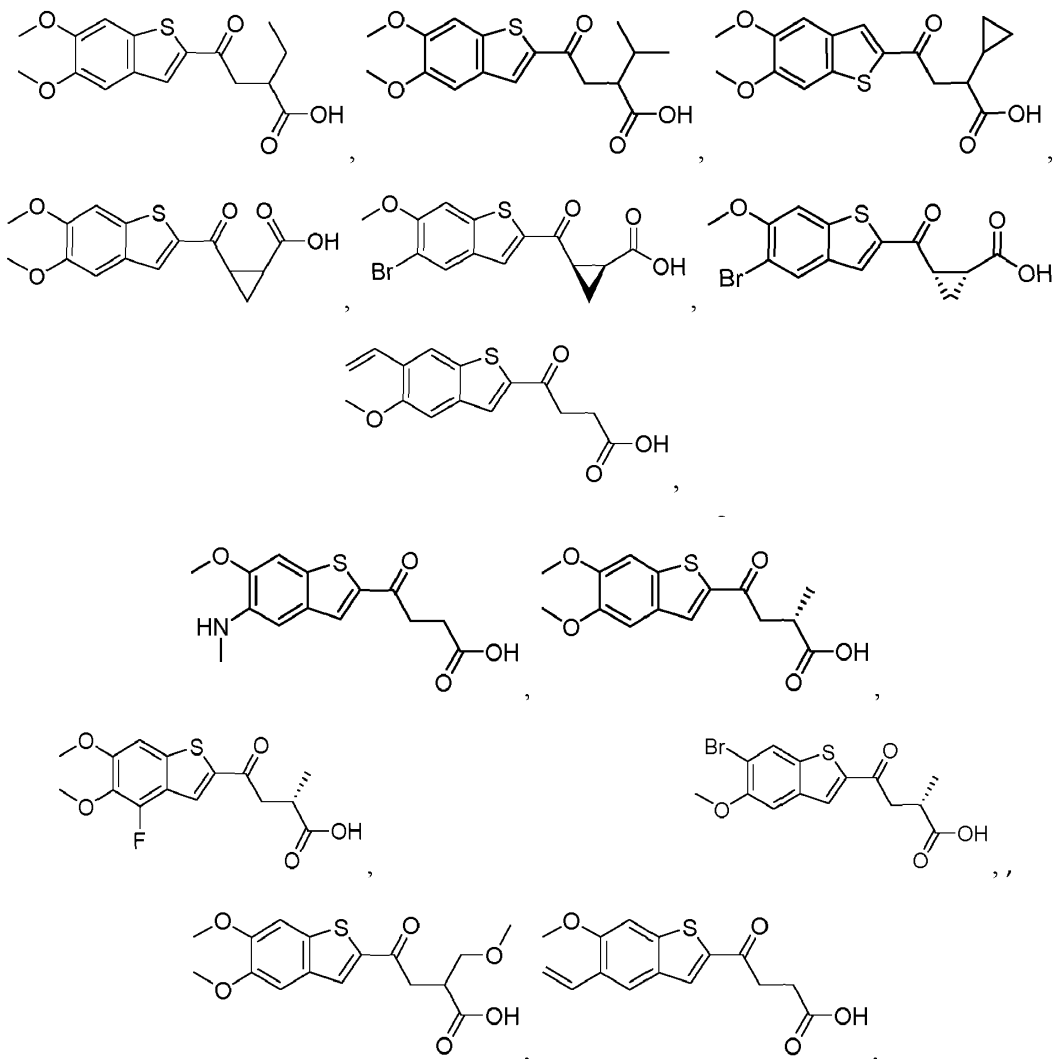
X³ se selecciona del grupo que consiste en COOH, COOC(CH₃)₃ y

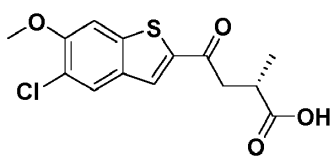
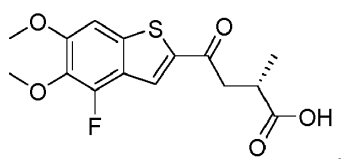
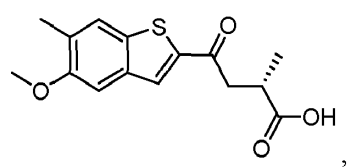
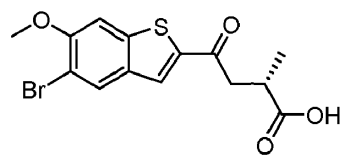
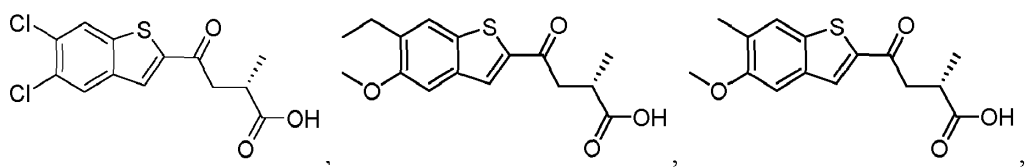


y;

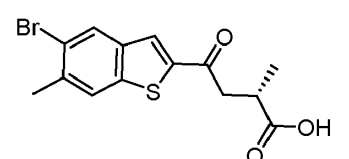
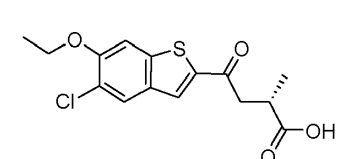
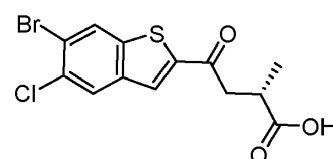
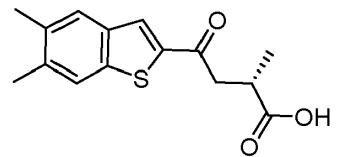
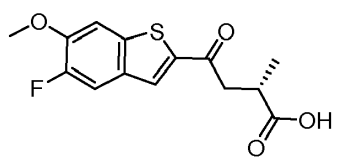
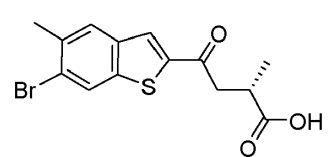
los 2 R⁸ se toman juntos, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo condensado de 3 a 6 miembros.

4. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:

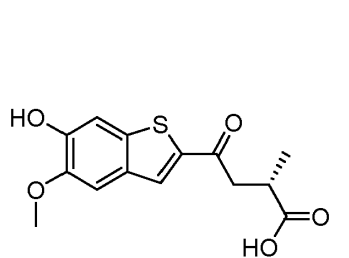
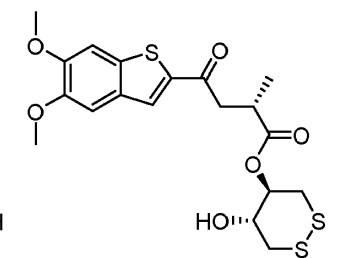
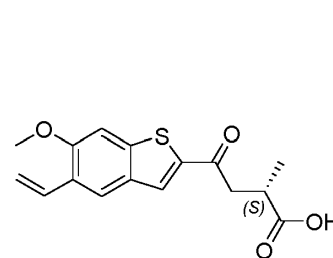
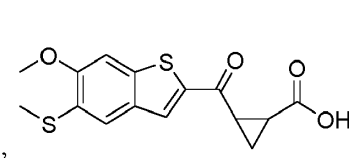
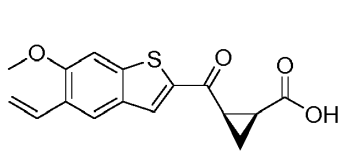
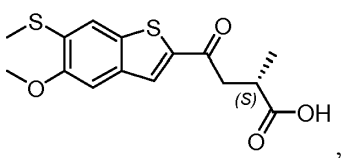
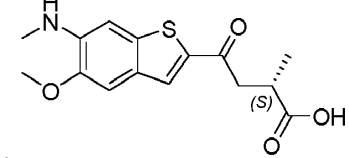
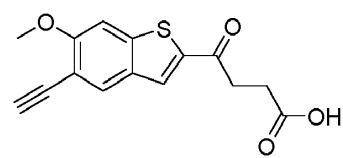
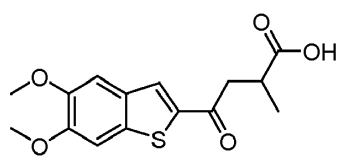




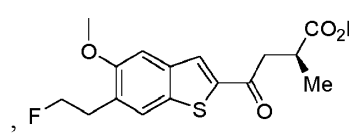
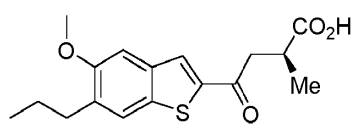
5

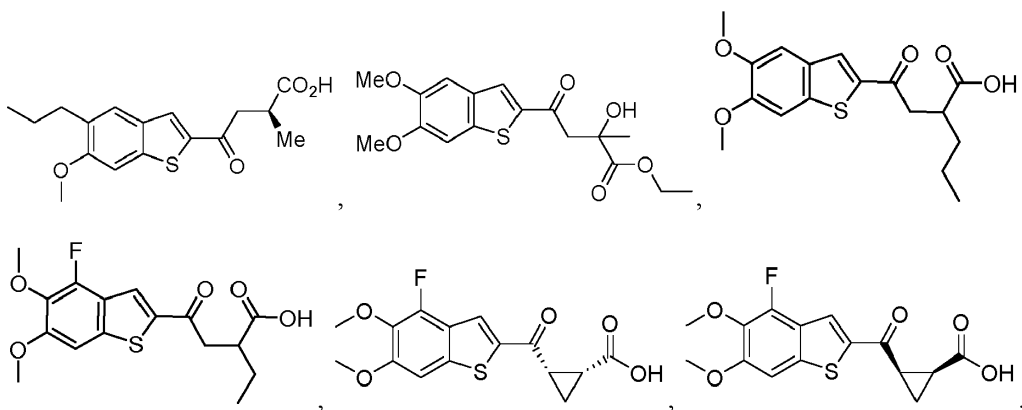


10



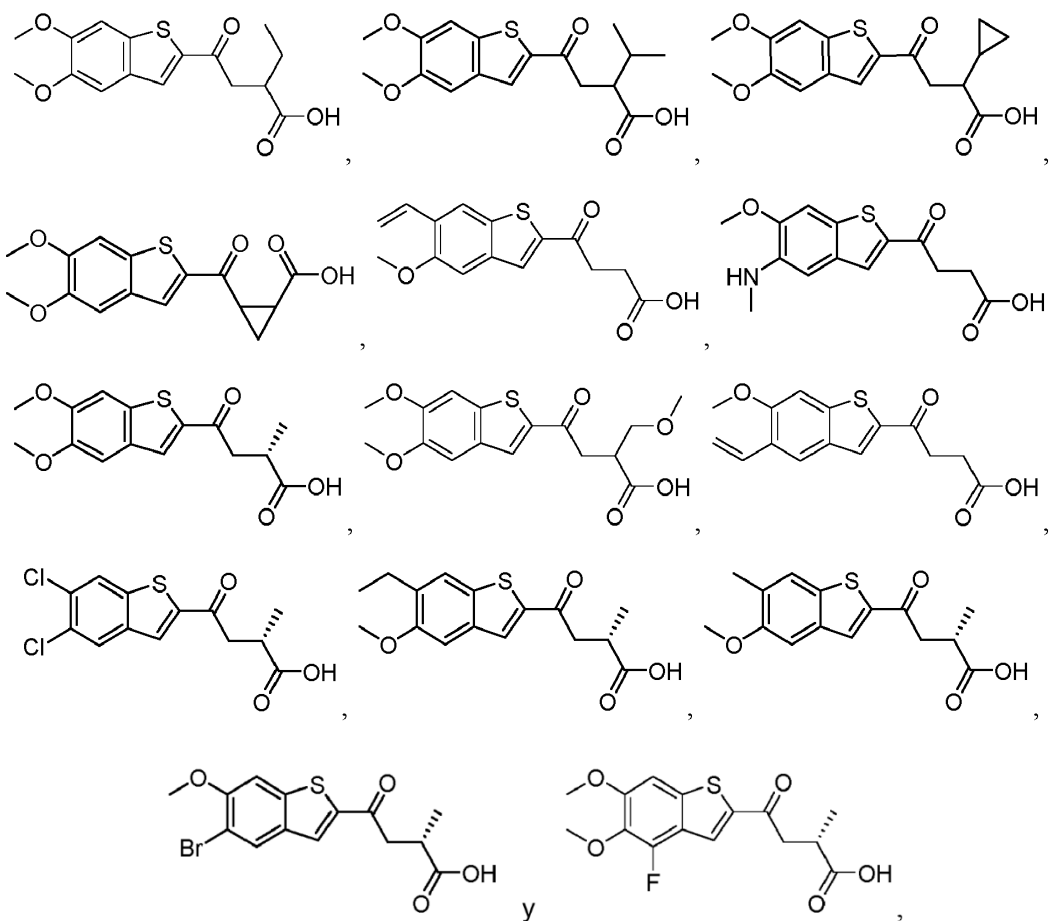
15





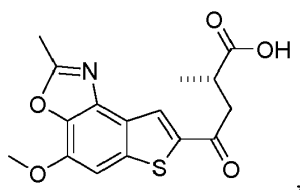
5 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



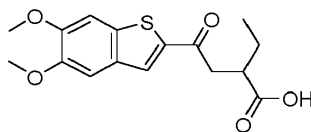
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto, que es;



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

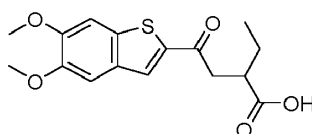
7. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en



5

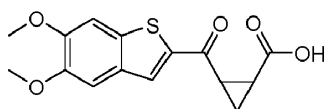
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

8. Un compuesto de la reivindicación 7, que es:



10

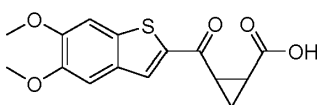
9. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en



15

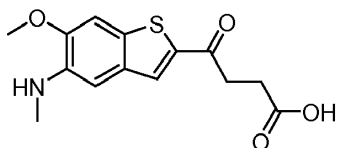
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

10. Un compuesto de la reivindicación 9 seleccionado del grupo que consiste en



20

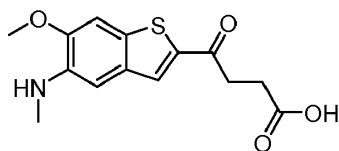
11. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en



25

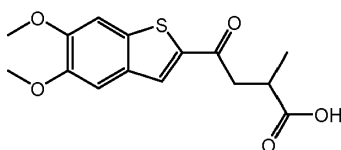
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

12. Un compuesto de la reivindicación 11, que es:



30

13. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en

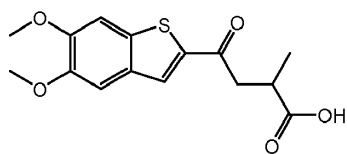


35

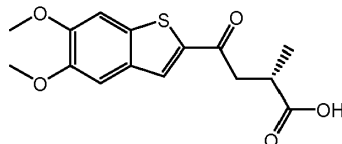
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

14. Un compuesto de la reivindicación 13, que es:

40



15. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en

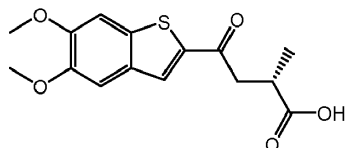


5

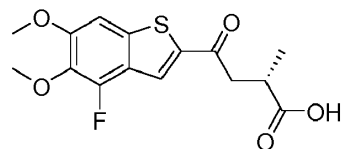
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

16. Un compuesto de la reivindicación 15, que es:

10



17. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en

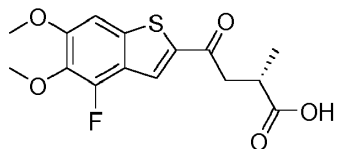


15

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

18. Un compuesto de la reivindicación 17, que es:

20



19. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

25

20. Una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición farmacéutica un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

21. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular.

22. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el trastorno de proliferación celular es cáncer.

35

23. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular.

24. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el trastorno de proliferación celular es cáncer.

40

25. Una combinación que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más principios activos adicionales.

26. Una combinación de la reivindicación 25, en la que dicho uno o más principios activos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en compuestos agonistas de STING, compuestos antivirales, antígenos, adyuvantes, agentes antineoplásicos, antagonistas de la vía CTLA-4, LAG-3 y PD-1, lípidos, liposomas, péptidos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, líneas celulares inmunomoduladoras, inhibidores del punto de control, inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidores de topoisomerasa II, inhibidores de smoothen, agentes alquilantes, antibióticos antitumorales, antimetabolitos, retinoides y agentes inmunomoduladores que incluyen, pero sin limitación, vacunas contra el cáncer.
27. Una combinación de la reivindicación 25, en la que el principio activo adicional es pembrolizumab.
28. Una combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en donde dicho compuesto o sal y dicho uno o más principios activos adicionales se administran por separado.