

Traduzione Brevetto Europeo N. 2 384 318 a nome Ardelyx, Inc., dal titolo: “Composti e metodi per inibire un antiporto mediato da NHE nel trattamento di disordini associati a ritenzione di fluidi o sovraccarico salino e disordini del tratto gastrointestinale”

5 **Descrizione**

ANTEFATTO

Campo

Il presente trovato si riferisce a composti che sono sostanzialmente attivi nel tratto gastrointestinale nell'inibire l'antiporto mediato da NHE di ioni sodio e ioni idrogeno e l'uso di tali composti nel trattamento di disordini associati alla ritenzione di fluidi o sovraccarico salino e nel trattamento di disordini del tratto gastrointestinale, compreso il trattamento o la riduzione del dolore associato a un disordine del tratto gastrointestinale.

Descrizione dell'arte correlata

Disturbi associati alla ritenzione dei fluidi e al sovraccarico salino

15 Secondo l'American Heart Association, più di 5 milioni di americani hanno sofferto di insufficienza cardiaca e circa 550.000 casi di insufficienza cardiaca congestizia (CHF) si verificano ogni anno (Schocken, D.D. et al., *Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group, and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group: Circulation*, v. 117, no. 19, p. 2544-2565 (2008)). La sindrome clinica dell'insufficienza cardiaca congestizia si verifica quando la disfunzione cardiaca impedisce un'adeguata perfusione dei tessuti periferici. La forma più comune di insufficienza cardiaca che porta a CHF è l'insufficienza cardiaca sistolica, causata da un'insufficienza contrattile del miocardio. Una causa principale di CHF è dovuta alla malattia coronarica ischemica, con o senza infarto. L'ipertensione permanente, in particolare quando è controllata male, può portare a CHF.

25 Nei pazienti con CHF, i meccanismi compensatori neuroumorali (cioè il sistema nervoso simpatico e il sistema renina-angiotensina) vengono attivati nel tentativo di mantenere la circolazione normale. Il sistema renina-angiotensina viene attivato in risposta a una diminuzione della gittata cardiaca, causando aumentati livelli di renina, angiotensina II e aldosterone nel plasma. Quando il volume del sangue aumenta nel cuore, aumenta proporzionalmente la gittata cardiaca, fino a un punto in cui il cuore non è in grado di dilatarsi ulteriormente. Nel cuore con insufficienza, la contrattilità è ridotta, quindi il cuore

opera a volumi più elevati e pressioni di riempimento più elevate per mantenere la gittata. Le pressioni di riempimento possono eventualmente aumentare a un livello che causa trasudazione di fluido nei polmoni e sintomi congestivi (ad es. edema, fiato corto). Tutti questi sintomi sono legati al volume di fluido e alla ritenzione salina e questo sovraccarico cronico di fluidi e sali contribuisce ulteriormente alla progressione della malattia.

La conformità al regime farmacologico e alle restrizioni di sodio nella dieta è una componente critica dell'autogestione per i pazienti con insufficienza cardiaca e può allungare la vita, ridurre l'ospedalizzazione e migliorare la qualità di vita. I medici spesso consigliano di mantenere l'assunzione di sale sotto 2,3 g al giorno e non più di 2 g al giorno per persone con insufficienza cardiaca. La maggior parte delle persone mangia notevolmente più di questo, quindi è probabile che una persona con insufficienza cardiaca congestizia avrà bisogno di trovare modi per ridurre il sale nella dieta.

Attualmente esistono numerose terapie farmacologiche per pazienti affetti da CHF. Ad esempio, i diuretici possono essere usati o somministrati per alleviare la congestione diminuendo il volume e, di conseguenza, la pressione di riempimento a quelli inferiori a quelli che causano edema polmonare. Contrastando l'aumento di volume, i diuretici riducono la gittata cardiaca; tuttavia, stanchezza e vertigini possono sostituire i sintomi della CHF. Le tiazidi sono tra le classi o tipi di diuretici attualmente in uso. Le tiazidi inibiscono il trasporto di NaCl nel rene, impedendo così il riassorbimento di Na nel segmento di diluizione corticale alla parte finale del ciclo di Henle e alla porzione prossimale del tubulo convoluto distale. Tuttavia, questi farmaci non sono efficaci quando la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è inferiore a 30 ml/min. Inoltre, le tiazidi, così come altri diuretici, possono causare ipocaliemia. Anche i diuretici dell'ansa (ad es. furosemide) sono tra le classi o tipi di diuretici attualmente in uso. Questi sono i diuretici più potenti e sono particolarmente efficaci nel trattamento dell'edema polmonare. I diuretici dell'ansa inibiscono il sistema di trasporto NaKCl, impedendo così il riassorbimento di Na nell'ansa di Henle.

I pazienti che hanno edema persistente nonostante ricevano alte dosi di diuretici possono essere o diventare resistenti al diuretico. La resistenza al diuretico può essere causata dalla scarsa disponibilità del farmaco. In pazienti con insufficienza renale, che ha un'incidenza elevata nella popolazione CHF, gli acidi endogeni competono con i diuretici dell'ansa, come furosemide, per il percorso di secrezione degli acidi organici nel lume tubolare del nefrone. Sono quindi necessarie dosi più elevate o infusioni continue per ottenere l'ingresso di una quantità adeguata di farmaci nel nefrone. Tuttavia, meta-analisi recente ha aumentato la consapevolezza circa il rischio a lungo termine dell'uso cronico di diuretici nel trattamento di

CHF. Ad esempio, in uno studio recente (Ahmed et al., *Int J Cardiol.* 2008 April 10; 125(2): 246-253) è stato dimostrato che l'uso cronico di diuretico era associato ad una mortalità significativamente aumentata e ad ospedalizzazione in adulti ambulatoriali più anziani con insufficienza cardiaca che ricevevano inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina e diuretici.

5

Gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina ("ACE") sono un esempio di un'altra terapia farmacologica che può essere usata per il trattamento dell'insufficienza cardiaca congestizia. Gli ACE inibitori provocano vasodilatazione bloccando il sistema renina-angiotensina-aldosterone. La gittata cardiaca anormalmente bassa può causare al sistema renale di reagire rilasciando renina, che poi converte l'angiotensinogeno in angiotensina I. L'ACE converte l'angiotensina I in angiotensina II. L'angiotensina II stimola i centri della sete nell'ipotalamo e causa vasocostrizione, aumentando così la pressione sanguigna e il ritorno venoso. L'angiotensina II provoca anche il rilascio di aldosterone, causando riassorbimento di Na e concomitante riassorbimento passivo di fluidi, che a sua volta determina un aumento del volume del sangue. Gli ACE inibitori bloccano questo sistema compensativo e migliorano la prestazione cardiaca diminuendo la resistenza vascolare sistemica e polmonare. Gli ACE inibitori hanno mostrato un beneficio di sopravvivenza e sono stati tradizionalmente un trattamento di scelta per CHF. Tuttavia, poiché gli ACE inibitori riducono l'aldosterone, l'ormone secernente K, uno degli effetti collaterali del loro uso è l'ipercaliemia. Inoltre, gli ACE inibitori sono stati dimostrati condurre a insufficienza renale acuta in alcune categorie di pazienti CHF. (vedere, ad es., C.S. Cruz et al., "Incidence and Predictors of Development of Acute Renal Failure Related to the Treatment of Congestive Heart Failure with ACE Inhibitors, *Nephron Clin. Pract.*, v. 105, no. 2, pp c77-c83 (2007)).

10

15

20

25

30

Pazienti con insufficienza renale terminale ("ESRD"), cioè scompenso renale cronico di stadio 5, devono essere sottoposti a emodialisi tre volte alla settimana. La quasi assenza della funzionalità renale e della capacità di eliminare sale e fluido provoca grandi fluttuazioni nel peso corporeo poiché fluido e sale aumentano nel corpo (sovraccarico di sodio/volume). Il sovraccarico di fluidi è caratterizzato come aumento di peso interdialitico. Il sovraccarico di fluidi elevato è anche aggravato da disfunzione cardiaca, in particolare CHF. La dialisi viene usata per rimuovere le tossine uremiche e regolare anche l'omeostasi dei sali e dei fluidi. Tuttavia, quando i pazienti sono sovradializzati può verificarsi ipotensione intradialitica sintomatica (SIH). La SIH si manifesta in circa dal 15% al 25% della popolazione ESRD (Davenport, A., C. Cox and R. Thuraisingham, *Blood pressure control and symptomatic*

intradialytic hypotension in diabetic haemodialysis patients: a cross-sectional survey; Nephron Clin. Pract., v. 109, no. 2, p. c65-c71 (2008)). Come nei pazienti CHF e ipertesi, sono altamente raccomandate, ma scarsamente seguite a causa della scarsa palatabilità del cibo povero di sale, restrizioni dietetiche di sale e fluidi.

5 La causa dell'ipertensione primaria o "essenziale" è sfuggente. Tuttavia, diverse osservazioni puntano al rene come fattore primario. I dati più forti per l'assunzione in eccesso di sale e la pressione sanguigna elevata provengono da INTERSALT, uno studio trasversale di oltre 10.000 partecipanti. Per gli individui è stata riscontrata una relazione lineare significativa, positiva e indipendente tra l'escrezione di sodio nelle 24 ore e la pressione sanguigna
10 sistolica. Più elevate singole escrezioni di sodio nelle urine nelle 24 ore sono risultate associate ad una pressione sanguigna sistolica/diastolica più elevata in media di 6-3/3-0 mm Hg. L'ipertensione primaria è un tipico esempio di un tratto complesso, multifattoriale e poligenico. Tutte queste sindromi ipertensive monogeniche sono virtualmente limitate a geni mutati che coinvolgono l'incremento di funzione di vari componenti del sistema renina-
15 angiotensina-aldosterone, con conseguente eccessiva ritenzione renale di sodio. In senso ampio, queste sindromi sono caratterizzate da aumentato riassorbimento renale del sodio derivante da difetti primari nei sistemi di trasporto del sodio o dalla stimolazione dell'attività del recettore dei mineralocorticoidi (Altun, B., and M. Arici, 2006, *Salt and blood pressure: time to challenge*; Cardiology, v. 105, no. 1, p. 9-16 (2006)). Un numero molto maggiore di
20 studi controllati è stato eseguito su soggetti ipertesi negli ultimi tre decenni per determinare se la riduzione di sodio ridurrà la pressione arteriosa alta accertata. Le meta-analisi di questi studi hanno chiaramente mostrato una forte riduzione della pressione sanguigna nei pazienti ipertesi.

Nella fase terminale della malattia epatica (ESLD), l'accumulo di fluido come ascite, edema
25 o effusione pleurica dovuta alla cirrosi è comune e risulta da uno sconvolgimento nei meccanismi di regolazione del volume di fluido extracellulare. La ritenzione di fluidi è la complicanza più frequente dell'ESLD e si verifica in circa il 50% dei pazienti entro 10 anni dalla diagnosi di cirrosi. Questa complicanza compromette in modo significativo la qualità di vita dei pazienti cirrotici ed è anche associata a prognosi scadenti. Il tasso di sopravvivenza a
30 un anno e a cinque anni è rispettivamente dell'85% e del 56% (Kashani et al., *Fluid retention in cirrhosis: pathophysiology and management*; QJM, v. 101, no. 2, p. 71-85 (2008)). Le teorie più accettabili ipotizzano che l'evento iniziale nella formazione di ascite nel paziente cirrotico è l'ipertensione sinusoidale. L'ipertensione portale causata da un aumento della pressione sinusoidale attiva i meccanismi vasodilatatori. Negli stadi avanzati di cirrosi, la

vasodilatazione arteriolare provoca un sottoriempimento dello spazio vascolare arterioso sistemico. Questo evento, attraverso una diminuzione del volume sanguigno efficace, porta ad un calo della pressione arteriosa. Di conseguenza, si verificano l'attivazione mediata dal barorecettore del sistema aldosterone renina-angiotensina, il sistema nervoso simpatico e il rilascio nonosmotico di ormone antidiuretico per ripristinare la normale omeostasi del sangue. Questi eventi causano ulteriore ritenzione renale di sodio e fluido. La vasodilatazione splancnica aumenta la produzione linfatica splancnica, superando la capacità del sistema di trasporto linfatico, e porta alla perdita linfatica nella cavità peritoneale. La persistente ritenzione renale di sodio e fluido, accanto all'aumentata permeabilità vascolare splancnica oltre alla perdita linfatica nella cavità peritoneale, svolgono un ruolo importante in una formazione di ascite prolungata.

I tiazolidindioni (TZD), come il rosiglitazone, sono agenti agonisti del recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR) usati per il trattamento del diabete di tipo 2 e sono ampiamente prescritti. Purtroppo, la ritenzione dei fluidi è emersa come il più comune e grave effetto collaterale dei TZD ed è diventata la causa più frequente di interruzione della terapia. L'incidenza della ritenzione di fluidi indotta da TZD varia dal 7% in monoterapia e fino al 15% in combinazione con l'insulina (Yan, T., Soodvilai, S., *PPAR Research* volume 2008, articolo ID 943614). I meccanismi per tali effetti collaterali non sono completamente compresi ma possono essere correlati a Na e riassorbimento di fluido nel rene. Tuttavia la ritenzione di fluidi indotta da TZD è resistente a diuretici dell'ansa o a diuretici tiazidici e la combinazione di agonisti del recettore alfa attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR) con PPAR gamma agonisti, che sono stati proposti per ridurre tale sovraccarico di fluidi, sono associati a eventi cardiovascolari avversi maggiori.

In considerazione di quanto sopra, è riconosciuto che l'accumulo di sale e fluidi contribuisce alla morbilità e alla mortalità di molte malattie, tra cui insufficienza cardiaca (in particolare insufficienza cardiaca congestizia), malattia renale cronica, malattia renale in fase terminale, malattia epatica e simili. Viene anche accettato che l'accumulo di sale e fluidi sono fattori di rischio per l'ipertensione. Di conseguenza, vi è una chiara necessità di un medicamento che, somministrato a un paziente che ne necessita, comporti una riduzione della ritenzione di sodio, della ritenzione di fluidi o preferibilmente di entrambe. Un tale medicamento preferibilmente inoltre non dovrebbe coinvolgere o alterare altrimenti meccanismi renali di omeostasi fluido/Na.

Un'opzione da considerare per il trattamento di un eccessivo sovraccarico di fluidi è di indurre diarrea. La diarrea può essere attivata da diversi agenti, inclusi, ad esempio, lassativi

come sorbitolo, polietilenglicole, bisacodile e fenolftaleina. Il sorbitolo e il polietilenglicole innescano diarrea osmotica con bassi livelli di elettroliti secreti; quindi, la loro utilità nella rimozione del sale sodico dal tratto GI è limitata. Il meccanismo d'azione della fenolftaleina non è chiaramente stabilito, ma si pensa sia causato dall'inibizione della Na/K ATPasi e dello scambiatore anionico Cl/HCO_3 e dalla stimolazione della secrezione di anioni elettrogeni (vedi ad es. Eherer, A.J., C.A. Santa Ana, J. Porter and J.S. Fordtran, 1993, *Gastroenterology*, v. 104, no.4, p. 1007-1012). Tuttavia, alcuni lassativi, come la fenolftaleina, non sono opzioni valide per il trattamento cronico del sovraccarico di fluidi, a causa del potenziale rischio di cancerogenicità negli esseri umani. Inoltre, i lassativi non possono essere usati in modo cronico, poiché sono stati dimostrati essere irritanti e causare danni alla mucosa. Di conseguenza, dovrebbe anche essere riconosciuto che l'induzione della diarrea cronica come parte di uno sforzo di controllare il sovraccarico di sale e fluido sarebbe una modalità di trattamento indesiderata per la maggior parte dei pazienti. Ogni medicamento che utilizza il tratto GI per questo scopo avrebbe quindi bisogno di controllare la diarrea per essere di vantaggio pratico.

Un approccio per il trattamento della diarrea lieve è la somministrazione di un polimero che assorbe fluidi, come la fibra vegetale naturale psillio. Possono anche essere usati materiali polimerici, e più precisamente polimeri idrogel, per la rimozione del fluido dal tratto gastrointestinale (GI). L'uso di tali polimeri è descritto, ad esempio, nel brevetto U.S. N. 4.470.975 e N. 6.908.609. Tuttavia, perché tali polimeri rimuovano efficacemente quantità significative di fluido, devono resistere in modo desiderabile all'intervallo di pressione statica e osmotica esistente nel tratto GI. Molti mammiferi, compresi gli esseri umani, fanno delle feci morbide con un tenore d'acqua di circa il 70%, e lo fanno trasportando fluido contro l'elevata resistenza idraulica imposta dalla massa fecale. Diversi studi mostrano che la pressione richiesta per disidratare le feci da circa l'80% a circa il 60% è tra circa 500 kPa e circa 1000 kPa (cioè da circa 5 a circa 10 atm). (Vedi, ad es., McKie, A. T., W. Powrie e R. J. Naftalin, 1990, *Am J Physiol*, v. 258, no. 3 Pt 1, p. G391-G394; Bleakman, D. e R. J. Naftalin, 1990, *Am J Physiol*, v. 258, no. 3 Pt 1, p. G377-G390; Zammit, P. S., M. Mendizabal e R. J. Naftalin, 1994, *J Physiol*, v. 477 (Pt 3), p. 539-548.) Tuttavia, la pressione statica misurata intraluminalmente è di solito tra circa 6 kPa e circa 15 kPa. La pressione piuttosto elevata necessaria per disidratare le feci è essenzialmente dovuta ad un processo osmotico e non a un processo meccanico prodotto da forze muscolari. La pressione osmotica nasce dal trasporto attivo di sale attraverso la mucosa del colon che in definitiva produce un assorbimento di fluido ipertonico. Il gradiente osmotico prodotto guida il fluido

dal lume al lato sieroso della mucosa. Polimeri che assorbono fluidi, come quelli descritti per esempio nei brevetti U.S. N. 4.470.975 e 6.908.609, possono non essere in grado di sostenere tale pressione. Tali polimeri possono collassare in un colon normale dove il processo di assorbimento del sale è intatto, rimuovendo così una modesta quantità di fluido e quindi di sale.

Sono stati descritti anche polimeri sintetici che legano il sodio. Ad esempio, le resine polimeriche a scambio ionico, come le resine a scambio cationico tipo Dowex, sono state conosciute fin dagli anni '50. Tuttavia, ad eccezione di Kayexalate™ (o Kionex™), che è un sale polistirenico solfonato approvato per il trattamento dell'ipercaliemia, le resine a scambio cationico hanno un utilizzo molto limitato come farmaci, a causa almeno in parte della loro capacità limitata e scarsa selettività di legare cationi. Inoltre, durante il processo di scambio ionico, le resine possono rilasciare una quantità stechiometrica di cationi esogeni (ad es. H, K, Ca), che possono a loro volta potenzialmente causare acidosi (H), ipercaliemia (K) o contribuire alla calcificazione vascolare (Ca). Tali resine possono anche causare costipazione.

Disordini del tratto gastrointestinale

La costipazione è caratterizzata da un passaggio di feci infrequente e difficile e diventa cronica quando un paziente soffre dei sintomi specificati per oltre 12 settimane non consecutive entro un periodo di 12 mesi. La costipazione cronica è idiopatica se non è causata da altre malattie o dall'uso di medicinali. Un approccio basato sull'evidenza alla gestione della costipazione cronica in Nord America (Brandt et al., 2005, Am. J. Gastroenterol. 100(Suppl. 1):S5-S21) ha rivelato che la prevalenza è circa il 15% della popolazione generale. La costipazione è segnalata più comunemente nelle donne, negli anziani, nei non bianchi e in individui provenienti da gruppi socioeconomici più bassi.

La sindrome dell'intestino irritabile (IBS) è un disturbo GI comune associato ad alterazioni della motilità, della secrezione e della sensazione viscerale. Una serie di sintomi clinici caratterizzano questo disturbo, tra cui la frequenza e la forma delle feci, dolori addominali e gonfiori. Il riconoscimento dei sintomi clinici dell'IBS deve ancora essere definito, ma ora è comune riferirsi a IBS diarrea-predominante (D-IBS) e IBS costipazione-predominante (C-IBS), in cui D-IBS è definito come passaggio continuo di feci molli o acquose e C-IBS come un gruppo di disturbi funzionali che si presentano come defecazione difficile, infrequente o apparentemente incompleta. La fisiopatologia dell'IBS non è pienamente compresa e sono stati suggeriti diversi meccanismi. L'ipersensibilità viscerale è spesso considerata giocare un importante ruolo eziologico ed è stata proposta essere un marcatore biologico utile persino

per discriminare tra IBS e altre cause di dolore addominale. In uno studio clinico recente (Posserud, I. et al, *Gastroenterology*, 2007; 133:1113-1123) pazienti IBS sono stati sottoposti a un test di sensibilità viscerale (distensione del palloncino) e confrontati con soggetti sani. È stato rilevato che il 61% dei pazienti IBS aveva una percezione viscerale alterata come misurata tramite dolore e soglia di disagio. Altre recensioni hanno documentato il ruolo dell'ipersensibilità viscerale nel dolore addominale sintomatico di vari disturbi del tratto gastrointestinale (Akbar, A, et al, *Aliment. Pharmaco. Ther.*, 2009, 30, 423-435; Bueno et al., *Neurogastroenterol Motility* (2007) 19 (suppl.1), 89-119). La distensione colonica e rettale è stata ampiamente usata come strumento per valutare la sensibilità viscerale in studi sugli animali e sull'uomo. Il tipo di stress usato per indurre la sensibilità viscerale varia in base ai modelli (vedi ad esempio Eutamien, H *Neurogastroenterol Motil.* 2009 Aug 25. [Epub prima della stampa]), tuttavia lo stress come lo stress da restrizione parziale (PRS) è un modello relativamente lieve e non ulcerogeno considerato più rappresentativo della configurazione IBS.

La costipazione è comunemente riscontrata nella popolazione geriatrica, in particolare nei pazienti con osteoporosi che devono assumere integratori di calcio. Gli integratori di calcio hanno dimostrato di essere vantaggiosi nei pazienti osteoporotici per ripristinare la densità ossea, ma la compliance è scarsa a causa degli effetti di costipazione indotti dal calcio.

La costipazione indotta da oppiacei (OIC) (chiamata anche disfunzione intestinale indotta da oppiacei o disfunzione intestinale oppiacea (OBD)) è un comune effetto avverso associato alla terapia oppiacea. L'OIC è comunemente descritta come costipazione; tuttavia, è una costellazione di effetti gastrointestinali (GI) avversi, che comprende anche crampi addominali, gonfiori e reflusso gastroesofageo. I pazienti con tumore possono presentare una costipazione legata alla malattia, che di solito è peggiorata dalla terapia oppiacea. Tuttavia, l'OIC non è limitata ai pazienti affetti da tumore. Un recente sondaggio su pazienti che assumono terapia oppiacea per dolore di origine non tumorale ha rilevato che circa il 40% dei pazienti ha avuto esperienza di costipazione connessa alla terapia oppiacea (<3 movimenti intestinali completi alla settimana) rispetto al 7,6% in un gruppo di controllo. Di soggetti che hanno richiesto la terapia lassativa, solo il 46% dei pazienti trattati con oppiacei (soggetti di controllo, 84%) ha riferito di raggiungere i risultati desiderati del trattamento >50% delle volte (Pappagallo, 2001, *Am. J. Surg.* 182(5A Suppl.): 11S-18S).

Alcuni pazienti che soffrono di costipazione idiopatica cronica possono essere trattati con successo con la modifica dello stile di vita, cambiamenti dietetici ed aumento dell'assunzione di fluidi e fibre e questi trattamenti sono generalmente provati per primi. Per i pazienti che

non riescono a rispondere a questi approcci, i medici raccomandano tipicamente i lassativi, la maggior parte dei quali sono disponibili senza prescrizione. L'uso di lassativi forniti senza prescrizione è giudicato inefficiente da circa la metà dei pazienti (Johanson and Kralstein, 2007, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 25(5):599-608). Altre opzioni terapeutiche attualmente prescritte o in sviluppo clinico per il trattamento dell'IBS e della costipazione cronica, inclusa OIC, sono descritte in, ad esempio: Chang et al., 2006, *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* 9(4):314-323; Gershon e Tack, 2007, *Gastroenterology* 132(1):397-414; e Hammerle e Surawicz, 2008, *World J. Gastroenterol.* 14(17):2639-2649. Tali trattamenti includono, ma non sono limitati a, ligandi del recettore della serotonina, attivatori del canale del cloro, antagonisti del recettore oppiaceo, agonisti del recettore guanilato-ciclasasi ed agonisti del recettore del nucleotide P2Y(2). Molte di queste opzioni di trattamento sono inadeguate, in quanto possono dare assuefazione, essere inefficaci in alcuni pazienti, possono causare effetti negativi a lungo termine o altrimenti sono meno che ottimali.

Inibitori dello scambiatore Na^+ / H^+ (NHE)

Una funzione importante del tratto GI è la conservazione dell'omeostasi acqua/Na tramite l'assorbimento praticamente di tutta l'acqua e l'Na a cui è esposto il tratto GI. Lo strato epiteliale che copre la superficie apicale del colon dei mammiferi è un tipico epitelio che trasporta elettroliti, in grado di muovere grandi quantità di sale ed acqua in entrambe le direzioni attraverso la mucosa. Ad esempio, ogni giorno il tratto GI processa circa 9 litri di fluido e circa 800 meq di Na. (Vedi, ad es., Zachos et al., *Molecular physiology of intestinal Na^+/H^+ exchange*; *Annu. Rev. Physiol.*, v. 67, p. 411-443 (2005).) Solo circa 1,5 litri di questo fluido e circa 150 meq di questo sodio provengono dall'ingestione; piuttosto, la maggior parte del fluido (ad es. circa 7,5 litri) e del sodio (circa 650 meq) viene secreto attraverso gli organi GI come parte della digestione. Il tratto GI rappresenta pertanto un obiettivo valido per modulare i livelli sistemici di sodio e fluidi.

Sono state pubblicate molte recensioni sulla fisiologia e sui meccanismi di secrezione e/o assorbimento del tratto GI (vedi, ad es., Kunzelmann et al., *Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease*; *Physiol. Rev.*, v. 82, no. 1, p. 245-289 (2002); Geibel, J. P.; *Secretion and absorption by colonic crypts*; *Annu. Rev. Physiol.*, v. 67, p. 471-490 (2005); Zachos et al., *supra*; Kiela, P. R. et al., *Apical Na^+/H^+ exchanger in the mammalian gastrointestinal tract*; *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 57 Suppl. 7, p. 51-79 (2006)). I due principali meccanismi di assorbimento di Na sono il trasporto elettroneutrale ed elettrogeno. Il trasporto elettroneutrale è sostanzialmente dovuto all'antiporto NHE Na^+/H^+ (ad es., NHE-3) ed è responsabile della maggior parte

dell'assorbimento di Na. Il trasporto elettrogeno è fornito dal canale del sodio dell'epitelio ("ENaC"). Il trasporto elettroneutrale si trova principalmente nel segmento dell'ileo e nel colon prossimale e il trasporto elettrogeno si trova nel colon distale.

Gli NHE di membrana del plasma contribuiscono al mantenimento del pH e del volume intracellulare, dell'assorbimento transcellulare di NaCl e NaHCO₃ e del bilanciamento del fluido effettuati dalle cellule epiteliali, in particolare nel rene, nell'intestino, nella colecisti e nelle ghiandole salivari, nonché alla regolazione del pH sistemico. Esiste una porzione di letteratura dedicata al ruolo e all'intervento clinico sugli NHE sistemici per il trattamento di disturbi legati all'ischemia e alla riperfusione per la cardioprotezione o la protezione renale.

Sono state identificate nove isoforme di NHE (Kiela, P. R., et al; *Apical NA⁺/H⁺ exchangers in the mammalian gastrointestinal tract*; J. Physiol. Pharmacol., v. 57 Suppl 7, p. 51-79 (2006)), di cui NHE-2, NHE-3 e NHE-8 sono espressi sul lato apicale del tratto GI, con NHE-3 che fornisce un maggior contributo al trasporto. Un altro, ancora da identificare, NHE Cl-dipendente è stato identificato nella cripta delle cellule del ratto. Inoltre, è stata

dedicata molta ricerca all'identificazione degli inibitori degli NHE. Gli obiettivi principali di tale ricerca sono stati NHE-1 e NHE-3. Inibitori NHE a molecola piccola sono, ad esempio, descritti in: brevetti U.S. N. 5.866.610; 6.399.824; 6.911.453; 6.703.405; 6.005.010; 6.736.705; 6.887.870; 6.737.423; 7.326.705; 5,824,691 (WO 94/026709); 6,399,824 (WO 02/024637); Pub. Brev. U.S. N. 2004/0039001 (WO 02/020496); 2005/0020612 (WO 03/055490); 2004/0113396 (WO 03/051866); 2005/0020612; 2005/0054705; 2008/0194621; 2007/0225323; 2004/0039001; 2004/0224965; 2005/0113396; 2007/0135383; 2007/0135385; 2005/0244367; 2007/0270414; Pubblicazione internazionale n. WO 01/072742; WO 01/021582 (CA2387529); WO 97/024113 (CA02241531) e Brev. Europeo N. EP0744397 (CA2177007). In particolare EP1794128 (WO2006/032372) e EP1453810 (WO 03/048129) descrivono composti fenil-tetraidroisochinolinici come inibitori NHE-3.

Tuttavia, ad oggi, tale ricerca non è riuscita a sviluppare o riconoscere il valore o l'importanza degli inibitori NHE che non sono assorbiti (cioè non sistemici) e mirano al tratto gastrointestinale. Tali inibitori potrebbero essere utilizzati nel trattamento di disordini associati alla ritenzione di fluidi e al sovraccarico salino e al trattamento di disordini del tratto GI, compreso il trattamento o la riduzione del dolore associato a un disordine del tratto gastrointestinale. Tali inibitori sarebbero particolarmente vantaggiosi perché potrebbero essere somministrati con minor timore di effetti sistemici sul bersaglio o fuori bersaglio (ad es., poco o nessun rischio di coinvolgimento renale o altri effetti sistemici).

Di conseguenza, mentre sono stati compiuti progressi nei campi precedenti, rimane un'esigenza nell'arte di nuovi composti per l'uso nei disordini associati alla ritenzione di fluidi e al sovraccarico di sale e al trattamento di disordini del tratto gastrointestinale, compreso il trattamento o la riduzione del dolore associato a un disordine del tratto gastrointestinale. La presente invenzione soddisfa questa necessità e fornisce ulteriori vantaggi correlati.

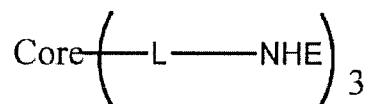
BREVE RIASSUNTO

L'invenzione è definita dalle rivendicazioni annesse.

Aspetti che non ricadono nell'ambito delle rivendicazioni non formano parte dell'invenzione attualmente rivendicata.

In alcune forme di realizzazione, il composto è un oligomero, dendrimero o polimero e Z è una porzione Core avente su di sé due o più siti per l'attacco a piccole molecole multiple NHE-inibenti, o direttamente o indirettamente attraverso un porzione di legame L e il composto ha la struttura di Formula (X):

15

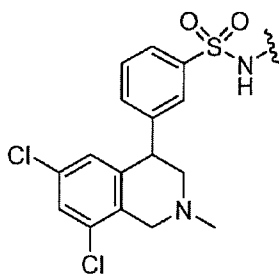


(X)

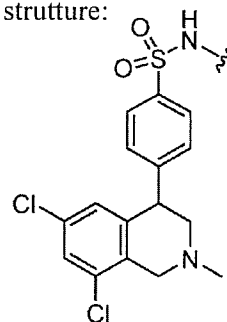
in cui L è un legame o un collegatore che collega il Core alla piccola molecola NHE-inibente ed n è un intero di 2 e ulteriormente in cui ciascuna piccola molecola NHE-inibente può essere uguale o diversa dalle altre.

La piccola molecola NHE-inibente ha una delle seguenti strutture:

25



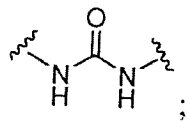
o



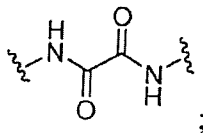
o un loro stereoisomero, precursore o sale farmaceuticamente accettabile.

L è un collegatore polietilene glicole. In alcune forme di realizzazione, L è un collegatore polietilene glicole.

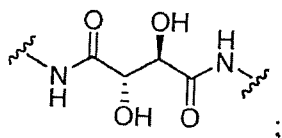
Il Core è scelto dal gruppo che consiste di:



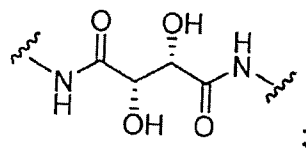
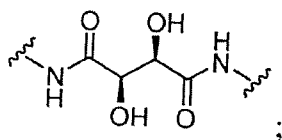
5



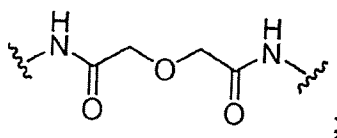
10



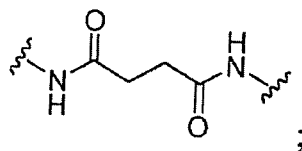
15



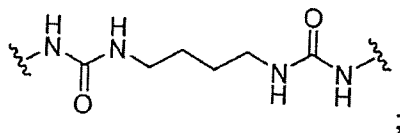
20



25

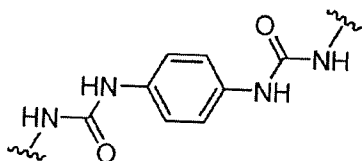


30



30

e



In un'altra forma di realizzazione, viene fornita una composizione farmaceutica comprendente un composto come sopra indicato, oppure un suo stereoisomero, un suo sale farmaceuticamente accettabile o un suo precursore e un veicolante, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

5 In ulteriori forme di realizzazione, la composizione comprende inoltre un polimero che assorbe fluidi. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi viene somministrato direttamente al colon. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che
10 assorbe fluidi ha un'assorbenza di fluido di almeno circa 15 g di fluido isotonico per g di polimero sotto una pressione statica di circa 5 kPa. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi ha un'assorbenza di fluido di almeno circa 15 g di fluido isotonico per g di polimero sotto una pressione statica di circa 10 kPa. In ulteriori forme di
15 realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è caratterizzato da una assorbenza di fluido di almeno circa 10 g/g. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è caratterizzato da un'assorbenza di fluido di almeno circa 15 g/g. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è superassorbente. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è un idrogel polielettrolita parzialmente neutralizzato reticolato. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è un poliacrilato reticolato. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è un polielettrolita. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è Carbophil
20 calcico. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi viene preparato da un processo di emulsione a fase interna elevata. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è una schiuma. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi viene preparato mediante una polimerizzazione radicalica libera acquosa di acrilammide o di un suo derivato, un reticolatore e un sistema di redox iniziatore di
25 radicali liberi in acqua. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è un idrogel. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è una N-alchil acrilammide. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è un gel superporoso. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è ricorrente in natura. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è scelto dal gruppo
30 che consiste di xantano, guar, wellan, emicellulosa, alchilcellulosa idro-alchil-cellulosa, carbossi-alchil-cellulosa, carragenina, destrano, acido ialuronico e agarosio. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è psillio. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è un polisaccaride che comprende xilosio e arabinosio. In ulteriori forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è un

polisaccaride che comprende xilosio e arabinosio, in cui il rapporto tra xilosio e arabinosio è almeno di circa 3:1 in peso.

5 In ulteriori forme di realizzazione, la composizione comprende inoltre un altro agente o composto farmaceuticamente attivo. In ulteriori forme di realizzazione, la composizione
comprende inoltre un altro agente farmaceuticamente attivo o un composto scelto dal gruppo
che consiste di un diuretico, un glicoside cardiaco, un ACE inibitore, un antagonista del
10 recettore angiotensina-2, un bloccante del canale del calcio, un beta bloccante, un alfa bloccante, un alfa agonista centrale, un vasodilatatore, un diluente del sangue, un agente anti-
piastrinico, un agente riducente i lipidi e un agente agonista del recettore gamma attivato dai
proliferatori dei perossisomi (PPAR). In ulteriori forme di realizzazione, il diuretico è scelto
dal gruppo che consiste di un diuretico dell'ansa ad alto tetto, un diuretico benzotiadiazinico,
un diuretico a risparmio di potassio e un diuretico osmotico. In ulteriori forme di
realizzazione, la composizione comprende inoltre un altro agente o composto
15 farmaceuticamente attivo scelto dal gruppo che consiste di un peptide o agente analgesico. In
ulteriori forme di realizzazione, la composizione comprende inoltre un altro agente o
composto farmaceuticamente attivo scelto dal gruppo che consiste di un agente lassativo
scelto tra un agente produttore massa (ad es. buccia di psillio (Metamucil)), metilcellulosa
(Citrucel), policarbofilo, fibre alimentari, mele, tensioattivi/ammorbidenti delle feci (ad es.
docusato, Colace, Diocto), un agente osmotico o idratante (ad es., fosfato di sodio dibasico,
20 citrato di magnesio, idrossido di magnesio (latte di magnesia), solfato di magnesio (che è
sale Epsom), fosfato di sodio monobasico, bifosfato di sodio), un agente iperosmotico (ad es.
supposte di glicerina, sorbitolo, lattulosio e polietilene glicole (PEG)).

In un'altra forma di realizzazione, è fornito un metodo per trattare un disordine scelto dal
gruppo che consiste di malattia renale cronica, malattia renale in fase terminale, il metodo
25 comprendendo la somministrazione ad un mammifero che ne necessita di una quantità
farmaceuticamente efficace di un composto o di una composizione farmaceutica come
precedentemente indicato.

In ulteriori forme di realizzazione, il composto o composizione viene somministrato per via
orale, mediante supposta rettale o clistere.

30 In ulteriori forme di realizzazione, il metodo comprende la somministrazione di una quantità
farmaceuticamente efficace del composto o composizione in combinazione con uno o più
composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali. In ulteriori forme di realizzazione,
detti uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali sono scelti dal gruppo
che consiste di un diuretico, un glicoside cardiaco, un ACE inibitore, un antagonista del

recettore dell'angiotensina-2, un antagonista dell'aldosterone, un bloccante del canale del calcio, un beta-bloccante, un alfa-bloccante, un alfa agonista centrale, un vasodilatatore, un diluente del sangue, un agente anti-piastrinico, un agente riducente i lipidi e un agente agonista del recettore gamma attivato dai proliferatori di perossisomi (PPAR). In ulteriori
5 forme di realizzazione, il diuretico è scelto dal gruppo che consiste di un diuretico dell'ansa ad alto tetto, un diuretico benzotiadiazinico, un diuretico a risparmio di potassio e un diuretico osmotico. In ulteriori forme di realizzazione, la quantità farmaceuticamente efficace del composto o composizione ed uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali vengono somministrati come parte di un singolo preparato farmaceutico. In
10 ulteriori forme di realizzazione, la quantità farmaceuticamente efficace del composto o composizione e uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali vengono somministrati come singoli preparati farmaceutici. In ulteriori forme di realizzazione, il singolo preparato farmaceutico viene somministrato in sequenza. In ulteriori forme di realizzazione, il singolo preparato farmaceutico viene somministrato contemporaneamente.

15 In un'altra forma di realizzazione, viene fornito un metodo per trattare un disordine del tratto gastrointestinale, il metodo comprendendo la somministrazione ad un mammifero che ne necessita di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto o una composizione farmaceutica come sopra indicato. Il disordine del tratto gastrointestinale è la costipazione e la costipazione da trattare è associata alla fibrosi cistica.

20 In un'altra forma di realizzazione, viene fornito un metodo per trattare la sindrome da colon irritabile, il metodo comprendendo la somministrazione ad un mammifero che ne necessita di una quantità farmaceuticamente accettabile di un composto NHE-3 inibitore o di una composizione farmaceutica comprendente un composto NHE-3 inibitore. In ulteriori forme di realizzazione, il composto NHE-3 inibitore è un composto o una composizione farmaceutica come sopra indicato.

25 In ulteriori forme di realizzazione, il composto o composizione viene somministrato per via orale o per supposta rettale.

In ulteriori forme di realizzazione, il metodo comprende la somministrazione di una quantità farmaceuticamente efficace del composto o composizione, in combinazione con uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali. In ulteriori forme di realizzazione, detti uno o più agenti o composti farmaceuticamente attivi addizionali sono un peptide o agente analgesico. In ulteriori forme di realizzazione, detti uno o più agenti o composti farmaceuticamente attivi addizionali sono scelti dal gruppo che consiste di un agente lassativo scelto tra un agente produttore massa (ad es. buccia di psillio (Metamucil)),

30

metilcellulosa (Citrucel), policarbofil, fibra alimentare, mele, tensioattivi/ammorbidenti delle feci (ad es., docusato, Colace, Diocto), un agente idratante o osmotico (ad es., fosfato di sodio dibasico, citrato di magnesio, idrossido di magnesio (latte di magnesia), solfato di magnesio (che è sale di Epsom), sodio monobasico fosfato, sodio bifosfato) e un agente iperosmotico (ad es., supposte di glicerina, sorbitolo, lattulosio e polietilene glicole (PEG)).

In ulteriori forme di realizzazione, la quantità farmaceuticamente efficace del composto o composizione e detti uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali vengono somministrati come parte di un unico preparato farmaceutico. In ulteriori forme di realizzazione, la quantità farmaceuticamente efficace del composto o composizione e detti uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali vengono somministrati come singoli preparati farmaceutici. In ulteriori forme di realizzazione, il singolo preparato farmaceutico viene somministrato in sequenza. In ulteriori forme di realizzazione, il singolo preparato farmaceutico viene somministrato contemporaneamente.

Questi ed altri aspetti dell'invenzione risulteranno evidenti con riferimento alla seguente descrizione dettagliata.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1 è un grafico che illustra la relazione tra tPSA e Permeabilità (Papp, come misurata nel saggio PAMPA) di certi composti degli esempi, come ulteriormente discusso negli Esempi (sotto il sottotitolo "2. Test Farmacologico Esempio 2").

Figure 2A e 2B sono grafici che illustrano il contenuto di acqua del cieco e del colon dopo somministrazione orale di certi composti degli esempi, come ulteriormente discusso negli Esempi (sotto il sottotitolo "3. Test Farmacologico Rif. Esempio 3").

Figure 3A e 3B sono grafici che illustrano la diminuzione dose dipendente dei livelli salini urinari dopo somministrazione orale di certi composti degli esempi, come ulteriormente discusso negli Esempi (sotto il sottotitolo "14. Test Farmacologico Rif. Esempio 14").

Figura 4 è un grafico che illustra l'aumento dose dipendente del contenuto di acqua fecale dopo somministrazione orale di certi composti degli esempi, come ulteriormente discusso negli Esempi (sotto il sottotitolo "15. Test Farmacologico Rif. Esempio 15").

Figure 5A, 5B e 5C sono grafici che illustrano che integrando la dieta con Psillio si ottiene una lieve riduzione della forma fecale ma senza influire sulla capacità di un certo composto degli esempi di aumentare il contenuto d'acqua fecale o diminuire il sodio urinario, come ulteriormente discusso negli Esempi (sotto il sottotitolo "16. Test Farmacologico Rif. Esempio 16").

Figura 6 è un grafico che illustra che l'inibizione di NHE-3 riduce l'ipersensibilità alla distensione, come ulteriormente discusso negli Esempi (sotto il sottotitolo "17. Test Farmacologico Rif. Esempio 17").

5 Figure 7A e 7B sono grafici che illustrano che l'inibizione di NHE-3 aumenta la quantità di sodio escreto nelle feci, come ulteriormente discusso negli Esempi (sotto il sottotitolo "18. Test Farmacologico Rif. Esempio 18").

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

L'invenzione è definita dalle rivendicazioni annesse.

10 Secondo il presente trovato e come dettagliato ulteriormente qui di seguito, è stato trovato che l'inibizione dell'antiporto mediato da NHE di ioni sodio (Na^+) e di ioni idrogeno (H^+) nel tratto gastrointestinale, e più particolarmente negli epiteli gastrointestinali, è un approccio potente al trattamento di vari disordini che possono essere associati o causati da ritenzione di fluidi e/o sovraccarico salino e/o da disordini quali insufficienza cardiaca (in particolare
15 insufficienza cardiaca congestizia), malattia renale cronica, malattia renale di stadio terminale, malattia epatica e/o ritenzione di fluidi indotta da agonisti del recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR). Più in particolare, è stato trovato che l'inibizione dell'antiporto mediato da NHE di ioni sodio e ioni idrogeno nel tratto GI
20 aumenta l'escrezione fecale di sodio, riducendo efficacemente i livelli sistemici di sodio e fluido. Questo, a sua volta, migliora lo stato clinico di un paziente affetto da, ad esempio, CHF, ESRD/CKD e/o malattia epatica. È stato inoltre trovato che un tale trattamento può essere eventualmente potenziato dalla co-somministrazione di altri composti o composizioni benefiche, come ad esempio un polimero che assorbe fluidi. Il polimero che assorbe fluidi può essere scelto in modo ottimale in modo da non bloccare o altrimenti interferire negativamente con il meccanismo di azione dell'NHE inibitore co-dosato.

25 Inoltre, e anche come dettagliato qui di seguito, è stato ulteriormente trovato che l'inibizione dell'antiporto mediato da NHE di ioni sodio (Na^+) e ioni idrogeno (H^+) nel tratto gastrointestinale, e più in particolare negli epiteli gastrointestinali, è un approccio potente al trattamento dell'ipertensione, che può essere associata o causata da ritenzione di fluidi e/o sovraccarico salino. Più in particolare, è stato trovato che l'inibizione dell'antiporto mediato
30 da NHE di ioni sodio e ioni idrogeno nel tratto GI aumenta l'escrezione fecale di sodio, riducendo efficacemente i livelli sistemici di sodio e fluido. Questo, a sua volta, migliora lo stato clinico di un paziente affetto da ipertensione. Tale trattamento può essere eventualmente potenziato dalla co-somministrazione di altri composti o composizioni benefici, come ad esempio un polimero che assorbe fluidi. Il polimero che assorbe fluidi può

essere scelto in modo ottimale in modo da non bloccare o altrimenti interferire negativamente con il meccanismo d'azione del NHE inibitore co-dosato. e/o ipertensione.

5 Inoltre, e anche come dettagliato qui di seguito, è stato ulteriormente trovato che l'inibizione dell'anticorpo mediato da NHE di ioni sodio (Na^+) e ioni idrogeno (H^+) nel tratto
gastrointestinale, e più in particolare gli epitelii gastrointestinali, è un approccio potente al
10 trattamento di vari disordini del tratto gastrointestinale, compreso il trattamento o la riduzione del dolore associato a disordini del tratto gastrointestinale e più in particolare al ripristino della appropriata secrezione di fluidi nell'intestino e al miglioramento di condizioni patologiche incontrate in stati di costipazione. I richiedenti hanno inoltre riconosciuto che
15 bloccando il riassorbimento di ioni sodio, i composti dell'invenzione ripristinano l'omeostasi fluida nel tratto GI, in particolare in situazioni in cui la secrezione/assorbimento di fluidi è alterato in modo tale da risultare in un elevato grado di disidratazione delle feci, bassa motilità intestinale e/o o un lento tempo di transito producente stati di costipazione e disagio GI in genere. È stato inoltre trovato che un tale trattamento può essere eventualmente potenziato dalla co-somministrazione di altri composti o composizioni benefici, come ad esempio un polimero che assorbe fluidi. Il polimero che assorbe fluidi può essere scelto in modo ottimale in modo da non bloccare o altrimenti interferire negativamente con il meccanismo di azione del NHE inibitore co-dosato.

20 A causa della presenza di NHE in altri organi o tessuti del corpo, il metodo della presente invenzione impiega l'uso di composti e composizioni auspicabilmente altamente selettivi o localizzati, agendo così sostanzialmente nel tratto gastrointestinale senza esposizione ad altri tessuti o organi. In questo modo, tutti gli effetti sistemici possono essere ridotti al minimo (siano essi al bersaglio o fuori bersaglio). Di conseguenza, si deve notare che, come qui usato, e come qui ulteriormente dettagliato altrove, "sostanzialmente attivo nel tratto
25 gastrointestinale" si riferisce generalmente a composti sostanzialmente sistematicamente non bio-disponibili e/o sostanzialmente impermeabili allo strato di cellule epiteliali, e più specificamente all'epitelio del tratto GI. È da notare inoltre che, come qui usato, e come qui ulteriormente dettagliato altrove, "sostanzialmente impermeabile" comprende in modo più specifico composti impermeabili allo strato di cellule epiteliali e più specificamente
30 all'epitelio gastrointestinale (o strato epiteliale). "Epitelio gastrointestinale" si riferisce al tessuto membranoso che copre la superficie interna del tratto gastrointestinale. Di conseguenza, essendo sostanzialmente impermeabile, un composto ha una capacità molto limitata di essere trasferito attraverso l'epitelio gastrointestinale e quindi contattare altri organi interni (ad es. il cervello, il cuore, il fegato, ecc.). Il meccanismo tipico attraverso il

quale un composto può essere trasferito attraverso l'epitelio gastrointestinale è o per transito transcellulare (una sostanza viaggia attraverso la cellula, mediata da un trasporto attivo o passivo che passa attraverso le membrane apicali e basolaterali) e/o per un transito paracellulare, dove una sostanza viaggia tra le cellule di un epitelio, di solito attraverso strutture altamente restrittive note come "giunzioni strette".

I composti del presente trovato non possono quindi essere assorbiti e pertanto essenzialmente non sono affatto bio-disponibili (ad es. del tutto impermeabili all'epitelio gastrointestinale) o non mostrano alcuna concentrazione rilevabile del composto nel siero. In alternativa, i composti possono: (i) presentare una certa permeabilità rilevabile allo strato di cellule epiteliali, e più in particolare l'epitelio del tratto GI, inferiore a circa il 20% del composto somministrato (ad es. meno di circa il 15%, circa il 10% o addirittura circa il 5% e, ad esempio, maggiore di circa lo 0,5% o l'1%), ma poi vengono rapidamente eliminati nel fegato (cioè estrazione epatica) attraverso il metabolismo di primo passaggio; e/o (ii) presentano una certa permeabilità rilevabile allo strato di cellule epiteliali, e più in particolare l'epitelio del tratto GI, inferiore a circa il 20% del composto somministrato (ad es. meno di circa il 15%, circa il 10% o addirittura circa il 5% e, ad esempio, maggiore di circa lo 0,5% o l'1%), ma vengono rapidamente eliminati nel rene (cioè escrezione renale).

A questo proposito si deve ancora precisare ulteriormente che, come qui usato, "sostanzialmente non bio-disponibile" si riferisce generalmente all'incapacità di rilevare un composto nella circolazione sistemica di un animale o di un essere umano dopo una dose orale del composto. Per essere biodisponibile, un composto deve essere trasferito attraverso l'epitelio gastrointestinale (cioè sostanzialmente permeabile come sopra definito), essere trasportato attraverso la circolazione portale al fegato, evitare sostanziale metabolismo nel fegato e quindi essere trasferito nella circolazione sistemica.

Come qui ulteriormente dettagliato altrove, piccole molecole che esibiscono un effetto inibitorio sull'antiporto mediato da NHE di ioni sodio e idrogeno qui descritte possono essere modificate o funzionalizzate per renderle "sostanzialmente attive" nel tratto GI (o "sostanzialmente impermeabili" al tratto GI e/o "sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili" dal tratto GI), per esempio, assicurandosi che il composto finale abbia: (i) un peso molecolare maggiore di circa 500 Daltons (Da) (ad es. maggiore di circa 1000 Da, circa 2500 Da, circa 5000 Da o persino circa 10000 Da) nella sua forma non salificata; e/o (ii) almeno circa 10 legami liberamente rotabili in esso (ad es. circa 10, circa 15 o persino circa 20); e/o (iii) un Coefficiente di Partizione di Moriguchi di almeno circa 10^5 (o $\log P$ di almeno circa 5), per esempio aumentando l'idrofobicità del composto (ad es. inserendo o

installando in esso una catena idrocarburica di sufficiente o adatta lunghezza), o in alternativa un Coefficiente di Partizione di Moriguchi inferiore a 10 (o in alternativa un log P inferiore a circa 1 o inferiore a circa 0); e/o (iv) un numero di donatori di legame a idrogeno in esso maggiore di circa 5, circa 10 o circa 15; e/o (v) un numero di accettori di legame a idrogeno in esso maggiore di circa 5, circa 10 o circa 15; e/o (vi) un numero totale di donatori e accettori di legame a idrogeno in esso maggiore di circa 5, circa 10 o circa 15; e/o (vii) un'area superficiale polare topologica (tPSA) in esso maggiore di circa 100 \AA^2 , circa 120 \AA^2 , circa 130 \AA^2 o circa 140 \AA^2 e in qualche caso circa 150 \AA^2 , circa 200 \AA^2 , circa 250 \AA^2 , circa 270 \AA^2 , circa 300 \AA^2 , circa 400 \AA^2 o persino circa 500 \AA^2 , per esempio inserendo o installando in esso un gruppo funzionale sufficientemente idrofilo (ad es. un etere polialchilenico o un poliolo o un gruppo ionizzabile, quale un fosfonato, solfonato, carbossilato, ammina, ammina quaternaria, ecc.), contribuendo anche i gruppi donatore/accettore di legami ad idrogeno al tPSA del composto.

Uno o più dei metodi sopra notati per modificare strutturalmente o funzionalizzare la piccola molecola NHE-inibente possono essere usati per preparare un composto adatto all'uso nei metodi del presente trovato, così da rendere il composto sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile; cioè, una o più delle proprietà fisiche esemplificative notate possono essere "ingegnerizzate" nella piccola molecola NHE-inibente per rendere il composto ottenuto sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile o più in generale sostanzialmente attivo nel tratto GI mentre possiede ancora in esso una regione o porzione che è attiva nell'inibire l'antiporto mediato da NHE di ioni sodio e ioni idrogeno.

Senza essere tenuti ad alcuna teoria particolare, si ritiene che gli NHE-inibitori (ad es. NHE-3, -2 e/o -8) del presente trovato agiscano attraverso un meccanismo distinto e unico, provocando la ritenzione di fluidi e ioni nel tratto GI (e stimolando l'escrezione fecale) piuttosto che stimolando una maggiore secrezione di detti fluidi e ioni. Ad esempio, lubiprostone (Amitiza® Sucampo/Takeda) è un analogo dell'acido grasso prostaglandina E1 biciclico che attiva il Canale del Cloro di Tipo 2 (ClC-2) e aumenta la secrezione di fluido ricco di cloruro dal sierosale al lato mucosale del tratto GI (vedere, ad es., Pharmacological Reviews for Amitiza®, NDA package). Linaclotide (MD-1100 acetato, Microbia/Forest Labs) è un analogo peptidico di 14 amminoacidi di un ormone endogeno, guanilina, e indirettamente attiva il Regolatore della Conduttanza Transmembrana della Fibrosi Cistica (CFTR) inducendo in tal modo la secrezione di fluidi e elettroliti nel GI (vedere, ad es., Li et al., J. Exp. Med., Vol. 202 (2005), pp. 975-986). Gli NHE inibitori sostanzialmente

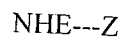
impermeabili descritti nel presente trovato agiscono inibendo il riassorbimento di sale e fluido piuttosto che promuovendo la secrezione. Dal momento che il tratto GI processa circa 9 litri di fluido e circa 800 meq di Na ogni giorno, si prevede che l'inibizione di NHE potrebbe consentire la rimozione di sostanziali quantità di fluido e di sodio sistemico per riassorbire l'edema e risolvere i sintomi della CHF.

I. Composti NHE-Inibenti Sostanzialmente Impermeabili o Sostanzialmente Sistemicamente Non-Biodisponibili

A. Struttura generale

Sono descritte in generale piccole molecole, che possono essere monovalenti o polivalenti, che sono efficaci o attive come NHE inibitori e che sono sostanzialmente attive nel tratto GI, e più particolarmente sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili in esso, inclusi noti NHE inibitori che possono essere modificati o funzionalizzati in accordo con il presente trovato per variare le loro proprietà chimico-fisiche in modo da rendere l'intero composto sostanzialmente attivo nel tratto GI. In particolare, tuttavia, il presente trovato comprende composti monovalenti o polivalenti che sono efficaci o attivi come NHE-3, NHE-2 e/o NHE-8 inibitori.

In accordo, i composti del presente trovato possono generalmente essere rappresentati dalla Formula (I):



(I)

in cui: (i) NHE rappresenta una piccola molecola NHE-inibente e (ii) Z rappresenta una porzione avente su di essa almeno un sito per l'attacco ad una piccola molecola NHE-inibente, la molecola NHE-Z ottenuta possedendo proprietà chimico-fisiche complessive che la rendono sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile. La piccola molecola NHE-inibente generalmente comprende una porzione contenente un eteroatomo ed una porzione impalcatura o supporto ciclica o eterociclica legata direttamente o indirettamente ad essa. In particolare, l'esame delle strutture di piccole molecole descritte ad oggi essere NHE inibitori suggerisce, come ulteriormente illustrato qui sotto, che la maggior parte comprendono un supporto o impalcatura ciclici o eterociclici direttamente o indirettamente legati (per esempio, da una porzione acile o una porzione idrocarbile o eteroidrocarbile, quali una porzione alchile, alchenile, eteroalchile o eteroalchenile) ad una porzione contenente eteroatomo che è in grado di mimare un atomo di sodio o uno ione sodio, che è tipicamente scelta tra una porzione guanidil sostituita e una porzione eterociclica sostituita (ad es. una porzione eterociclica contenente azoto).

Eventualmente, la porzione contenente eteroatomo può essere fusa con la porzione impalcatura o supporto a formare una struttura biciclica fusa e/o può essere in grado di formare una carica positiva ad un pH fisiologico.

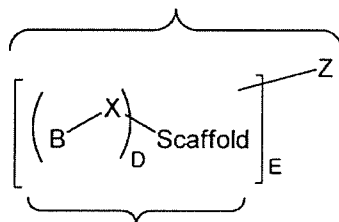
5 A questo proposito, si deve notare che la porzione contenente eteroatomo che è in grado di mimare un atomo o ione sodio può eventualmente formare una carica positiva, che non dovrebbe essere intesa o interpretata richiedere che l'intero composto abbia una carica positiva netta o solo una singola porzione positivamente carica in esso. Piuttosto, il composto può non avere alcuna porzione carica o può avere multiple porzioni cariche (che possono avere cariche positive, cariche negative o una loro combinazione, essendo il composto per esempio uno zwitterione) in esso. In aggiunta, viene inteso che l'intero composto può avere 10 una carica netta neutra, una carica netta positiva (ad es. +1, +2, +3, ecc.) o una carica netta negativa (ad es. -1, -2, -3, ecc.).

La porzione Z può essere legata essenzialmente ad ogni posizione sopra o entro la piccola molecola NHE, ed in particolare può essere: (i) legata alla porzione impalcatura o supporto, 15 (ii) legata ad una posizione sopra o entro la porzione contenente eteroatomo e/o (iii) legata ad una posizione sopra o entro una porzione spaziatrice che collega l'impalcatura alla porzione contenente eteroatomo, a condizione che l'installazione della porzione Z non influenzi in modo significativamente avverso l'attività NHE inibente. Z può essere sotto forma di un oligomero, dendrimero o polimero legato alla piccola molecola NHE (ad es. 20 legato per esempio all'impalcatura o alla porzione spaziatrice) o in alternativa Z può essere sotto forma di uno spaziatore che collega insieme multiple piccole molecole NHE, e pertanto che agisce per aumentare: (i) il peso molecolare totale e/o l'area superficiale polare della molecola NHE-Z; e/o (ii) il numero di legami liberamente rotabili nella molecola NHE-Z; e/o (iii) il numero di donatori e/o accettori di legame ad idrogeno nella molecola NHE-Z; e/o 25 (iv) il valore di Log P della molecola NHE-Z ad un valore di almeno circa 5 (o alternativamente meno di 1 o persino circa 0), tutto come esposto qui; così che l'intero composto NHE inibente (cioè il composto NHE-Z) sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile.

Il presente trovato è più particolarmente diretto ad un tale composto NHE inibente 30 sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o un suo sale farmaceutico, in cui il composto ha la struttura di Formula (II):

Composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile
e/o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile

5



Piccola Molecola

10

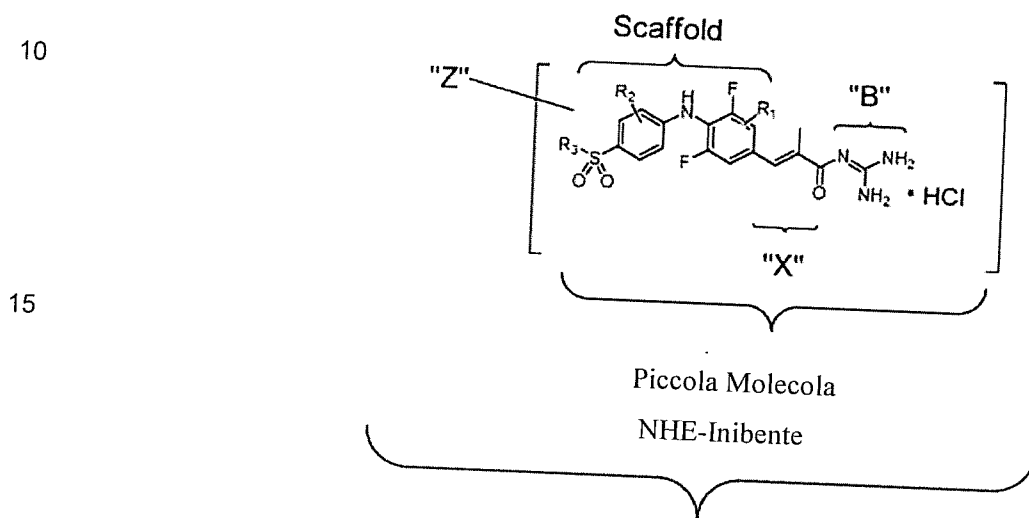
NHE-inibente

(II)

in cui: (i) Z, come precedentemente definito sopra, è una porzione legata a oppure incorporata nella piccola molecola NHE inibente, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta possieda proprietà chimico-fisiche complessive che la rendono sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile; (ii) B è la porzione contenente eteroatomo della piccola molecola NHE inibente e può essere scelto tra una porzione guanidinica sostituita e una porzione eterociclica sostituita, che può essere eventualmente fusa con la porzione Scaffold a formare una struttura biciclica fusa; (iii) Scaffold è la porzione ciclica o eterociclica a cui è legata direttamente o indirettamente la porzione contenente eteroatomo (ad es. la porzione guanidinica sostituita o una porzione eterociclica sostituita), B, e che è eventualmente sostituita con una o più porzioni idrocarbile o eteroidrocarbile addizionalmente; (iv) X è un legame o una porzione spaziatrice scelta da un gruppo che consiste di porzioni idrocarbile o eteroidrocarbile sostituite o non sostituite, e in particolare C₁-C₇ idrocarbile o eteroidrocarbile sostituito o non sostituito (ad es. C₁-C₇ alchile, alchenile, eteroalchile o eteroalchenile) e porzioni cicliche o eterocicliche, sature o insature, sostituite o non sostituite (ad es. porzioni cicliche o eterocicliche C₄-C₇), che collega B e lo Scaffold; e (v) D ed E sono interi, ciascuno avente indipendentemente un valore di 1, 2 o più.

Come ulteriormente illustrato qui sotto, B può essere scelto tra una porzione guanidinica o una porzione che è un bioisostero guanidinico scelto dal gruppo che consiste di ciclobutendione sostituito, imidazolo sostituito, tiazolo sostituito, ossadiazolo sostituito, pirazolo sostituito o un'ammina sostituita. Più particolarmente, B può essere scelto tra guanidinile, acilguanidinile, solfonilguanidinile o un bioisostero di guanidina quale un ciclobutendione, un eterociclo a 5- o 6-membri sostituito o non sostituito quale imidazolo,

amminoimidazolo, alchilimidazolo, tiazolo, ossadiazolo, pirazolo, alchiltioimidazolo
 sostituito o non sostituito, o altra funzionalità che può eventualmente diventare carica
 positivamente o funzionare come un sodio mimetico, incluse ammine (ad es. ammine
 terziarie), alchilammine e simili, ad un pH fisiologico. B può essere una porzione
 5 guanidinica sostituita o una porzione eterociclica sostituita che può eventualmente diventare
 carica positivamente ad un pH fisiologico per funzionare da sodio mimetico. Il composto del
 presente trovato (o più particolarmente il suo sale HCl farmaceuticamente accettabile, come
 illustrato) può avere la struttura di Formula (III):

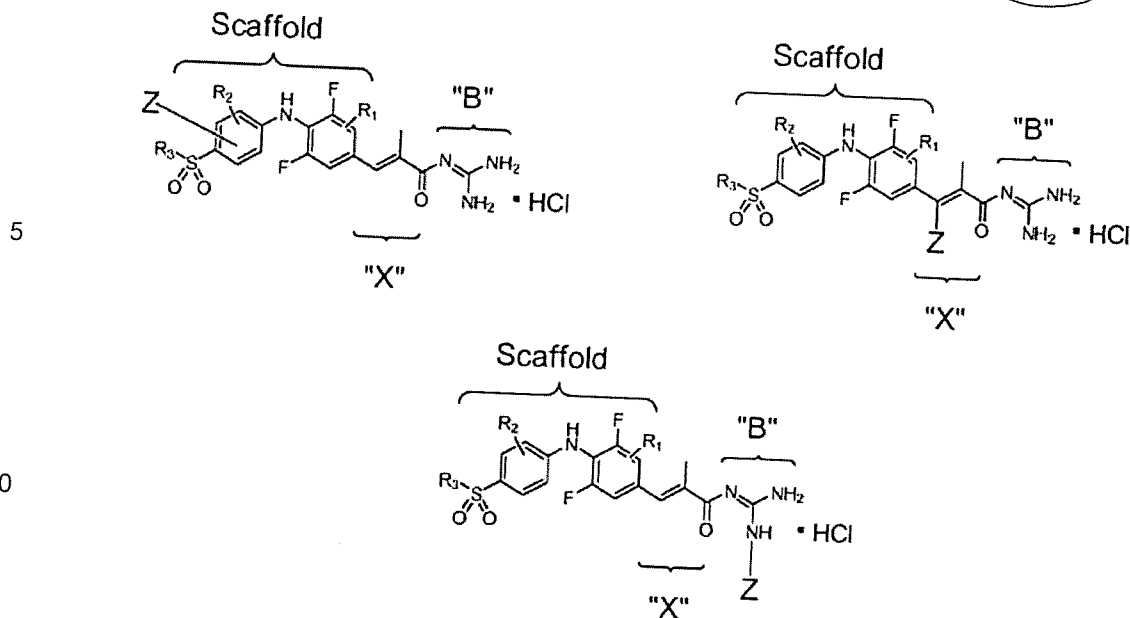


20 Composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile
 e/o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile

(III)

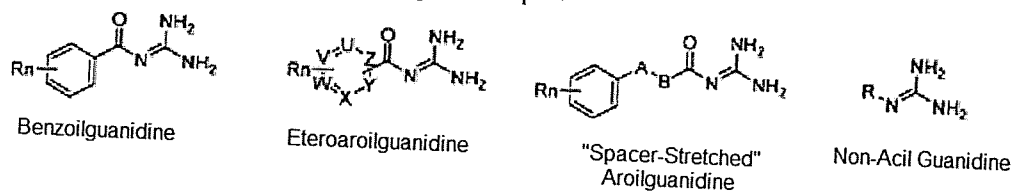
25 in cui Z può essere eventualmente attaccato ad uno qualsiasi di un numero di siti sulla
 piccola molecola NHE-inibente ed ulteriormente in cui i sostituenti R_1 , R_2 ed R_3 sugli anelli
 aromatici sono come dettagliato qui altrove e/o nel Brev. U.S. N. 6,339,824.

A questo proposito si deve notare tuttavia che i composti NHE-inibenti sostanzialmente
 impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili del presente trovato
 possono avere una struttura diversa da quella sopra illustrata, senza allontanarsi dallo scopo
 del presente trovato. Per esempio, uno o entrambi gli atomi di azoto terminali nella porzione
 30 guanidinica possono essere sostituiti con uno o più sostituenti e/o la porzione modificante o
 funzionalizzante Z può essere attaccata al composto NHE-inibente per mezzo di (i) lo
 Scaffold, (ii) lo spaziatore X o (iii) la porzione contenente eteroatomo, B, come
 ulteriormente illustrato in generale nelle strutture previste sotto:

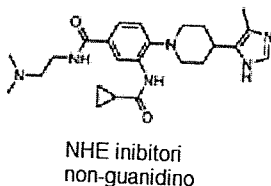


A questo proposito si deve ulteriormente notare che, come qui usato, "bioisostero" si riferisce generalmente ad una porzione con proprietà fisiche e chimiche simili ad una porzione guanidinica, che a sua volta conferisce proprietà biologiche a quella data porzione simile, di nuovo, ad una porzione guanidinica, in questo caso. (Vedasi, per esempio, Ahmad, S. et al., Aminoimidazoles as Bioisosteres of Acylguanidines: Novel, Potent, Selective and Orally Bioavailable Inhibitors of the Sodium Hydrogen Exchanger Isoform-1, *Boorganic & Med. Chem. Lett.*, pag. 177-180 (2004))

20 Come ulteriormente dettagliato sotto, piccole molecole NHE-inibenti note o chemotipi che possono servire come adatti materiali di partenza (per modifica o funzionalizzazione al fine di rendere le piccole molecole sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili e/o usate in preparazioni farmaceutiche in combinazione con, per esempio, un polimero fluido-assorbente) possono generalmente essere organizzate in un numero di sottoinsiemi, quali per esempio:



30



in cui: l'anello terminale (o, nel caso delle non-acil guanidine, "R") rappresentano la porzione scaffold o supporto; la porzione guanidinica (o l'eterociclo sostituito e, più specificamente l'anello piperidinico, nel caso degli inibitori non-guanidinici) rappresenta B; e X è la porzione acile o la porzione -A-B-acile (o un legame nel caso delle guanidine non-acile e degli inibitori non-guanidinici). (Vedasi, ad es., Lang, H. J., "Chemistry of NHE Inhibitors" in The Sodium-Hydrogen Exchanger, Harmazyn, M., Avkiran, M. e Fliegel, L., Eds., Kluwer Academic Publishers 2003. Vedasi anche B. Masereel et al., An Overview of Inhibitors of Na⁺ / H⁺ Exchanger, *European J. of Med. Chem.*, 38, pp. 547-554 (2003)).

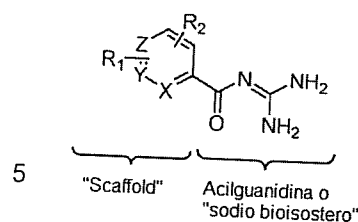
5
10
15

Senza essere legati ad alcuna particolare teoria, è stato proposto che un gruppo guanidinico o un gruppo acilguanidinico o un gruppo guanidinico o acilguanidinico carichi (o, nel caso degli inibitori non-guanidinici, un eterociclo o altro gruppo funzionale che può replicare le interazioni molecolari di una funzionalità guanidinica incluso, ma non limitato a, un atomo di azoto protonato in un anello piperidinico) a pH fisiologico possano mimare uno ione sodio al sito di legame dello scambiatore o antiporto (Vedasi, ad es., Vigne, P.; Frelin, C.; Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 9394).

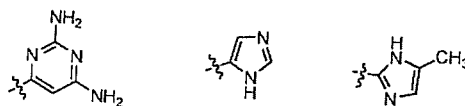
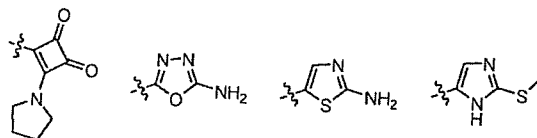
Sebbene la porzione contenente eteroatomo può essere in grado di formare una carica positiva, questo non dovrebbe essere inteso o interpretato richiedere che l'intero composto abbia una carica netta positiva o solo una singola porzione carica positivamente in esso o persino che la porzione contenente eteroatomo in esso sia in grado di formare una carica positiva in tutti i casi. Piuttosto, in varie forme di realizzazione alternative, il composto può non avere alcuna porzione carica in esso o può avere multiple porzioni cariche (che possono avere cariche positive, cariche negative o loro combinazioni) in esso. In aggiunta, si deve comprendere che l'intero composto può avere una carica netta neutra, una carica netta positiva o una carica netta negativa.

20
25
30

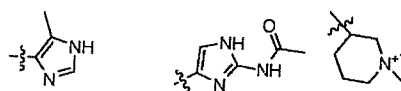
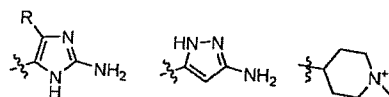
In aggiunta alle strutture illustrate sopra e qui altrove, si deve notare che possono anche essere usate sostituzioni bioisosteriche per guanidina o acilguanidina. "Sostituzioni guanidiniche" bioisosteriche potenzialmente praticabili identificate ad oggi hanno un anello eterociclico a cinque- o sei-membri con modelli donatore/accettore e pKa simili a quello di guanidina e acilguanidina (vedasi per esempio Ahmad, S. et al., Aminoimidazoles as Bioisosteres of Acylguanidines: Novel, Potent, Selective and Orally Bioavailable Inhibitors of the Sodium Hydrogen Exchanger Isoform-1, *Boorganic & Med. Chem. Lett.*, pag. 177-180 (2004)), e includono quelli illustrati sotto:



Esempi di isosteri acil guanidina



10



- 15 I composti bioisostericici di cui sopra (cioè il gruppo di strutture sopra) corrispondono a "B" nella struttura di Formula (II), il legame rotto in essi essendo attaccato a "X" (ad es. la porzione acile o in alternativa un legame che collega il bioisostero allo scaffold), con legami a Z in Formula (III) non mostrati qui.
- 20 Si deve notare che, nelle molte strutture qui illustrate, non saranno mostrati in ogni esempio tutti i vari collegamenti e legami. Per esempio, in una o più delle strutture sopra illustrate, un legame o collegamento tra la piccola molecola NHE-inibente e la porzione modificante o funzionalizzante Z non è sempre mostrato. Tuttavia, questo non dovrebbe essere visto in senso limitante. Piuttosto, si deve intendere che la piccola molecola NHE-inibente è legata o collegata in qualche modo (ad es. tramite un legame o collegatore di qualche tipo) a Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia adatta all'uso (cioè sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile nel tratto GI). In alternativa, Z può essere incorporato nella piccola molecola NHE-inibente, come ad esempio posizionandolo tra la porzione guanidinica e lo scaffold.
- 25
- 30 Si deve ulteriormente notare che sono qui previste un numero di strutture per composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili e/o per piccole molecole NHE-inibenti adatte per modifica o funzionalizzazione in accordo con il presente trovato così da renderle sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili. A causa del grande numero di strutture, vari identificatori (ad es. itentificatori atomici in una catena o anello, identificatori per sostituenti su un anello

o catena, ecc.) possono essere usati più di una volta. Un identificatore in una struttura non dovrebbe pertanto essere assunto avere lo stesso significato in una struttura diversa, a meno che non specificamente dichiarato (ad es. "R₁" in una struttura può essere o meno lo stesso "R₁" in un'altra struttura.

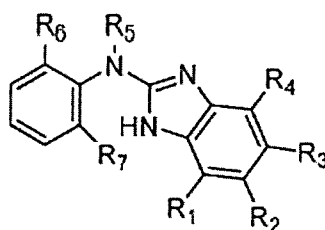
5 **B. Piccole Molecole Illustrative**

I composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili del presente trovato possono in generale essere derivati o preparati essenzialmente da qualsiasi piccola molecola che possiede la capacità di inibire l'attività NHE, incluse piccole molecole che sono già state riportate o identificate come inibenti
10 l'attività NHE ma prive di impermeabilità (cioè non sono sostanzialmente impermeabili). Particolarmente preferibilmente, i composti utilizzati nei vari metodi del presente trovato sono derivati o preparati da piccole molecole che inibiscono le isoforme NHE-3, -2 e/o -8. Ad oggi, una considerevole quantità di lavoro è stato dedicato allo studio di piccole molecole mostranti inibizione NHE-1, mentre meno è stato dedicato per esempio allo studio di piccole
15 molecole mostranti inibizione NHE-3. Sebbene il presente trovato sia diretto generalmente a composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili, i composti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili che mostrano inibizione NHE-3, -2 e/o -8 sono di particolare interesse. Tuttavia, mentre è previsto che appropriati punti di partenza possono
20 essere la modifica di piccole molecole note NHE-3, -2 e/o -8 inibenti, piccole molecole identificate per l'inibizione di altri sottotipi NHE, incluso NHE-1, possono anche essere di interesse, e possono essere ottimizzate per selettività e potenza per antiporto del sottotipo NHE-3, -2 e/o -8.

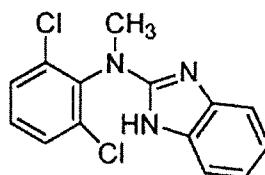
Piccole molecole adatte per l'uso (cioè adatte per modifica o funzionalizzazione in accordo
25 con il presente trovato) nel preparare i composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili del presente trovato includono quelli illustrati sotto. A questo proposito si deve notare che non è specificamente mostrato un legame o collegamento a Z (cioè la modifica o funzionalizzazione che rende le piccole molecole sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-
30 biodisponibili). Come precedentemente notato, la porzione Z può essere attaccata alla, o inclusa nella, piccola molecola essenzialmente ad ogni sito o posizione che non interferisce (ad es. interferisce stericamente) con la capacità del composto ottenuto di inibire efficacemente l'antiporto NHE di interesse. Più particolarmente, Z può essere attaccato essenzialmente a qualsiasi sito della piccola molecola NHE-inibente, spostando per esempio

Z tutto o una parte di un sostituito inizialmente o originariamente presente su di essa e come illustrato sopra, a condizione che il sito di istallazione della porzione Z non abbia un impatto sostanzialmente avverso sulla sua attività NHE-inibente. Tuttavia, un legame o collegamento si estende da Z ad un sito sulla piccola molecola che effettivamente posiziona il punto di attacco tanto lontano (basato, per esempio, sul numero di atomi o legami che intervengono) dall'atomo o dagli atomi presenti nel composto ottenuto che effettivamente agiscono come ione sodio mimetici (per esempio, l'atomo o atomi in grado di formare uno ione positivo in condizioni di pH fisiologico). Preferibilmente, il legame o collegamento si estenderà da Z ad un sito in un anello, e più preferibilmente un anello aromatico, nella piccola molecola, che serve da scaffold.

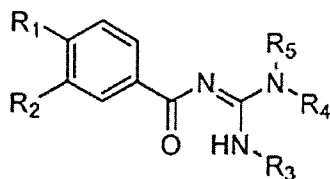
In base a quanto sopra, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto U.S. N. 2005/0054705, può essere adatta per uso o modifica in accordo con il presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).



Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata. In particolare, R₆ ed R₇ sono un alogeno (ad es. Cl), R₅ è alchile inferiore (ad es. CH₃) e R₁-R₄ sono H, il composto avendo per esempio la struttura:



In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

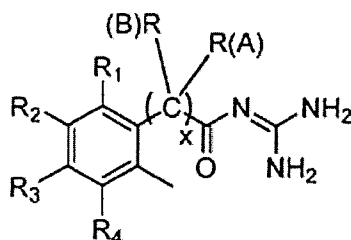


5

Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

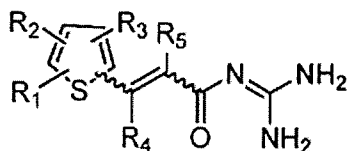
15



Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

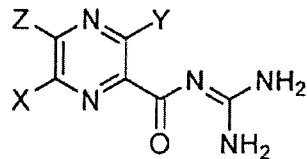
In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

25



Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).



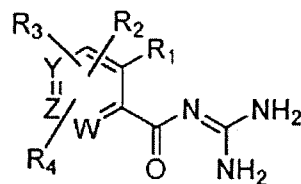
5

Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata. (A questo proposito si deve notare che il sostituito Z nella struttura sopra illustrata non deve essere confuso con la porzione Z che, in accordo al presente trovato, è attaccata alla piccola molecola NHE-inibente per rendere efficace la molecola "NHE-Z" ottenuta sostanzialmente impermeabile).

10

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

15



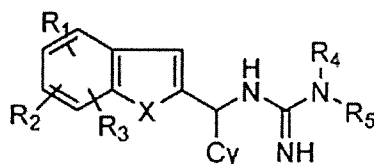
20

Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata. (A questo proposito si deve notare che il sostituito Z nella struttura sopra illustrata non deve essere confuso con la porzione Z che, in accordo al presente trovato, è attaccata alla piccola molecola NHE-inibente per rendere efficace la molecola "NHE-Z" ottenuta sostanzialmente impermeabile).

25

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

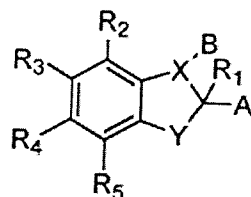
30



Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere
5 adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

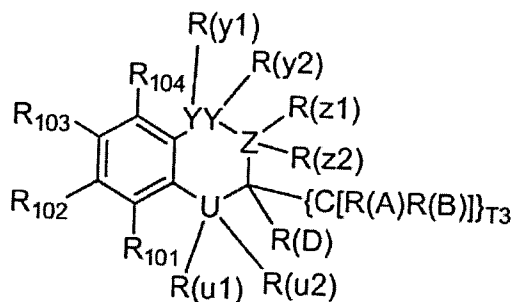
10



Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese
15 N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

20



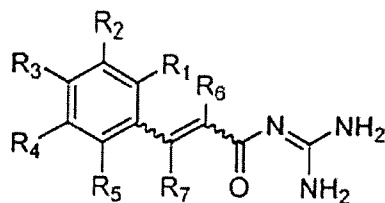
25

Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata. (A questo proposito si deve notare che il sostituente Z nella struttura sopra illustrata non deve essere confuso con la porzione Z che, in accordo al presente trovato, è attaccata alla piccola
30 molecola NHE-inibente per rendere efficace la molecola "NHE-Z" ottenuta sostanzialmente impermeabile).

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per

includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

5

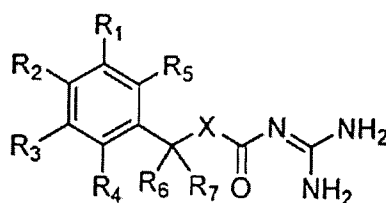


Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata (in cui, in particolare, i legami ondulati indicano lunghezza variabile o un numero variabile di atomi in essi).

10

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

15

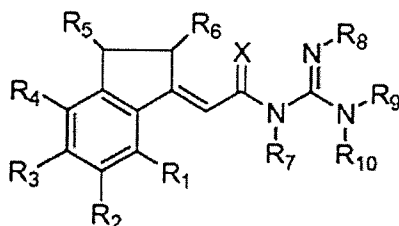


20

Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nel Brevetto U.S. N. 5,900,436 (o EP 0822182 B1) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

25



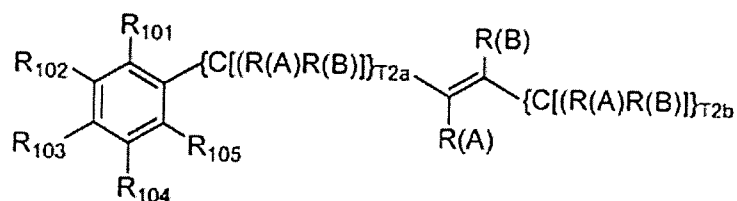
30

Le variabili nelle strutture sono definite nei brevetti citati.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere

adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

5

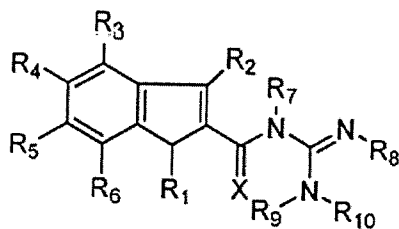


Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

10

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

15

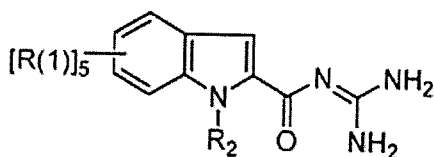


20

Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

25



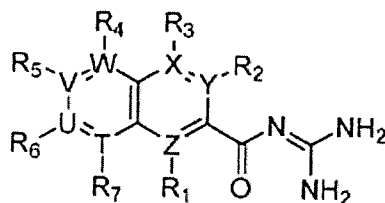
30

Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto Canadese N. 2,241,531 (o Pubblicazione di Brevetto Internazionale N. WO 97/24113) può essere

adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

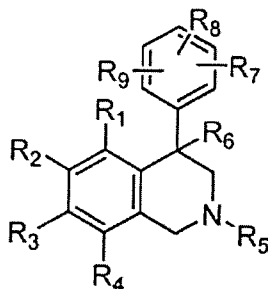
5



10 Le variabili nella struttura sono definite nella domanda di brevetto citata. (A questo proposito si deve notare che il sostituito Z nella struttura sopra illustrata non deve essere confuso con la porzione Z che, in accordo al presente trovato, è attaccata alla piccola molecola NHE-inibente per rendere efficace la molecola "NHE-Z" ottenuta sostanzialmente impermeabile).

15 In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nei Brevetti U.S. N. 6,911,453 e 6,703,405 può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

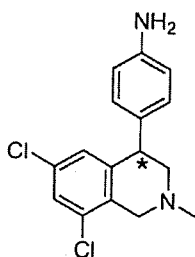
20



25

Le variabili nella struttura sono definite nei brevetti citati. Una piccola molecola particolarmente preferita che ricade nella struttura sopra-notata è ulteriormente illustrata sotto (vedasi, per es., Rif. Esempio 1 del brevetto 6,911,453):

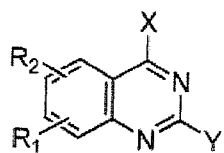
30



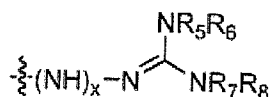
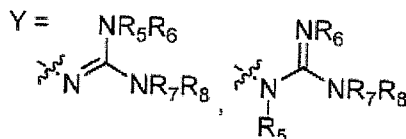
In alternativa, le piccole molecole seguenti, descritte nelle Domanda di Brevetto U.S. N. 2004/0039001, 2004/0224965, 2005/0113396 e 2005/0020612 possono essere adatte per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legate a o modificate per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

5

10



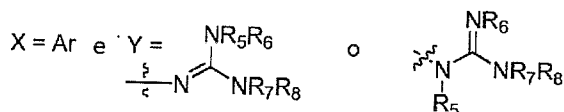
X = Ar (arile), Het (eterociclo)



15

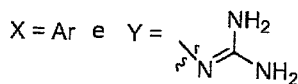
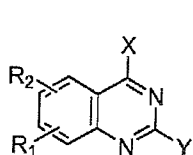
Le variabili nelle strutture sono definite sopra e/o in una o più delle domande di brevetto citate e/o come illustrato sopra (in cui i legami rotti indicano un punto di attacco per la porzione Y all'anello eterociclico fuso). In particolare, la combinazione di X e Y può essere come segue:

20

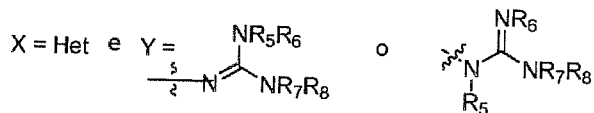


(vedi, ad es. US 2004/0039001, p. 1 ivi)

25

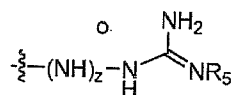
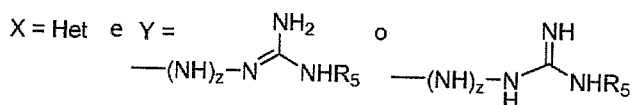


(vedi, ad es. US 2004/0224965, p. 1 ivi)



(vedi, ad es. US 2005/0113396, p. 1 ivi)

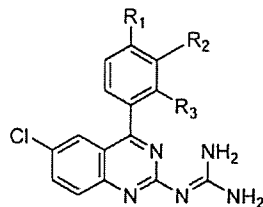
30



(vedi, ad es. US 2005/00020612, p. 1 ivi)

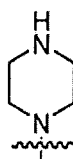
In un esempio particolarmente preferito della struttura sopra evidenziata, la piccola molecola ha la struttura generale:

5



in cui R_1 , R_2 ed R_3 possono essere uguali o diversi ma sono preferibilmente diversi e sono indipendentemente scelti tra H, $NR'R''$ (in cui R' ed R'' sono indipendentemente scelti tra H e idrocarbile, quale alchile inferiore, come qui definito altrove) e la struttura:

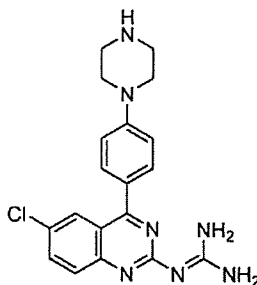
10



15

In un esempio particolarmente più preferito della struttura di cui sopra, una piccola molecola che ricade nella struttura sopra evidenziata è ulteriormente illustrata sotto (vedasi, ad es. composto I1 a pag. 5 della domanda di brevetto 2005/0020612):

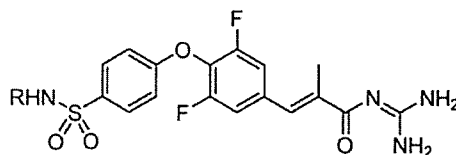
20



25

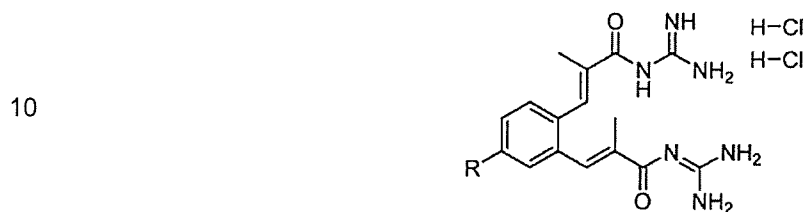
In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nel Brevetto U.S. N. 6,399,824 può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemamente non-biodisponibile).

30



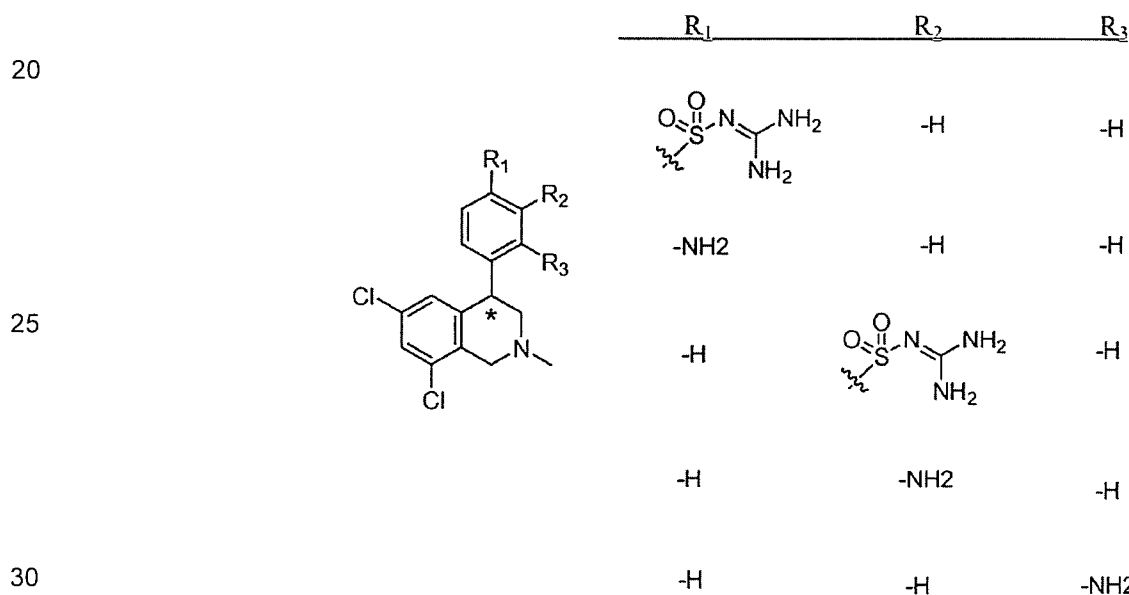
Nella struttura, R può essere preferibilmente scelto tra H e (CH₃)₂NCH₂CH₂-, con H essendo particolarmente preferito.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nel Brevetto U.S. N. 6,005,010 (e in particolare colonne 1-3 ivi) e/o Brevetto U.S. N. 6,166,002 (e in particolare colonne 1-3 ivi) può essere adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).



La variabile ("R") nella struttura è definita nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto U.S. N. 2008/0194621 può essere particolarmente adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

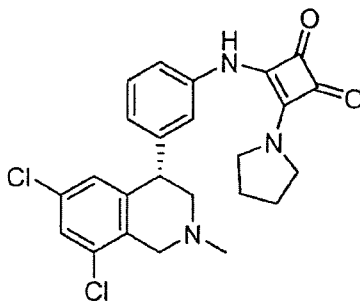


Le variabili ("R₁", "R₂" ed "R₃") nella struttura sono come definite sopra e/o come definite nella domanda di brevetto citata.

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nella Domanda di Brevetto U.S. N. 2007/0225323 può essere particolarmente adatta per uso o modifica in accordo al presente

trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

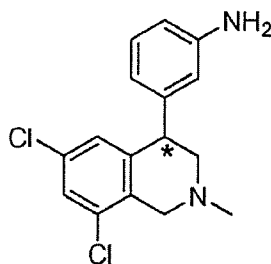
5



10

In alternativa, la piccola molecola seguente, descritta nel Brevetto U.S. N. 6,911,453 può essere particolarmente adatta per uso o modifica in accordo al presente trovato (ad es. legata a o modificata per includere Z, in modo che la molecola NHE-Z ottenuta sia sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile).

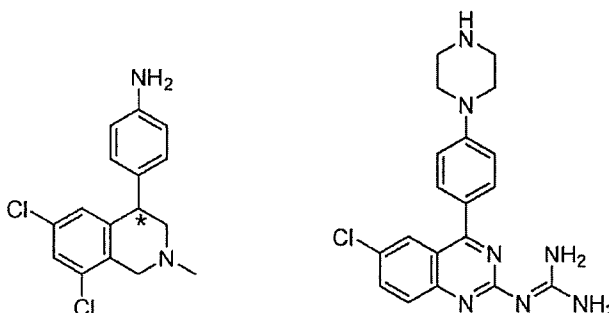
15



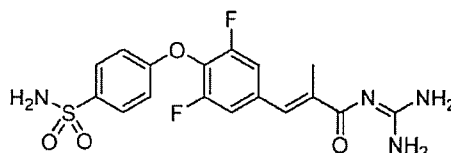
20

In alternativa del presente trovato, la piccola molecola può essere scelta dal gruppo che consiste di:

25



30



In queste strutture, un legame o collegamento (non mostrato) può estendersi, per esempio, tra il Core e l'anello aromatico ammino-sostituito (prima struttura), l'anello eterociclico o l'anello aromatico a cui è legato o in alternativa l'anello aromatico cloro-sostituito (seconda struttura) o l'anello aromatico difluoro-sostituito o l'anello aromatico sulfonammido-sostituito (terza struttura).

5

C. Selettività di Piccole Molecole Esemplificative

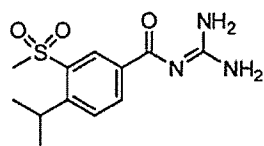
Vengono mostrati sotto esempi di varie piccole molecole NHE inibenti e la loro selettività verso le isoforme NHE-1, -2 e -3. (Vedasi, ad es., B. Masereel et al., An Overview of Inhibitors of Na⁺ / H⁺ Exchanger, *European J. of Med. Chem.*, 38, pag. 547-554 (2003)). La maggior parte di queste piccole molecole sono state ottimizzate come NHE-1 inibitori e questo è riflesso nella loro selettività rispetto ad esso (le IC₅₀ per il sottotipo-1 sono significativamente più potenti (numericamente inferiori) di quelle per il sottotipo-3). Tuttavia, i dati in Tabella 1 indicano che l'attività NHE-3 può essere ingegnerizzata in una serie di inibitori originariamente ottimizzata verso una isoforma diversa. Per esempio, amiloride è un debole NHE-3 inibitore ed era inattivo verso questo antiporto alla massima concentrazione testata (IC₅₀ >100 μM); tuttavia, analoghi di questo composto, quali DMA ed EIPA, hanno NHE-3 IC₅₀ rispettivamente di 14 e 2,4 uM. La cinnamoilguanidina S-2120 è più di 500 volte più attiva verso NHE-1 che NHE-3; tuttavia, questa selettività è invertita nel regioisomero S-3226. E' quindi possibile ingegnerizzare la selettività NHE-3 in una serie chimica ottimizzata per potenza verso un'altra isoforma di antiporto; cioè, le classi di inibitore esemplificate nell'arte possono essere opportunamente modificate per attività e selettività verso NHE-3 (o in alternativa NHE-2 e/o NHE-8) come pure essere modificate per renderle sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemamente non-biodisponibili.

10

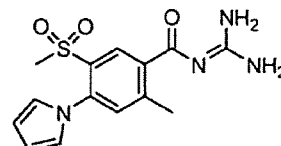
15

20

25

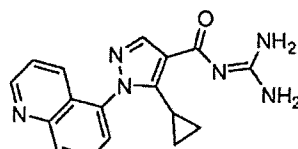


Cariporide

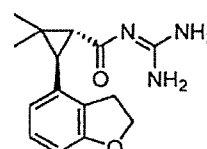


Eniporide

30



Zoniporide



BMS-284640

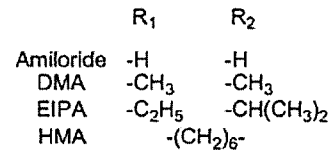
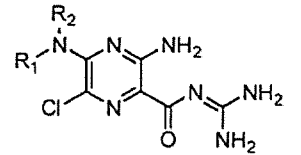
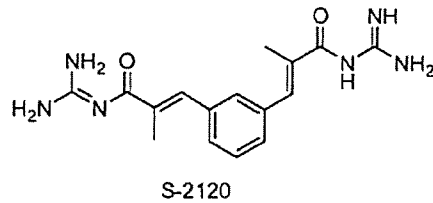
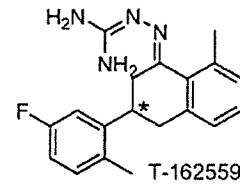
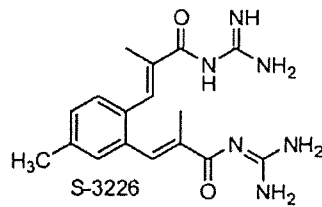


Tabella 1

Farmaco ^a	IC ₅₀ o K _i (μM) ^b			
	NHE-1	NHE-2	NHE-3	NHE-5
Amiloride	1-1,6*	1,0**	>100*	21
EIPA	0,01* - 0,02**	0,08*-0,5**	2,4*	0,42
HMA	0,013*	--	2,4*	0,37
DMA	0,023*	0,25*	14*	--
Cariporide	0,03-3,4	4,3-62	1->100	>30
Eniporide	0,005-0,38	2-17	100-460	>30
Zoniporide	0,059	12	>500*	--
BMS-284640	0,009	1800	>30	3,36
T-162559 (S)	0,001	0,43	11	--
T-162559 (R)	35	0,31	>30	--
S-3226	3,6	80**	0,02	
S-2120	0,002	0,07	1,32	

25 * = da ratto, ** = da coniglio. NA = non attivo

^a Tabella adattata da Masereel, B. et al. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003, 38, 547-54.

^b i valori di K_i sono in corsivo

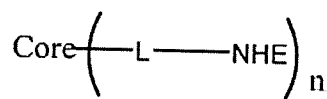
30 Come precedentemente evidenziato sopra, le piccole molecole NHE inibitore qui descritte, incluse quelle sopra evidenziate, possono essere vantaggiosamente modificate per renderle sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili. I composti come qui descritti sono di conseguenza efficacemente localizzati nel tratto o lume gastrointestinale e in una particolare forma di realizzazione nel colon. Poiché possono essere trovate varie isoforme NHE in molti organi interni diversi (ad es. cervello, cuore, fegato,

ecc.), la localizzazione degli inibitori NHE nel lume intestinale è desiderabile per minimizzare o eliminare effetti sistemici (cioè prevenire o limitare significativamente l'esposizione di tali organi a questi composti). In accordo, il presente trovato prevede NHE inibitori, e in particolare NHE-3, -2 e/o -8 inibitori, che sono sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili nel tratto GI e più specificatamente sostanzialmente sistemicamente impermeabili all'epitelio intestinale, come ulteriormente descritto sotto.

II. Strutture Polivalenti: Macromolecole e Oligomeri

A. Struttura Generale

Come sopra notato, i composti del presente trovato comprendono una piccola molecola NHE-inibente che è stata modificata o funzionalizzata strutturalmente per alterare le sue proprietà chimico-fisiche (tramite l'attacco o inclusione della porzione Z), più specificatamente le proprietà chimico-fisiche della molecola NHE-Z, rendendola quindi sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile. In forme di realizzazione dell'invenzione, e come ulteriormente dettagliato qui altrove, il composto NHE-Z è polivalente (cioè un oligomero), in cui Z può essere riferito generalmente in questa forma di realizzazione ad una porzione "Core" e la piccola molecola NHE-inibente può essere legata, direttamente o indirettamente (per mezzo di una porzione di collegamento) ad essa, i composti polivalenti avendo la seguente struttura generale di Formula (X):



(X)

in cui; Core (o Z) ed NHE sono come definiti sopra; L è un legame o collegatore, come ulteriormente definito qui altrove sotto ed n è un intero di 2.

in cui: L è una porzione di collegamento; NHE è una piccola molecola NHE-inibente, ogni NHE come descritto sopra e in maggior dettaglio di seguito; ed n è un intero non-zero (cioè un intero di 1).

La porzione Core ha due siti di attacco a cui sono legate le piccole molecole NHE-inibenti, e preferibilmente covalentemente legate, tramite un legame o collegatore, L. La porzione Core può, in generale, essere qualsiasi cosa che serve a rendere l'intero composto sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile (ad es. un atomo, una piccola molecola, ecc.), ma preferibilmente è una porzione oligomerica, dendrimerica o polimerica, in ogni caso avente più di un sito di attacco per L (e quindi per la piccola

molecola NHE-inibente). La combinazione del Core e della piccola molecola NHE-inibente (cioè la molecola "NHE-Z") può avere proprietà chimico-fisiche che rendono l'intero composto sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile.

5 A questo proposito si deve ulteriormente notare che, come ulteriormente qui illustrato altrove, certi composti NHE-inibenti polivalenti del presente trovato mostrano potenza inaspettatamente più alta, come misurata tramite saggi di inibizione (come qui ulteriormente
10 dettagliato altrove) e caratterizzata dalla concentrazione di detto NHE inibitore risultante nel 50% di inibizione (cioè i valori di IC_{50}). E' stato osservato che certe strutture multivalenti, rappresentate in generale dalla Formula (X) sopra, hanno un valore di IC_{50} parecchie volte inferiore in grandezza rispetto alla struttura dell'NHE individuale o L-NHE (a cui ci si può riferire come alla forma "monomera" o monovalente). Per esempio, composti multivalenti secondo la Formula (X) sono stati osservati avere un valore di IC_{50} di almeno circa 5 volte inferiore (cioè potenza circa 5 volte più elevata) rispetto alla forma monomera (o
15 monovalente) (ad es. Esempi 46 e 49). Altri composti multivalenti secondo la Formula (X) sono stati osservati avere un valore di IC_{50} di almeno circa 10 volte inferiore (cioè potenza circa 10 volte più elevata) rispetto alla forma monomera (ad es. Esempi di Riferimento 87 e 88).

20 Si deve notare che, entro una o più delle varie alternative qui illustrate, piccole molecole NHE-inibenti adatte all'uso (cioè adatte per modifica e funzionalizzazione al fine di renderle sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili) possono, in particolare, essere scelte indipendentemente da una o più delle piccole molecole descritte sopra e come discusse in ulteriore dettaglio qui di seguito come benzoilguanidine, eteroaroilguanidine, "spacer-stretched" aroilguanidine, non-acil guanidine e isosteri di
25 acilguanidine e/o alle piccole molecole dettagliate in, per esempio: US5866610; US6399824; US6911453; US6703405; US6005010; US6887870; US6737423; US7326705; US55824691 (WO94/026709); US6399824 (WO02/024637); US 2004/0339001 (WO02/020496); US 2005/0020612 (WO03/055490); WO01/072742; CA 2387529 (WO01021582); CA 02241531 (WO97/024113); US 2005/0113396 (WO03/051866); US2005/0020612;
30 US2005/0054705; US2008/0194621; US2007/0225323; US2004/0039001; US2004/0224965; US2005/0113396; US2007/0135383; US2007/0135385; US2005/0244367; US2007/0270414; e CA 2177007 (EP0744397). Nuovamente si deve notare che quando si dice che la piccola molecola NHE-inibente è scelta indipendentemente, si intende che, per esempio, la struttura oligomerica rappresentata in Formula (X) sopra può

includere diverse strutture di piccole molecole NHE, all'interno dello stesso oligomero o polimero. In altre parole, ogni "NHE" entro una data forma di realizzazione polivalente può indipendentemente essere uguale o diverso dalle altre porzioni "NHE" entro la stessa forma di realizzazione polivalente.

5 Nel progettare e fare i composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibili che possono essere utilizzati per i trattamenti dettagliati nel presente trovato, può essere vantaggioso in alcuni casi determinare dapprima un verosimile punto di attacco su una piccola molecola NHE inibitrice, dove un nucleo o collegatore potrebbe essere installato o attaccato prima di fare una serie di composti
10 candidati multivalenti o polivalenti. Questo può essere fatto da un esperto del ramo tramite metodi noti per installare sistematicamente gruppi funzionali o gruppi funzionali mostranti un frammento del nucleo o collegatore desiderato, su varie posizioni della piccola molecola NHE inibitore e quindi testando questi adottati per determinare se l'inibitore modificato mantiene ancora desiderate proprietà biologiche (ad es. inibizione NHE). Una comprensione
15 della SAR dell'inibitore permette anche di progettare nuclei e/o collegatori che contribuiscono positivamente all'attività dei composti ottenuti. Per esempio, la SAR di una serie di NHE inibitori può mostrare che l'installazione di una piperazina N-alchilata contribuisce positivamente all'attività biochimica (potenza aumentata) o proprietà farmaceutiche (solubilità aumentata); la porzione piperazinica può quindi essere usata come
20 il punto di attacco del nucleo o collegatore desiderato per N-alchilazione. In questo modo, il composto così ottenuto mantiene le favorevoli proprietà biochimiche e farmaceutiche della piccola molecola progenitrice. In un altro esempio, la SAR di una serie di NHE inibitori potrebbe indicare che un donatore di legame ad idrogeno è importante per attività o selettività. Possono quindi essere progettate porzioni nucleo o collegatrici per attenuare o
25 potenziare il pKa del donatore di legame-H, potenzialmente permettendo miglioramenti in potenza e selettività. In un altro scenario, un anello aromatico in un inibitore potrebbe essere un importante farmacoforo, interagendo con il bersaglio biologico tramite un effetto pi-stacking o interazione pi-catione. Motivi nucleo e collegatore possono essere in modo simile progettati per essere isosterici o altrimenti sinergizzare con gli aspetti aromatici della piccola
30 molecola. In accordo, una volta che viene capita la relazione struttura-attività in una serie molecolare, le molecole di interesse possono essere frammentate nei farmacofori chiave che agiscono come elementi di riconoscimento molecolare essenziali. Quando si considera l'installazione di un motivo nucleo o collegatore, detti motivi possono essere progettati per sfruttare questa SAR e possono essere installati per essere isosterici e isoelettronici con

questi motivi, ottenendo composti che mantengono attività biologica ma hanno permeabilità significativamente ridotta.

Un altro modo in cui la SAR di una serie di inibitori può essere sfruttata nell'installazione di gruppi nucleo o collegatori è capire quali regioni della molecola sono insensibili a cambi strutturali. Per esempio, strutture di co-cristalli a raggi-X di inibitori proteina-legati può
5 rivelare quelle porzioni dell'inibitore che sono esposte al solvente e non coinvolte in interazioni produttive con il bersaglio. Tali regioni possono anche essere identificate empiricamente quando modifiche chimiche in queste regioni determinano una "flat SAR" (cioè modifiche che appaiano avere contribuito minimo all'attività biochimica). Quelli esperti
10 del ramo hanno frequentemente sfruttato tali regioni per ingegnerizzare proprietà farmaceutiche in un composto, per esempio, installando motivi che possono migliorare solubilità o potenziare proprietà ADME. Nello stesso modo, tali regioni sono attese essere posti vantaggiosi per installare gruppi nucleo o collegatori per creare composti come descritti nel presente trovato. Queste regioni sono anche attese essere siti per aggiungere, ad esempio,
15 funzionalità altamente polari quali acidi carbossilici, acidi fosfonici, acidi solfonici e simili per aumentare enormemente il tPSA.

Un altro aspetto che si deve considerare nel progettare nuclei e collegatori che mostrano un inibitore NHE è il limitare o prevenire il collasso idrofobico. Composti con estese funzionalità idrocarburiche possono collassare su se stessi in un modo intramolecolare,
20 causando un'aumentata barriera entalpica per interazione con il bersaglio biologico desiderato. In accordo, quando si progettano nuclei e collegatori, questi sono preferibilmente progettati per essere resistenti al collasso idrofobico. Per esempio, vincoli conformazionali quali anelli monociclici, biciclici o policiclici rigidi possono essere installati in un nucleo o collegatore per aumentare la rigidità della struttura. Legami insaturi, quali alcheni e alchini,
25 possono anche o alternativamente essere installati. Tali modifiche possono assicurare che il composto NHE-inibente sia accessibile per il legame produttivo con il bersaglio. Inoltre, l'idrofilicità dei collegatori può essere migliorata aggiungendo motivi di donatori o accettori di legame ad idrogeno o motivi ionici quali ammine che sono protonate nel GI o acidi che sono deprotonati. Tali modifiche aumenteranno l'idrofobicità del nucleo o collegatore ed
30 aiuteranno a prevenire il collasso idrofobico. Inoltre, tali modifiche contribuiranno anche all'impermeabilità dei composti ottenuti aumentando tPSA.

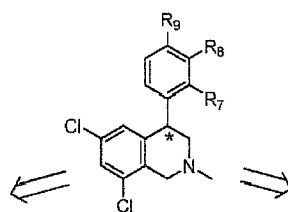
Esempi specifici di piccole molecole NHE-inibenti modificate coerenti con i principi dettagliati sopra sono illustrati sotto. Queste porzioni mostrano gruppi funzionali che facilitano la loro appendice a "Z" (as es. un gruppo nucleo, Core, o gruppo collegatore, L).

Questi gruppi funzionali possono includere elettrofili, che possono reagire con nuclei o collegatori nucleofili, e nucleofili, che possono reagire con nuclei o collegatori elettrofili. Inibitori NHE a piccola molecola possono essere in modo simile derivatizzati con, per esempio, gruppi di acido boronico che possono quindi reagire con appropriati nuclei o collegatori tramite reazioni di accoppiamento incrociato mediate da palladio. L'inibitore NHE può anche contenere olefine che possono quindi reagire con appropriati nuclei o collegatori tramite chimica di metatesi di olefine, o alchini o azidi che possono quindi reagire con appropriati nuclei o collegatori tramite cicloadizione [2 + 3]. Un esperto del ramo può considerare una varietà di gruppi funzionali che permetteranno l'attacco facile e specifico di una piccola molecola NHE inibente al nucleo o collegatore desiderato. Derivati funzionalizzati esemplificativi di NHE includono ma non sono limitati ai seguenti:

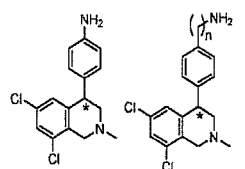
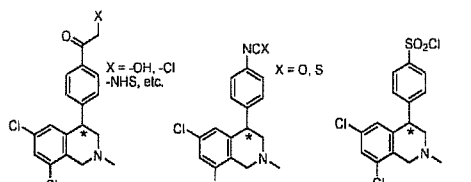
Schema 2

Porzione Tetraidroisochinolinica NHE-inibente Funzionalizzata per Mostrare Gruppi Elettrofili o Nucleofili per Facilitare Reazione con Nuclei e Collegatori

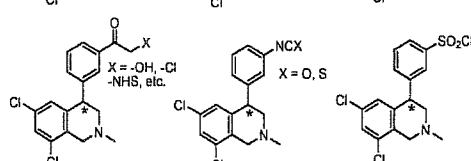
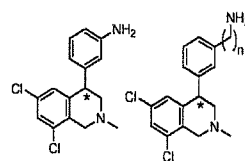
15



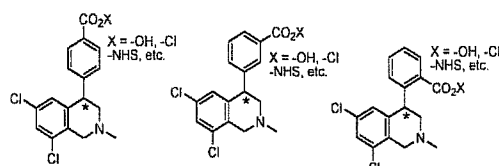
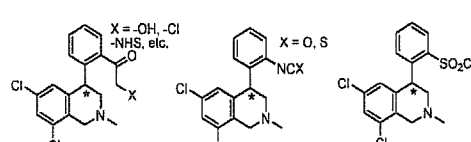
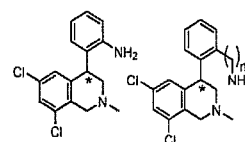
20

Intermedi Nucleofili:**Intermedi Elettrofili:**

25



30



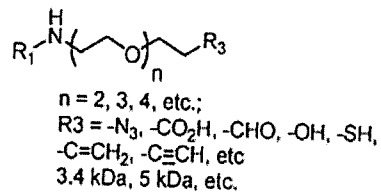
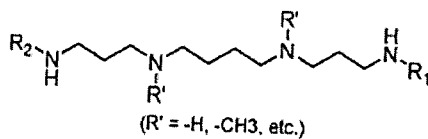
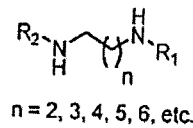
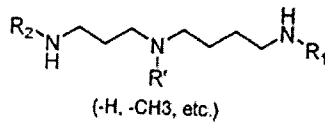
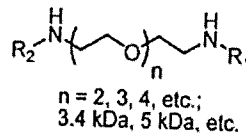
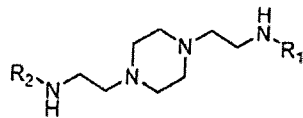
in cui le variabili nelle strutture sopra evidenziate (ad es. R_{7-9} , ecc.) sono definite nel Brevetto U.S. N. 6,911,453.

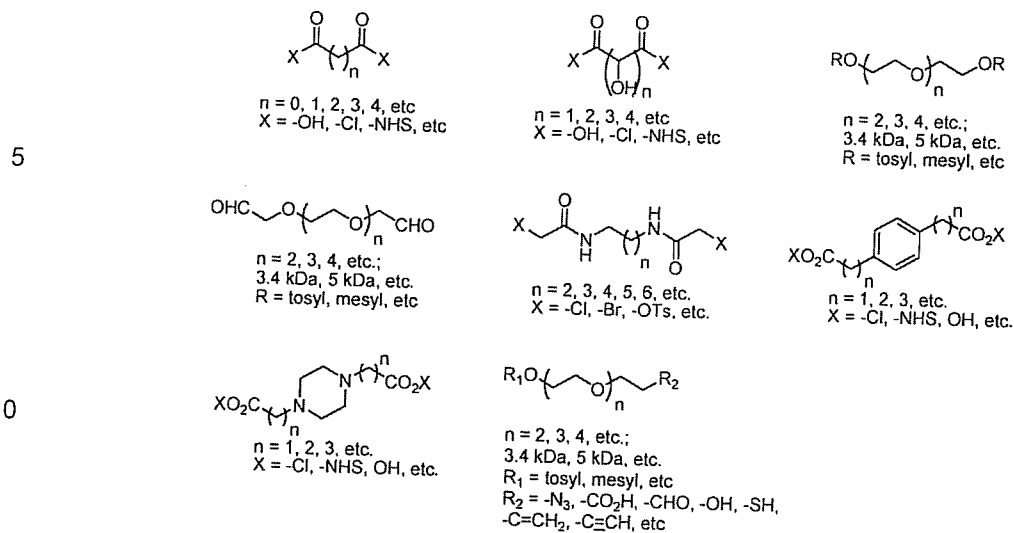
Si deve notare che un esperto del ramo può immaginare un numero di porzioni nucleo o collegatore che possono essere funzionalizzate con un appropriato elettrofilo o neutrofilo.

Sotto sono mostrati una serie di composti scelti in base a diverse considerazioni di progetto, incluse solubilità, effetti sterici e la loro capacità di conferire o essere coerente con favorevoli relazioni struttura-attività. A questo proposito si deve ulteriormente notare, tuttavia, che le strutture previste sotto e sopra sono solo a scopo illustrativo e pertanto non dovrebbero essere viste in un senso limitativo.

Porzioni esemplari di collegatori elettrofili e nucleofili includono, ma non sono limitate a, porzioni di collegatori illustrati negli esempi e di seguito:

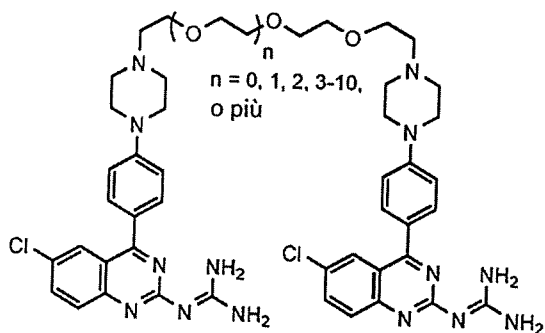
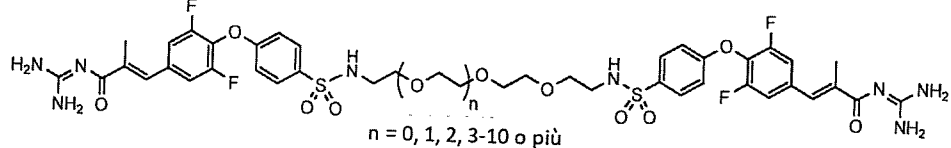
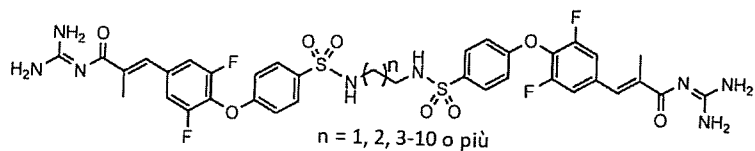
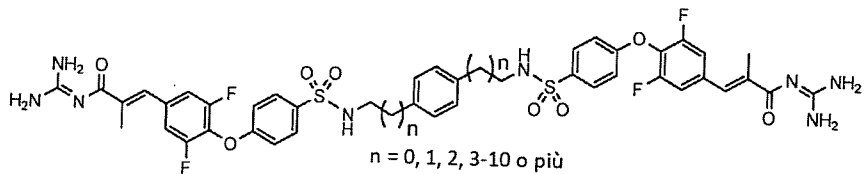
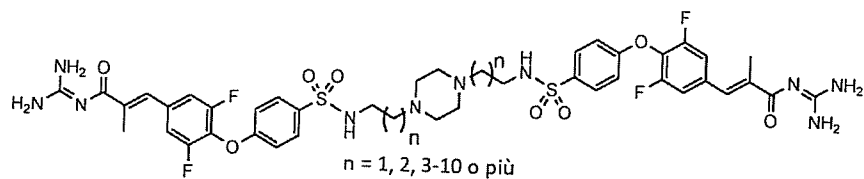
Collegatori nucleofili (per uso con derivati elettrofili di NHE-inibitori)

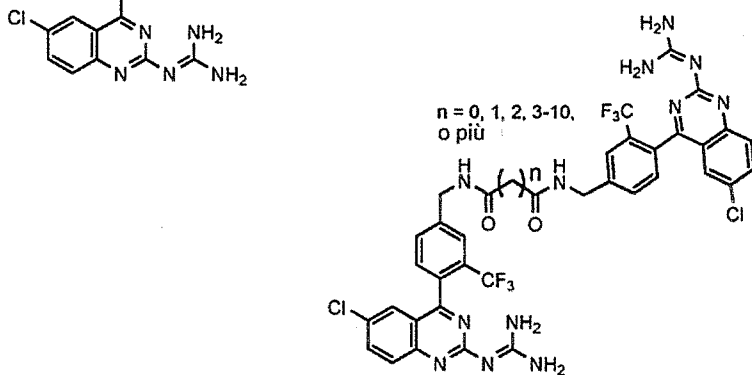
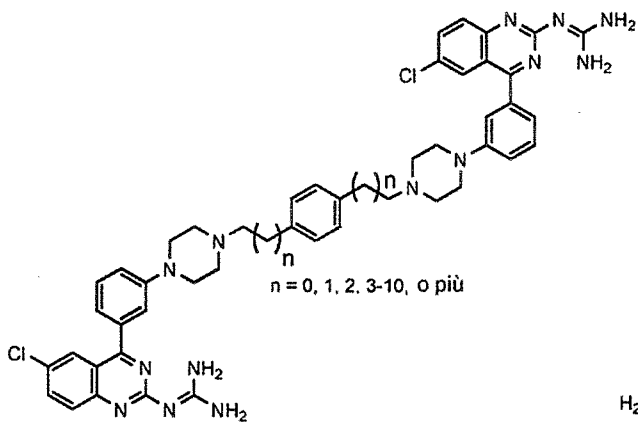
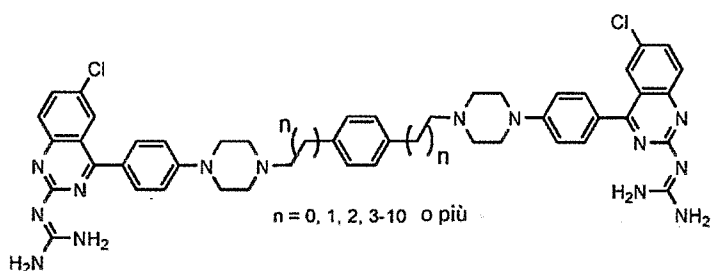
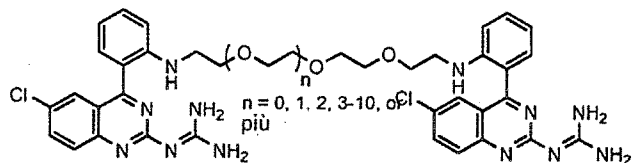
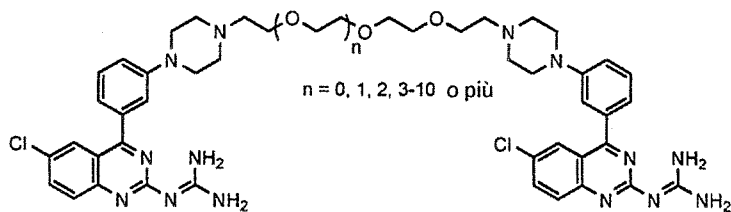


Collegatori elettrofili (per uso con derivati nucleofili di NHE-inibitori)

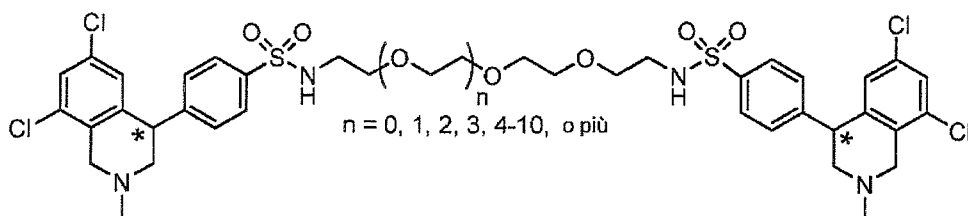
La porzione di collegamento, L, in ognuna delle forme di realizzazione descritte (incluse
 15 forme di realizzazione in cui una piccola molecola NHE-inibente è collegata ad un nucleo
 quale una piccola molecola, una porzione polimerica, una porzione oligomerica o una
 porzione non-ripetitiva) può essere un collegatore chimico, quale un legame o altra porzione,
 per esempio, comprendente da circa 1 a circa 200 atomi, o da circa 1 a circa 100 atomi, o da
 circa 1 a circa 50 atomi, che possono essere idrofilici e/o idrofobici. In una forma di
 20 realizzazione, la porzione di collegamento può essere una porzione polimerica innestata su
 uno scheletro polimerico, per esempio, usando approcci di polimerizzazione di radicali liberi
 vivi noti nell'arte. Strutture o porzioni L preferite possono anche essere scelte tra, per
 esempio, glicol oligoetilene, oligopeptide, oligoetilenimina, oligotetrametilene glicol e
 oligocaprolattone.

La piccola molecola NHE inibente, NHE, è attaccata ad entrambe le estremità della catena
 25 polimerica. Per esempio, una macromolecola (ad es. un polimero o oligomero) avente una
 delle seguenti strutture esemplificative può essere progettata e costruita come qui descritto:

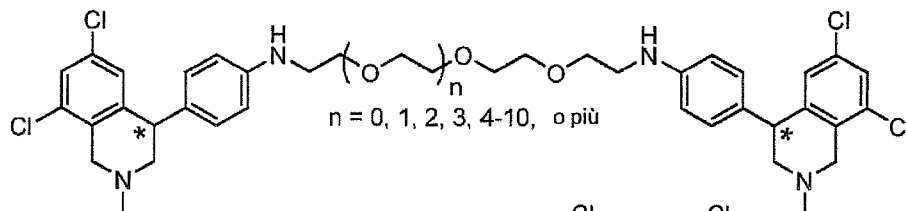




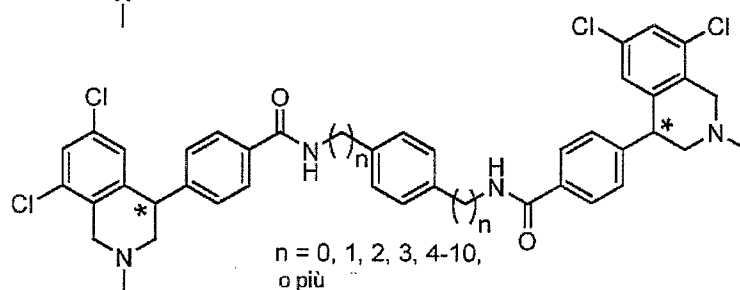
5



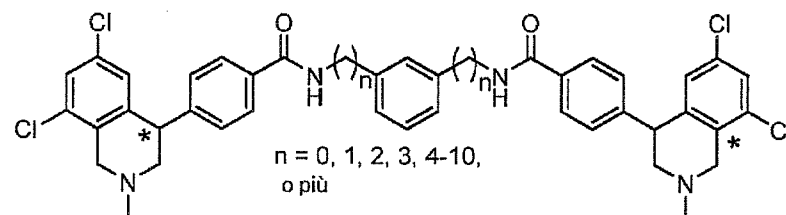
10



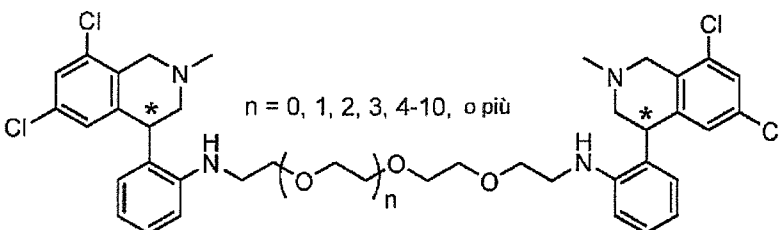
15



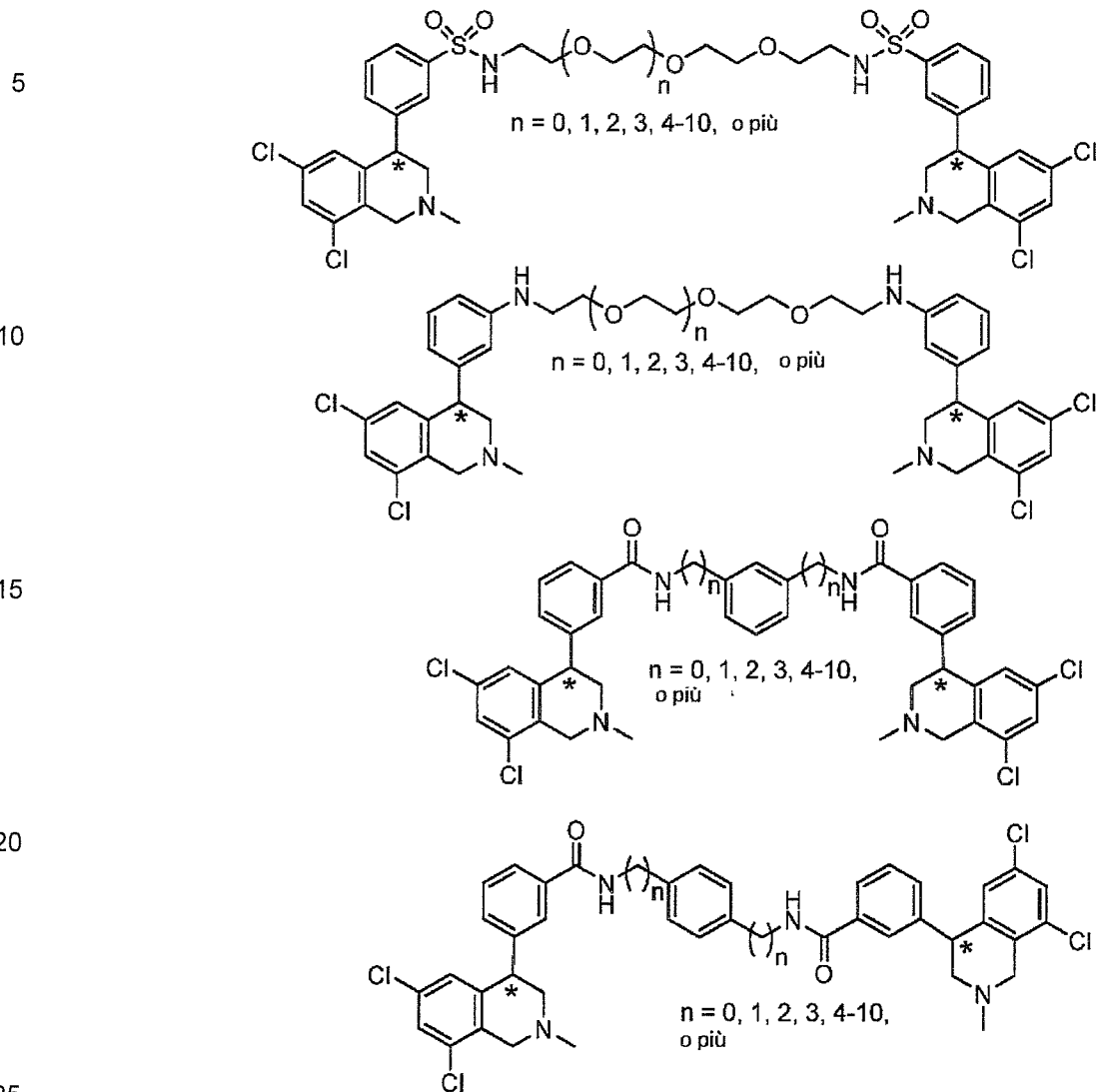
20



25



30



Si deve notare che varie proprietà degli oligomeri e polimeri che formano la porzione nucleo come qui descritti sopra possono essere ottimizzati per un dato uso o applicazione usando mezzi sperimentali e principi generalmente noti nell'arte. Per esempio, il peso molecolare complessivo dei composti o strutture qui sopra presentati può essere scelto in modo da ottenere non-assorbibilità, persistenza di inibizione e/o potenza.

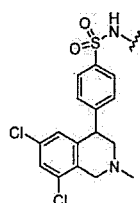
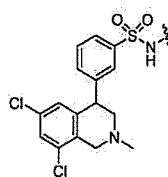
In aggiunta, con rispetto a quelle forme di realizzazione polimeriche che comprendono o includono i composti generalmente rappresentati dalla struttura di Formula (I) qui e/o quelli descritti per esempio nei numerosi brevetti e domande di brevetto qui citati (vedasi, per es., US5866610; US6399824; US6911453; US6703405; US6005010; US6887870; US6737423;

US7326705; US 55824691 (WO94/026709); US6399824 (WO02/024637); US
 2004/0339001 (WO02/020496); US 2005/0020612 (WO03/055490); WO01/072742; CA
 238729 (WO01021582); CA 02241531 (WO97/024113); US 2005/0113396
 (WO03/051866); US2005/0020612; US2005/0054705; US2008/0194621; US2007/0225323;
 5 US2004/0039001; US2004/0224965; US2005/0113396; US2007/0135383;
 US2007/0135385; US2005/0244367; US2007/0270414; e CA 2177007 (EP0744397), quali
 quelli in cui questi composti e strutture sono pendenti dello scheletro o catena del polimero,
 la composizione dello scheletro o catena del polimero come pure la dimensione o peso
 molecolare complessivo del polimero e/o il numero di molecole pendenti presenti su di esso
 10 possono essere scelti secondo vari principi noti nell'arte in vista dell'applicazione o uso
 inteso.

In forme di realizzazione preferite, la porzione polimerica è stabile nelle condizioni
 fisiologiche del tratto GI. Per "stabile" si intende che la porzione polimerica non si degrada o
 non si degrada significativamente o essenzialmente non si degrada nelle condizioni
 15 fisiologiche del tratto GI. Per esempio, almeno circa il 90%, preferibilmente almeno circa il
 95% e più preferibilmente almeno circa il 98% e persino ancor più preferibilmente almeno
 circa il 99% della porzione polimerica rimane non-degradata o intatta dopo almeno circa 5
 ore, almeno circa 12 ore, almeno circa 18 ore, almeno circa 24 ore o almeno circa 48 ore di
 permanenza in un tratto gastrointestinale. La stabilità in un tratto gastrointestinale può essere
 20 valutata usando mimetici gastrointestinali, ad es. mimetici gastrici o mimetici intestinali
 dell'intestino tenue, che sono approssimativamente modello delle condizioni fisiologiche ad
 una o più posizioni in esso.

B. Particolari trovati

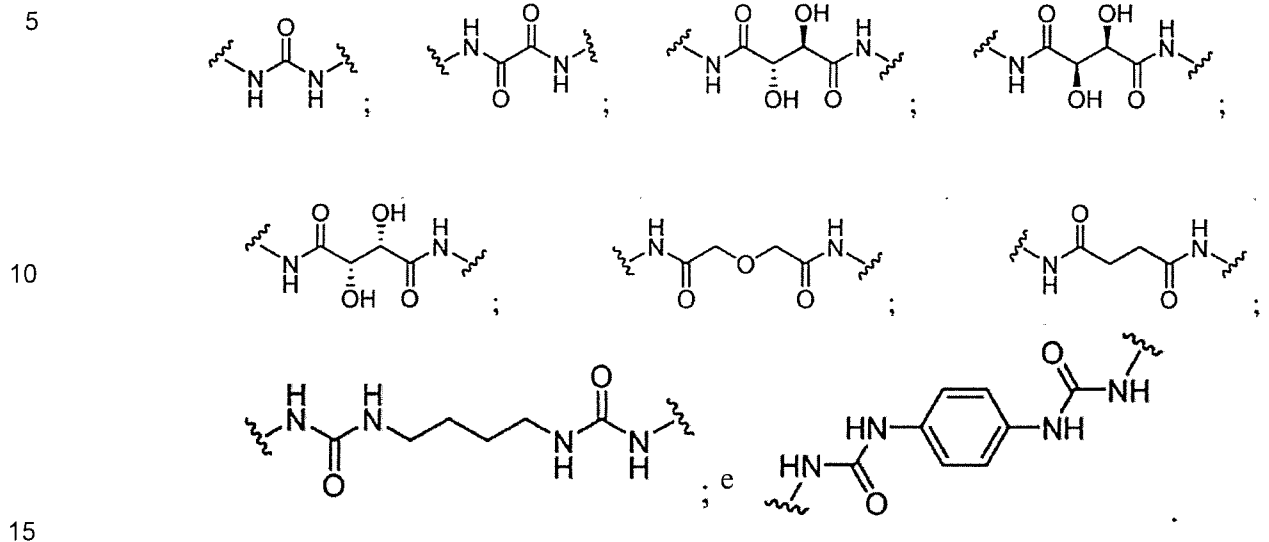
In forme di realizzazione dell'invenzione, la piccola molecola NHE-inibente ha una delle
 25 seguenti strutture:



o un loro stereoisomero, precursore o sale farmaceuticamente accettabile.

L è un collegatore polialchilene glicole, quale un collegatore polietilene glicole, ed n è 2.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, il Core è scelto dal gruppo che consiste di:



III. Terminologia, Proprietà Fisiche e Prestazionali

A. Terminologia

A meno che il contesto non richieda diversamente, per tutta la presente descrizione e le rivendicazioni, la parola "comprendere" e le sue variazioni, come, "comprende" e "comprendente" devono essere interpretate in senso aperto e inclusivo, ovvero "incluso, ma non limitato a".

Il riferimento per tutta questa descrizione a "una sola forma di realizzazione" o "una forma di realizzazione" indica che un particolare aspetto, struttura o caratteristica descritta in relazione alla forma di realizzazione è inclusa in almeno una forma di realizzazione della presente invenzione. Così, le comparse delle frasi "in una sola forma di realizzazione" o "in una forma di realizzazione" in vari punti in tutta questa descrizione non sono necessariamente tutti riferiti alla stessa forma di realizzazione. Inoltre, i particolari aspetti, strutture o caratteristiche possono essere combinati in qualsiasi modo idoneo in una o più forme di realizzazione.

"Ammino" si riferisce al radicale $-NH_2$.

"Ciano" si riferisce al radicale $-CN$.

"Idrossi" o "idrossile" si riferisce al radicale $-OH$.

"Immino" si riferisce al sostituente $=NH$.

"Nitro" si riferisce al radicale $-\text{NO}_2$.

"Osso" si riferisce al sostituente $=\text{O}$.

"Tioosso" si riferisce al sostituente $=\text{S}$.

5 "Alchile" si riferisce ad un radicale di catena idrocarburica lineare o ramificata consistente solamente di atomi di carbonio e di idrogeno, che è satura o insatura (cioè contiene uno o più legami doppi e/o tripli), avente da uno a dodici atomi di carbonio ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$ alchile), preferibilmente da uno a otto atomi di carbonio ($\text{C}_1\text{-C}_8$ alchile) oppure da uno a sei atomi di carbonio ($\text{C}_1\text{-C}_6$ alchile) e che è attaccato al resto della molecola tramite un legame singolo, ad es. metile, etile, *n*-propile, 1-metiletile (*iso*-propile), *n*-butile, *n*-pentile, 1,1-dimetiletile (*t*-butile), 3-metilesile, 2-metilesile, etenile, prop-1-enile, but-1-enile, pent-1-enile, penta-1,4-
10 dienile, etinile, propinile, butinile, pentinile, esinile e simili. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo alchile può essere eventualmente sostituito.

15 "Alchilene" o "catena alchilenica" si riferisce ad una catena idrocarburica divalente lineare o ramificata che collega il resto della molecola a un gruppo radicale, consistente solamente di atomi di carbonio e idrogeno, che è satura o insatura (cioè contiene uno o più legami doppi e/o tripli) e avente da uno a dodici atomi di carbonio, ad es. metilene, etilene, propilene, *n*-butilene, etenilene, propenilene, *n*-butenilene, propinilene, *n*-butinilene e simili. La catena alchilenica è attaccata al resto della molecola attraverso un legame singolo o doppio e al gruppo radicale attraverso un legame singolo o doppio. I punti di attacco della catena
20 alchilenica al resto della molecola e al gruppo radicale possono essere attraverso un carbonio o due qualsiasi carboni all'interno della catena. Salvo diversamente specificato nella descrizione, una catena alchilenica può essere eventualmente sostituita.

25 "Alcossi" si riferisce ad un radicale di formula $-\text{OR}_a$ dove R_a è un radicale alchile come sopra definito contenente da uno a dodici atomi di carbonio. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo alcossi può essere eventualmente sostituito.

"Alchilammino" si riferisce ad un radicale di formula $-\text{NHR}_a$ o $-\text{NR}_a\text{R}_a$ dove ciascun R_a è, indipendentemente, un radicale alchile come sopra definito contenente da uno a dodici atomi di carbonio. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo alchilammino può essere eventualmente sostituito.

30 "Tioalchile" si riferisce ad un radicale di formula $-\text{SR}_a$ dove R_a è un radicale alchile come sopra definito contenente da uno a dodici atomi di carbonio. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo tioalchile può essere eventualmente sostituito.

"Arile" si riferisce ad un radicale a sistema di anelli idrocarburici comprendente idrogeno, da 6 a 18 atomi di carbonio e da almeno un anello aromatico. Per gli scopi di questa invenzione,

il radicale arile può essere un sistema di anelli monociclico, biciclico, triciclico o tetraciclico, che può includere sistemi di anelli fusi o a ponte. I radicali arile comprendono, ma non sono limitati a, radicali arile derivati da aceantrilene, acenaftilene, acefenantrilene, antracene, azulene, benzene, crisene, fluorantene, fluorene, *as*-indacene, *s*-indacene, indano, indene, naftalene, fenalene, fenantrene, pleiadene, pirene e trifenilene. Salvo diversamente specificato nella descrizione, il termine "arile" o il prefisso "ar-" (come in "aralchile") si intende includere radicali arile che sono eventualmente sostituiti.

"Aralchile" si riferisce ad un radicale di formula $-R_b-R_c$ dove R_b è una catena alchilenica come sopra definita e R_c è uno o più radicali arile come sopra definito, ad esempio benzile, difenilmetile e simili. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo aralchile può essere eventualmente sostituito.

"Cicloalchile" o "anello carbociclico" si riferisce ad un radicale idrocarburo monociclico o policiclico non aromatico stabile consistente solamente di atomi di carbonio e idrogeno, che può includere sistemi di anelli fusi o a ponte, avente da tre a quindici atomi di carbonio, preferibilmente da tre a dieci atomi di carbonio, e che è saturo o insaturo e collegato al resto della molecola tramite un legame singolo. I radicali monociclici includono, ad esempio, ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile, cicloeptile e ciclooctile. I radicali policiclici includono, ad esempio, adamantile, norbornile, decalinile, 7,7-dimetil-biciclo[2.2.1]eptanile e simili. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo cicloalchile può essere eventualmente sostituito.

"Cicloalchilalchile" si riferisce ad un radicale di formula $-R_bR_d$ dove R_d è una catena alchilenica come sopra definito e R_g è un radicale cicloalchile come sopra definito. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo cicloalchile può essere eventualmente sostituito.

"Fuso" si riferisce a qualsiasi struttura ad anello descritta qui che sia fusa ad una struttura ad anello esistente nei composti dell'invenzione. Quando l'anello fuso è un anello eterociclico o un anello eteroarilico, qualsiasi atomo di carbonio sulla struttura ad anello esistente che diventa parte dell'anello eterociclico fuso o dell'anello eteroarilico fuso può essere sostituito con un atomo di azoto.

"Alo" o "alogeno" si riferisce a bromo, cloro, fluoro o iodo.

"Aloalchile" si riferisce ad un radicale alchile, come sopra definito, che è sostituito da uno o più radicali alo, come sopra definito, ad es., trifluorometile, difluorometile, triclorometile, 2,2,2-trifluoroetil, 1,2-difluoroetil, 3-bromo-2-fluoropropile, 1,2-dibromoetil e simili. Salvo

diversamente specificato nella descrizione, un gruppo aloalchile può essere eventualmente sostituito.

"Eterociclice" o "anello eterociclico" si riferisce ad un radicale ad anello non aromatico stabile da 3 a 18 membri che consiste di da due a dodici atomi di carbonio e da uno a sei eteroatomi scelti dal gruppo che consiste di azoto, ossigeno e zolfo. Salvo diversamente specificato nella descrizione, il radicale eterociclico può essere un sistema ad anelli monociclico, biciclico, triciclico o tetraciclico, che può includere sistemi ad anelli fusi o a ponte; e gli atomi di azoto, carbonio o zolfo nel radicale eterociclico possono essere eventualmente ossidati; l'atomo di azoto può essere eventualmente quaternarizzato; ed il radicale eterociclico può essere parzialmente o completamente saturo. Esempi di tali radicali eterociclici comprendono, ma non sono limitati a, diossolanile, tienil[1,3]ditanile, decaidroisochinolinile, imidazolinile, imidazolidinile, isotiazolidinile, isossazolidinile, morfolinile, ottaidroindolile, ottaidroisindolile, 2-ossopiperazinile, 2-ossopiperidinile, 2-ossopirrolidinile, ossazolidinile, piperidinile, piperazinile, 4-piperidonile, pirrolidinile, pirazolidinile, chinuclidinile, tiazolidinile, tetraidrofurile, tritanile, tetraidropiranile, tiomorfolinile, tiamorfolinile, 1-osso-tiomorfolinile e 1,1-diosso-tiomorfolinile. Salvo diversamente specificato nella descrizione, Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo eterociclico può essere eventualmente sostituito.

"N-eterociclice" si riferisce ad un radicale eterociclico come sopra definito contenente almeno un azoto e dove il punto di attacco del radicale eterociclico al resto della molecola è attraverso un atomo di azoto nel radicale eterociclico. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo N-eterociclico può essere eventualmente sostituito.

"Eterociclicilalchile" si riferisce ad un radicale di formula $-R_bR_c$ dove R_b è una catena alchilenica come sopra definita e R_c è un radicale di eterociclico come sopra definito e, se l'eterociclice è un eterociclice contenente azoto, l'eterociclice può essere attaccato al radicale alchilico all'atomo di azoto. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo eterociclicilalchile può essere opzionalmente sostituito.

"Eteroarile" si riferisce ad un radicale di un sistema ad anello da 5 a 14 componenti, comprendente atomi di idrogeno, da uno a tredici atomi di carbonio, da uno a sei eteroatomi scelti tra il gruppo che consiste di azoto, ossigeno e zolfo e almeno un anello aromatico. Per gli scopi di questa invenzione, il radicale eteroarile può essere un sistema ad anello monociclico, biciclico, triciclico o tetraciclico, che può includere sistemi ad anello fusi o a ponte; e gli atomi di azoto, carbonio o zolfo nel radicale eteroarile possono essere eventualmente ossidati; l'atomo di azoto può essere eventualmente quaternarizzato. Esempi

includono, ma non sono limitati a, azepinile, acridinile, benzimidazolile, benzotiazolile, benzindolile, benzodiossolile, benzofuranile, benzossazolile, benzotiazolile, benzotiadiazolile, benzo[*b*][1,4]diossepinile, 1,4-benzodiossanile, benzonaftofuranile, benzossazolile, benzodiossolile, benzodiossinile, benzopiranile, benzopiranonile, 5 benzofuranile, benzofuranonile, benzotienile (benzotiofenile), benzotriazolile, benzo[4,6]imidazo[1,2-*a*]piridinile, carbazolile, cinnolinile, dibenzofuranile, dibenzotiofenile, furanile, furanonile, isotiazolile, imidazolile, indazolile, indolile, indazolile, isoindolile, indolinile, isoindolinile, isochinolinile, indolizinile, isossazolile, naftiridinile, ossadiazolile, 2-ossoazepinile, ossazolile, ossiranile, 1-ossidopiridinile, 1-ossidopirimidinile, 10 1-ossidopirazinile, 1-ossido-piridazinile, 1-fenil-1*H*-pirrolile, fenazinile, fenotiazinile, fenossazinile, ftalazinile, pteridinile, purinile, pirrolile, pirazolile, piridinile, pirazinile, pirimidinile, piridazinile, chinazolinile, chinossalinile, chinolinile, chinuclidinile, isochinolinile, tetraidrochinolinile, tiazolile, tiadiazolile, triazolile, tetrazolile, triazinile e tiofenile (cioè tienile). Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo eteroarile 15 può essere eventualmente sostituito.

"*N*-eteroarile" si riferisce ad un radicale eteroarile come sopra definito contenente almeno un azoto e dove il punto di attacco del radicale eteroarile al resto della molecola è attraverso un atomo di azoto nel radicale eteroarilico. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo *N*-eteroarile può essere eventualmente sostituito.

20 "Eteroarilalchile" si riferisce ad un radicale di formula $-R_bR_f$ dove R_b è una catena alchilenica come sopra definita e R_f è un radicale eteroarile come sopra definito. Salvo diversamente specificato nella descrizione, un gruppo eteroarilalchile può essere eventualmente sostituito.

Il termine "sostituito" qui usato significa uno qualsiasi dei gruppi di cui sopra (cioè alchile, 25 alchilene, alchossi, alchilammino, tioalchile, arile, aralchile, cicloalchile, cicloalchilalchile, aloalchile, eterociclice, *N*-eterociclice, eterociclicilalchile, eteroarile, *N*-eteroarile e/o eteroarilalchile) in cui almeno un atomo di idrogeno è sostituito da un legame ad atomi non di idrogeno quali, ma non limitati a: un atomo di alogeno come F, Cl, Br e I; un atomo di ossigeno in gruppi come gruppi idrossilici, gruppi alcossilici e gruppi esteri; un atomo di 30 zolfo in gruppi come gruppi tiolici, gruppi tioalchilici, gruppi solfone, gruppi solfonici e gruppi solfossidi; un atomo di azoto in gruppi come ammine, ammidi, alchilammine, dialchilammine, arilammine, alchilarilammine, diarilammine, *N*-ossidi, immidi e enammine; un atomo di silicio in gruppi come gruppi trialchilsilile, gruppi dialchilarilsilile, gruppi alchildiarilsilile e gruppi triarilsilile; e altri eteroatomi in vari altri gruppi. "Sostituito"

significa anche uno qualsiasi dei gruppi di cui sopra in cui uno o più atomi di idrogeno sono sostituiti da un legame di ordine superiore (ad es. un doppio o triplo legame) ad un eteroatomo come ossigeno in osso, carbonile, carbossile e gruppi estere; e azoto nei gruppi come immine, ossime, idrazoni e nitrili. Ad esempio, "sostituito" include uno qualsiasi dei gruppi di cui sopra in cui uno o più atomi di idrogeno sono sostituiti con $-NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)R_h$, $-NR_gC(=O)NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NR_gSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $-SO_2OR_g$, $=NSO_2R_g$, e $-SO_2NR_gR_h$. "Sostituito" significa anche uno qualsiasi dei gruppi di cui sopra in cui uno o più atomi di idrogeno sono sostituiti con $-C(=O)R_g$, $-C(=O)OR_g$, $-C(=O)NR_gR_h$, $-CH_2SO_2R_g$, $-CH_2SO_2NR_gR_h$, $-(CH_2CH_2O)_{2-10}R_g$. Nelle precedenti, R_g e R_h sono uguali o diversi e indipendentemente idrogeno, alchile, alchossi, alchilammino, tioalchile, arile, aralchile, cicloalchile, cicloalchilalchile, haloalchile, eterociclile, *N*-eterociclile, eterociclilalchile, eteroarile, *N*-eteroarile e/o eteroarilalchile. "Sostituito" indica inoltre uno qualsiasi dei gruppi di cui sopra in cui uno o più atomi di idrogeno sono sostituiti da un legame ad un gruppo ammino, ciano, idrossile, immino, nitro, osso, tiosso, alogeno, alchile, alcossi, alchilammino, tioalchile, arile, aralchile, cicloalchile, cicloalchilalchile, aloalchile, eterociclile, *N*-eterociclile, eterociclilalchile, eteroarile, *N*-eteroarile e/o eteroarilalchile. Inoltre, ciascuno dei suddetti sostituenti può anche essere eventualmente sostituito con uno o più dei suddetti sostituenti.

"Profarmaco" è inteso indicare un composto che può essere convertito in condizioni fisiologiche o mediante solvolisi ad un composto biologicamente attivo dell'invenzione. Così, il termine "profarmaco" si riferisce ad un precursore metabolico di un composto dell'invenzione che è farmaceuticamente accettabile. Un profarmaco può essere inattivo quando somministrato ad un soggetto che ne necessita, ma viene convertito *in vivo* in un composto attivo dell'invenzione. I profarmaci sono tipicamente rapidamente trasformati *in vivo* a dare il composto progenitore dell'invenzione, per esempio, mediante idrolisi nel sangue. Il composto profarmaco spesso offre vantaggi di solubilità, compatibilità tissutale o rilascio ritardato in un organismo di mammifero (vedi, Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), pp. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam)). Una discussione sui profarmaci è disponibile in Higuchi, T., et al., A.C.S. Symposium Series, Vol. 14, e in Bioreversible Carriers in Drug Design, Ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Il termine "profarmaco" è anche inteso includere tutti i veicoli legati covalentemente, che rilasciano il composto attivo dell'invenzione *in vivo* quando tale profarmaco viene somministrato ad un soggetto di mammifero. I profarmaci di un composto dell'invenzione

possono essere preparati modificando gruppi funzionali presenti nel composto dell'invenzione in modo tale che le modifiche siano scisse, o in manipolazione di routine o *in vivo*, al composto progenitore dell'invenzione. I profarmaci includono composti dell'invenzione in cui un gruppo idrossi, ammino o mercapto è legato a qualsiasi gruppo che, quando il profarmaco del composto dell'invenzione viene somministrato ad un soggetto di mammifero, si scinde per formare rispettivamente un gruppo idrossi libero, ammino libero o mercapto libero. Esempi di profarmaci includono, ma non sono limitati a, derivati acetato, formiato e benzoato di alcol o derivati amidici di gruppi funzionali amminici nei composti dell'invenzione e simili.

L'invenzione qui descritta è intesa anche comprendere i prodotti metabolici *in vivo* dei composti descritti. Tali prodotti possono risultare, per esempio, dall'ossidazione, riduzione, idrolisi, amidazione, esterificazione e simili del composto somministrato, principalmente grazie a processi enzimatici. In accordo, l'invenzione include composti prodotti da un processo comprendente il somministrare un composto di questa invenzione ad un mammifero per un periodo di tempo sufficiente ad ottenere un suo prodotto metabolico. Tali prodotti sono tipicamente identificati per somministrazione di un composto radiomarcato dell'invenzione in una dose rilevabile ad un animale, quale un ratto, topo, cavia, scimmia o ad un umano, consentendo tempo sufficiente perché avvenga il metabolismo ed isolamento dei suoi prodotti di conversione dalle urine, dal sangue o da altri campioni biologici.

"Composto stabile" e la "struttura stabile" sono intesi indicare un composto che è sufficientemente robusto per sopravvivere all'isolamento ad un grado di purezza utile da una miscela di reazione e alla formulazione in un efficace agente terapeutico.

"Eventuale" o "eventualmente" indica che l'evento o le circostanze successivamente descritti possono o non possono verificarsi e che la descrizione include esempi in cui detto evento o circostanza si verifica ed esempi in cui non si verifica. Ad esempio, "arile eventualmente sostituito" indica che il radicale arile può o non essere sostituito e che la descrizione include sia radicali arilici sostituiti che radicali arilici privi di sostituzione.

"Veicolo, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile" include, senza limitazione, qualsiasi adiuvante, veicolante, eccipiente, legante, dolcificante, diluente, conservante, colorante/tintura, miglioratore dell'aroma, tensioattivo, agente bagnante, agente disperdente, agente sospendente, stabilizzante, agente isotonic, solvente o emulsionante che è stato approvato dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti come accettabile per l'uso negli esseri umani o negli animali domestici.

"Sale farmaceuticamente accettabile" include sia sali di addizione acida che basica. "Sale di addizione acido farmaceuticamente accettabile" si riferisce a quei sali che mantengono l'efficacia biologica e le proprietà delle basi libere, che non sono biologicamente o altrimenti indesiderabili e che si formano con acidi inorganici come, ma non sono limitati a, acido cloridrico, acido bromidrico, acido solforico, acido nitrico, acido fosforico e simili e acidi organici come, ma non limitati a, acido acetico, acido 2,2-dicloroacetico, acido adipico, acido alginico, acido ascorbico, acido aspartico, acido benzensolfonico, acido benzoico, acido 4-acetamidobenzoico, acido canforico, acido canfor-10-solfonico, acido caprico, acido caproico, acido caprilico, acido carbonico, acido cinnamico, acido citrico, acido ciclammino, acido dodecilsolfonico, acido etan-1,2-disolfonico, acido etansolfonico, acido 2-idrossietansolfonico, acido formico, acido fumarico, acido galattarico, acido gentisico, acido glucoptonico, acido gluconico, acido glucuronico, acido glutammico, acido glutarico, acido 2-osso-glutarico, acido glicerofosforico, acido glicolico, acido ippurico, acido isobutirrico, acido lattico, acido lattobionico, acido laurico, acido maleico, acido malico, acido malonico, acido mandelico, acido metansolfonico, acido mucico, acido naftalen-1,5-disolfonico, acido naftalen-2-solfonico, acido 1-idrossi-2-naftoico, acido nicotinico, acido oleico, acido orotico, acido ossalico, acido palmitico, acido pamoico, acido propionico, acido piroglutammico, acido piruvico, acido salicilico, acido 4-amminosalicilico, acido sebacico, acido stearico, acido succinico, acido tartarico, acido tiocianico, acido *p*-toluensolfonico, acido trifluoroacetico, acido undecilenico e simili.

"Sale di addizione basica farmaceuticamente accettabile" si riferisce a quei sali che mantengono l'efficacia biologica e le proprietà degli acidi liberi, che non sono biologicamente o altrimenti indesiderabili. Questi sali vengono preparati per aggiunta di una base inorganica o di una base organica all'acido libero. Sali derivati da basi inorganiche includono, ma non sono limitati a, sali di sodio, potassio, litio, ammonio, calcio, magnesio, ferro, zinco, rame, manganese, alluminio e simili. Sali inorganici preferiti sono i sali di ammonio, sodio, potassio, calcio e magnesio. Sali derivati da basi organiche includono, ma non sono limitati a, sali di ammine primarie, secondarie e terziarie, ammine sostituite incluse ammine sostituite ricorrenti in natura, ammine cicliche e resine a scambio ionico basico, quali ammoniacale, isopropilammina, trimetilammina, dietilammina, trietilammina, tripropilammina, dietanolammina, etanolammina, deanolo, 2-dimetilamminoetanolo, 2-dietilamminoetanolo, dicicloesilammina, lisina, arginina, istidina, caffeina, procaina, idrabamina, colina, betaina, benetammina, benzatina, etilendiammina, glucosammina, metilglucammina, teobromina, trietanolammina, trometamina, purina, piperazina, piperidina,

N-etilpiperidina, resine poliamminiche e simili. Basi organiche particolarmente preferite sono isopropilammina, dietilammina, etanolammina, trimetilammina, dicioesilammina, colina e caffeina.

5 Spesso le cristallizzazioni producono un solvato del composto dell'invenzione. Come qui usato, il termine "solvato" si riferisce ad un aggregato che comprende una o più molecole di un composto dell'invenzione con una o più molecole di solvente. Il solvente può essere acqua, nel qual caso il solvato può essere un idrato. In alternativa, il solvente può essere un
10 solvente organico. Così, i composti della presente invenzione possono esistere come un idrato, compresi un monoidrato, diidrato, emidrato, sesquidrato, triidrato, tetraidrato e simili, così come le corrispondenti forme solvate. Il composto dell'invenzione possono essere veri solvati, mentre in altri casi il composto dell'invenzione può semplicemente trattenere acqua accidentale o essere una miscela di acqua e qualche solvente accidentale.

15 Una "composizione farmaceutica" si riferisce ad una formulazione di un composto dell'invenzione e di un mezzo generalmente accettato nella tecnica per la somministrazione del composto biologicamente attivo ai mammiferi, ad es. umani. Tale mezzo comprende di conseguenza tutti i veicoli, i diluenti o gli eccipienti farmaceuticamente accettabili.

I composti dell'invenzione o i loro sali farmaceuticamente accettabili possono contenere uno o più centri asimmetrici e possono quindi dare origine a enantiomeri, diastereomeri e altre forme stereoisomeriche che possono essere definite, in termini di stereochimica assoluta, come (*R*)- o (*S*)- o, come (*D*)- o (*L*)- per gli amminoacidi. La presente invenzione intende includere tutti questi isomeri possibili, così come le loro forme racemiche e otticamente pure. Gli isomeri otticamente attivi (+) e (-), (*R*)- e (*S*)- o (*D*)- e (*L*)- possono essere preparati usando sintoni chirali o reagenti chirali oppure risolti usando tecniche convenzionali, ad esempio, cromatografia e cristallizzazione frazionata. Tecniche convenzionali per la
20 preparazione/isolamento di singoli enantiomeri comprendono la sintesi chirale da un adatto precursore otticamente puro o la risoluzione del racemato (o del racemato di un sale o di un derivato) usando, ad esempio, la cromatografia liquida ad alta pressione chirale (HPLC). Quando i composti qui descritti contengono doppi legami olefinici o altri centri di asimmetria geometrica e, a meno che non sia specificato diversamente, si intende che i
25 composti comprendano sia gli isomeri geometrici *E* sia *Z*. Allo stesso modo, tutte le forme tautomeriche sono anche intese essere incluse.

30 Uno "stereoisomero" si riferisce ad un composto costituito dagli stessi atomi legati dagli stessi legami ma aventi diverse strutture tridimensionali, che non sono intercambiabili. La presente invenzione contempla vari stereoisomeri e loro miscele e comprende "enantiomeri",

che si riferisce a due stereoisomeri le cui molecole sono immagini speculari non sovrapponibili l'un l'altro.

Un "tautometro" si riferisce ad un passaggio protonico da un atomo di una molecola ad un altro atomo della stessa molecola. La presente invenzione comprende tautomeri di tutti i detti composti.

In accordo con il presente trovato, i composti qui descritti sono progettati per essere sostanzialmente attivi o localizzati nel lume gastrointestinale di un soggetto umano o animale. Il termine "lume gastrointestinale" è usato qui intercambiabilmente con il termine "lume", per riferirsi allo spazio o cavità all'interno di un tratto gastrointestinale (tratto GI, che può anche essere indicato come intestino), delimitato dalla membrana apicale di cellule epiteliali GI del soggetto. In alcune forme di realizzazione, i composti non vengono assorbiti attraverso lo strato di cellule epiteliali del tratto GI (noto anche come epitelio GI). "Mucosa gastrointestinale" si riferisce allo(agli) strato(i) di cellule che separano il lume gastrointestinale dal resto del corpo e comprendono la mucosa gastrica e intestinale, come la mucosa dell'intestino tenue. Una "cellula epiteliale gastrointestinale" o una "cellula epiteliale intestinale", come qui usato, si riferisce a qualsiasi cellula epiteliale sulla superficie della mucosa gastrointestinale che guarda il lume del tratto gastrointestinale, inclusa, ad esempio, una cellula epiteliale dello stomaco, una cellula epiteliale intestinale, una cellula epiteliale del colon e simili.

"Sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili" e/o "sostanzialmente impermeabili" come qui usati (nonché le loro variazioni) si riferiscono generalmente a situazioni in cui una quantità statisticamente significativa, e in alcune forme di realizzazione essenzialmente tutto il composto del presente trovato (che include la piccola molecola NHE-inibitore), rimane nel lume gastrointestinale. Ad esempio, in accordo a una o più forme di realizzazione del presente trovato, preferibilmente almeno circa 70%, circa 80%, circa 90%, circa 95%, circa 98%, circa 99%, o addirittura circa 99,5% del composto rimane nel lume gastrointestinale. In questi casi, la localizzazione del lume gastrointestinale si riferisce alla riduzione del movimento netto attraverso uno strato gastrointestinale di cellule epiteliali, ad esempio attraverso il trasporto sia transcellulare sia paracellulare, come pure attraverso un trasporto attivo e/o passivo. Il composto in tali forme di realizzazione è impedito dalla permeazione netta di uno strato di cellule epiteliali gastrointestinali nel trasporto transcellulare, ad esempio attraverso una membrana apicale di una cellula epiteliale dell'intestino tenue. Il composto in queste forme di realizzazione è anche impedito dalla permeazione netta

attraverso le "giunzioni strette" nel trasporto paracellulare tra cellule epiteliali gastrointestinali che rivestono il lume.

A questo proposito va notato che, in una particolare forma di realizzazione, il composto non è essenzialmente assorbito affatto dal tratto GI o dal lume gastrointestinale. Come qui usati, i
5 termini "sostanzialmente impermeabili" o "sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili" si riferisce a forme di realizzazione in cui non viene rilevata alcuna quantità rilevabile di assorbimento o permeazione o esposizione sistemica del composto, usando mezzi comunemente noti nella tecnica.

A questo proposito, si deve ancora osservare, tuttavia, che in forme di realizzazione
10 alternative "sostanzialmente impermeabili" o "sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili" implica o consente che si verifichi un certo assorbimento limitato nel tratto GI, e più in particolare nell'epitelio intestinale (ad es., una certa quantità di assorbimento rilevabile, come ad esempio almeno circa 0,1%, 0,5%, 1% o più e meno di circa 30%, 20%, 10%, 5% ecc., l'intervallo di assorbimento essendo per esempio tra circa 1% e 30%, o 5% e
15 20%, ecc.; detto in altro modo, "sostanzialmente impermeabili" o "sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili", si riferisce a composti che presentano una certa permeabilità rilevabile a uno strato epiteliale di cellule nel tratto GI inferiore a circa il 20% del composto somministrato (ad es., meno di circa 15%, circa 10% o addirittura circa 5% e, ad esempio, maggiore di circa 0,5% o 1%), ma vengono poi eliminati dal fegato (cioè estrazione epatica) e/o dal rene (cioè escrezione renale).
20

B. Permeabilità

A questo proposito va notato che, in varie forme di realizzazione, la capacità del composto di essere sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile è basata sulla carica, sulle dimensioni e/o su altri parametri fisico-chimici del composto (ad esempio, area superficie
25 polare, numero di donatori e/o accettori di legame idrogeno, numero di legami liberamente rotanti, ecc.). Più specificamente, si deve notare che il carattere di assorbimento di un composto può essere scelto applicando principi di farmacodinamica, ad esempio, applicando la regola di Lipinski, nota anche come "la regola del cinque." Anche se non è una regola, ma piuttosto un insieme di linee guida, Lipinski mostra che farmaci a piccola molecola con (i)
30 un peso molecolare, (ii) un numero di donatori di legame idrogeno, (iii) un numero di accettori di legame idrogeno e/o (iv) un coefficiente di ripartizione acqua/ottanolo (Moriguchi Log P), superiore a un determinato valore soglia, non presentano generalmente una significativa concentrazione sistemica (cioè non sono generalmente assorbiti in misura significativa). (Vedi, ad es., Lipinski et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 2001 3-26)

Di conseguenza, composti sostanzialmente non biodisponibili sistemicamente (ad es. composti NHE-inibenti sostanzialmente non biodisponibili sistemicamente) possono essere progettati per avere strutture molecolari superiori a uno o più valori soglia di Lipinski. (Vedi anche Lipinski et al., *Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings*, Adv. Drug Delivery Reviews, 46: 3-26 (2001); e Lipinski, *Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability*, J. Pharm. & Toxicol. Methods, 44:235-249 (2000)). In alcune forme di realizzazione, ad esempio, un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile del presente trovato può essere costruito in modo da presentare una o più delle seguenti caratteristiche: (i) un PM superiore a circa 500 Da, circa 1000 Da, circa 2500 Da, circa 5000 Da, circa 10.000 Da o più (nella forma non salificata del composto); (ii) un numero totale di NH e/o OH e/o altri potenziali donatori di legame idrogeno superiore a circa 5, circa 10, circa 15 o più; (iii) un numero totale di atomi di O e/o atomi di N e/o altri potenziali accettori di legame idrogeno superiore a circa 5, circa 10, circa 15 o più; e/o (iv) un coefficiente di ripartizione di Moriguchi superiore a circa 10^5 (cioè Log P maggiore di circa 5, circa 6, circa 7, ecc.) oppure in alternativa inferiore a circa 10 (cioè un log P inferiore a 1, o anche 0).

In vista di quanto segue, e come qui precedentemente osservato, essenzialmente qualsiasi piccola molecola di NHE inibitore nota (descritta qui e/o nell'arte) può essere usata nel progettare una struttura molecolare di NHE inibitore sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile, in accordo con il presente trovato. Oltre ai parametri sopra indicati, l'area superficiale polare molecolare (cioè "PSA"), che può essere caratterizzata come la superficie appartenente ad atomi polari, è un descrittore che è anche stato dimostrato correlare bene con il trasporto passivo attraverso le membrane e, dunque, consente la previsione delle proprietà di trasporto dei farmaci. È stato applicato con successo per la previsione dell'assorbimento intestinale e della penetrazione del monostrato di cellule Caco2. (Per i dettagli della prova di penetrazione del monostrato di cellule Caco2, vedere ad esempio la descrizione del Modello Caco2 fornita nell'esempio 31 del brevetto U.S. N. 6.737.423 e il testo dell'esempio 31, in particolare, che può essere applicato per esempio alla valutazione o alla prova dei composti del presente trovato.) PSA è espresso in \AA^2 (angstrom quadrati) ed è calcolato da una rappresentazione molecolare tridimensionale. Adesso è disponibile un metodo di calcolo veloce (vedere, ad es., Ertl et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43, 3714-3717, il cui intero contenuto è qui incorporato come riferimento per tutti gli scopi rilevanti e coerenti) usando un computer e pacchetti di strumenti grafici chimici disponibili in

commercio, come ChemDraw. Il termine "PSA topologico" (tPSA) è stato coniato per questo metodo di calcolo rapido. Il tPSA è ben correlato con i dati di assorbimento umano con farmaci comuni (vedere, ad es, Tabella 2, di seguito):

Tabella 2

Nome	%FA ^a	TPSA ^b
metoprololo	102	50,7
Nordiazepam	99	41,5
diazepam	97	32,7
oxprenololo	97	50,7
fenazone	97	26,9
oxazepam	97	61,7
alprenololo	96	41,9
practololo	95	70,6
pindololo	92	57,3
ciprofloxacina	69	74,6
metalozone	64	92,5
acido tranexamico	55	63,3
atenololo	54	84,6
sulpiride	36	101,7
mannitolo	26	121,4
foscarnet	17	94,8
sulfasalazina	12	141,3
olsalazina	2,3	139,8
lattulosio	0,6	197,4
raffinosio	0,3	268,7

5

(da Ertl et al., *J. Med. Chem.*, 2000, 43:3714-3717). Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione preferite, i composti del presente trovato possono essere costruiti per avere un valore tPSA superiore a circa 100 Å², circa 120 Å², circa 130 Å², circa 140 Å², e in alcuni casi circa 150 Å², circa 200 Å², circa 250 Å², circa 270 Å², circa 300 Å², circa 400 Å², o addirittura circa 500 Å², in modo tale che i composti siano sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili (come qui definito altrove).

10

Poiché ci sono eccezioni alla "regola" di Lipinski o al modello tPSA, le proprietà di permeabilità dei composti del presente trovato possono essere sottoposte al vaglio sperimentale. Il coefficiente di permeabilità può essere determinato con metodi conosciuti agli esperti del ramo, includendo ad esempio con il test di permeabilità delle cellule Caco-2 e/o utilizzando una membrana artificiale come modello di una cellula epiteliale gastrointestinale. (Come sopra precedentemente osservato, vedi ad esempio brevetto U.S. N. 6.737.423, Esempio 31 per una descrizione del Modello Caco-2). Una membrana sintetica impregnata con, ad esempio, lecitina e/o dodecano per mimare le caratteristiche di permeabilità netta di una mucosa gastrointestinale, può essere usata come un modello di una

15

20

mucosa gastrointestinale. La membrana può essere usata per separare un compartimento contenente il composto del presente trovato da un compartimento in cui verrà monitorata la velocità di permeazione. Inoltre, possono essere eseguiti dei test di permeabilità della membrana artificiale parallela (PAMPA). Tali misurazioni *in vitro* possono indicare
5 ragionevolmente la permeabilità effettiva *in vivo*. (Vedi, ad esempio, Wohnsland et al., *J. Med. Chem.*, 2001, 44:923-930; Schmidt ed altri, Millipore Corp. Application Note, 2002, n. AN1725EN00 e n. AN1728EN00,)

Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, i composti utilizzati nei metodi del presente trovato possono avere un coefficiente di permeabilità, P_{app} , inferiore a circa 100×10^{-6} cm/s, o inferiore a circa 10×10^{-6} cm/s, o inferiore a circa 1×10^{-6} cm/s, o inferiore a
10 circa $0,1 \times 10^{-6}$ cm/s, misurato con mezzi noti nell'arte (quale per esempio l'esperimento di permeabilità descritto in Wohnsland et al., *J. Med. Chem.*, 2001, 44. 923-930).

Come precedentemente notato, in accordo al presente trovato, una porzione di piccola molecola NHE-inibente è modificata come sopra descritto per ostacolare l'assorbimento netto attraverso uno strato di cellule epiteliali intestinali, rendendole sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili. In alcuni particolari trovati, i composti del presente trovato comprendono una piccola molecola NHE-inibente collegata, accoppiata o altrimenti
15 attaccata ad una porzione Z, che può essere una porzione oligomerica, una porzione polimerica, una porzione idrofobica, una porzione idrofilica e/o una porzione carica, che rende il composto complessivo sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile. In alcuni trovati, la piccola molecola NHE-inibente è accoppiata ad una porzione multimerica o polimerica tale che la molecola NHE-Z risultante è sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile. La porzione multimerica o polimerica può avere un peso molecolare superiore a circa 500
25 Dalton (Da), circa 1000 Da, circa 2500 Da, circa 5000 Da, circa 10.000 Da o più e in particolare può avere un peso molecolare nell'intervallo da circa 1000 Dalton (Da) a circa 500.000 Da, preferibilmente nell'intervallo da circa 5000 a circa 200.000 Da, e più preferibilmente può avere un peso molecolare che è sufficientemente elevato per escludere essenzialmente qualsiasi assorbimento netto del composto attraverso uno strato di cellule
30 epiteliali intestinali. Per esempio, una piccola molecola NHE-inibente può essere collegata ad almeno una unità ripetitiva di una porzione polimerica secondo, per esempio, la struttura di Formula (XIIA) o Formula (XIIB), come qui illustrato. In questi ed altri particolari trovati, la piccola molecola NHE-inibente viene modificata come qui descritto per sostanzialmente ostacolare il suo assorbimento netto attraverso uno strato delle cellule epiteliali dell'intestino

e può comprendere, per esempio, un composto NHE-inibente legato, accoppiato o altrimenti attaccato ad una porzione “Core” sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non-biodisponibile, come sopra descritto.

C. Effetto Inibitorio Persistente

5 In altre forme di realizzazione, i composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili usati nei metodi di trattamento del presente trovato possono inoltre presentare un effetto inibitore persistente. Questo effetto si manifesta quando l'azione inibitoria di un composto ad una certa concentrazione in equilibrio con la cellula epiteliale (ad es., alla o al di sopra della sua concentrazione inibitoria, IC) non
10 ritorna alla linea di riferimento (cioè, il trasporto di sodio senza inibitore) dopo che il composto è esaurito per semplice lavaggio del contenuto del lume.

Questo effetto può essere interpretato come un risultato del legame stretto dei composti NHE-inibenti alla proteina NHE sul lato apicale intestinale della cellula epiteliale dell'intestino. Il legame può essere considerato quasi irreversibile nella misura in cui, dopo
15 che il composto è stato posto a contatto con la cellula epiteliale dell'intestino e successivamente lavato via da detta cellula epiteliale dell'intestino, il flusso del trasporto di sodio è ancora significativamente inferiore rispetto al controllo senza il composto. Questo effetto inibitorio persistente ha il chiaro vantaggio di mantenere l'attività del farmaco all'interno del tratto GI anche se il tempo di permanenza dell'attivo nel tratto GI superiore è
20 breve e quando nessun processo di riciclo entero-biliare è efficace per ripristinare la concentrazione del composto vicino al suo sito di azione.

Tale effetto inibitorio persistente ha un ovvio vantaggio in termini di accettazione del paziente, ma anche nella limitazione all'esposizione al farmaco all'interno del tratto GI.

L'effetto di persistenza può essere determinato utilizzando metodi *in vitro*; in un caso, le
25 linee cellulari che esprimono i trasportatori di NHE sono suddivise in varie fiale e trattate con un composto NHE-inibente e una soluzione di sodio per misurare la velocità di assorbimento del sodio. Le cellule in una serie di fiale vengono lavate per diversi periodi di tempo per rimuovere l'inibitore e la misurazione dell'assorbimento di sodio viene ripetuta dopo il lavaggio. I composti che mantengono l'effetto inibitorio dopo multiple/lunghe fasi di
30 lavaggio (rispetto all'effetto inibitorio misurato nelle fiale in cui il lavaggio non avviene) sono inibitori persistenti. L'effetto di persistenza può essere caratterizzato anche *ex vivo* usando la tecnica della sacca rivoltata, in cui il trasporto di Na viene monitorato usando un segmento reciso di GI perfuso con una soluzione contenente l'inibitore e subito dopo aver sciacquato la soluzione del bagno con una soluzione tampone priva di inibitore. Un effetto di

persistenza può anche essere caratterizzato *in vivo* osservando il tempo necessario affinché il bilancio del sodio torni alla normalità quando il trattamento inibitore viene interrotto. Il limite del metodo risiede nel fatto che le cellule apicali (e quindi i trasportatori di NHE apicali) vengono rimossi dopo un periodo di da 3 a 4 giorni, il tipico tempo di ricambio delle cellule epiteliali dell'intestino. Un effetto di persistenza può essere ottenuto aumentando il tempo di permanenza del composto attivo sulla superficie apicale delle cellule epiteliali dell'intestino; questo può essere ottenuto mediante la progettazione di inibitori dell'antiporto NHE con più porzioni di piccole molecole NHE-inibenti incorporate nella piccola molecola o oligomero (in cui "più" come qui usato tipicamente significa almeno circa 2, circa 4, circa 6 o più). Esempi di tali strutture nel contesto di analoghi dell'antibiotico vancomicina sono dati in Griffin, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 6517-6531. In alternativa, il composto comprende gruppi che contribuiscono ad aumentare l'affinità verso la cella epiteliale dell'intestino in modo da aumentare il tempo di contatto con la superficie delle cellule epiteliali dell'intestino. Tali gruppi sono indicati come essere "mucoadesivi". "Più specificamente, la porzione Core o L può essere sostituita da tali gruppi mucoadesivi, quali poliacrilati, chitosano parzialmente deacetilato o polialchilenglicole. (Vedi anche Patil, S.B. et al., *Curr. Drug. Deliv.*, 2008, Oct. 5(4), pp. 312-8.)

D. Resistenza agli enzimi GI

Poiché i composti usati nei metodi di trattamento del presente trovato sono preferibilmente sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili e/o preferibilmente presentano un effetto inibitorio persistente, è anche auspicabile che durante il loro prolungato tempo di permanenza nell'intestino questi composti sopportino le condizioni idrolitiche prevalenti nel tratto GI superiore. In tali forme di realizzazione, i composti del presente trovato sono resistenti al metabolismo enzimatico. Ad esempio, i composti somministrati sono preferibilmente resistenti all'attività di enzimi P450, glucucosil transferasi, sulfotransferasi, glutatione S-transferasi e simili, nella mucosa intestinale, così come gastrici (ad es. lipasi gastriche e pepsina), pancreatici (ad es. tripsina, lipasi pancreatica trigliceride, fosfolipasi A2, endonucleasi, nucleotidasi e alfa-amilasi) e di enzimi dell'orletto a spazzola (ad es. fosfatasi alcalina, glicosidasi e proteasi) generalmente noti nella tecnica.

I composti che sono usati nei metodi del presente trovato sono inoltre preferibilmente resistenti al metabolismo della flora batterica intestinale; cioè i composti non sono substrati per enzimi prodotti dalla flora batterica. Inoltre, i composti somministrati secondo i metodi del presente trovato possono essere sostanzialmente inattivi verso la flora gastrointestinale e non disturbare la crescita o la sopravvivenza batterica. Ne risulta che, in varie forme di

realizzazione qui, la minima concentrazione inibitoria (o "MIC") rispetto alla flora GI è auspicabilmente maggiore di circa 15 µg/ml, circa 30 µg/ml, circa 60 µg/ml, circa 120 µg/ml o addirittura circa 240 µg/ml, la MIC in varie forme di realizzazione essendo per esempio tra circa 16 e circa 32 µg/ml o tra circa 64 e circa 128 µg/ml o superiore a circa 256 µg/ml.

5 Per l'esperto nell'arte della chimica medicinale, la stabilità metabolica può essere ottenuta in diversi modi. La funzionalità suscettibile all'ossidazione mediata da P450 può essere protetta, ad esempio, bloccando il punto di metabolismo con un gruppo alogeno o altro gruppo funzionale. In alternativa, gruppi elettronattrattori possono essere aggiunti ad un sistema coniugato per fornire generalmente protezione all'ossidazione riducendo l'elettrofilicità del
10 composto. La stabilità proteolitica può essere ottenuta evitando legami ammidici secondari o incorporando cambiamenti nella stereochimica o altre modifiche che impediscono che il farmaco venga altrimenti riconosciuto come substrato dall'enzima metabolizzante.

E. Produzione di Sodio e/o Fluido

Si deve anche notare che, in varie forme di realizzazione del presente trovato, uno o più dei
15 composti NHE-inibenti (monovalenti o divalenti) descritti qui, quando vengono somministrati da soli o in combinazione con uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali (compresi, ad esempio, un polimero che assorbe fluido) ad un paziente che ne necessita, possono agire ad aumentare la produzione fecale giornaliera di sodio del
20 paziente da almeno circa 20, circa 30 mmol, circa 40 mmol, circa 50 mmol, circa 60 mmol, circa 70 mmol, circa 80 mmol, circa 90 mmol, circa 100 mmol, circa 125 mmol, circa 150 mmol o più, l'aumento essendo ad esempio nell'intervallo da circa 20 a circa 150 mmol/giorno o da circa 25 a circa 100 mmol/giorno o da circa 30 a circa 60 mmol/giorno

Inoltre, o in alternativa, si deve anche notare che, in varie forme di realizzazione del presente trovato, uno o più dei composti NHE-Z inibenti (monovalenti o divalenti) descritti qui,
25 quando somministrati da soli o in combinazione con uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali (incluso, ad esempio, un polimero che assorbe fluido) ad un paziente che ne necessita, possono agire ad aumentare la produzione di fluido giornaliera del paziente di almeno circa 100 ml, circa 200 ml, circa 300 ml, circa 400 ml, circa 500 ml, circa 600 ml, circa 700 ml, circa 800 ml, circa 900 ml, circa 1000 ml o più,
30 l'aumento essendo ad esempio nell'intervallo da circa 100 a circa 1000 ml/giorno oppure da circa 150 a circa 750 ml/giorno, o da circa 200 a circa 500 ml/giorno (assumendo il fluido isotonico).

F. C_{max} e IC_{50}

È anche da notare che, in varie forme di realizzazione del presente trovato, uno o più composti NHE-Z inibenti (monovalenti o divalenti) descritti qui, quando somministrati da soli o in combinazione con uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali (compreso, ad esempio, un polimero che assorbe fluido) ad un paziente che ne necessita ad una dose che produce almeno un aumento del 10% del contenuto fecale di acqua, hanno una C_{max} che è inferiore all' IC_{50} per NHE-3, più specificatamente, inferiore di circa 10X (10 volte) l' IC_{50} e, più precisamente ancora, inferiore di circa 100X (100 volte) l' IC_{50} .

Inoltre, o in alternativa, è anche da notare che, in varie forme di realizzazione del presente trovato, uno o più composti NHE-Z inibenti (monovalenti o divalenti) descritti qui, quando somministrati da soli o in combinazione con uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali (compreso, ad esempio, un polimero che assorbe fluido) ad un paziente che ne necessita, possono avere un C_{max} inferiore a circa 10 ng/ml, circa 7,5 ng/ml, circa 5 ng/ml, circa 2,5 ng/ml, circa 1 ng/ml, o circa 0,5 ng/ml, il C_{max} essendo per esempio nell'intervallo da circa 1 ng/ml a circa 10 ng/ml, o da circa 2,5 ng/ml a circa 7,5 ng/ml.

Inoltre, o in alternativa, si deve anche notare che, in varie forme di realizzazione del presente trovato, uno o più composti NHE-Z inibenti (monovalenti o divalenti) descritti qui, quando somministrati da soli o in combinazione con uno o più composti o agenti farmaceuticamente attivi addizionali (compreso ad esempio un polimero che assorbe fluido) ad un paziente che ne necessita, possono avere una IC_{50} inferiore a circa 10 μM , circa 7,5 μM , circa 5 μM , circa 2,5 μM , circa 1 μM o circa 0,5 μM , l' IC_{50} essendo per esempio nell'intervallo di da circa 1 μM a circa 10 μM , o da circa 2,5 μM a circa 7,5 μM .

Inoltre, o in alternativa, si deve anche notare che, in varie forme di realizzazione del presente trovato, uno o più dei composti NHE-Z inibenti (monovalenti o divalenti) descritti qui, quando somministrati ad un paziente che ne necessita, possono avere un rapporto $IC_{50}:C_{max}$, in cui IC_{50} e C_{max} sono espressi in termini di stesse unità, di almeno circa 10, circa 50, circa 100, circa 250, circa 500, circa 750 o circa 1000.

Inoltre, o in alternativa, si deve anche notare che, in varie forme di realizzazione del presente trovato, in cui uno o più composti NHE-Z inibenti (monovalenti o divalenti) come qui dettagliato vengono somministrati oralmente ad un paziente che ne necessita, all'interno dell'intervallo o concentrazione terapeutici, la concentrazione massima del composto rilevata nel siero, definita come C_{max} , è inferiore alla concentrazione NHE-inibitoria IC_{50} di detto composto. Come precedentemente notato, come qui utilizzato, IC_{50} è definito come la misura quantitativa che indica la concentrazione del composto richiesta per inibire il 50% dell'attività dell'antiporto Na/H mediato da NHE in un test basato su cellula.

IV. Composizioni Farmaceutiche e Metodi di Trattamento

A. Composizioni e Metodi

1. Disordini della Ritenzione di Fluidi e/o del Sovraccarico Salino

Una composizione o un preparato farmaceutico che può essere utilizzato secondo il presente
5 trovato per il trattamento di vari disordini associati a ritenzione di fluido e/o sovraccarico
salino nel tratto gastrointestinale (ad es., ipertensione, insufficienza cardiaca (in particolare,
insufficienza cardiaca congestizia), malattia renale cronica, malattia renale di fase terminale,
malattia epatica e/o ritenzione di fluido indotta da agonisti del recettore gamma attivato dai
10 proliferatori di perossisomi (PPAR) comprende, in generale, il composto NHE-inibente
sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile del
presente trovato, così come vari altri componenti facoltativi, come qui di seguito dettagliato
(ad es., eccipienti farmaceuticamente accettabili, ecc.). I composti utilizzati nei metodi di
trattamento del presente trovato, così come le composizioni farmaceutiche che li contengono,
15 possono essere di conseguenza somministrati da soli o come parte di un protocollo o regime
di trattamento che include la somministrazione o l'uso di altri composti benefici (come
ulteriormente dettagliati qui altrove). In alcune forme di realizzazione particolari, il
composto NHE-inibente, compresa qualsiasi composizione farmaceutica comprendente il
composto, viene somministrato con un polimero che assorbe fluido (come pienamente
descritto più avanti).

20 Un "soggetto" o "mammifero" è preferibilmente un essere umano, ma può essere anche un
animale che necessita di trattamento con un composto del trovato, ad es. animali da
compagnia (ad es. cani, gatti e simili), animali da allevamento (ad es. mucche, suini, cavalli e
simili) e animali da laboratorio (ad es. ratti, topi, cavie e simili).

Soggetti "che necessitano di trattamento" con un composto del presente trovato o soggetti
25 "che necessitano di NHE-inibizione" includono soggetti con malattie e/o condizioni che
possono essere trattati con composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o
sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili, con o senza un polimero che assorbe
fluido, per ottenere un benefico risultato terapeutico e/o profilattico. Un risultato benefico
include una diminuzione della gravità dei sintomi o ritardo nell'insorgenza dei sintomi,
30 maggiore longevità e/o una risoluzione più rapida o più completa della malattia o della
condizione. Ad esempio, un soggetto che necessita di un trattamento può soffrire di
ipertensione; di ipertensione sensibile al sale che può derivare dall'assunzione di sale
alimentare; di un rischio di disordine cardiovascolare (ad es., infarto miocardico,
insufficienza cardiaca congestizia e simili) derivanti dall'ipertensione; di insufficienza

cardiaca (ad es., insufficienza cardiaca congestizia) che provoca un sovraccarico di liquido o di sale; di malattia renale cronica che provoca un sovraccarico di liquidi o di sale, di malattia renale in fase terminale che causa un sovraccarico di fluido o di sale; di malattia del fegato che causa sovraccarico di liquido o di sale; di ritenzione di fluido indotta da agonisti del recettore gamma attivato dai proliferatori di perossisomi (PPAR); o di edema derivante da

5
10
15

insufficienza cardiaca congestizia o da malattia renale in fase terminale. In varie forme di realizzazione, un soggetto che necessita di trattamento mostra tipicamente segni di ipervolemia derivanti da ritenzione di fluidi e sale che sono caratteristiche comuni di insufficienza cardiaca congestizia, insufficienza renale o cirrosi epatica. La ritenzione di fluido e la ritenzione salina si manifestano col verificarsi di mancanza di fiato, edema, ascite o aumento di peso interdialitico. Altri esempi di soggetti che beneficerebbero del trattamento sono coloro che soffrono di insufficienza cardiaca congestizia e pazienti ipertesi e, in particolare, quelli che sono resistenti al trattamento con diuretici, cioè pazienti per i quali sono disponibili pochissime opzioni terapeutiche. Un soggetto "che necessita di

15

trattamento" include anche un soggetto con ipertensione, pressione sanguigna sensibile al sale e soggetti con pressione sanguigna sistolica/diastolica superiore a circa 130-139 / 85-89 mm Hg.

La somministrazione di composti NHE-inibenti, con o senza somministrazione di polimeri che assorbono fluidi, può essere benefica per pazienti che hanno adottato un regime dietetico

20

"senza aggiunta di sale" (cioè 60-100 mmol di Na al giorno), per liberalizzare la loro dieta mantenendo un equilibrio del sodio neutro o leggermente negativo (cioè l'assorbimento complessivo di sale sarebbe uguale a meno del sale secreto). In questo contesto, "liberalizzare la loro dieta" significa che i pazienti trattati possono aggiungere sale ai loro pasti per rendere i piatti più gradevoli e/o diversificare la loro dieta con alimenti contenenti

25

sale, mantenendo così un buon stato nutrizionale migliorando la loro qualità di vita.

I metodi di trattamento qui descritti possono anche aiutare pazienti con edema associato a chemioterapia, sovraccarico di fluido pre-mestruale e preeclampsia (ipertensione indotta da gravidanza).

Di conseguenza, va notato che il presente trovato è ulteriormente diretto a metodi di

30

trattamento che comportano la somministrazione del composto del presente trovato, o una composizione comprendente un tale composto. Tali metodi possono comprendere, ad esempio, un metodo per il trattamento dell'ipertensione, il metodo comprendendo la somministrazione al paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una composizione farmaceutica che lo

comprende. Il metodo può essere per ridurre il sovraccarico del fluido associato a insufficienza cardiaca (in particolare, insufficienza cardiaca congestizia), il metodo comprendendo la somministrazione al paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una
5 composizione farmaceutica che lo comprende. Il metodo può essere per ridurre il sovraccarico del fluido associato a malattia renale in stadio terminale, il metodo comprendendo la somministrazione al paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una
10 composizione che lo comprende. Il metodo può essere per ridurre il sovraccarico di fluido associato alla terapia agonista del recettore gamma attivato dai proliferatori di perossisomi (PPAR), il metodo comprendendo la somministrazione al paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una composizione che lo comprende. Inoltre, o alternativamente, il metodo
15 può essere per ridurre l'attività di un trasportatore di NHE intestinale in un paziente, il metodo comprendendo: somministrare al paziente un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una composizione che lo comprende.

2. Disordini del Tratto Gastrointestinale

Una composizione o un preparato farmaceutico che può essere usato secondo il presente
20 trovato per il trattamento di vari disordini del tratto gastrointestinale, compreso il trattamento o la riduzione del dolore associato a disordini del tratto gastrointestinale, comprende, in generale, qualsiasi piccola molecola, che può essere monovalente o polivalente, che è efficace o attiva come un NHE-inibitore e che è sostanzialmente attiva nel tratto GI, in particolare, un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente
25 sistemicamente non biodisponibile del presente trovato, così come vari altri componenti facoltativi, come descritto ulteriormente qui di seguito (ad es., eccipienti farmaceuticamente accettabili, ecc.). I composti usati nei metodi di trattamento del presente trovato, così come le composizioni farmaceutiche che li contengono, possono essere somministrati da soli o come parte di un protocollo o regime di trattamento che include la somministrazione o l'uso
30 di altri composti benefici (come ulteriormente dettagliati qui altrove). In alcune forme di realizzazione particolari, il composto NHE-inibente, inclusa qualsiasi composizione farmaceutica comprendente il composto, viene somministrato con un polimero che assorbe fluido (come più completamente descritto più avanti).

Un "soggetto" è preferibilmente un essere umano, ma può anche essere un animale che necessita di un trattamento con un composto del trovato, ad es., animali da compagnia (ad es. cani, gatti e simili), animali da allevamento (ad es. mucche, suini, cavalli e simili) e animali da laboratorio (ad es. ratti, topi, cavie e simili).

5 Soggetti "che necessitano di trattamento" con un composto del presente trovato o soggetti "che necessitano di NHE-inibizione" includono soggetti con malattie e/o condizioni che possono essere trattate con composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili, con o senza un polimero che assorbe fluido, per ottenere un benefico risultato terapeutico e/o profilattico. Un risultato benefico
10 include una diminuzione della gravità dei sintomi o ritardo nell'insorgenza dei sintomi, maggiore longevità e/o risoluzione più rapida o più completa della malattia o della condizione. Ad esempio, un soggetto che necessita di un trattamento è affetto da un disordine del tratto gastrointestinale; il paziente è affetto da un disordine scelto dal gruppo che consiste di: un disordine della motilità gastrointestinale, sindrome dell'intestino irritabile,
15 costipazione cronica, costipazione idiopatica cronica, costipazione cronica verificantesi in pazienti con fibrosi cistica, costipazione cronica verificantesi in pazienti con malattia renale cronica, costipazione indotta da calcio in pazienti osteoporotici, costipazione indotta da oppiacei, un disordine funzionale del tratto gastrointestinale, malattia da reflusso gastroesofageo, bruciore di stomaco funzionale, dispepsia, dispepsia funzionale, dispepsia non ulcerosa, gastroparesi, pseudo-ostruzione cronica intestinale, malattia di Crohn, colite
20 ulcerosa e malattie correlate denominate sindrome infiammatoria intestinale, pseudo-ostruzione del colon e simili.

In varie forme di realizzazione preferite, la costipazione da trattare è: associata all'uso di un agente terapeutico; associata a un disordine neuropatico; costipazione post-chirurgica (ileo
25 postoperatorio); associata a un disordine del tratto gastrointestinale; idiopatica (costipazione funzionale o costipazione da transito lento); associata a disordini neuropatici, metabolici o endocrini (ad es. diabete mellito, insufficienza renale, ipotiroidismo, ipertiroidismo, ipocalcemia, Sclerosi Multipla, malattia di Parkinson, lesioni del midollo spinale, neurofibromatosi, neuropatia autonoma, malattia di Chagas, malattia di Hirschsprung o
30 fibrosi cistica e simili). La costipazione può anche essere il risultato di un intervento chirurgico (ileo postoperatorio) o dovuta all'uso di farmaci quali analgesici (ad es., oppioidi), antipertensivi, anticonvulsivi, antidepressivi, antispasmodici e antipsicotici.

Di conseguenza, va notato che il presente trovato è ulteriormente diretto a metodi di trattamento che comportano la somministrazione del composto del presente trovato, o una

composizione farmaceutica comprendente un tale composto. Tali metodi possono comprendere, ad esempio, un metodo per aumentare la motilità gastrointestinale in un paziente, il metodo comprendendo la somministrazione al paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una composizione farmaceutica che lo comprende. Inoltre, o
5
alternativamente, il metodo può essere per diminuire l'attività di un trasportatore di NHE intestinale in un paziente, il metodo comprendendo: la somministrazione al paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una composizione che lo comprende. Inoltre, o in alternativa, il metodo
10
può essere per il trattamento di un disordine del tratto gastrointestinale, un disordine della motilità gastrointestinale, sindrome dell'intestino irritabile, costipazione cronica indotta da calcio in pazienti osteoporotici, costipazione cronica verificantesi in pazienti con fibrosi cistica, costipazione cronica verificantesi in pazienti con malattia renale cronica, un disordine funzionale del tratto gastrointestinale, malattia da reflusso gastroesofageo, bruciore
15
di stomaco funzionale, dispepsia, dispepsia funzionale, dispepsia non ulcerosa, gastroparesi, pseudo-ostruzione intestinale cronica, pseudo-ostruzione del colon, malattia di Crohn, colite ulcerosa, malattia infiammatoria intestinale, il metodo comprendendo la somministrazione di un antagonista dell'NHE intestinale, più in particolare, un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile, o una
20
composizione, o per via orale o per supposta rettale. Inoltre, o alternativamente, il metodo può essere per trattare o ridurre il dolore, compreso dolore viscerale, dolore associato ad un disordine del tratto gastrointestinale o dolore associato a qualche altro disordine, il metodo comprendendo la somministrazione a un paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente non biodisponibile, o una composizione.
25
Inoltre, o in alternativa, il metodo può essere per il trattamento dell'infiammazione, compresa l'infiammazione del tratto gastrointestinale, ad es. l'infiammazione associata a un disordine del tratto gastrointestinale o ad un'infezione o a qualche altro disordine, il metodo comprendendo la somministrazione a un paziente di un composto NHE-inibente sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente non biodisponibile, o una composizione.

30 **B. Terapie di Combinazione**

1. Disordini da Ritenzione di Fluidi e/o Sovraccarico Salino

Come precedentemente osservato, i composti qui descritti possono essere usati da soli o in combinazione con altri agenti. Ad esempio, i composti possono essere somministrati insieme a un diuretico (cioè, Diuretici dell'Ansa ad Alto Tetto, Diuretici Benzotiadiazidici, Diuretici

a Risparmio Di Potassio, Diuretici Osmotici), glicoside cardiaco, ACE inibitore, antagonista del recettore angiotensino-2, bloccante del canale del calcio, beta bloccante, alfa bloccante, alfa agonista centrale, vasodilatatore, diluente del sangue, agente anti-piastrinico, agente che diminuisce i lipidi, agente o composto agonista del recettore gamma attivato dai proliferatori di perossisomi (PPAR) o con un polimero che assorbe fluido come meglio descritto più
5 avanti. L'agente può essere fissato in modo covalente ad un composto descritto qui o può essere un agente separato somministrato insieme o in sequenza con un composto qui descritto in una terapia combinata.

La terapia combinata può essere ottenuta somministrando due o più agenti, ad es. un
10 composto NHE-inibente sostanzialmente non permeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile descritto qui e un diuretico, glicoside cardiaco, ACE inibitore, antagonista del recettore dell'angiotensina-2, bloccante del canale del calcio, beta bloccante, alfa bloccante, agonista alfa centrale, vasodilatatore, diluente del sangue, agente anti-piastrinico o composto, ognuno dei quali è formulato e somministrato separatamente, o
15 somministrando due o più agenti in una singola formulazione. Altre combinazioni sono incluse anche dalla terapia di combinazione. Ad esempio, due agenti possono essere formulati insieme e somministrati in combinazione con una formulazione separata contenente un terzo agente. Mentre i due o più agenti nella terapia combinata possono essere somministrati contemporaneamente, non è necessario che lo siano. Ad esempio, la
20 somministrazione di un primo agente (o combinazione di agenti) può precedere la somministrazione di un secondo agente (o combinazione di agenti) di minuti, ore, giorni o settimane. Così, i due o più agenti possono essere somministrati entro pochi minuti l'uno dall'altro o entro 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 o 24 ore l'uno dall'altro o entro 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 giorni l'uno dall'altro o entro 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o settimane l'uno dall'altro. In
25 alcuni casi sono possibili anche intervalli più lunghi. Mentre in molti casi è auspicabile che i due o più agenti usati in una terapia combinata siano presenti contemporaneamente all'interno del corpo del paziente, ciò non deve essere così.

La terapia combinata può anche includere due o più somministrazioni di uno o più agenti usati nella combinazione. Ad esempio, se l'agente X e l'agente Y vengono usati in una
30 combinazione, si potrebbero somministrare sequenzialmente in qualsiasi combinazione una o più volte, ad es. nell'ordine X-Y-X, X-X-Y, Y-X-Y, Y-Y-X, X-X-Y-Y ecc.

I composti qui descritti possono essere usati in terapia combinata con un diuretico. Tra gli agenti diuretici utili ci sono ad esempio: Diuretici dell'Ansa ad Alto Tetto [Furosemide (Lasix), Acido Etacrinico (Edecrin), Bumetanide (Bumex)], Diuretici Benzotiadiazidici

[Idroclorotiazide (Hydrodiuril), Clorotiazide (Diuril), Clortalidone (Hygroton) Benzotiazide (Aguapres), Bendroflumetiazide (Naturetin), Metilclotiazide (Aguatensen), Politiazide (Renese), Indapamide (Lozol), Ciclotiazide (Anhydron), Idroflumetiazide (Diucardin), Metolazone (Diulo), Quinetazone (Hydromox), Triclorometiazide (Naqua)], Diuretici a

5 Risparmio di Potassio [Spironolattone (Aldactone), Triamterene (Dyrenium), Amiloride (Midamor)] e Diuretici Osmotici [Mannitolo (Osmitrol)]. Gli agenti diuretici nelle varie classi sono noti e descritti in letteratura.

Glicosidi cardiaci (cardenolidi) o altri preparati digitalici possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra i glicosidi cardiaci utili ci sono, ad esempio:

10 Digitoxina (Crystodigin), Digoxina (Lanoxin) o Deslanoside (Cedilanid-D). I glicosidi cardiaci nelle varie classi sono descritti in letteratura.

Gli Inibitori dell'Enzima di Conversione dell'Angiotensina (ACE Inibitori) possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra gli ACE inibitori utili ci sono, ad esempio: Captopril (Capoten), Enalapril (Vasotec), Lisinopril (Prinivil). Gli ACE inibitori

15 nelle varie classi sono descritti in letteratura.

Antagonisti del Recettore dell'Angiotensina-2 (noti anche come AT₁-antagonisti o bloccanti del recettore dell'angiotensina, o ARB) possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra gli Antagonisti del Recettore dell'Angiotensina-2 utili ci sono, ad esempio, Candesartan (Atacand), Eprosartan (Teveten), Irbesartan (Avapro), Losartan

20 (Cozaar), Telmisartan (Micardis), Valsartan (Diovan). Antagonisti del Recettore dell'Angiotensina-2 nelle varie classi sono descritti in letteratura.

I bloccanti del canale di calcio come Amlodipina (Norvasc, Lotrel), Bepridil (Vascor), Diltiazem (Cardizem, Tiazac), Felodipina (Plendil), Nifedipina (Adalat, Procardia), Nimodipina (Nimotop), Nisoldipina (Sular), Verapamil (Calan, Isoptin, Verelan) e composti correlati descritti in, ad esempio, EP 625162B1, Brev. U.S. N. 5.364.842, brev. U.S. N. 5.587.454, brev. U.S. N. 5.824.645, brev. U.S. N. 5.859.186, brev. U.S. N. 5.994.305, brev. U.S. N. 6.087.091, brev. U.S. N. 6.136.786, WO 93/13128 A1, EP 1336409 A1, EP 835126 A1, EP 835126 B1, brev. U.S. N. 5.795.864, brev. U.S. N. 5.891.849, brev. U.S. N. 6.054.429, WO 97/01351 A1 possono essere usati con i composti del trovato.

25

I beta-bloccanti possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra i beta-bloccanti utili ci sono ad esempio: Acebutololo (Sectral), Atenololo (Tenormin), Betaxololo (Kerlone), Bisoprololo/idroclorotiazide (Ziac), Bisoprololo (Zebeta), Carteololo (Cartrol), Metoprololo (Lopressor, Toprol XL), Nadololo (Corgard), Propranololo (Inderal),

30

Sotalolo (Betapace), Timololo (Blocadren). I beta-bloccanti nelle varie classi sono descritti in letteratura.

5 Agonisti gamma PPAR come tiazolidindioni (chiamati anche glitazoni) possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra gli agonisti PPAR utili ci sono, ad esempio: rosiglitazone (Avandia), pioglitazone (Actos) e rivoglitazone.

Gli antagonisti dell'aldosterone possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra gli antagonisti dell'Aldosterone utili ci sono, ad esempio: eplerenone, spironolattone e canrenone.

10 Gli alfa bloccanti possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra gli Alfa bloccanti utili ci sono, ad esempio, Doxazosin mesilato (Cardura), Prazosin cloridrato (Minipress). Prazosin e politiazide (Minizide), Terazosin cloridrato (Hytrin). Gli alfa bloccanti nelle varie classi sono descritti in letteratura.

15 Gli alfa agonisti centrali possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra gli alfa agonisti Centrali utili ci sono, ad esempio: Clonidina cloridrato (Catapres), clonidina cloridrato e clortalidone (Clorpres, Combipres), Guanabenz Acetato (Wytensin), Guanfacina cloridrato (Tenex), Metildopa (Aldomet), Metildopa e clorotiazide (Aldochlor), Metildopa e idroclorotiazide (Aldoril). Gli alfa agonisti centrali nelle varie classi sono descritti in letteratura.

20 I vasodilatatori possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra i vasodilatatori utili ci sono, ad esempio: Isosorbide dinitrato (Isordil), Nesiritide (Natreacor), Idralazina (Apresoline), Nitrati/nitroglicerina, Minoxidil (Loniten). Vasodilatatori nelle varie classi sono descritti in letteratura.

25 I diluenti di sangue possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra i diluenti del sangue utili ci sono, ad esempio: Warfarin (Coumadin) e Eparina. I diluenti di sangue nelle varie classi sono descritti in letteratura.

30 Gli agenti anti-piastrinici possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Tra gli agenti anti-piastrinici utili ci sono, ad esempio: Inibitori della cicloossigenasi (Aspirin), inibitori del recettore dell'adenosina difosfato (ADP) [Clopidogrel (Plavix), Ticlopidine (Ticlid)], inibitori della fosfodiesterasi [Cilostazolo (Pletal)], inibitori della glicoproteina IIB/IIIA [Abciximab (ReoPro), Eptifibatide (Integrilin), Tirofiban (Aggrastat), Defibrotide], Inibitori della ricaptazione di adenosina [Dipiridamolo (Persantine)]. Gli agenti anti-piastrinici nelle varie classi sono descritti in letteratura.

Gli agenti che abbassano i lipidi possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia. Fra gli agenti che abbassano i lipidi utili ci sono: Statine (inibitori della HMG

CoA riduttori), [Atorvastatina (Lipitor), Fluvastatina (Lescol), Lovastatina (Mevacor, Altoprev), Pravastatina (Pravachol), Rosuvastatina Calcica (Crestor), Simvastatina (Zocor)],
inibitori selettivi dell'assorbimento del colesterolo [ezetimibe (Zetia)], Resine (sequestratori
di acidi biliari o farmaci che legano acidi biliari) [Colestiramina (Questran, Questran Light,
5 Prevalite, Locholest, Locholest Light), Colestipol (Colestid), Colesevelam Hcl (WelChol)],
Fibrati (Derivati dell'acido fibrico) [Gemfibrozil (Lopid), Fenofibrato (Antara, Lofibra,
Tricor e Triglide), Clofibrato (Atromide-S), Niacina (Acido Nicotinico). Gli agenti che
abbassano i lipidi nelle varie classi sono descritti in letteratura.

I composti del trovato possono essere usati in combinazione con peptidi o analoghi peptidici
10 che attivano il recettore della Guanilato Ciclastasi nell'intestino e provocano l'elevazione del
secondo messaggero intracellulare, o guanosina ciclica monofosfato (cGMP), con aumentata
secrezione di cloruro e bicarbonato nel lume intestinale e concomitante secrezione del fluido.
Esempi di tali peptidi sono Linaclotide (MD-1100 Acetato), ormoni endogeni guanilina e
uroguanilina e peptidi batterici enterici della famiglia di enterotossine stabili al calore
15 (peptidi ST) e quelli descritti in US 5140102, US 5489670, US 5969097, WO
2006/001931A2, WO 2008/002971A2, WO 2008/106429A2, US 2008/0227685A1 e US
7041786.

I composti del trovato possono essere usati in combinazione con agonisti del canale del cloro
di tipo 2, come Amitiza (Lubiprostone) e altri composti correlati descritti in US 6414016.

20 I composti del trovato possono essere usati in combinazione con agonisti del recettore P2Y2,
come quelli descritti in EP 1196396B1 e US 6624150.

Altri agenti includono peptidi natriuretici quali nesiritide, una forma ricombinante del
peptide natriuretico cerebrale (BNP) e un peptide natriuretico atriale (ANP). Gli antagonisti
del recettore del vasopressina come tolvaptano e conivaptan possono essere co-somministrati
25 così come leganti di fosfati come renagel, renleva, foslo e fosrenolo. Altri agenti
comprendono inibitori del trasporto di fosfati (come descritto nei brev. U.S. N. 4.806.532;
6.355.823; 6.787.528; 7.119.120; 7.109.184; Pub. Brev. U.S. N. 2007/021509;
2006/0280719; 2006/0217426; Publ. Brev Internazionale WO 2001/005398, WO
2001/087294, WO 2001/082924, WO 2002/028353, WO 2003/048134, WO 2003/057225,
30 WO2003/080630, WO 2004/085448, WO 2004/085382; Brev. Europei N. 1465638 e
1485391; e Brevetto JP N. 2007131532, o antagonisti del trasporto di fosfati come
Nicotinammide.

2. Disordini del Tratto Gastrointestinale

Come precedentemente osservato, i composti qui descritti possono essere usati da soli o in combinazione con altri agenti. Ad esempio, i composti possono essere somministrati insieme a un peptide o composto analgesico. Il peptide o composto analgesico può essere fissato in modo covalente ad un composto descritto qui o può essere un agente separato che è
5 somministrato insieme o in sequenza con un composto qui descritto in una terapia combinata.

La terapia combinata può essere ottenuta somministrando due o più agenti, ad es. un composto NHE-inibente sostanzialmente non permeabile o sostanzialmente non biodisponibile qui descritto e un peptide o composto analgesico, ognuno dei quali è
10 formulato e somministrato separatamente oppure somministrando due o più agenti in una singola formulazione. Anche altre combinazioni sono incluse dalla terapia combinata. Ad esempio, due agenti possono essere formulati insieme e somministrati in combinazione con una formulazione separata contenente un terzo agente. Mentre i due o più agenti nella terapia combinata possono essere somministrati contemporaneamente, ciò non è necessario. Ad
15 esempio, la somministrazione di un primo agente (o combinazione di agenti) può precedere la somministrazione di un secondo agente (o combinazione di agenti) di minuti, ore, giorni o settimane. Così, i due o più agenti possono essere somministrati entro pochi minuti l'uno dall'altro o entro 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 o 24 ore l'uno dall'altro o entro 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 giorni l'uno dall'altro o entro 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o settimane l'uno dall'altro. In
20 alcuni casi sono possibili anche intervalli più lunghi. Mentre in molti casi è auspicabile che i due o più agenti usati in una terapia combinata siano presenti contemporaneamente all'interno del corpo del paziente, non è necessario che sia così.

La terapia combinata può anche includere due o più somministrazioni di uno o più agenti usati nella combinazione. Ad esempio, se l'agente X e l'agente Y vengono usati in una
25 combinazione, potrebbero essere somministrati sequenzialmente in qualsiasi combinazione una o più volte, ad es. nell'ordine X-Y-X, X-X-Y, Y-X-Y, Y-Y-X, X-X-Y-Y ecc.

I composti qui descritti possono essere usati in terapia combinata con un agente analgesico, ad es. un composto analgesico o un peptide analgesico. L'agente analgesico può essere eventualmente fissato in modo covalente ad un composto qui descritto. Fra gli agenti
30 analgesici utili ci sono, ad esempio: bloccanti del canale del Ca, 5HT3 agonisti (ad es., MCK-733), 5HT4 agonisti (ad es., tegaserod, prucalopride) e antagonisti del recettore 5HT1, agonisti del recettore degli oppiacei (loperamide, fedotozina e fentanil), antagonisti del recettore NK1, agonisti del recettore CCK (ad es., loxiglumide), antagonisti del recettore NK1, antagonisti del recettore NK3, inibitori della ricaptazione della serotonina (NSR1),

agonisti del recettore dei cannabinoidi e vanilloidi e sialorfina. Gli agenti analgesici nelle varie classi sono descritti in letteratura.

Antagonisti e agonisti del recettore degli oppiacei possono essere somministrati con i composti del trovato in co-terapia o collegati al composto del trovato, ad es. mediante un
5 legame covalente. Ad esempio, gli antagonisti del recettore degli oppiacei come naloxone, naltrexone, metil naloxone, nalmefene, cipridime, beta funaltrexamina, naloxonazina, naltrindolo e nor-binaltorfimina sono considerati utili nel trattamento della costipazione indotta da oppiacei (OIC). Può essere utile formulare gli antagonisti degli oppiacei di questo
10 tipo in una formulazione a rilascio prolungato o ritardato, in modo tale che il rilascio iniziale dell'antagonista sia nell'intestino tenue medio e distale e/o colon ascendente. Tali antagonisti sono descritti in US 6.734.188 (WO 01/32180 A2). Il pentapeptide encefalina (HOE825; Tyr-D-Lys-Gly-Phe-L-omoserina) è un agonista dei recettori μ - e γ -oppioidi ed è ritenuto utile per aumentare la motilità intestinale (*Eur. J. Pharm.*, 219:445, 1992), e questo peptide può essere usato in combinazione con i composti del trovato. Utile è anche trimebutina che si
15 pensa legarsi ai recettori oppioidi μ /delta/kappa e attivare il rilascio di motilina e modulare il rilascio di gastrina, peptide intestinale vasoattivo, gastrina e glucagoni. Gli agonisti del recettore K-oppioidi come fedotozina, ketociclazocina e i composti descritti in US 2005/0176746 (WO 03/097051 A2) possono essere usati con o collegati ai composti del trovato. Inoltre, possono essere usati agonisti del recettore μ -oppioidi, come morfina,
20 difenilossilato, frakefamide (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂, descritti in WO 01/019849 A1 e loperamide.

Tyr-Arg (kyotorfin) è un dipeptide che agisce stimolando il rilascio di met-enkefaline per ottenere un effetto analgesico (*J. Biol. Chem.* 262:8165, 1987). Kyotorfin può essere usato con o collegato ai composti del trovato. Agonisti del recettore CCK come ceruleina da anfibi
25 e altre specie sono agenti analgesici utili che possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

I peptidi di conotossina rappresentano una grande classe di peptidi analgesici che agiscono su canali del Ca voltaggio-dipendenti, recettori NMDA o recettori nicotinici. Questi peptidi possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

30 Analoghi peptidici di timulina (US 7.309.690 o FR 2830451) possono avere attività analgesica e possono essere usati con o collegate ai composti del trovato.

Antagonisti del recettore CCK (CCKa o CCKb), inclusi loxiglumide e dexloxiglumide (l'isomero R di loxiglumide) (US 5.130.474 o WO 88/05774) possono avere attività analgesica e possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

Altri agenti analgesici utili includono agonisti 5-HT₄ come tegaserod/zelnorm e lirexapride. Tali agonisti sono descritti in: EP1321142 A1, WO 03/053432A1, EP 505322 A1, EP 505322 B1, EP 507672 A1, EP 507672 B1, brev. U.S. N. 5.510.353 e brev. U.S. N. 5.273.983

5 Bloccanti del canale del calcio come ziconotide e composti correlati descritti in, ad esempio, EP 625162B1, brev. U.S. N. 5.364.842, brev. U.S. N. 5.587.454, brev. U.S. N. 5.824.645, brev. U.S. N. 5.859.186, brev. U.S. N. 5.994.305, brev. U.S. N. 6.087.091, brev. U.S. N. 6.136.786, WO 93/13128 A1, EP 1336409 A1, EP 835126 A1, EP 835126 B1, brev. U.S. N. 5.795.864, brev. U.S. N. 5.891.849, brev. U.S. N. 6.054.429, WO 97/01351 A1 possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

Vari antagonisti dei recettori NK-1, NK-2 e NK-3 (per una rassegna vedi Giardina et al. 2003 Drugs 6:758) possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

Antagonisti del recettore NK1 quali: aprepitant (Merck & Co Inc), vofopitant, ezlopitant (Pfizer, Inc.), R-673 (Hoffmann-La Roche Ltd), SR-14033 e composti correlati descritti in, ad esempio, EP 873753 A1, U.S. 20010006972 A1, U.S. 20030109417 A1, WO 01/52844 A1 possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

Antagonisti del recettore K-2, come nepadutant (Menarini Ricerche SpA), saredutant (Sanofi-Synthelabo), SR-144190 (Sanofi-Synthelabo) e UK-290795 (Pfizer Inc) possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

20 Antagonisti del recettore K3 come osanetant (Sanofi-Synthelabo), talnetant e composti correlati descritti in, ad esempio, WO 02/094187 A2, EP 876347 A1, WO 97/21680 A1, brev. U.S. N. 6.277.862, WO 98/11090, WO 95/28418, WO 97/19927 e Boden et al. (J Med. Chem. 39:1664-75, 1996) possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

Inibitori della ricaptazione della norepinefrina-serotonina come milnacipran e composti correlati descritti in WO 03/077897 A1 Antagonisti del recettore dei vanilloidi quali arvanil e composti correlati descritti in WO 01/64212 A1 possono essere usati con o collegati ai composti del trovato.

I composti possono essere utilizzati in terapia combinata con un inibitore della fosfodiesterasi (esempi di tali inibitori possono essere trovati nel brev. U.S. N. 6.333.354.

30 I composti possono essere usati da soli o in terapia combinata per trattare disordini associati a secrezione di cloruro o bicarbonato che possono portare a costipazione, ad es. Fibrosi Cistica.

I composti possono anche o alternativamente essere usati da soli o in terapia combinata per trattare gli effetti di costipazione indotti dal calcio. La costipazione è comunemente

riscontrata nella popolazione geriatrica, in particolare nei pazienti con osteoporosi che devono assumere integratori di calcio. Gli integratori di calcio hanno dimostrato di essere vantaggiosi nei pazienti osteoporotici per ripristinare la densità ossea, ma la accettabilità è scarsa a causa degli effetti di costipazione ad essi associati.

5 I composti del presente trovato possono essere usati in combinazione con un oppioide. L'uso di oppioidi è principalmente diretto al sollievo del dolore, con un notevole effetto collaterale nel disordine GI, ad es. costipazione. Questi agenti operano legandosi ai recettori oppioidi, che si trovano principalmente nel sistema nervoso centrale e nel tratto gastrointestinale. I recettori in questi due sistemi di organi mediano sia gli effetti benefici, sia gli effetti
10 collaterali indesiderati (ad es. riduzione della motilità intestinale e conseguente costipazione). Gli oppioidi adatti all'uso appartengono di norma a una delle seguenti classi esemplificative: oppiacei naturali, alcaloidi contenuti nella resina del papavero da oppio, tra cui morfina, codeina e tebaina; oppiati semi-sintetici, creati dagli oppiacei naturali, come idromorfone, idrocodone, ossicodone, ossimorfone, desomorfina, diacetilmorfina (eroina),
15 nicomorfina, dipropanoilmorfina, benzilmorfina e etilmorfina; oppiacei completamente sintetici, come fentanil, petidina, metadone, tramadolo e propossifene; peptidi endogeni oppiacei, prodotti naturalmente nel corpo, quali endorfine, enkefaline, dinorfine e endomorfine.

Il composto del trovato possono essere usati da soli o in terapia combinata per alleviare i
20 disordini GI incontrati in pazienti con insufficienza renale (fase 3-5). La costipazione è il secondo sintomo più riportato in quella categoria di pazienti (Murtagh et al., 2006; Murtagh et al., 2007a; Murtagh et al., 2007b). Senza essere legati dalla teoria, si ritiene che l'insufficienza renale sia accompagnata da una stimolazione del riassorbimento intestinale di Na (Hatch e Freel, 2008). L'inibizione totale o parziale di tale trasporto mediante
25 somministrazione dei composti del trovato può avere un beneficio terapeutico nel migliorare il transito GI e alleviare il dolore addominale. In questo contesto, i composti del trovato possono essere usati in combinazione con agenti modulanti l'Angiotensina: inibitori dell'Enzima di Conversione dell'Angiotensina (ACE) (ad es. captopril, enalapril, lisinopril, ramipril) e terapia antagonista del recettore dell'Angiotensina II (noti anche come AT₁-
30 antagonisti o bloccanti del recettore dell'angiotensina o ARB); diuretici quali diuretici dell'ansa (ad es. furosemide, bumetanide), diuretici tiazidici (ad es. idroclorotiazide, clortalidone, clortiazide) e diuretici a risparmio di potassio: amiloride; beta-bloccanti: bisoprololo, carvedilolo, nebivololo e metoprololo a rilascio prolungato; inotropi positivi: digossina, dobutamina; inibitori della fosfodiesterasi come milrinone; vasodilatatori

alternativi: combinazione di isosorbide dinitrato/idralazine; antagonisti del recettore dell'aldosterone: spironolattone, eplerenone; peptidi natriuretici: Nesiritide, una forma ricombinante del peptide natriuretico cerebrale (BNP), peptide natriuretico atriale (ANP); antagonisti del recettore della vasopressina: Tolvaptano e conivaptano; legante dei fosfati (Renagel, Renleva, Phoslo, Fosrenol);
5 in US 4806532, US 6355823, US 6787528, WO 2001/005398, WO 2001/087294, WO 2001/082924, WO 2002/028353, WO 2003/048134, WO 2003/057225, US 7119120, EP 1465638, Dom. US 2007/021509, WO 2003/080630, US 7109184, Dom. US 2006/0280719, EP 1485391, WO 2004/085448, WO 2004/085382, Dom. US 2006/0217426, JP
10 2007/131532, o antagonista del trasporto dei fosfati (Nicotinammide).

I composti del trovato possono essere usati in combinazione con peptidi o analoghi peptidici che attivano il recettore della Guanilato Ciclastasi nell'intestino e provocano l'elevazione del secondo messaggero intracellulare, o guanosina monofosfato ciclica (cGMP), con una maggiore secrezione di cloruro e bicarbonato nel lume intestinale e concomitante secrezione
15 di fluido. Esempio di tali peptidi sono Linaclotide (MD-1100 Acetato), ormoni endogeni guanilina e uroguanilina e peptidi batterici enterici della famiglia delle enterotossine stabili al calore (peptidi ST) e quelli descritti in US 5140102, US 5489670, US 5969097, WO 2006/001931A2, WO 2008/002971A2, WO 2008/106429A2, US 2008/0227685A1 e US 7041786.

20 I composti del trovato possono essere usati in combinazione con agonisti del canale del cloro di tipo 2, come Amitiza (Lubiprostone) e altri composti correlati descritti in US 6414016.

I composti del trovato possono essere usati in combinazione con agonisti del recettore P2Y2, come quelli descritti in EP 1196396B1 e US 6624150.

I composti del trovato possono essere usati in combinazione con agenti lassativi quali agenti
25 che producono massa, ad es. polvere di psillio (Metamucil), metilcellulosa (Citrucel), policarbofil, fibra alimentare, mele, ammorbidenti/tensioattivi delle feci come docusato (Colace, Diocto); agenti idratanti (osmotici), quali fosfato di sodio dibasico, citrato di magnesio, idrossido di magnesio (latte di magnesia), solfato di magnesio (che è sale di Epsom), fosfato di sodio monobasico, bifosfato di sodio; agenti iperosmotici: supposte di
30 glicerina, sorbitolo, lattulosio e polietilenglicole (PEG). I composti del trovato possono anche essere usati in combinazione con agenti che stimolano la peristalsi intestinale, come compresse di Bisacodil (Dulcolax), Casantranolo, Senna e Aloina, da Aloe Vera.

In una forma di realizzazione, i composti del trovato accelerano il transito gastrointestinale, e più specificamente nel colon, senza influenzare sostanzialmente il tempo di permanenza

nello stomaco, cioè senza alcun effetto significativo sul tempo di svuotamento gastrico. Ancor più in particolare i composti dell'invenzione ristabiliscono il transito nel colon senza gli effetti collaterali associati a ritardi dello svuotamento gastrico, come la nausea. Il transito GI e nel colon sono misurati in pazienti usando metodi riportati in, ad esempio: Burton DD, Camilleri M, Mullan BP, et al., *J. Nucl. Med.*, 1997;38: 1807-1810; Cremonini F, Mullan BP, Camilleri M, et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2002;16:1781-1790; Camilleri M, Zinsmeister AR, *Gastroenterology*, 1992;103,36-42; Bouras EP, Camilleri M, Burton DD, et al., *Gastroenterology*, 2001;120:354-360; Coulie B, Szarka LA, Camilleri M, et al., *Gastroenterology*, 2000;119:41-50; Prather CM, Camilleri M, Zinsmeister AR, et al., *Gastroenterology*, 2000;118:463-468; e Camilleri M, McKinzie S, Fox J et al., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*,2004;2:895-904.

C. Terapia Combinata con Polimero

I composti NHE-inibenti qui descritti possono essere somministrati a pazienti che ne necessitano in combinazione con un polimero che assorbe fluido ("FAP"). I polimeri che assorbono fluidi intestinali utili per la somministrazione secondo le forme di realizzazione del presente trovato possono essere somministrati per via orale in combinazione con composti NHE-inibenti non assorbibili (ad es. un inibitore NHE-3) per assorbire il fluido intestinale risultante dall'azione degli inibitori del trasporto di sodio. Tali polimeri si gonfiano nel colon e legano il fluido per dare una consistenza alle feci che è accettabile per i pazienti. I polimeri che assorbono fluidi qui descritti possono essere scelti tra polimeri con proprietà lassative, indicati anche come agenti di ammassamento (cioè polimeri che mantengono dei fluidi intestinali nelle feci e conferiscono un maggiore grado di idratazione nelle feci e facilitano il transito). I polimeri che assorbono fluidi possono anche essere scelti eventualmente tra polimeri farmaceutici con funzione anti-diarrea, cioè agenti che mantengono una certa consistenza delle feci per evitare feci acquose e potenziale incontinenza.

La capacità del polimero di mantenere una certa consistenza delle feci con un elevato contenuto di fluido può essere caratterizzata dal suo "potere di tenuta dell'acqua". "Wenzl et al. (in *Determinants of decreased fecal consistency in patients with diarrhea*; *Gastroenterology*, v. 108, no. 6, p. 1729-1738 (1995)) hanno studiato le determinanti che controllano la consistenza delle feci di pazienti con diarrea e trovato che erano strettamente correlati con il potere di tenuta dell'acqua delle feci. Il potere di tenuta dell'acqua è determinato come il tenore d'acqua di date feci per ottenere un certo livello di consistenza (corrispondente alla consistenza di "feci formate") dopo che la materia fecale ricostituita è

stata centrifugata ad un determinato numero di g. Senza essere tenuti ad alcuna teoria particolare, è stato trovato che il potere di tenuta dell'acqua delle feci è aumentato per ingestione di taluni polimeri con un dato profilo di assorbimento dei fluidi. Più in particolare, è stato trovato che il potere di tenuta dell'acqua di detti polimeri è correlato con la loro
5 assorbanza di fluidi sotto carico (AUL); ancor più in particolare l'AUL di detti polimeri è superiore a 15 g di fluido isotonico/g di polimero sotto pressione statica di 5kPa, ancora più preferibilmente sotto pressione statica di 10kPa.

Il FAP usato nel metodo di trattamento del presente trovato preferibilmente ha un AUL di almeno circa 10 g, circa 15 g, circa 20 g, circa 25 g o più di fluido isotonico/g di polimero
10 sotto una pressione statica di circa 5 kPa e preferibilmente di circa 10 kPa e può avere un'assorbanza di fluido di circa 20 g, circa 25 g o più, come determinato usando mezzi noti in genere nell'arte. Inoltre, o in alternativa, il FAP può fornire una consistenza minima alla materia fecale e, in alcune forme di realizzazione, una consistenza classificata come "morbida" nella scala descritta nel metodo di prova di seguito, quando la frazione solida
15 fecale non solubile in acqua è dal 10% al 20% e la concentrazione di polimero è da 1% a 5% del peso delle feci. La determinazione della frazione solida fecale non solubile in acqua di feci è descritta in Wenz et al. Il polimero può essere non carico o può avere una bassa densità di carica (ad es., 1-2 meq/gr). In alternativa o in aggiunta, il polimero può essere somministrato direttamente al colon usando metodi di somministrazione noti per evitare
20 prematuro rigonfiamento nell'esofago.

In una forma di realizzazione del presente trovato, il FAP è un polimero "superassorbente" (cioè un idrogel polielettrolitico leggermente reticolato e parzialmente neutralizzato simile a quelli usati nei pannolini, prodotti igienici femminili, additivi agricoli, ecc.). I polimeri superassorbenti possono essere fatti da un idrogel di poliacrilato leggermente reticolato. Il
25 rigonfiamento del polimero è guidato sostanzialmente da due effetti: (i) l'idratazione dello scheletro polimerico e l'entropia di miscelazione e (ii) la pressione osmotica derivante dai contro-ioni (ad es. ioni Na) all'interno del gel. Il rapporto di rigonfiamento del gel all'equilibrio è controllato dalla resistenza elastica inerente alla rete del polimero e dal potenziale chimico del fluido da bagno, cioè, il gel si sgonfierà a maggiore concentrazione
30 salina perché l'elettrolita di fondo ridurrà la densità di carica apparente sul polimero e ridurrà la differenza di concentrazioni di ioni liberi all'interno e all'esterno del gel che guida la pressione osmotica. Il rapporto di rigonfiamento SR (g di fluido per g di polimero secco e sinonimo di "assorbanza di fluidi") può variare da 1000 in acqua pura fino a 30 in soluzione di NaCl allo 0,9% rappresentativa della salina fisiologica (cioè isotonica). SR può aumentare

con il grado di neutralizzazione e può diminuire con la densità di reticolazione. SR generalmente diminuisce con un carico applicato con la portata della riduzione dipendente dalla forza del gel, cioè dalla densità di reticolazione. La concentrazione salina all'interno del gel, rispetto alla soluzione esterna, può essere inferiore a causa dell'effetto Donnan dovuto al
5 potenziale elettrico interno.

Il polimero che assorbe fluido può includere poliacrilati reticolati che sono assorbenti fluidi come quelli preparati da monomeri α,β -etilenicamente insaturi, quali acidi monocarbossilici, acidi policarbossilici, acrilammide e loro derivati. Questi polimeri possono avere unità
10 ripetitive di acido acrilico, acido metacrilico, sali metallici dell'acido acrilico, acrilammide e derivati dell'acrilammide (come acido 2-acrilammido-2-metilpropansolfonico) insieme a varie combinazioni di tali unità ripetitive come copolimeri. Tali derivati includono polimeri acrilici che includono innesti idrofilici di polimeri come l'alcool polivinilico. Esempi di polimeri e processi idonei, inclusi i processi di polimerizzazione a gel, per la preparazione di tali polimeri sono descritti nei brev. U.S. N. 3.997.484; 3.926.891; 3.935.099; 4.090.013;
15 4.093.776; 4.340.706; 4.446.261; 4.683.274; 4.459.396; 4.708.997; 4.076.663; 4.190.562; 4.286.082; 4.857.610; 4.985.518; 5.145.906; 5, 669, 377 e 6, 908, 609 (inoltre, vedere Buchholz, F.L. e Graham, A.T., "Modern Superabsorbent Polymer Technology", John Wiley & Sons (1998). Una classe di polimeri preferiti per il trattamento in combinazione con NHE-inibitori è i polielettroliti.

20 Il grado di reticolazione può variare notevolmente a seconda dello specifico materiale polimerico; tuttavia, nella maggior parte delle applicazioni, i polimeri superassorbenti in oggetto sono solo leggermente reticolati, cioè, il grado di reticolazione è tale che il polimero può ancora assorbire più di 10 volte il suo peso in salina fisiologica (cioè 0,9% salina). Ad esempio, tali polimeri includono tipicamente meno di circa 0,2 moli% di agente reticolante.

25 In alcune forme di realizzazione, i FAP usati per il trattamento sono Carbofil Calcico (numero di registro: 9003-97-8, noto anche come Carbopol EX-83) e Carpopol 934P.

In alcune forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi viene preparato con processi di emulsione a fase interna elevata ("HIPE"). Il processo HIPE porta a lastre di schiuma polimeriche con una frazione porosa molto grande di vuoti grandi interconnessi (circa 100
30 micron) (cioè, strutture a cellule aperte). Questa tecnica produce materiali schiumosi flessibili e pieghevoli con eccezionali pressioni di aspirazione e assorbanza del fluido (vedere Brevetti U.S. N. 5.650.222, 5.763.499 e 6.107.356, che sono qui incorporati per tutti gli scopi rilevanti e coerenti). Il polimero è idrofobico e quindi la superficie deve essere modificata in modo da essere bagnata dal fluido acquoso. Ciò avviene post-trattando il

materiale schiumoso con un tensioattivo per ridurre la tensione di interfaccia. Questi materiali sono dichiarati meno conformi ai carichi, cioè meno soggetti a sgonfiore sotto pressione statica.

5 In alcune forme di realizzazione, i gel che assorbono fluido vengono preparati mediante polimerizzazione radicalica libera acquosa di acrilammide o un suo derivato, un reticolante (ad es., metilene-bis-acrilammide) e un sistema redox iniziatore di radicali liberi in acqua. Il materiale viene ottenuto come lastra. In genere il rapporto di rigonfiamento della poliacrilammide reticolata a bassa densità di reticolazione (ad es., 2%-4% espresso in peso% di metilene-bis-acrilammide) è compreso fra 25 e 40 (F. Horkay, *Macromolecules*, 22, pp. 10 2007-09 (1989)). Le proprietà di rigonfiamento di questi polimeri sono state ampiamente studiate e sono sostanzialmente uguali a quelle degli acidi poliacrilici reticolati ad alta concentrazione salina. In queste condizioni, la pressione osmotica è nulla per la presenza di controioni e il rigonfiamento è controllato dall'energia libera di miscelazione e dall'energia elastica della rete. Detto diversamente, un gel di poliacrilammide reticolato della stessa 15 densità di reticolazione di un acido poliacrilico neutralizzato presenterà lo stesso rapporto di rigonfiamento (cioè, proprietà di assorbimento del fluido) e si ritiene lo stesso grado di sgonfiamento sotto pressione, come il polielettrolita reticolato ad elevato contenuto salino (ad es., 1 M). Le proprietà (ad es. rigonfiamento) di idrogeli neutri non saranno sensibili all'ambiente salino finché il polimero rimane in buone condizioni di solvente. Senza essere 20 tenuti ad alcuna teoria particolare, si ritiene che il fluido contenuto nel gel abbia la stessa composizione salina del fluido circostante (cioè, non vi è alcuna partizione di sale dovuta all'effetto Donnan).

Un'altra sottoclasse di polimeri che assorbono fluidi che possono essere usati sono materiali idrogelici che includono polimeri di N-alchil acrilammide (ad es., N-isopropilacrilammide 25 (NIPAM)). Il corrispondente idrogel acquoso di poliNIPAM mostra una transizione di temperatura a circa 35°C. Sopra questa temperatura l'idrogel può collassare. Il meccanismo è generalmente reversibile e il gel si sgonfia al suo rapporto di rigonfiamento originale quando la temperatura ritorna a temperatura ambiente. Ciò consente la produzione di nanoparticelle mediante polimerizzazione in emulsione (R. Pelton, *Advances in Colloid and Interface Science*, 85, pp. 1-33 (2000)). Sono state riportate le caratteristiche di rigonfiamento delle 30 nanoparticelle poli-NIPAM al di sotto della temperatura di transizione e sono simili a quelle riportate per il gel di massa di poliNIPAM e equivalenti a quelle trovate per la poliacrilammide (cioè 30-50 g/g) (W. McPhee, *Journal of Colloid and Interface Science*,

156, pp. 24-30 (1993); e K. Oh, *Journal of Applied Polymer Science*, 69, pp. 109-114 (1997)).

In alcune forme di realizzazione, il FAP usato per il trattamento in combinazione con un NHE-inibitore è un gel superporoso che può ritardare lo svuotamento dello stomaco per il
5 trattamento dell'obesità (J. Chen, *Journal of Controlled Release*, 65, pp. 73-82 (2000), o per somministrare proteine. Può anche essere usato SAP a base di poliacrilato con una struttura macroporosa. SAP macroporosi e gel superporosi differiscono in quanto la struttura porosa rimane quasi intatta allo stato secco per i gel superporosi, ma scompare dopo essiccazione per i SAP macroporosi. Il metodo di preparazione è diverso, anche se entrambi i metodi
10 usano un agente schiumogeno (ad es., sale carbonato che genera bolle di CO₂ durante la polimerizzazione). Rapporti tipici di rigonfiamento, SR, di materiali superporosi sono circa 10. I gel superporosi mantengono un grande volume interno dei pori nello stato asciutto.

Possono anche essere formati idrogeli macroporosi usando un metodo per la separazione della fase polimerica indotta da un non solvente. Il polimero può essere poli-NIPAM e il non
15 solvente usato può essere glucosio (vedi, ad es., Z. Zhang, *J. Org. Chem.*, 69, 23 (2004)) o NaCl (vedi, ad es., Cheng et al., *Journal of Biomedical Materials Research - Parte A*, Vol. 67, Numero 1, 1 ottobre 2003, pagine 96-103). La separazione di fase indotta dalla presenza di NaCl porta ad un aumento del rapporto di rigonfiamento. Questi materiali sono preferiti se il rapporto di rigonfiamento del materiale, SR, viene mantenuto in soluzione salina isotonica
20 e se i gel non collassano sotto carico. La temperatura di "servizio" dovrebbe essere spostata oltre la temperatura corporea, ad es. diluendo NIPAM nel polimero con monomero privo di fenomeno della temperatura di transizione.

In alcune forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi può essere scelto da certi polimeri presenti in natura, come quelli contenenti porzioni di carboidrati. In una forma di
25 realizzazione preferita, tali idrogeli contenenti carboidrati non sono digeribili, hanno una bassa frazione di materiale solubile e una elevata frazione di materiali che formano gel. In alcune forme di realizzazione, il polimero che assorbe fluidi è scelto tra xantano, guar, wellan, emicellulose, alchilcellulosa, idroalchilcellulosa, carbossialchilcellulosa, carragenina, destrano, acido ialuronico e agarosio. In una forma di realizzazione preferita, il polimero che
30 forma il gel è psillio. Psillio (o "ispaghula") è il nome comune utilizzato per diversi membri della pianta del genere *Plantago* i cui semi sono usati commercialmente per la produzione di mucillagine. Più preferibilmente, il polimero che assorbe fluido è nella frazione formante gel dello psillio, ovvero un copolimero di saccaride neutro di arabinosio (25%) e xilosio (75%) come caratterizzato in (J. Marlett, *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, pp. 2-7-209

(2003) e, M. Fischer, *Carbohydrate Research*, 339, 2009-2012 (2004)), e descritti inoltre nei Brev. U.S. N. 6.287.609; 7.026.303; 5.126.150; 5.445.831; 7.014.862; 4.766.004; 4.999.200, ognuno di essi è qui incorporato per tutti gli scopi rilevanti e coerenti, e gli agenti contenenti psillio da banco come quelli commercializzati sotto il nome di Metamucil (The Procter and Gamble company). Preferibilmente la forma di dosaggio contenente psillio è adatta da masticare, in cui l'azione di masticazione disintegra la compressa in particelle discrete più piccole prima della deglutizione ma che subisce una minima gelificazione in bocca e ha accettabile sensazione in bocca e buona estetica come percepita dal paziente.

La forma di dosaggio contenente psillio comprende un'unità fisicamente discreta adatta come dosaggio unitario per soggetti umani e altri mammiferi, ognuna contenente una quantità prestabilita di materiale attivo (ad es. il polisaccaride formante gel) calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato. Forme orali solide di dosaggio che sono adatte per le presenti composizioni comprendono compresse, pillole, capsule, pastiglie, compresse masticabili, pasticche, cachet, pellet, cialde e simili.

In alcune forme di realizzazione, il FAP è una particella di polisaccaride in cui il componente polisaccaride comprende xilosio e arabinosio. Il rapporto tra xilosio e arabinosio può essere almeno di circa 3:1 in peso, come descritto nei brev. U.S. N. 6.287.609; 7.026.303 e 7.014.862, ognuno dei quali è qui incorporato per tutti gli scopi rilevanti e coerenti.

I polimeri che assorbono fluidi qui descritti possono essere usati in combinazione con il composto NHE-inibente o una composizione farmaceutica che lo contiene. L'inibitore NHE e il FAP possono anche essere somministrati con altri agenti, inclusi quelli descritti nella rubrica "Terapie di combinazione", senza allontanarsi dallo scopo del presente trovato. Come sopra descritto, l'inibitore NHE può essere somministrato senza uso di un polimero che assorbe fluido per risolvere i sintomi senza provocare diarrea significativa o secrezione di fluido fecale che richiederebbe la co-somministrazione di un polimero che assorbe fluidi.

I polimeri che assorbono fluidi qui descritti possono essere scelti in modo da non indurre alcuna interazione sostanziale con il composto NHE-inibente o con una composizione farmaceutica contenente il composto. Come qui usato, "nessuna interazione sostanziale" in generale significa che la co-somministrazione del polimero FAP non altererebbe sostanzialmente (cioè, né sostanzialmente diminuire né sostanzialmente aumentare) la proprietà farmacologica dei composti NHE-inibenti somministrati da soli. Ad esempio, i FAP contenenti funzionalità cariche negativamente, come carbossilati, solfonati e simili, possono potenzialmente interagire ionicamente con inibitori NHE carichi positivamente,

impedendo all'inibitore di raggiungere il suo obiettivo farmacologico. Inoltre, può essere possibile che la forma e la disposizione della funzionalità in un FAP possano agire come elemento di riconoscimento molecolare e sequestrare inibitori NHE mediante interazioni "ospite-ospite" attraverso il riconoscimento di legami idrogeno specifici e/o regioni idrofobiche di un dato inibitore. Di conseguenza, in varie forme di realizzazione del presente trovato, il polimero FAP può essere scelto, per la co-somministrazione o l'uso con un composto del presente trovato, per garantire che (i) non interagisca ionicamente con o si leghi con il composto del presente trovato (ad esempio, tramite una porzione presente in essa che possiede una carica opposta a quella di una porzione del composto stesso) e/o (ii) non possieda una carica e/o una conformazione strutturale (o forma o disposizione) che gli consenta di stabilire un'interazione "ospite-ospite" con il composto del presente trovato (per esempio, tramite una porzione presente in essa che può agire come elemento di riconoscimento molecolare e sequestrare l'NHE-inibitore o inibendo la porzione del composto).

15 **D. Dosaggio**

Va notato che, come qui usato, una "quantità efficace" (o "quantità farmaceuticamente efficace") di un composto qui descritto è una quantità che produce un risultato clinico benefico della condizione trattata con il composto in confronto con l'assenza di trattamento. La quantità del composto o dei composti somministrata dipenderà dal grado, dalla gravità e dal tipo della malattia o della condizione, dalla quantità di terapia desiderata e dalle caratteristiche di rilascio della formulazione farmaceutica. Dipenderà anche dalla salute, dalla dimensione, dal peso, dall'età, dal sesso e dalla tolleranza ai farmaci del soggetto. Tipicamente, il composto viene somministrato per un periodo di tempo sufficiente per ottenere l'effetto terapeutico desiderato.

25 Nelle forme di realizzazione in cui sia un composto NHE-inibitore sia un polimero che assorbe fluidi sono usati in un protocollo di trattamento, il NHE-inibitore e FAP possono essere somministrati insieme o in un "regime doppio" in cui i due terapeutici vengono dosati e somministrati separatamente. Quando l'inibitore NHE e il polimero che assorbe fluido vengono dosati separatamente, il dosaggio tipico somministrato al soggetto che necessita dell'inibitore NHE è tipicamente da circa 5 mg al giorno a circa 5000 mg al giorno e, in altre forme di realizzazione, da circa 50 mg al giorno a circa 1000 mg al giorno. Tali dosaggi possono indurre l'escrezione fecale di sodio (e dei suoi anioni di accompagnamento), da circa 10 mmol fino a circa 250 mmol al giorno, da circa 20 mmol a circa 70 mmol al giorno o addirittura da circa 30 mmol a circa 60 mmol al giorno.

La dose tipica del polimero che assorbe fluidi è una funzione dell'estensione della secrezione fecale indotta dall'inibitore NHE non assorbibile. In genere la dose viene regolata in funzione della frequenza dei movimenti intestinali e della consistenza delle feci. Più in particolare la dose viene regolata in modo da evitare feci liquide e mantenere la consistenza delle feci come "morbide" o semiformate o formate. Per raggiungere la consistenza desiderata delle feci e fornire sollievo addominale ai pazienti, tipici intervalli di dosaggio del polimero che assorbe fluido da somministrare in combinazione con l'inibitore NHE sono da circa 2 g a circa 50 g al giorno, da circa 5 g a circa 25 g al giorno o addirittura da circa 10 g a circa 20 g al giorno. Quando il composto NHE-inibente e il FAP vengono somministrati come un regime di dosaggio singolo, l'assunzione giornaliera può essere da circa 2 g a circa 50 g al giorno, da circa 5 g a circa 25 g al giorno oppure da circa 10 g a circa 20 g al giorno, con un rapporto in peso tra l'inibitore NHE e il polimero che assorbe fluido che è da circa 1:1000 a 1:10 oppure addirittura da circa 1:500 a 1:5 o da circa 1:100 a 1:5.

Un dosaggio tipico del composto sostanzialmente impermeabile o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibile NHE-inibente, se utilizzato da solo senza un FAP, può essere compreso tra circa 0,2 mg al giorno e circa 2 g al giorno o tra circa 1 mg e circa 1 g al giorno o tra circa 5 mg e circa 500 mg o tra circa 10 mg e circa 250 mg al giorno, somministrato ad un soggetto che necessita di trattamento.

La frequenza di somministrazione dei terapeutici qui descritti può variare da una volta al giorno (QD) a due volte al giorno (BID) o tre volte al giorno (TID), ecc., la frequenza precisa di somministrazione variando con, ad esempio, la condizione del paziente, il dosaggio, ecc. Ad esempio, nel caso di un regime doppio, l'inibitore NHE potrebbe essere preso una volta al giorno mentre il polimero che assorbe fluido potrebbe essere preso ad ogni pasto (TID).

25 **E. Modi di Somministrazione**

I composti NHE-inibenti sostanzialmente impermeabili o sostanzialmente sistemicamente non biodisponibili del presente trovato con o senza i polimeri che assorbono fluidi qui descritti possono essere somministrati attraverso qualsiasi via adatta. Il composto è preferibilmente somministrato per via orale (ad es. dieta) in capsule, sospensioni, compresse, pillole, confetti, liquidi, gel, sciroppi, impasti e simili. Metodi per incapsulare composizioni (come in un rivestimento di gelatina dura o ciclodestrano) sono noti nell'arte (Baker et al., "Controlled Release of Biological Active Agents", John Wiley and Sons, 1986). I composti possono essere somministrati al soggetto insieme a un veicolo farmaceutico accettabile come parte di una composizione farmaceutica. La formulazione della composizione farmaceutica

varierà in funzione della via di somministrazione scelta. Veicoli farmaceutici adatti possono contenere ingredienti inerti che non interagiscono con il composto. I veicoli sono biocompatibili, cioè non tossici, non infiammatori, non immunogenici e privi di altre reazioni indesiderate nel sito di somministrazione. Esempi di veicoli farmaceuticamente accettabili includono, ad esempio, salina, gel inerti in commercio o liquidi integrati con albumina, metilcellulosa o matrice di collagene. Possono essere impiegate tecniche standard di formulazione farmaceutica, come quelle descritte in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

Preparazioni farmaceutiche per uso orale possono essere ottenute combinando un composto del presente trovato con un eccipiente solido, eventualmente macinando una miscela risultante e lavorando la miscela di granuli, dopo l'aggiunta di opportuni ausiliari, se desiderato, per ottenere compresse o nuclei di confetti. Eccipienti adatti sono in particolare riempitivi come zuccheri, compresi lattosio, saccarosio, mannitolo o sorbitolo; preparazioni di cellulosa come ad esempio amido di mais, amido di grano, amido di riso, amido di patate, gelatina, gomma adragante, metilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, sodio carbossimetilcellulosa e/o polivinilpirrolidone (PVP). Se si desidera, possono essere aggiunti agenti disgregranti, quali polivinilpirrolidone reticolato, agar o acido alginico o un suo sale come alginato di sodio.

I nuclei di confetti sono dotati di opportuni rivestimenti. A tale scopo possono essere usate soluzioni di zucchero concentrato, che possono eventualmente contenere gomma arabica, talco, polivinilpirrolidone, gel carbopol, polietilenglicole e/o biossido di titanio, soluzioni di lacca e adatti solventi organici o miscele di solventi. Coloranti o pigmenti possono essere aggiunti ai rivestimenti di compresse o confetti per identificare o per caratterizzare diverse combinazioni di dosi di composti attivi.

Le preparazioni farmaceutiche che possono essere usate per via orale comprendono capsule dure fatte in un materiale adatto, come la gelatina, nonché capsule molli sigillate fatte in un materiale adatto, ad esempio gelatina e un plastificante come glicerolo o sorbitolo. Le capsule dure possono contenere gli ingredienti attivi in miscela con riempitivo come lattosio, leganti come amidi e/o lubrificanti come talco o magnesio stearato e, eventualmente, stabilizzanti. Nelle capsule morbide, i composti attivi possono essere sciolti o sospesi in liquidi adatti, come oli grassi, paraffina liquida o glicoli polietilenici liquidi. Inoltre, possono essere aggiunti stabilizzanti. Tutte le formulazioni per somministrazione orale dovrebbero essere in dosaggi idonei per tale somministrazione.

Sarà inteso che alcuni composti del trovato possono essere ottenuti come stereoisomeri diversi (ad es., diastereomeri ed enantiomeri) o come isotopi e che il trovato comprende tutte le forme isomeriche, le miscele racemiche e gli isotopi dei composti descritti e un metodo per trattare un soggetto con entrambi gli isomeri puri e loro miscele, comprese miscele racemiche, nonché gli isotopi. Gli stereoisomeri possono essere separati e isolati usando
5 qualsiasi metodo adatto, come la cromatografia.

F. Rilascio ritardato

Le proteine NHE mostrano una notevole diversità nei loro modelli di espressione tissutale, localizzazione di membrana e ruoli funzionali. (Vedi, ad es., *The sodium-hydrogen exchanger – From molecule To Its Role In Disease*, Karmazyn, M., Avkiran, M., and Fliegel, L., eds.,
10 Kluwer Academics (2003).)

Nei mammiferi sono stati descritti nove distinti geni NHE (da NHE-1 a -9). Di questi nove, cinque (da NHE-1 a -5) sono principalmente attivi alla membrana plasmatica, mentre NHE-6, -7 e -9 risiedono prevalentemente in compartimenti intracellulari.

15 NHE-1 è espresso ubiquitariamente ed è principalmente responsabile del ripristino del pH intracellulare allo stato stazionario dopo acidificazione citosolica e del mantenimento del volume cellulare. Recenti risultati mostrano che NHE-1 è fondamentale per la funzione e la sopravvivenza dell'organo (ad es., topi privi di NHE-1 presentano anomalie locomotorie, crisi di tipo epilettiche e notevole mortalità prima dello svezzamento).

20 A differenza di NHE-1 espressa al lato basolaterale dei nefroni e delle cellule epiteliali dell'intestino, le NHE da -2 a -4 sono prevalentemente espresse sul lato apicale degli epitelii del rene e del tratto gastrointestinale. Diverse linee di prova dimostrano che NHE-3 è il principale contribuente del riassorbimento di massa di Na⁺ e fluidi renale attraverso il tubulo prossimale. La secrezione associata di H⁺ da NHE-3 nel lume dei tubuli renali è inoltre
25 essenziale per circa 2/3 del riassorbimento renale di HCO₃⁻. La disfunzione completa della funzione NHE-3 nei topi provoca una forte riduzione di HCO₃⁻, Na⁺ e riassorbimento di fluido nel rene, che è associata costantemente ad ipovolemia e acidosi.

In una forma di realizzazione, i composti del trovato sono intesi per indirizzarsi agli antiportatori apicali NHE (ad es. NHE-3, NHE-2 e NHE-8) senza permeabilità sostanziale
30 attraverso lo strato di cellule epiteliali intestinali e/o senza attività sostanziale nei confronti di NHE che non risiedono prevalentemente nel tratto GI. Questa invenzione fornisce un metodo per inibire selettivamente gli antiportatori NHE apicali GI e fornire l'effetto desiderato di inibizione dell'assorbimento di sale e liquidi per correggere l'omeostasi anormale del fluido che porta a stati di costipazione. A causa della loro mancanza di esposizione sistemica, detti

composti non interferiscono con altri ruoli fisiologici chiave di NHE evidenziati sopra. Ad esempio, ci si aspetta che i composti del trovato trattino la costipazione in pazienti che ne necessitano, senza provocare effetti sistemici indesiderati, come ad esempio la perdita di sale o la perdita di bicarbonato che portano ad iponatriemia e acidosi tra altri disordini.

5 In un'altra forma di realizzazione, i composti del trovato sono somministrati al piccolo intestino con poca o nessuna interazione con il GI superiore, come il compartimento gastrico e il duodeno. Il richiedente ha scoperto che un rilascio precoce dei composti nello stomaco o nel duodeno può avere un impatto negativo sulla secrezione gastrica o sulla secrezione di bicarbonato (nota anche come "scarico del bicarbonato"). In questa forma di realizzazione i
10 composti sono progettati in modo da essere rilasciati in forma attiva oltre il duodeno. Ciò può essere realizzato mediante un approccio profarmaco o da specifici sistemi di somministrazione di farmaci.

Come qui usato, "profarmaco" deve intendersi riferito ad una forma modificata dei composti che è inattiva (o significativamente meno attiva) nel GI superiore, ma una volta
15 somministrata viene metabolizzata in vivo in un metabolita attivo dopo aver superato, per esempio, il duodeno. Così, in un approccio profarmaco, l'attività dell'inibitore NHE può essere mascherata con un gruppo protettivo transitorio che viene liberato dopo il passaggio del composto attraverso il compartimento gastrico desiderato. Ad esempio, l'acilazione o l'alchilazione della funzionalità guanidinile essenziale dell'inibitore NHE lo renderebbe
20 biochimicamente inattivo; tuttavia, la scissione di questi gruppi funzionali da amidasi, esterasi, fosfatasi intestinali e simili, nonché da enzimi presenti nella flora del colon, libererebbe il composto parentale attivo. I profarmaci possono essere progettati per sfruttare l'espressione e localizzazione relativa di tali enzimi metabolici di fase I ottimizzando attentamente la struttura del profarmaco per il riconoscimento da enzimi specifici. Ad
25 esempio, l'agente anti-infiammatorio sulfasalazina viene convertito in 5-amminosalicilato nel colon per riduzione del legame diazo da batteri intestinali.

In un approccio di somministrazione di farmaci, i composti NHE-inibitori dell'invenzione sono formulati in alcune composizioni farmaceutiche per somministrazione orale che rilasciano l'attivo nelle aree mirate del GI, cioè digiuno, ileo o colon, o preferibilmente l'ileo
30 distale e il colon, o ancora più preferibilmente il colon.

Sono applicabili metodi noti agli esperti dell'arte. (Vedi, ad es., Kumar, P. e Mishra, B., Colon Targeted Drug Delivery System – An Overview, *Curr. Drug Deliv.*, **2008**, 5 (3), 186-198; Jain, S. K. e Jain, A., Target-specific Drug Release to the Colon., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2008**, 5 (5), 483-498; Yang, L., Biorelevant Dissolution Testing of Colon-Specific

Delivery Systems Activated by Colonic Microflora, *J. Control Release*, **2008**, 125 (2), 77-86; Siepmann, F. ; Siepmann, J. ; Walther, M. ; MacRae, R. J.; e Bodmeier, R., Polymeric Blends for Controlled Release Coatings, *J. Control Release* **2008**, 125 (1), 1-15; Patel, M. ; Shah, T. ; e Amin, A., Therapeutic Opportunities in Colon-Specific Drug-Delivery Systems, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **2007**, 24 (2), 147-202; Jain, A.; Gupta, Y.; Jain, S.K., Perspectives of Biodegradable Natural Polysaccharides for Site-Specific Drug Delivery to the Colon., *J. Pharm. Sci.*, **2007**, 10 (1), 86-128; Van den, M.G., Colon Drug Delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2006**, 3 (1), 111-125; Basit, A. W., Advances in Colonic Drug Delivery, *Drugs* **2005**, 65 (14), 1991-2007; Chourasia, M. K. ; Jain, S.K., Polysaccharides for Colon-Targeted Drug Delivery, *Drug Deliv.* **2004**, 11 (2), 129-148; Shareef, M. A.; Khar, R. K.; Ahuja, A.; Ahmad, F. J.; e Raghava, S., Colonic Drug Delivery: An Updated Review, *AAPS Pharm. Sci.* **2003**, 5 (2), E17; Chourasia, M. K.; Jain, S. K., Pharmaceutical Approaches to Colon Targeted Drug Delivery Systems, *J. Pharm. Sci.* **2003**, 6 (1), 33-66; e, Sinha, V. R.; Kumria, R., Colonic Drug Delivery: Prodrug Approach, *Pharm. Res.* **2001**, 18 (5), 557-564. In genere l'ingrediente farmaceutico attivo (API) è contenuto in una compressa/capsula progettata per rilasciare detto API in funzione dell'ambiente (ad es., pH, attività enzimatica, temperatura, ecc.) o in funzione del tempo. Un esempio di questo approccio è Eudracol™ (Pharma Polymers Business Line of Degussa's Specialty Acrylics Business Unit), dove il nucleo della compressa contenente l'API è stratificato con diversi rivestimenti polimerici con profili di dissoluzione specifici. Il primo strato assicura che la compressa passi attraverso lo stomaco intatta in modo che possa continuare attraverso il piccolo intestino. La variazione da un ambiente acido nello stomaco ad un ambiente alcalino nell'intestino tenue inizia il rilascio dello strato esterno protettivo. Mentre attraversa il colon, il successivo strato viene reso permeabile dall'alcalinità e dal liquido intestinale. Questo permette al fluido di penetrare nello strato interno e rilasciare il principio attivo, che diffonde dal nucleo all'esterno, dove può essere assorbito dalla parete intestinale. Sono contemplati altri metodi senza allontanarsi dallo scopo del presente trovato.

In un altro esempio, le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono essere usate con veicoli di farmaci compresi pectina e galattomannano, polisaccaridi che sono entrambi degradabili da enzimi batterici del colon. (Vedere, ad es., il brev. U.S. N. 6.413.494) Mentre pectina o galattomannano, se usati da soli come veicolo di un farmaco, sono facilmente disciolti nel fluido gastrico simulato e nel liquido intestinale simulato, una miscela di questi due polisaccaridi preparati ad un pH di circa 7 o superiore produce un gel forte, elastico e insolubile che non si scioglie o disgrega nei fluidi gastrici e intestinali simulati, proteggendo

così i farmaci rivestiti con la miscela dal rilascio nel tratto GI superiore. Quando la miscela di pectina e galattomannano arriva nel colon, viene rapidamente degradata dall'azione sinergica degli enzimi batterici colonici. In ancora un altro aspetto, le composizioni dell'invenzione possono essere usate con la matrice farmaceutica di un complesso di gelatina e di un polisaccaride anionico (ad es. pectinato, pectato, alginato, condroitina solfato, acido poligalatturonico, gomma adragante, gomma arabica e loro miscele), degradabile dagli enzimi colonici (brev. U.S. N. 6.319.518).

In ancora altre forme di realizzazione, i polimeri che assorbono fluidi che vengono somministrati secondo i metodi di trattamento del presente trovato sono formulati per fornire proprietà organolettiche accettabili/piacevoli come sensazione in bocca, gusto e/o per evitare rigonfiamento/gelificazione premature in bocca e nell'esofago e provocare soffocamento o ostruzione. La formulazione può essere progettata in modo da assicurare idratazione e rigonfiamento completi del FAP nel tratto GI e evitare la formazione di grumi. I dosaggi orali per il FAP possono assumere varie forme tra cui, ad esempio, polvere, granulati, compresse, cialda, biscotto e simili e sono preferibilmente somministrati al piccolo intestino con poca o nessuna interazione con il GI superiore, come il compartimento gastrico e il duodeno.

Gli approcci o i metodi sopra descritti sono solo alcuni dei molti metodi riportati per somministrare selettivamente un attivo nella parte inferiore dell'intestino.

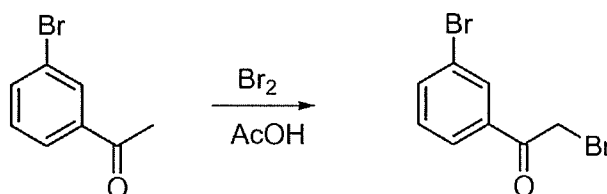
I seguenti esempi sono forniti per illustrare ulteriormente il presente trovato.

ESEMPI

Sintesi Composti Esemplificativi

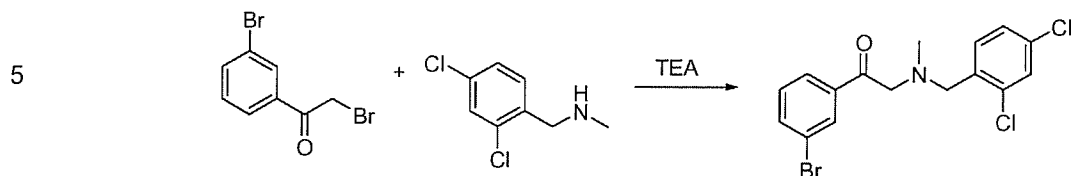
Rif. Esempio 1

acido 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etilfosfonico

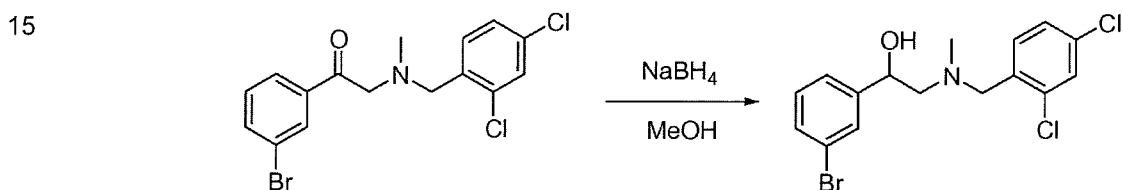


Intermedio 1.1: 2-bromo-1-(3-bromofenil)etanone: In un pallone a 3 colli da 500 mL, è stata posta una soluzione di 1-(3-bromofenil)etanone (40 g, 202,02 mmol 1,00 equiv) in acido acetico (200 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di Br₂ (32 g, 200,00 mmol) in acido acetico (50 mL) goccia a goccia con agitazione a 60°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 60°C in un bagno d'olio. La miscela ottenuta è stata

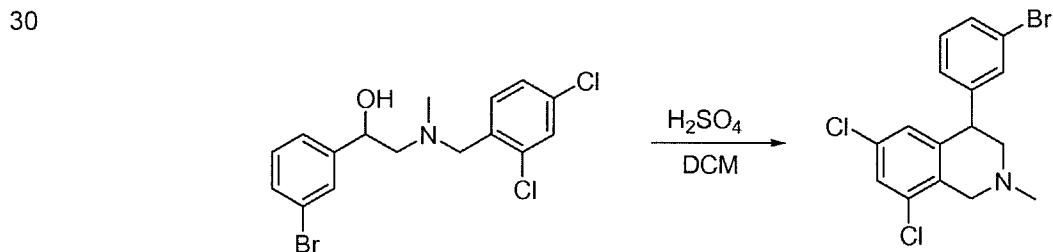
concentrata sotto vuoto. Il composto grezzo è stato ri-cristallizzato da etere di petrolio:etil acetato in rapporto 8:1. Questo è risultato in 24 g (43%) di 2-bromo-1-(3-bromofenil)etanone come solido giallo.



Intermedio 1.2: 1-(3-bromofenil)-2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)etanone: In un pallone a 3 colli da 1L purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-bromo-1-(3-bromofenil)etanone (55 g, 199,28 mmol, 1,00 equiv) in 1,4-diossano (300 mL), TEA (40 g, 396,04 mmol, 1,99 equiv) e (2,4-diclorofenil)-N-metilmetanamina (38 g, 201,06 mmol, 1,01 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 25°C in un bagno d'olio. I solidi sono stati filtrati ed il filtrato è stato usato senza alcuna ulteriore purificazione.

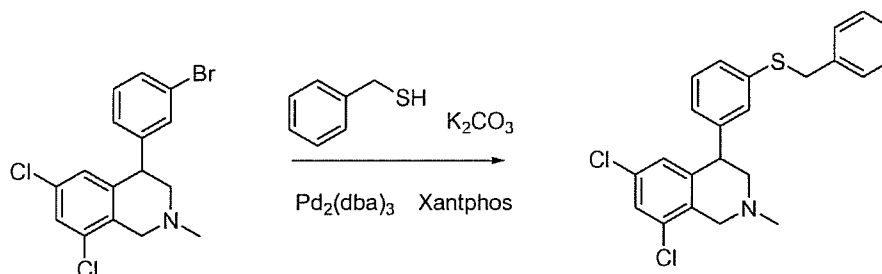


Intermedio 1.3: 1-(3-bromofenil)-2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)etanolo: In un pallone a 3 colli da 1L purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-bromofenil)etanone (77 g, 198,97 mmol, 1,00 equiv, resa teorica) in metanolo (300 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di NaBH₄ (15 g, 394,74 mmol, 1,98 equiv) in diverse porzioni a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 30 min a 0°C in un bagno acqua/ghiaccio. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 100 mL di acetone. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x100 mL di etil acetato e gli strati organici combinati e seccati su sodio solfato anidro. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:100). Questo è risultato in 50 g (65%) di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-bromofenil)etanolo come olio giallo.



Intermedio 1.4: 4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina: In un pallone a 3 colli da 500 mL, è stata posta una soluzione di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-bromofenil)etanolo (25 g, 64,27 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (100 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di acido solforico (100 mL) goccia a goccia con agitazione a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 4 h a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata diluita con acqua ghiacciata. Il valore di pH della soluzione è stato aggiustato ad 8 con sodio idrossido. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x300 mL di diclorometano e gli strati organici combinati e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ri-cristallizzato da etere di petrolio:etil acetato in rapporto 8:1. Questo è risultato in 15 g (63%) of 4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina come solido bianco.

15



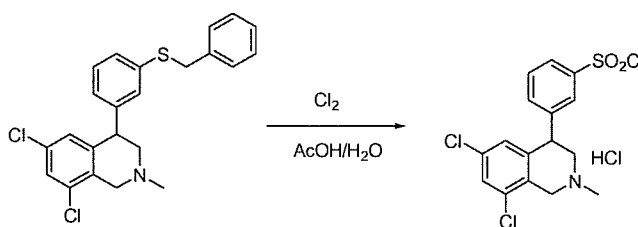
20

25

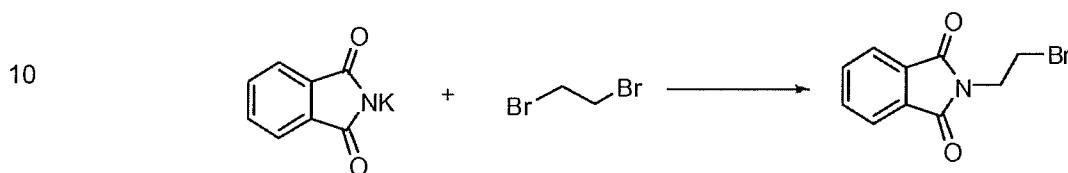
30

Intermedio 1.5: 4-(3-(benziltio)fenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina:

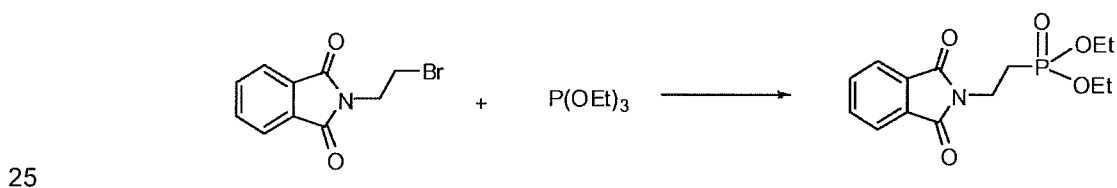
In un pallone a 3 colli da 1L purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di potassio carbonato (930 mg, 0,50 equiv) in xilene (50 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di fenilmetantiolo (2,5 g, 1,50 equiv) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 25°C. In un altro pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata aggiunta una soluzione di 4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (5,0 g, 1 equiv) in xilene (50 mL), Pd₂(dba)₃ (300 mg), Xantphos (300 mg). La soluzione ottenuta è stata agitata per 30 min a 25°C e poi aggiunta alla soluzione di reazione di cui sopra. La miscela è stata agitata per tutta la notte a 140°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:100~1:50). Questo è risultato in 2,5 g (45%) di 4-(3-(benziltio)fenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina come olio giallo.



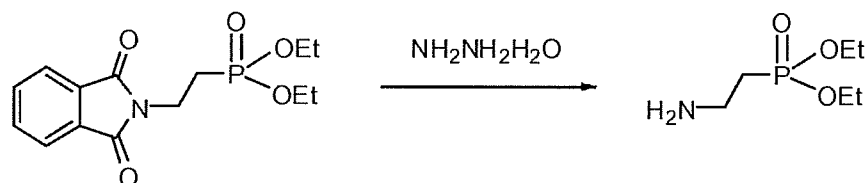
Intermedio 1.6: 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro: In un pallone a 3 colli da 250-mL, è stata posta una soluzione di 4-(3-(benziltio)fenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (8 g, 13,53 mmol, 1,00 equiv, 70%) in acido acetico/acqua (80/8 mL). E' stato introdotto Cl₂(g) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a temperature ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 5,0 g (90%) of 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro cloridrato come solido giallastro.



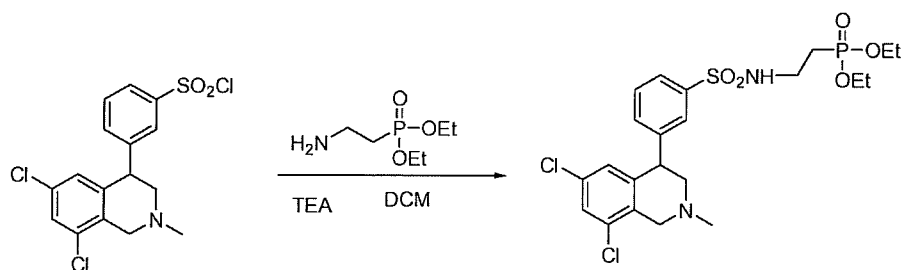
Intermedio 1.7: 2-(2-bromoetil)isoindolin-1,3-dione: In un pallone da 500 mL, è stata posta una soluzione di 1,2-dibromoetano (30 g, 159,57 mmol, 2,95 equiv) in N,N-dimetilformammide (200 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di potassio ftalimide (10 g, 54,05 mmol, 1,00 equiv) in varie porzioni. La soluzione ottenuta è stata agitata per 24 h a 60°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 500 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 2x200 mL di etil acetato e gli strati organici combinati e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:10). Questo è risultato in 8 g (57%) di 2-(2-bromoetil)isoindolin-1,3-dione come solido bianco.



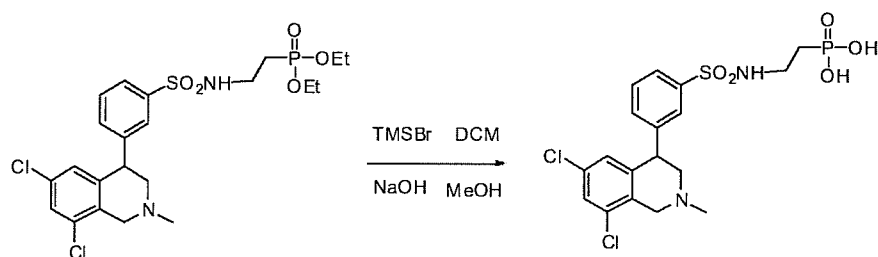
Intermedio 1.8: dietil 2-(1,3-diossoisoindolin-2-il)etilfosfonato: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stato posto 2-(2-bromoetil)isoindolin-1,3-dione (8 g, 31,50 mmol, 1,00 equiv) e trietil fosfito (6,2 g, 37,35 mmol, 1,19 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 18 h a 130°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ri-cristallizzato da etere:n-esano (1:2). Questo è risultato in 5 g (48%) di dietil 2-(1,3-diossoisoindolin-2-il)etilfosfonato come solido bianco.



Intermedio 1.9: dietil 2-amminoetilfosfonato: In un pallone da 500 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di dietil 2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etilfosfonato (5 g, 16,08 mmol, 1,00 equiv) in etanolo (200 mL) e idrazina idrata (8 g, 160,00 mmol, 9,95 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 12 h a temperatura ambiente. I solidi sono stati filtrati e la miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con diclorometano/metanolo (9:1). Questo è risultato in 2,5 g (51%) di dietil 2-amminoetilfosfonato come olio incolore.



Intermedio 1.10: Dietil 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etilfosfonato: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di dietil 2-amminoetilfosfonato (100 mg, 0,55 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (10 mL) con TEA (220 mg, 2,18 mmol, 3,94 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (300 mg, 0,60 mmol, 1,08 equiv, 78%) in varie porzioni. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su colonna di gel di silice con diclorometano:metanolo (50:1). Questo è risultato in 0,07 g (24%) di composto del titolo come olio incolore.



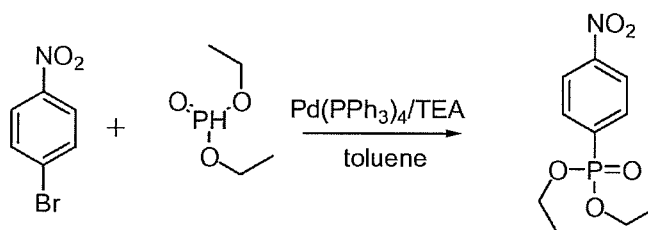
Composto 1: acido 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etilfosfonico: Ad una soluzione di Intermedio 1.10 (70 mg, 0,13 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (10 mL) è stata aggiunto bromotrimetilsilano (200 mg, 1,32 mmol, 10,04 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata tutta la notte a 40°C in un

bagno d'olio. Il procedere della reazione è stato controllato per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Ad essa è stato aggiunto metanolo. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di sodio idrossido (11 mg, 0,28 mmol, 2,10 equiv) in metanolo (2 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per ulteriore 1 h a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il solido è stato seccato in una stufa a pressione ridotta. Questo è risultato in 52,3 mg (73%) del composto del titolo come sale sodico. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,82(d, J=7,5Hz, 1H), 7,73(s, 1H), 7,56(m, 1H), 7,48(d, J=8,1Hz, 1H), 7,41(s, 1H), 6,88(s, 1H), 4,54(s, 1H), 3,97(m, 2H), 3,17(m, 3H), 2,97(m, 1H), 2,67(s, 3H), 1,68(m, 2H). MS (ES, m/z): 479 [M+H]⁺.

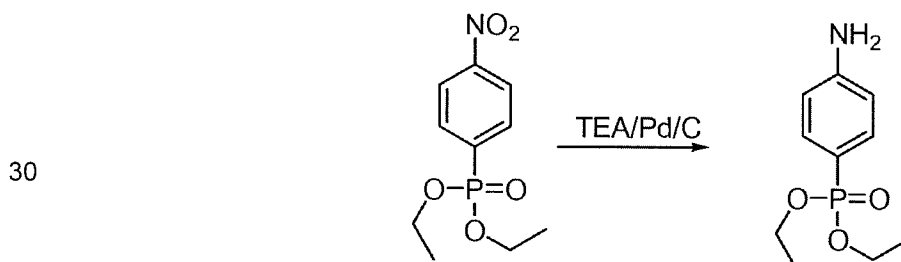
Esempio 2

acido 4-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)fenilfosfonico

15



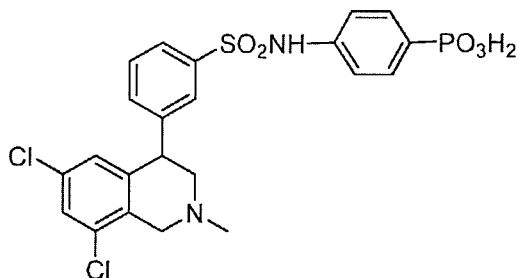
Intermedio 2.1: dietil 4-nitrofenilfosfonato: In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di dietil fosfonato (3,02 g, 21,88 mmol, 1,10 equiv) in toluene (10 mL), Pd(PPh₃)₄ (1,15 g, 1,00 mmol, 0,05 equiv), TEA (2,21 g, 21,88 mmol, 1,10 equiv). 1-bromo-4-nitrobenzene (4 g, 19,90 mmol, 1,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 15 h a 90°C. I solidi sono stati filtrati via e la miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:2). Questo è risultato in 3,53 g (68%) of dietil 4-nitrofenilfosfonato come liquido giallo.



30

Intermedio 2.2: dietil 4-amminofenilfosfonato: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di dietil 4-nitrofenilfosfonato (1,07 g, 4,13 mmol, 1,00 equiv), TEA (3 mL),

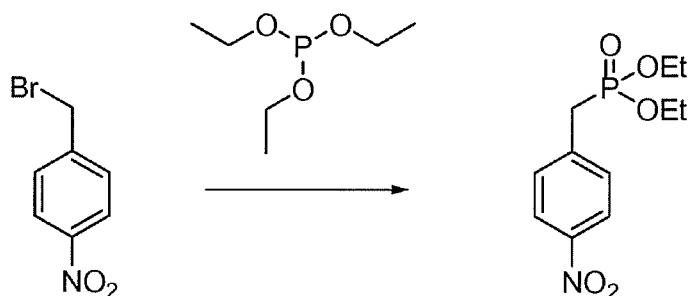
Palladio su carbone (0,025 g). Questo è stato seguito dall'aggiunta di acido formico (2 mL) goccia a goccia con agitazione a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata scaldata a riflusso per 3 h. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 5 mL di acqua e i solidi sono stati filtrati via. Il filtrato ottenuto è stato estratto con 5x10 mL di diclorometano e gli strati organici combinati e seccati su sodio solfato anidro. Questo è risultato in 800 mg (85%) di dietil 4-amminofenilfosfonato come solido bianco.



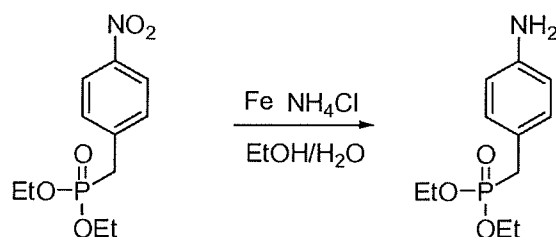
Composto 2: acido 4-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil-solfonammido)fenilfosfonico: Composto 2 è stato preparato in un modo analogo a quello di Composto 1 usando dietil 4-amminofenilfosfonato (Intermedio 2.2) come ammina. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD , ppm): 7,86(d, 1H), 7,69(m, 3H), 7,55(m, 3H), 7,21(m, 2H), 6,73(s, 1H), 4,70(m, 2H), 4,48(d, 1H), 3,79(m, 1H), 3,46(m, 1H), 3,09(s, 3H). MS (ES, m/z): 527 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Rif. Esempio 3

acido 4-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil-solfonammido)benzilfosfonico



Intermedio 3.1: dietil 4-nitrobenzilfosfonato: In un pallone da 250 mL, è stato posto 1-(bromometil)-4-nitrobenzene (15 g, 69,77 mmol, 1,00 equiv), trietil fosfito (70 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 110°C in un bagno d'olio. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:10-1:1). Questo è risultato in 17 g (89%) di composto del titolo come olio giallo.

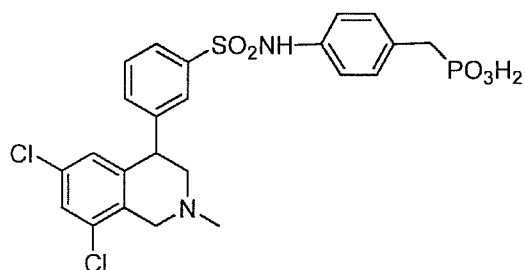


5

Intermedio 3.2: dietil 4-amminobenzilfosfonato: In un pallone da 100 mL, è stata posta una soluzione di dietil 4-nitrobenzilfosfonato (5 g, 18,32 mmol, 1,00 equiv) in etanolo (50 mL) ed è stata aggiunta una soluzione di NH_4Cl (2,9 g, 54,72 mmol, 2,99 equiv) in acqua (50 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di Fe (4,1 g, 73,21 mmol, 4,00 equiv), mentre la temperatura è stata mantenuta a riflusso. La soluzione ottenuta è stata scaldata a riflusso per 1 h. I solidi sono stati filtrati via. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x20 mL di etil acetato e gli strati organici combinati e seccati su sodio solfato anidro. I solidi sono stati filtrati via. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:3). Questo è risultato in 2,5 g (56%) di composto del titolo come solido giallo.

10

15



20

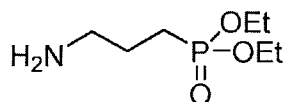
Composto 3: acido 4-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)benzilfosfonico: Composto 3 è stato preparato in un modo analogo a quello di Composto 1 usando dietil 4-amminobenzilfosfonato (Intermedio 3.2) come ammina. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD , ppm): 7,89(d, $J=7,8$ Hz, 1H), 7,61~7,66(m, 1H), 7,52~7,54(m, 2H), 7,21~7,20(m, 2H), 7,11(s, 1H), 6,95(d, $J=8,1$ Hz, 2H), 6,73(s, 1H), 4,51~4,59(m, 3H), 3,33(s, 1H), 3,03~2,89(m, 6H). MS (ES, m/z): 541 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

25

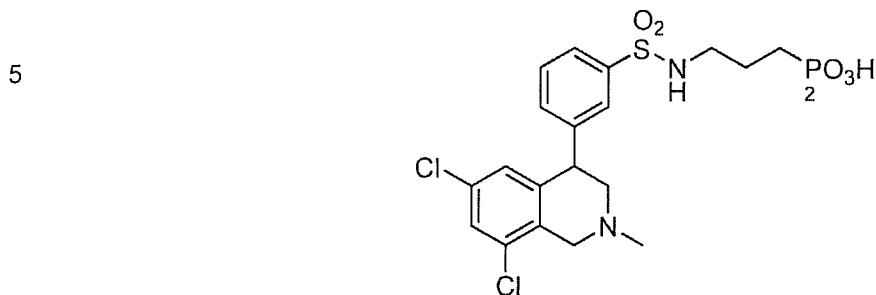
Rif. Esempio 4

acido 3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propilfosfonico

30



Intermedio 4.1: 3-dietil 3-amminopropilfosfonato: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 1, sostituendo dibromopropano per dibromoetano ha dato il composto del titolo.



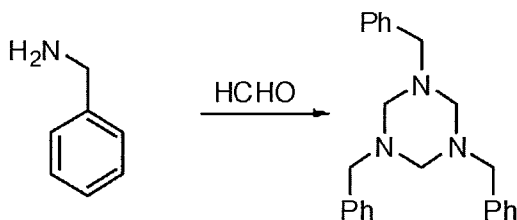
10 **Composto 4 acido 3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propilfosfonico:** Composto 4 è stato preparato in un modo analogo a quello di Composto 1 usando 3-dietil 3-amminopropilfosfonato (Intermedio 4.1) come ammina. ¹H-NMR (300MHZ, CD₃OD, ppm); 7,87(d, *J*=8,1Hz, 1H), 7,77(s, 1H), 7,61~7,66(m, 1H), 7,51~7,54(m, 2H), 6,88(s, 1H), 4,77~4,83(m, 1H), 4,65(d, *J*=16,2Hz, 1H), 4,44(d, *J*=15,6Hz, 1H), 3,78~3,84(m, 1H), 3,50~3,57(m, 1H), 3,08(s, 3H), 2,93~2,97(m, 2H), 1,61~1,72(m, 2H), 1,48~1,59(m, 2H). MS (ES, *m/z*): 493 [M+H]⁺.

15

Rif. Esempio 5

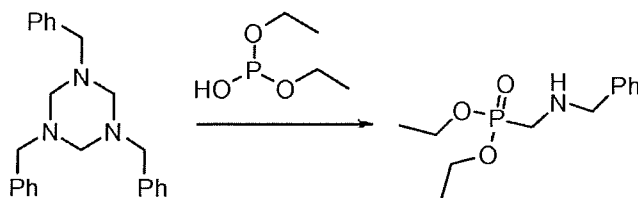
acido (3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)metilfosfonico

20



25 **Intermedio 5.1: 1,3,5-tribenzil-1,3,5-triazinano:** In un pallone a 3 colli da 100 mL è stata posta benzilammina (10 g, 93,46 mmol, 1,00 equiv), seguita dall'aggiunta di formaldeide (9,0 g, 1,20 equiv, 37%) goccia a goccia con agitazione a 0-10°C. Alla gomma precipitata è stato aggiunto sodio idrossido acquoso 3M (20mL) e la miscela è stata agitata. Dopo permanenza in ghiaccio per 0,3 h, è stato aggiunto etere (30mL) e la miscela agitata finché

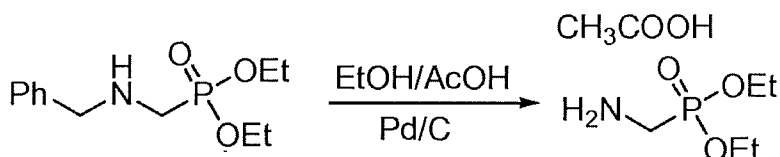
30 tutto il precipitato si è disciolto. La fase acquosa è stata separata ed estratta con etere. I solventi sono stati rimossi sotto vuoto ad ottenere 12 g (36%) of 1,3,5-tribenzil-1,3,5-triazinano come olio incolore.



5

Intermedio 5.2: dietil (benzilammino)metilfosfonato: In un pallone a 3 colli da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stato posto 1,3,5-tribenzil-1,3,5-triazinano (3,0 g, 8,40 mmol, 1,00 equiv) e dietil fosfito (3,5 g, 25,36 mmol, 3,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 100°C. Il residuo è stato caricato su colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (da 1:20 a 1:1). Questo è risultato in 2,0 g (90%) di dietil (benzilammino)metilfosfonato come olio incolore.

10

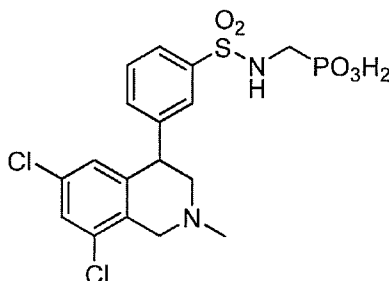


15

Intermedio 5.3: Dietil aminometilfosfonato: Un reattore con serbatoio a pressione da 250 mL è stato purgato, insufflato e mantenuto in atmosfera di idrogeno, è stata aggiunta una soluzione di dietil (benzilammino)metilfosfonato (3,5 g, 13,62 mmol, 1,00 equiv) in etanolo (180 mL), acido acetico (10 mL) e Palladio su carbone (0,2 g, 0,10 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 24 h a 50°C sotto pressione di 20 atm. I solidi sono stati filtrati via. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 2,0 g (grezzo) di composto del titolo come olio marrone che è stato usato senza ulteriore purificazione.

20

25



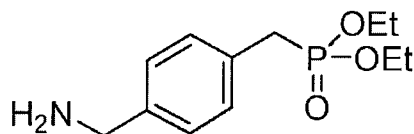
30

Composto 5: acido (3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)metilfosfonico: Composto 5 è stato preparato in un modo analogo a quello di Composto 1 usando dietil aminometilfosfonato (Intermedio 5.3) come ammina. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,89(d, *J*=7,8Hz, 1H), 7,74(s, 1H), 7,63~7,66(m, 1H), 7,57~7,61(m, 2H), 6,97(s, 1H), 4,80~4,89(m, 1H), 4,55~4,67(m, 2H), 3,83~3,89(m, 1H), 3,55~3,66(m, 1H), 3,02~3,11(m, 5H). MS (ES, *m/z*): 465 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 6

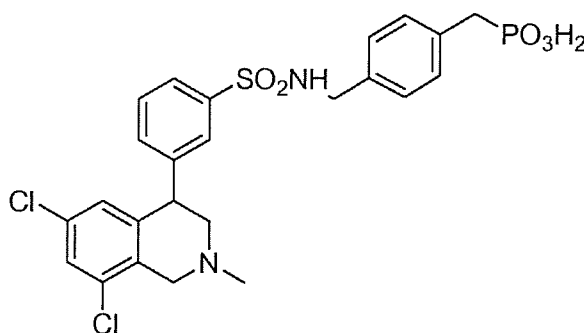
acido 4-((3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)metil)benzilfosfonico

5



Intermedio 6.1: 4-diethyl 4-(amminometil)benzilfosfonato: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 1, sostituendo 1,4-bis(bromometil)benzene per dibromoetano ha dato il composto del titolo.

10



15

Composto 6 acido 4-((3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)metil)benzilfosfonico:

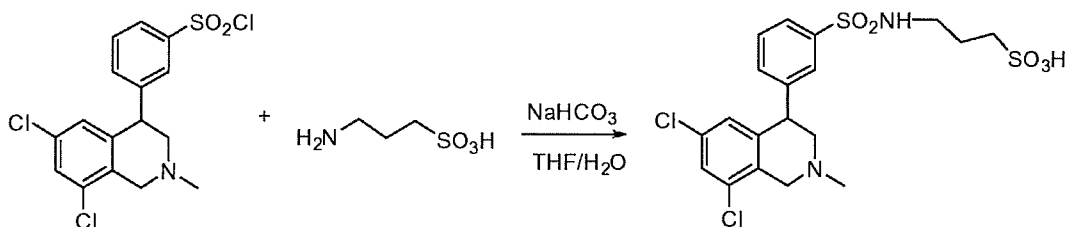
Composto 6 è stato preparato in un modo analogo a quello di Composto 1 usando 4-diethyl 4-(amminometil)benzilfosfonato (Intermedio 6.1) come ammina. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,85~7,88(m, 1H), 7,54~7,59(m, 2H), 7,37~7,42(m, 2H), 7,198~7,22(m, 2H), 7,06~7,09(m, 1H), 6,77(s, 1H), 4,64(m, J=16,2Hz, 1H), 4,49~4,53(m, 1H), 4,37(m, J=16,5, 1H), 4,17(s, 2H), 3,45~3,56(m, 1H), 3,11~3,27(m, 1H), 3,09~3,10(m, 4h), 2,96~2,97(m, 1H). MS (ES, m/z): 555 [M+H]⁺.

25

Rif. Esempio 7

acido 3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propan-1-solfonico

30



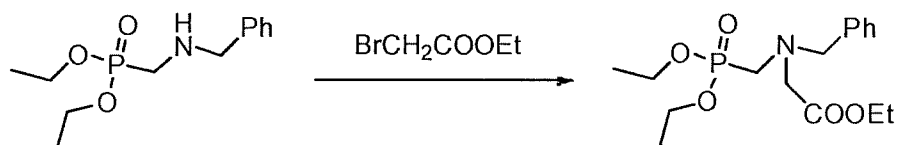
Composto 7: acido 3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propan-1-solfonico: In un pallone da 50 mL, è stata posta una

soluzione di acido 3-amminopropan-1-solfonico (180 g, 1,29 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano/acqua (10/10 mL) con sodio bicarbonato (430 mg, 5,12 mmol). Questo è stato seguito dall'aggiunta di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (500 mg, 1,29 mmol, 0,99 equiv) in varie porzioni. La soluzione ottenuta è stata agitata per 4 h a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 6 con idrogeno cloruro 1M. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo (500 mg) è stato purificato per HPLC preparativa a dare 26,7 mg di composto del titolo (4%) come sale TFA. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): 10,28(s, 1H), 7,53~7,79(m, 6H), 6,83(s, 1H), 4,74(s, 2H), 4,51(s, 1H), 3,90(s, 1H), 3,06(s, 3H), 2,86~2,93(m, 2H), 2,33~2,44(m, 2H), 1,58~1,63(m, 2H). MS (ES m/z): 493 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 8

acido 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-(fosfometil)fenilsolfonammido)acetico

15

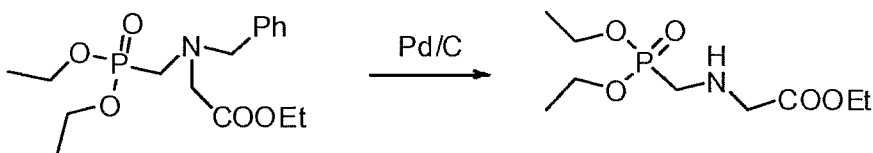


20

Intermedio 8.1: etil 2-(benzil((dietossifosforil)metil)ammino)acetato: In un pallone a 3 colli da 500 mL, è stata posta una soluzione di dietil (benzilammino)metilfosfonato (intermedio 5.2) (12 g, 46,49 mmol, 1,00 equiv) in acetonitrile (150 mL), DIEA (12 g, 2,00 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di etil 2-bromoacetato (8,4 g, 50,30 mmol, 1,10 equiv) goccia a goccia con agitazione. La miscela è stata agitata per 30 min a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata scaldata a riflusso per 6 h. La miscela ottenuta è stata raffreddata a temperatura ambiente e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (da 1:20 to 1:5). Questo è risultato in 8,0 g (50%) di etil 2-(benzil((dietossifosforil)metil)ammino)acetato come olio giallo.

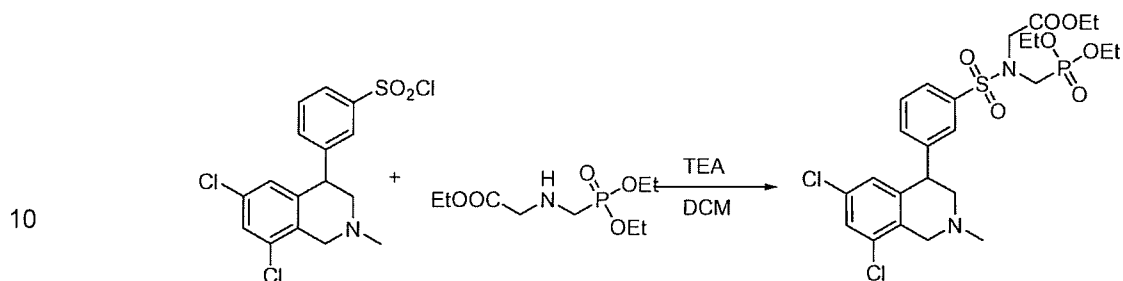
25

30



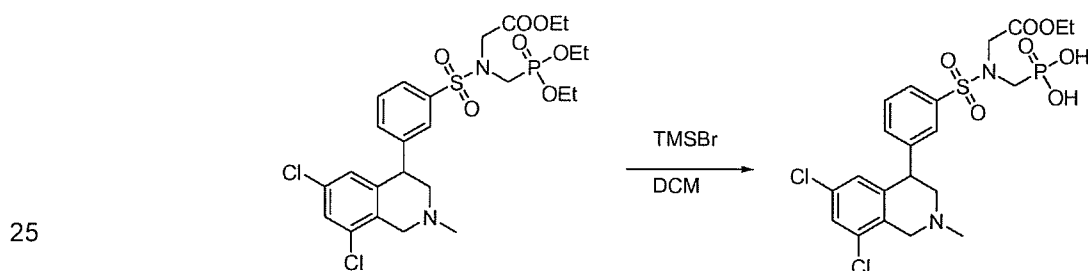
Intermedio 8.2: etil 2-((dietossifosforil)metilammino)acetato Un reattore con serbatoio a pressione da 250 mL è stato purgato, insufflato e mantenuto in atmosfera di idrogeno, poi, è

stata aggiunta una soluzione di etil 2-(benzil((dietossifosforil)metil)ammino)acetato (8,0 g, 23,32 mmol, 1,00 equiv) in etanolo (180 mL), acido acetico (10 mL), Pd/C (0,9 g). La soluzione ottenuta è stata agitata a 20 atm per 32 h a 50°C. I solidi sono stati filtrati via e la miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 6,0 g (82%) del sale di acido acetico di etil 2-((dietossifosforil)metilammino)acetato come olio marrone.



Intermedio 8.3: etil 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-((dietossifosforil)metil)fenilsolfonammido)acetato:

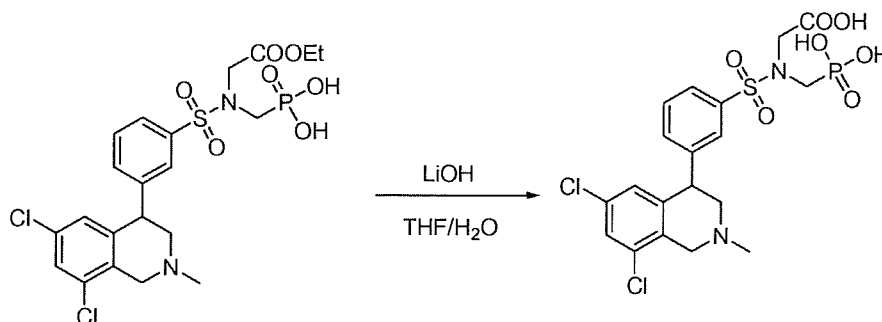
In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di etil 2-((dietossifosforil)metilammino)acetato (320 mg, 1,26 mmol, 1,0 equiv) in piridina (10 mL). 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (500 mg, 1,28 mmol, 1,01 equiv) è stato aggiunto e la soluzione ottenuta è stata agitata tutta la notte a temperatura ambiente. Il procedere della reazione è stato controllato per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo (400 mg) è stato purificato per HPLC preparativa a dare 200 mg (24%) di composto del titolo come sale TFA.



Intermedio 8.4: acido (3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-(2-etossi-2-ossoetil)fenilsolfonammido)metilfosfonico:

In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di Intermedio 8.3 (200 mg, 0,33 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (6 mL). E' stato aggiunto bromotrimetilsilano (502 mg, 3,30 mmol, 10,01 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 40°C in un bagno d'olio. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato disciolto in 10 mL di metanolo. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 180 mg (99%) del composto del titolo come solido giallo.

5

**Composto 8: acido 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-****(fosfonometil)fenilsolfonammido)acetico:** In un pallone da 50 mL, è stata posta una

10

soluzione di acido (3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-(2-etossi-2-

ossoetil)fenilsolfonammido)metilfosfonico (Intermedio 8.4) (180 mg, 0,33 mmol, 1,00

equiv) in tetraidrofurano/acqua (5/5 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di idrossido di

litio (39 mg, 1,62 mmol, 4,97 equiv) in varie porzioni a temperatura ambiente. La soluzione

ottenuta è stata agitata per 4h a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato

controllato per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il valore di pH

15

della soluzione è stato corretto a 6 con idrogeno cloruro 1M. La miscela ottenuta è stata

concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo (150 mg) è stato purificato per HPLC preparativa

dando 59,2 mg (35%) del composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300MHz,DMSO+D₂O, ppm): 7,73~7,74(m, 1H), 7,67~7,68(m, 1H), 7,58~7,62(m, 2H), 7,49(s, 1H),

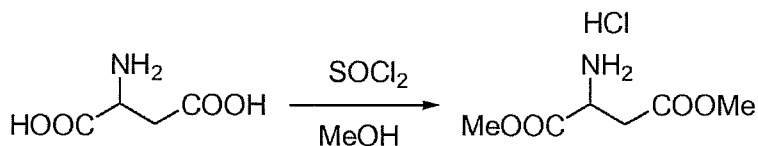
7,00(s, 1H), 4,71~4,75(m, 1H), 4,49(d, J=16,2Hz, 1H), 4,33(d, J=15,9Hz, 1H), 4,07(s, 2H),

20

3,62~3,64(m, 1H), 3,45~3,54(m, 2H), 3,31~3,40(m, 1H), 2,88(s, 3H). MS (ES, m/z): 523

[M+H]⁺.**Rif. Esempio 9****acido 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-
fenilsolfonammido)succinico**

25

**Intermedio 9.1: Dimetil 2-amminosuccinato cloridrato:** In un pallone da 100 mL, è stata

posta una soluzione di acido 2-amminosuccinico (3 g, 22,56 mmol, 1,00 equiv) in metanolo

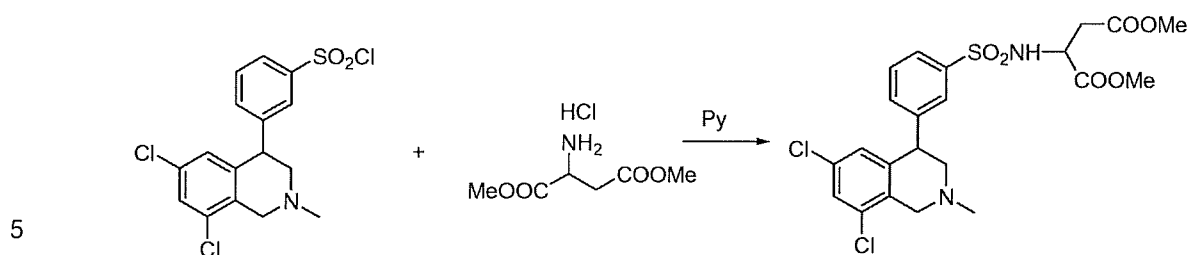
30

(20 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di cloruro di tionile (10 g, 84,75 mmol, 3,76

equiv) goccia a goccia con agitazione a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata scaldata a

riflusso per 2 h in un bagno d'olio. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto.

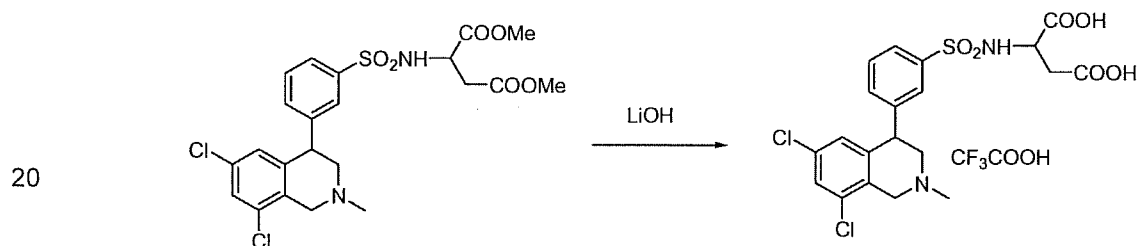
Questo è risultato in 4,2 g (95%) di composto del titolo come solido bianco.



Intermedio 9.2: Dimetil 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)succinato In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di dimetil 2-amminosuccinato cloridrato (107 mg, 0,54 mmol, 1,00 equiv) in piridina (5 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (300 mg, 0,69 mmol, 1,27 equiv, 90%) in varie porzioni. La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con diclorometano:metanolo (50:1). Questo è risultato in 200 mg (72%) del composto del titolo come olio incolore.

10

15



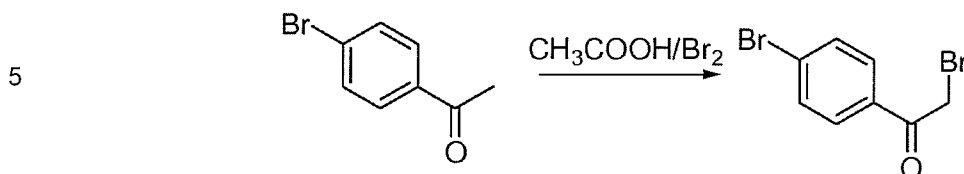
Composto 9: acido 2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)succinico: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di Intermedio 9.2 (100 mg, 0,19 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano (5 mL) ed acqua (5 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di LiOH (23 mg, 0,96 mmol, 4,93 equiv) in varie porzioni a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 6 con idrogeno cloruro (1 mol/L). I solidi sono stato raccolti per filtrazione. Il prodotto grezzo (200 mg) è stato purificato per HPLC preparativa a dare 12,1 mg (10%) di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,89(d, J=7,2Hz, 1H), 7,80(d, J=6,3Hz, 1H), 7,64~7,52(m, 3H), 6,95(s, 1H), 4,78~4,70(m, 2H), 4,55~4,50(m, 1H), 4,23~4,17(m, 1H), 3,87~3,82(m, 1H), 3,63~3,57(m, 1H), 3,12(s, 3H), 2,79~2,65(m, 2H). MS (ES, m/z): 487 [M-CF₃COOH+H]⁺.

25

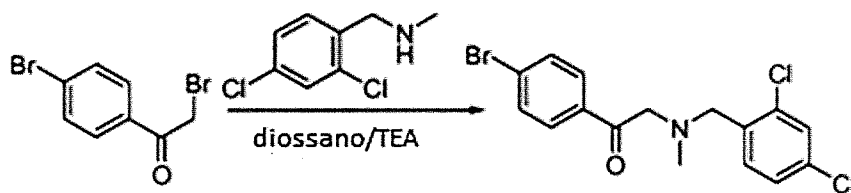
30

Rif. Esempio 10

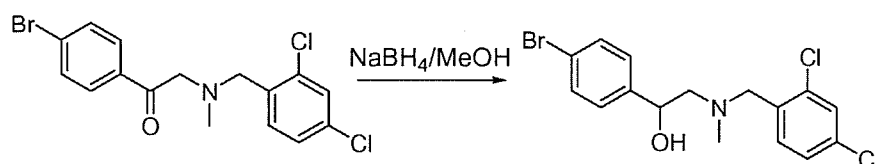
acido 2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonamido)etilfosfonico



10 **Intermedio 10.1: 2-bromo-1-(4-bromofenil)etanone:** In un pallone a 3 colli da 250 mL, è stata posta una soluzione di 1-(4-bromofenil)etanone (10,0 g, 50,25 mmol, 1,00 equiv) in acido acetico (50 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di bromo (8,2 g, 1,05 equiv) in acido acetico (50 mL) goccia a goccia con agitazione a 60°C per 90 min. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 60°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ri-cristallizzato da etere di petrolio/etil acetato in rapporto 7:1. Questo è risultato in 9,3 g (67%) di compost del titolo come solido giallo.

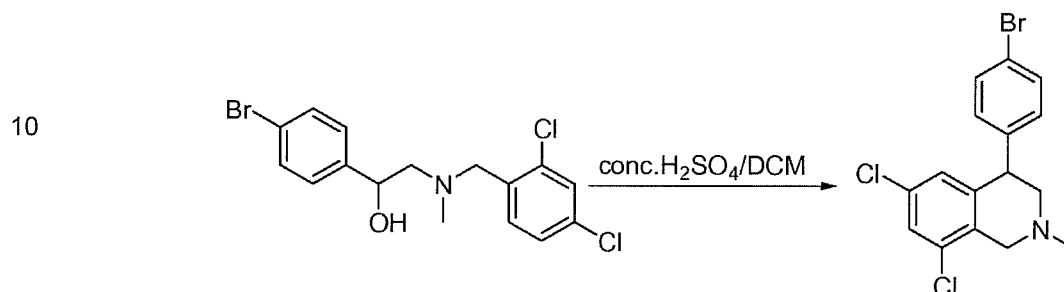


20 **Intermedio 10.2: 1-(4-bromofenil)-2-((2,4-diclorobenzil)(metil)amino)etanone:** In un pallone a 3 colli da 250 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-bromo-1-(4-bromofenil)etanone (9,3 g, 33,45 mmol, 1,00 equiv) in diossano (100 mL), trietilammina (5,0 g, 1,50 equiv) e (2,4-diclorofenil)-N-metilmetanamina (6,4 g, 33,68 mmol, 1,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 25°C. I solidi sono stati filtrati via. Il filtrato è stato usato direttamente per il passaggio successivo.

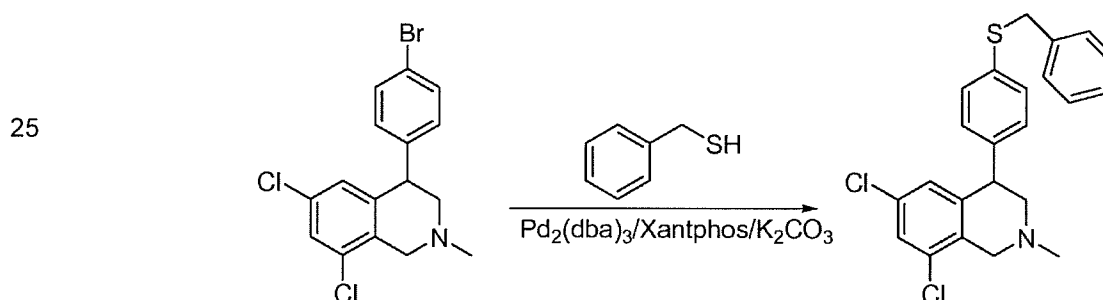


Intermedio 10.3: 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)amino)-1-(4-bromofenil)etanolo: In un pallone a 3 colli da 500 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione dell'Intermedio 10.2 grezzo in metanolo fresco (100 mL). Questo è stato

seguito dall'aggiunta di sodio boridruro (2,5 g, 65,79 mmol, 2,00 equiv) in varie porzioni a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 25°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di NH₄Cl sat. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. La soluzione ottenuta è stata estratta con EtOAc (2x100 mL) e gli strati organici combinati e concentrati sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ri-cristallizzato da etere di petrolio/etil acetato (60mL) in rapporto 7:1. Questo è risultato in 6,5 g (50%) di composto del titolo come solido bianco. MS (ES, *m/z*): 390 [M+H]⁺.



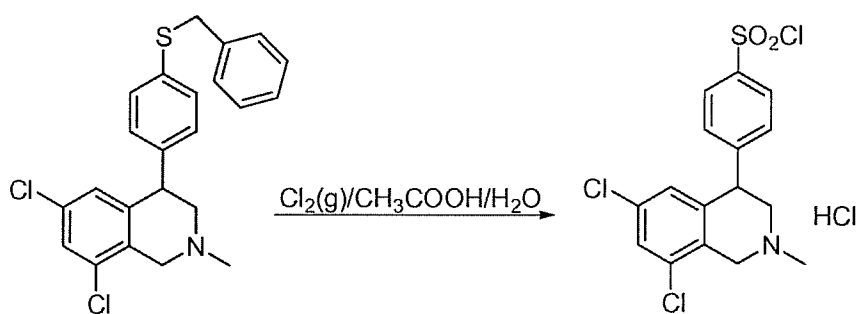
Intermedio 10.4: 4-(4-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)amino)-1-(4-bromofenil)etanolo (1,0 g, 2,57 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (3 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di H₂SO₄ conc. (2 mL) goccia a goccia con agitazione a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 20°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di acqua/ghiaccio. Il valore di pH è stato corretto a 9 con sodio idrossido. La soluzione ottenuta è stata estratta con diclorometano (2x30mL) e gli strati organici combinati e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Questo è risultato in 0,9 g di composto del titolo che è stato usato senza ulteriore purificazione. MS (ES, *m/z*): 372 [M+H]⁺.



Intermedio 10.5: 4-(4-(benziltio)fenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina: In un pallone a 3 colli da 250 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stato posto K₂CO₃ (800 mg, 0,50 equiv) e xilene (50mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di fenilmetantiolo (1,75 g, 1,00 equiv) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La miscela ottenuta è stata poi lasciata scaldare a temperatura ambiente per 1 h. In un altro pallone a 3 colli da 250 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta 4-(4-

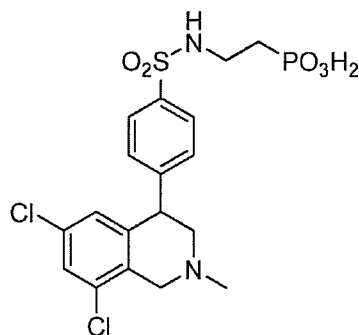
bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (4,8 g, 0,80 equiv), Xantphos (200 mg, 0,08 equiv) e $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (200 mg, 0,08 equiv) in xilene (30 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 20 min e trasferita al potassio tiolato formato precedentemente. La soluzione scura è stata poi purgata con azoto e scaldata a 130°C per 15 h. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la miscela è stata concentrata a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato poi purificato per cromatografia su gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:80~1:50) a dare 1,8 g (30%) di composto del titolo come olio giallo. MS (ES, m/z): 414 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10



Composto 10.6: 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolil)benzene-1-solfonil cloruro: In un pallone a 3 colli da 50 mL, è stata posta una soluzione di 4-(4-(benziltio)fenil-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolil) (250 mg, 0,60 mmol, 1,00 equiv) in acido acetico (8 mL), acqua (1 mL). Ad essa è stato introdotto $\text{Cl}_2(\text{g})$ e la soluzione ottenuta è stata agitata per 30 min a 25°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 200 mg (85%) di composto del titolo come solido giallo. MS (ES, m/z): 390 $[\text{M}-\text{HCl}+\text{H}]^+$.

25

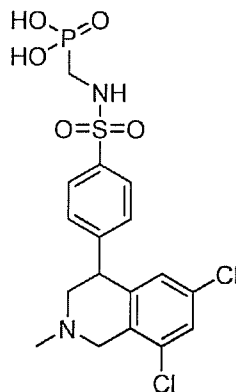


Composto 10: acido 2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolil)fenilsolfonammido)etilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 1, 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolil)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 10.6) è stato convertito a composto 10. Purificazione per HPLC preparativa ha dato un sale TFA del composto del titolo come solido bianco. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300MHz, ppm): 7,93(d, $J=8,4\text{Hz}$, 2H), 7,58~7,51(m, 3H), 6,89(s, 1H), 4,89~4,80(m, 2H), 4,56~4,51(m, 1H),

3,95~3,90(m, 1H), 3,69~3,65(m, 1H), 3,21~3,10(m, 5H), 2,01~1,89(m, 2H). MS (ES, m/z): 479 $[M+H]^+$.

Rif. Esempio 11

acido (4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)metilfosfonico

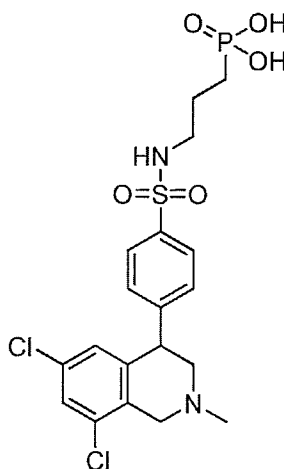


Composto 11: acido (4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

il)fenilsolfonammido)metilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 1, è stato fatto composto 11 usando 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 10.6) e dietil amminometilfosfonato (intermedio 5.3). Purificazione per HPLC preparativa ha dato un sale TFA del composto del titolo. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{DMSO}+\text{D}_2\text{O}$, ppm): 7,87(d, $J=8,4\text{Hz}$, 2H), 7,68(d, $J=1,5\text{Hz}$, 1H), 7,48(d, $J=9,4\text{Hz}$, 2H), 6,80(s, 1H), 4,74~4,66(m, 1H), 4,46~4,40(m, 1H), 3,82~3,77(m, 1H), 3,69~3,39(m, 1H), 3,01(s, 3H), 2,91~2,74(m, 2H). MS 465 $[M+H]^+$.

Rif. Esempio 12

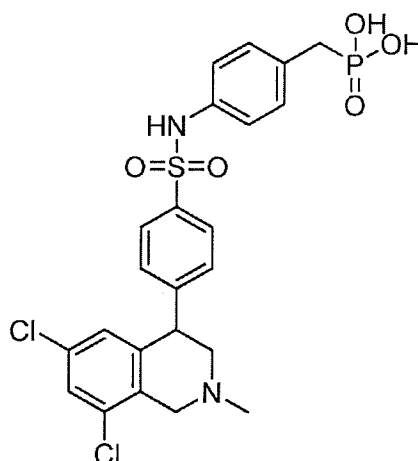
acido 3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propilfosfonico



Composto 12: acido 3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 1, è stato fatto composto 12 usando 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 10.6) e 3-dietil 3-amminopropilfosfonato (intermedio 4.1). Purificazione per HPLC preparativa ha dato un sale TFA del composto del titolo. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,90(d, J=8,4, 2H), 7,55(s, 1H), 7,46(d, J=8,1Hz, 2H), 6,88(s, 1H), 4,77~4,82(m, 1H), 4,71(d, J=16,2Hz, 1H), 4,47(d, J=15,9Hz, 1H), 3,80~3,86(m, 1H), 3,54~3,61(m, 1H), 3,11(s, 3H), 2,95~2,99(m, 2H), 1,53~1,71(m, 4H). MS 493 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 13

acido (4-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)fenil)metilfosfonico

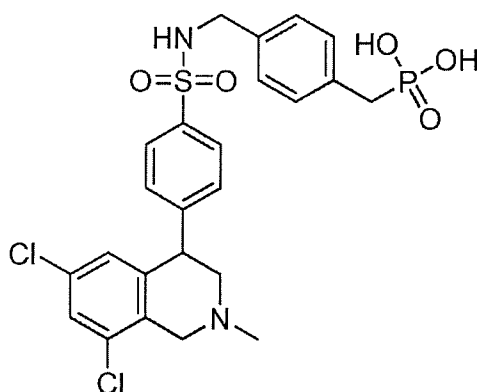


Composto 13: acido (4-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)fenil)metilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 1, è stato fatto composto 13 usando 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 10.6) e 4-amminobenzilfosfonato (intermedio 3.2). Purificazione per HPLC preparativa ha dato un sale TFA del composto del titolo. ¹H-MNR (300MHz, DMSO+D₂O, ppm): 7,69(d, J=8,4Hz, 2H), 7,46~7,46(m, 1H), 7,34(d, J=8,4Hz, 2H), 7,07(d, J=7,8Hz, 2H), 6,94(d, J=8,1, 2H), 6,71~6,71(m, 1H), 4,36~4,40(m, 1H), 3,65~3,80(m, 2H), 2,95~3,01(m, 1H), 2,72~2,79(m, 3H), 2,41(s, 3H). MS (ES, m/z): 541 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 14

acido (4-((4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)metil)fenil) metilfosfonico

5

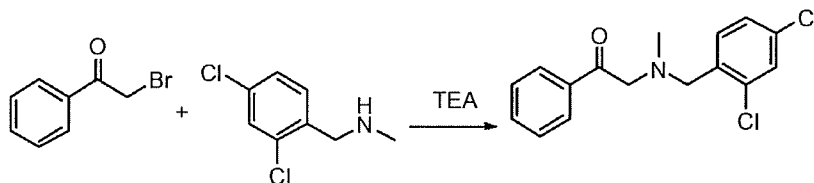


Composto 14: acido (4-((4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)metil)fenil metilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 1, è stato fatto composto 14 usando 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 10.6) e 4-(amminometil)benzilfosfonato (intermedio 6.1). Purificazione per HPLC preparativa ha dato un sale TFA del composto del titolo. ¹H-NMR (300MHz, DMSO+D₂O, ppm): 7,71(d, J=8,4Hz, 2H), 7,50(m, 1H), 7,40(d, J=8.4Hz, 2H), 7,06~7,15(m, 4H), 6,86~6,87(m, 1H), 4,38~4,40(m, 1H), 3,95(s, 2H), 3,75(d, J=16,2Hz, 1H), 3,53(m, 1H), 2,85~2,92(m, 2H), 2,69~2,75(m, 1H), 2,41(s, 3H). MS (ES, m/z): 555 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 15

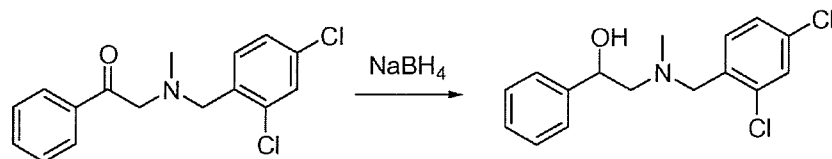
acido 3,3'-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonilazandiil)dipropanoico

20



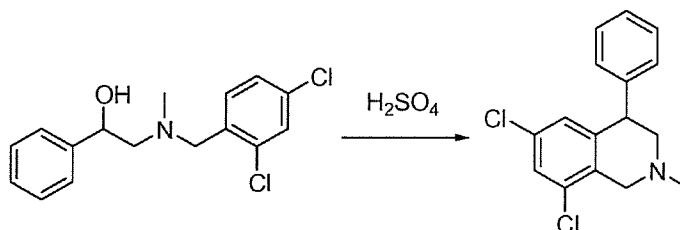
Intermedio 15.1: 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-feniletanone: In un pallone a 3 colli da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-bromo-1-feniletanone (1 g, 5,05 mmol, 1,00 equiv) in 1,4-diossano (20 mL) e (2,4-diclorofenil)-N-metilmetanammia (1,1 g, 5,82 mmol, 1,15 equiv). E' stata aggiunta trietilammia (2 g, 19,80 mmol, 3,92 equiv) goccia a goccia con agitazione a 20°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 20°C in un bagno d'olio. I solidi sono stati filtrati via. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:50). Questo è risultato in 1,4 g (90%) di composto del titolo come olio giallo.

30



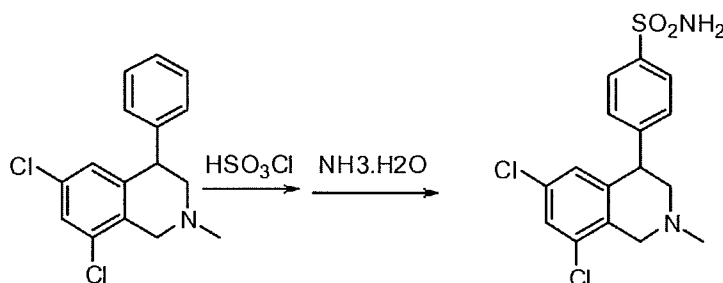
5 **Intermedio 15.2: 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-feniletanolo:** In un pallone a 3 colli da 250 ml purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-feniletanone (4,3 g, 14,01 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (50 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di NaBH₄ (1,5 g, 39,47 mmol, 2,82 equiv) in varie porzioni a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 30 min a 0°C in
10 bagno acqua/ghiaccio. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 20 mL di acetone. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:80~1:20). Questo è risultato in 3,4 g, (79%) di composto del titolo come solido bianco.

15

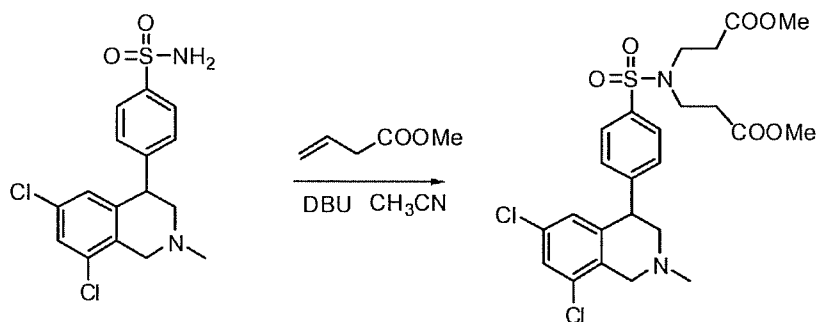


20 **Intermedio 15.3: 6,8-dicloro-2-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina:** In un pallone a 3 colli da 100 mL, è stata posta una soluzione di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-feniletanolo (3,4 g, 11,00 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (15 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di acido solforico (15 mL) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 0°C in un bagno acqua/ghiaccio. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 7 con sodio idrossido 1M. La soluzione ottenuta è stata
25 estratta con etil acetato (3x60mL) e gli strati organici riuniti seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etere di petrolio:etil acetato (80:1). Questo è risultato in 1,6 g (50%) del composto del titolo come olio incolore.

30

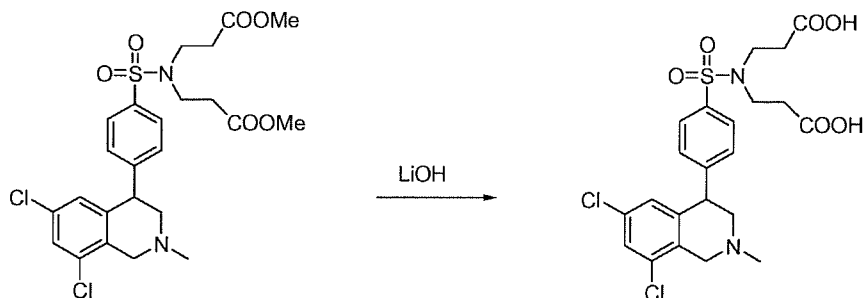


Intermedio 15.4: 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide: In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stato posto acido clorosolfonico (4 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta goccia a goccia di una soluzione di 6,8-dicloro-2-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (1,6 g, 5,5 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (30 mL) a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 0°C in un bagno acqua/ghiaccio e per ulteriore 1 h a 25°C in un bagno d'olio. A questo è stato aggiunto acido clorosolfonico (16 mL) goccia a goccia a 25°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per ulteriore 1 h a 25°C. Alla miscela ottenuta è stata raffreddata a 0°C e ammoniacca acquosa (120 mL) è stata aggiunta goccia a goccia. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 90°C in un bagno d'olio. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato disciolto in 20 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con diclorometano (3x30mL) e gli strati organici riuniti concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con diclorometano/metanolo (100:1). Il prodotto grezzo (0,5 g) è stato purificato per HPLC preparativa a dare 53 mg (3%) di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300MHz,CDCl₃, ppm): 7,89 (1H, d, J=8,4Hz), 7,35(2H, d, J=8,4Hz), 7,30(1H, m), 6,77(1H, s), 4,87(1H, s), 4,39(1H, s), 3,69(2H, m), 2,98(1H, t), 2,67(1H, dd), 2,55(3H, s). MS (ES, m/z): 371 [M+H]⁺.



Intermedio 15.5: dimetil 3,3'-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonilazendiil)dipropanoato: In un pallone a 3 colli da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide (Composto 15.4, 100 mg, 0,27 mmol, 1,00 equiv) in acetonitrile (5 mL). E' stato aggiunto metil but-3-enoato (40 mg, 0,40 mmol, 1,48 equiv) insieme con 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU, 20 mg, 0,13 mmol, 0,49 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata tutta la notte a 25°C in un bagno d'olio. Allontanando il solvente sotto vuoto si è ottenuto il composto del titolo che è stato usato senza ulteriore purificazione.

5



Composto 15: acido 3,3'-(4-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonilazandiil)dipropanoico: In un pallone a 3 colli da 50 mL purgato e mantenuto

10

in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di Intermedio 15.5 (140 mg, 0,26

mmol, 1,00 equiv, resa teorica) in tetraidrofurano(5 mL) ed acqua (5 mL). E' stato aggiunto

LiOH (20 mg, 0,83 mmol, 3,23 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a

temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato

15

caricato su una colonna di gel di silice con diclorometano/metanolo (100:1~20:1). Questo è

risultato in 0,015 g (11%) di composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz,

CD₃OD, ppm): 7,84(d, J=8,1HZ, 2H), 7,41(d, J=8,4Hz, 2H), 7,35(s, 1H), 6,84(s, 1H), 4,39(t,

1H), 3,77(d, 1H), 3,67(d, 1H), 3,45(m, 1H), 3,33(m, 4H), 2,69(d, 1H), 3,0(m, 1H), 2,47(m,

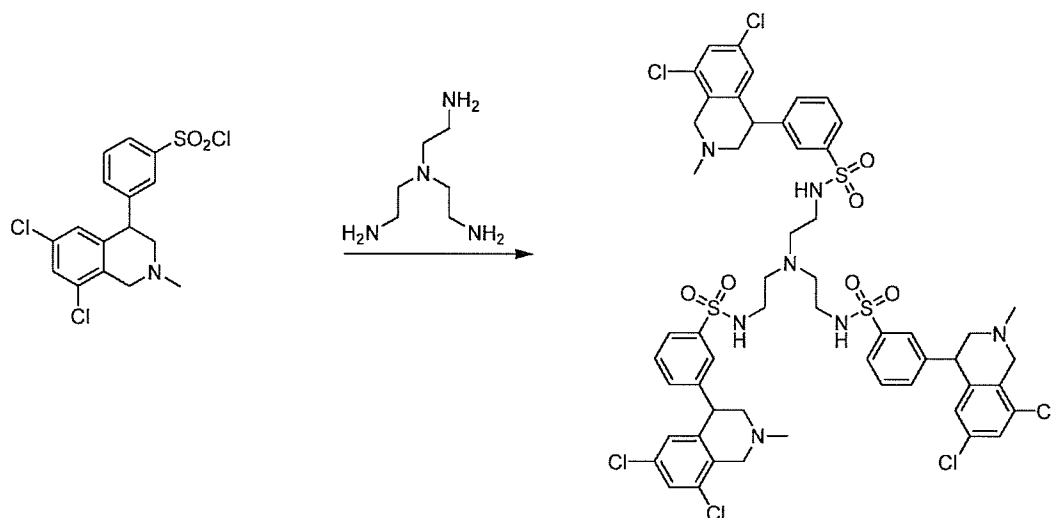
6H). MS (ES, m/z): 515 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 16

20

N,N',N''-(2,2',2''-nitilotris(etan-2,1-diil))tris(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)

25



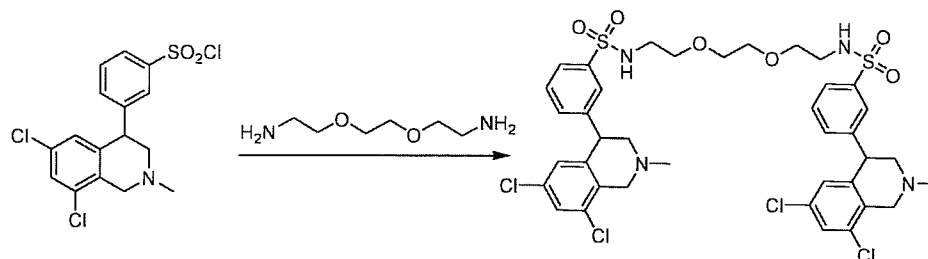
30

Composto 16: N,N',N''-(2,2',2''-nitilotris(etan-2,1-diil))tris(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide): Ad una soluzione di 3-(6,8-

dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (intermedio 1.6) (100mg, 0,235mmol) in DMF (1,5mL) è stata aggiunta TEA (94,94mg, 0,94mmol) ed una soluzione di N1,N1-bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina (11,45mg, 0,0783mmol) in 0,1mL DMF. La reazione è stata agitata per 40 minuti al qual punto LCMS ha indicato che non rimaneva prodotto di partenza. Il solvente è stato allontanato ed il residuo disciolto in 50% acido acetico in acqua e purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (25,4mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHZ, d₆-DMSO): δ7,77 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,59 (m, 3H), 6,76 (s, 1H), 4,70 (m, 1H), 4,38(m, 1H), 3,90(br m, 8H), 3,26 (m, 1H), 3,95(s, 3H), 2,65 (m, 2H). MS (*m/z*): 1210,01 (M+H).

Rif. Esempio 17

N,N'-(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)

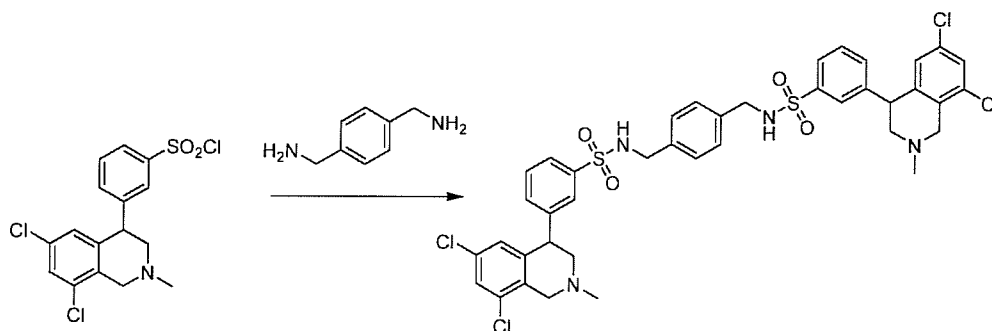


Composto 17: N,N'-(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide): Ad una soluzione di 2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))dietanammia (26,17 mg, 0,176mmol) in cloroformio (0,223mL) a 0°C è stata aggiunta diisopropiletilammia (DIEA, 182mg, 1,412mmol) ed una soluzione di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (intermedio 1.6) (150mg, 0,353mmol) in cloroformio (0,706mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 10 minuti al qual punto il solvente è stato allontanato ed il residuo ripreso in miscela 50% isopropanolo/acqua e purificato per HPLC preparativa. Il composto del titolo è stato ottenuto (44,5mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ7,87 (d, 1H), 7,64 (t, 1H), 7,64 (t, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,51 (d, 1H), 6,81 (s, 1H), 4,47 (d, 1H), 3,83 (dd, 1H), 3,59 (t, 1H), 3,43 (m, 2H), 3,12 (s, 4H), 3,01 (q, 2H). MS (*m/z*): 857,17 (M+H).

Rif. Esempio 18

N,N'-(1,4-fenilenbis(metilene))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)

5



Composto 18: *N,N'*-(1,4-fenilenbis(metilene))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide): Seguendo le procedure delineate in Rif.

10

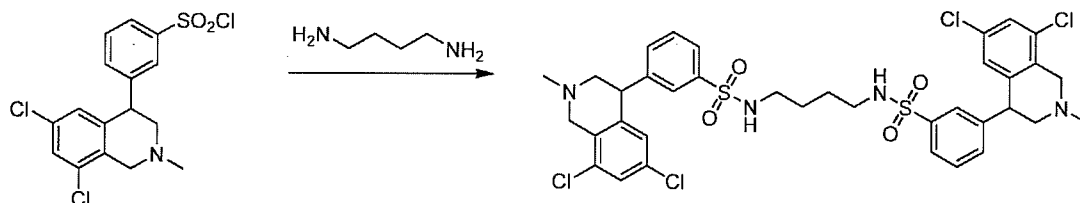
Esempio 17, è stato fatto composto 18 usando 1,4-fenilendimetanamina come ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,87 (d, 2H), 7,67 (s, 2H), 7,52 (m, 4H), 7,49 (d, 2H), 7,09 (s, 4H), 6,82 (s, 2H), 4,78 (m, 7H), 4,43 (d, 2H), 4,00 (s, 4H), 3,82 (dd, 2H), 3,51 (t, 2H), 3,11 (s, 6H). MS (*m/z*): 845,03 (M+H).

15

Rif. Esempio 19

***N,N'*-(butan-1,4-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)**

20



Composto 19: *N,N'*-(butan-1,4-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide): Seguendo le procedure delineate in Rif.

25

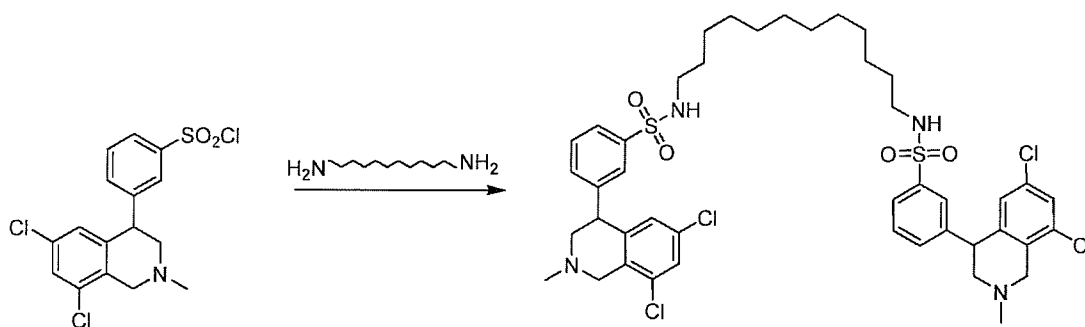
Esempio 17, è stato fatto composto 19 usando butan-1,4-diammina come ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,85 (d, 2H), 7,80 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,54 (t, 4H), 6,82(s, 2H), 4,49(d, 1H), 3,88 (dd, 2H), 3,58 (t, 2H), 3,14 (s, 6H), 2,81 (m, 4H). MS (*m/z*): 797,19 (M+H).

30

Rif. Esempio 20

***N,N'*-(dodecan-1,12-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)**

5



Composto 20: **N,N'-(dodecan-1,12-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide):** Seguendo le procedure delineate in Rif.

10

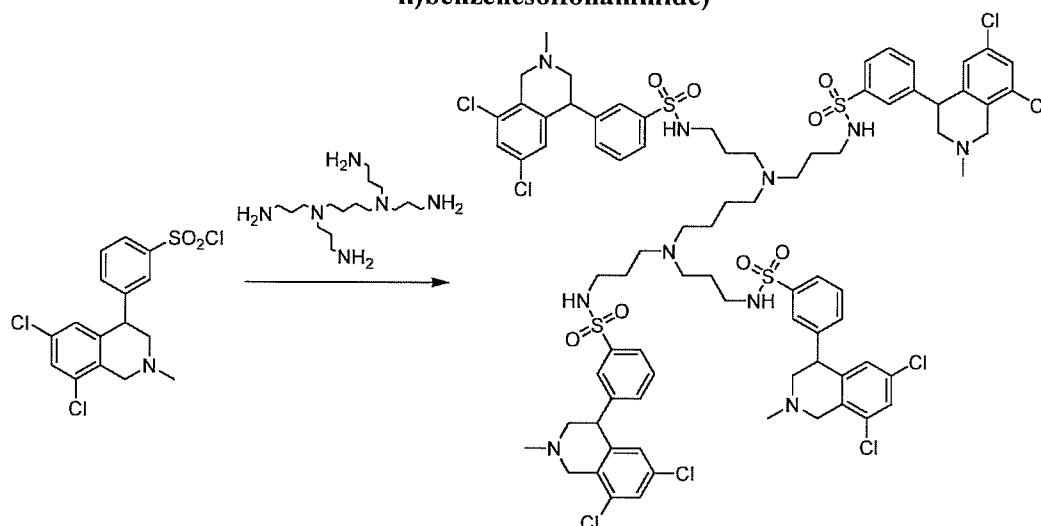
Esempio 17, è stato fatto composto 20 usando dodecan-1,12-diammina come ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ7,85 (d, 2H), 7,71(s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,54(m, 4H), 6,81 (s, 2H), 4,74 (m, 2H), 4,51 (d, 2H), 3,86 (dd, 2H), 3,29 (t, 2H), 3,13 (s, 7H), 2,79 (t, 4H), 1,39 (m, 4H), 1,22 (m, 20H). MS (*m/z*): 909,28 (M+H).

15

Rif. Esempio 21

N,N',N'',N'''-(3,3',3'',3''')-(butan-1,4-diilbis(azantrii))tetrakis(propan-3,1-diil)tetrakis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)

20



25

Composto 21: **N,N',N'',N'''-(3,3',3'',3''')-(butan-1,4-diilbis(azantrii))tetrakis(propan-3,1-diil)tetrakis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide):**

30

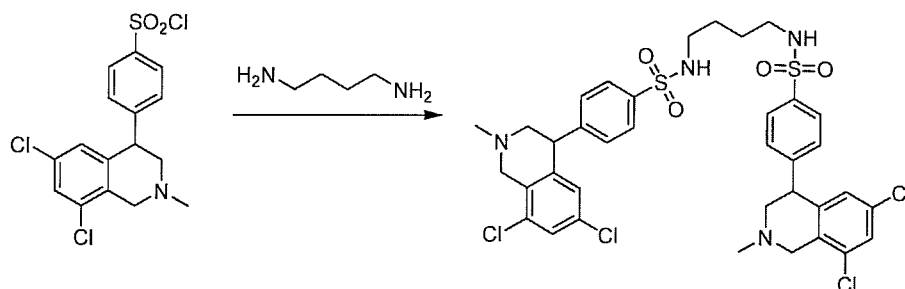
Ad una soluzione di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 1.6) (150mg, 0,0352mmol) in THF/H₂O (0,704mL, 50% v/v) è stata aggiunta DIEA (181,6mg, 1,41mmol) ed infine N1,N1'-(butan-1,4-diil)bis(N1-(3-amminopropil)propan-1,3-diammina) (27,54mg,

0,08825mmol). La miscela di reazione è stata agitata vigorosamente per 1 ora al qual punto il solvente è stato allontanato. Il residuo ottenuto è stato ripreso in 50% acetonitrile/acqua e purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (117mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ7,85 (d, 2H), 7,78 (s, 2H), 7,62 (t, 2H), 7,36 (m, 4H), 6,79 (s, 2H), 4,78 (m, 4H), 4,47 (d, 2H), 3,86 (dd, 2H), 3,55 (t, 2H), 3,55 (t, 2H), 3,12 (s, 6H), 2,94 (m, 4H), 1,90 (m, 4H), 1,85(m, 2H). MS (*m/z*): 1732,90 (M+H).

Rif. Esempio 22

N,N'-**(butan-1,4-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)**

10



Composto 22: N,N'-**(butan-1,4-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)**:

15

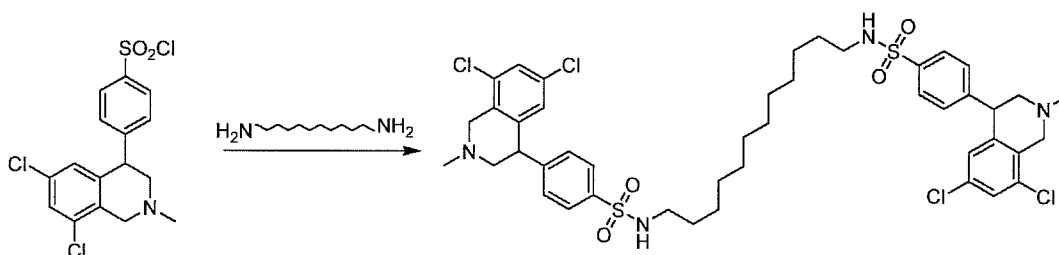
Ad una soluzione di 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 10.6) (150mg, 0,353mmol) in cloroformio (0,706mL) è stata aggiunta DIEA (182mg, 1,412mmol) ed una soluzione di butan-1,4-diammina (15,5mg, 0,176mmol) in cloroformio (0,176mL). La reazione è stata agitata per tutta la notte al qual punto il solvente è stato allontanato ed il residuo ottenuto ripreso in 50% IPA/H₂O. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (18,4mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ7,86 (d, 4H), 7,53 (s, 2H), 7,45 (d, 4H), 6,84 (s, 2H), 4,73 (m, 3H), 4,46 (d, 2H), 3,86 (dd, 2H), 3,57 (t, 2H), 3,12 (s, 6H), 2,84 (m, 4H), 1,41 (m, 4H). MS (*m/z*): 797,15 (M+H).

20

Rif. Esempio 23

N,N'-**(dodecan-1,12-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)**

25

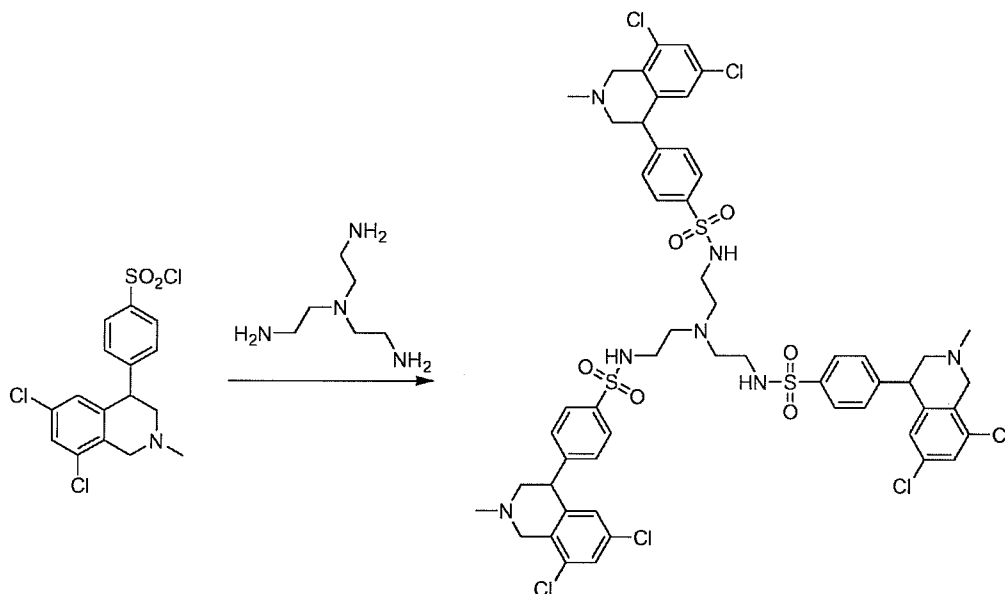


30

Composto 23: **N,N'-(dodecan-1,12-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide):** Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 22, è stato fatto composto 23 usando dodecan-1,12-diammina come ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): 7,89 (d, 4H), 7,54 (m, 2H), 7,42 (m, 4H), 6,82 (s, 2H), 4,85 (m, 3H), 4,72 (d, 2H), 3,85 (dd, 2H), 3,59 (t, 2H), 3,13 (m, 8H), 2,85 (m, 4H), 1,89 (m, 5H), 1,33 (m, 23H). MS (*m/z*): 909,21 (M+H).

Esempio 24

N,N',N''-(2,2',2''-nitriлотris(etan-2,1-diil)tris(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)



Composto 24: **N,N',N''-(2,2',2''-nitriлотris(etan-2,1-diil)tris(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide):** Ad una soluzione di 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (intermedio 10.6) (150mg, 0,353mmol) in soluzione THF/H₂O (50% v/v, 0,704mL) è stata aggiunta DIEA (182,2mg, 1,412mmol) e N1,N1-bis(2-amminoetil)etan-1,2-diammina (17,0mg, 0,116mmol). La reazione è stata agitata vigorosamente a temperatura ambiente per 40 minuti al qual punto il solvente è stato allontanato. Il residuo ottenuto è stato disciolto in acetonitrile/acqua (50% v/v) e purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (57,6mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): 7,94 (d, 6H), 7,51 (t, 9H), 6,83 (s, 3H), 4,78 (m, 6H), 4,45 (d, 3H), 3,83 (dd, 3H), 3,49 (t, 3H), 3,30 (m, 6H), 3,29 (m, 21H), 3,12 (s, 9H). MS (*m/z*): 1208,09 (M+H).

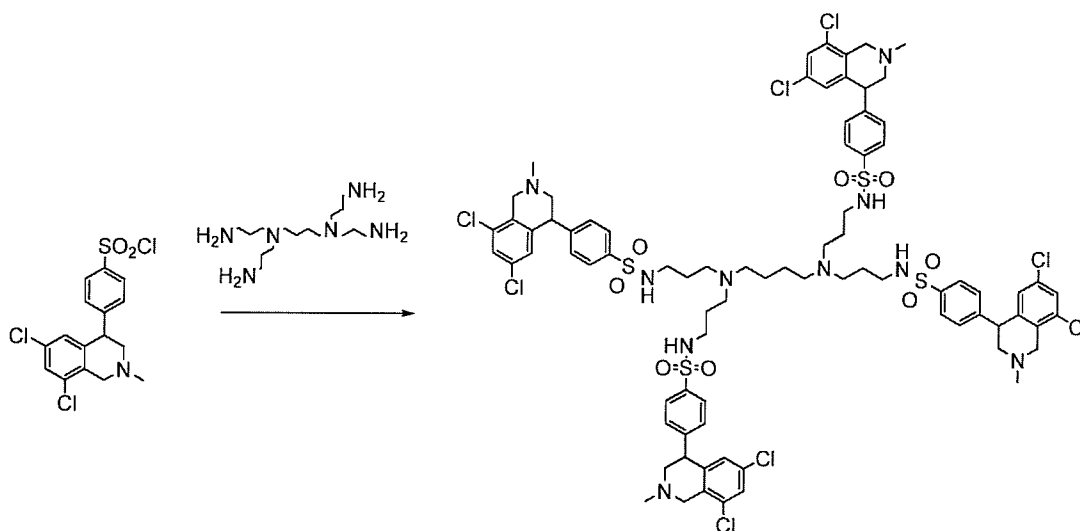
Rif. Esempio 25

N,N',N'',N'''-(3,3',3'',3''')-(butan-1,4-diilbis(azantriil))tetrakis(propan-3,1-diil)tetrakis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)

5

10

15



Composto 25: N,N',N'',N'''-(3,3',3'',3''')-(butan-1,4-diilbis(azantriil))tetrakis(propan-3,1-diil)tetrakis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

20

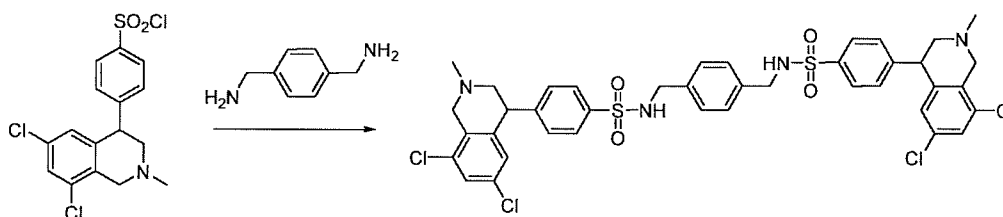
il)benzenesolfonammide): Seguendo la procedura delineata in Esempio 24, è stato fatto Composto 25 usando N1,N1'-(butan-1,4-diil)bis(N1-(3-aminopropil)propan-1,3-diammina) come ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): 7,88 (d, 8H), 7,51 (s, 4H), 7,48 (d, 8H), 6,81 (s, 4H), 4,75 (m, 8H), 4,47 (d, 4H), 3,85 (dd, 4H), 3,58 (t, 4H), 3,13(s, 12H), 2,98(t, 8H), 1,97 (m, 8H), 1,88 (m, 4H). MS (*m/z*): 1733.02 (M+H).

25

Rif. Esempio 26

N,N'-(1,4-fenilenebis(metilene))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)

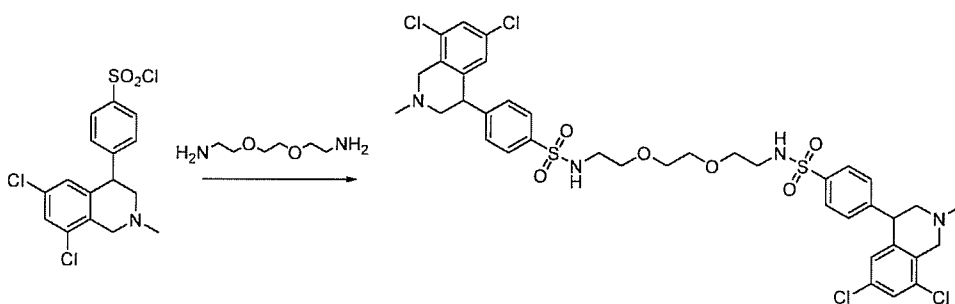
30



Composto 26: **N,N'-(1,4-fenilenebis(metilene))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide):** Seguendo la procedura delineata in Esempio 24, è stato fatto composto 26 usando 1,4-fenilendimetanamina come ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): 7,76 (d, 4H), 7,54 (s,2H), 7,39 (d,4H), 7,08 (s, 4H), 6,82 (s, 2H), 4,72 (m, 3H), 4,47 (d, 2H), 4,07 (s, 4H), 3,88 (dd, 2H), 3,61 (t, 2H), 3,16 (s, 6H). MS (*m/z*): 845,07 (M+H).

Rif. Esempio 27

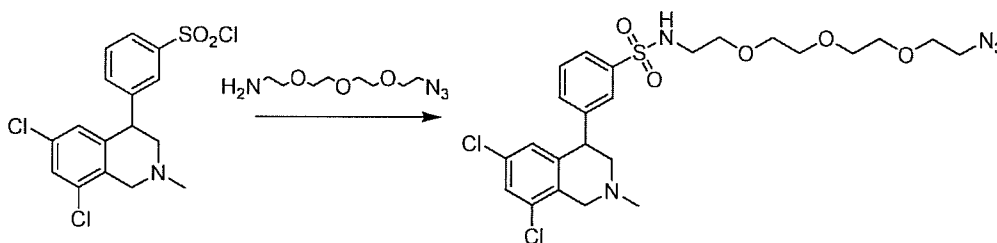
N,N'-(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide)



Composto 27: **N,N'-(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonammide):** Seguendo la procedura delineata in Esempio 24, è stato fatto composto 27 usando 2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))dietanamina come ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): 7,89 (d, 4H), 7,52 (s, 2H), 7,47 (d, 4H), 6,82 (s, 2H), 4,77 (m, 4H), 4,47 (d, 2H), 3,86 (dd, 2H), 3,59 (t, 2H), 3,43 (t, 8H), 3,13 (s, 6H), 3,06 (t, 4H). MS (*m/z*): 857,15 (M+H).

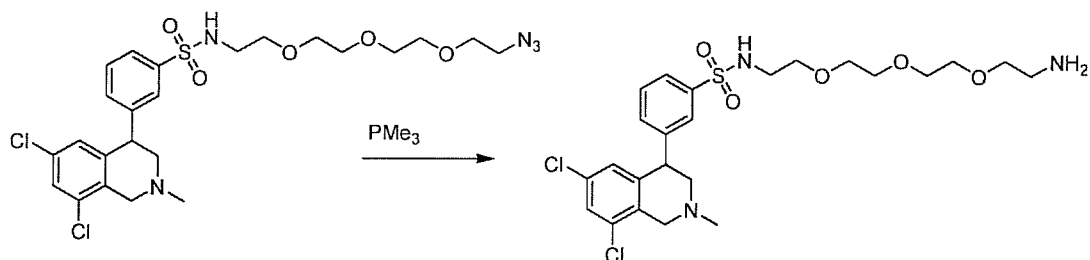
Rif. Esempio 28

N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide



Intermedio 28.1 **N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:** Ad una soluzione di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzene-1-solfonil cloruro (intermedio 1.6) (600mg,

1,41mmol) in cloroformio (2,82mL) è stata aggiunta DIEA (545,7mg, 4,24mmol) e 2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etanamina (616,3mg, 2,82mmol). La reazione è stata agitata per tutta la notte al qual punto la miscela è stata diluita con 50 mL DCM e lavata con NaHCO₃ (50mL). Lo strato acquoso è stato estratto con DCM (2x50mL) e le frazioni organiche riunite lavate con acqua (200mL), salamoia (200 mL) ed essiccate su Na₂SO₄. Allontanando il solvente si è ottenuto il composto del titolo come olio che è stato usato senza ulteriore purificazione.



Composto 28: N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:

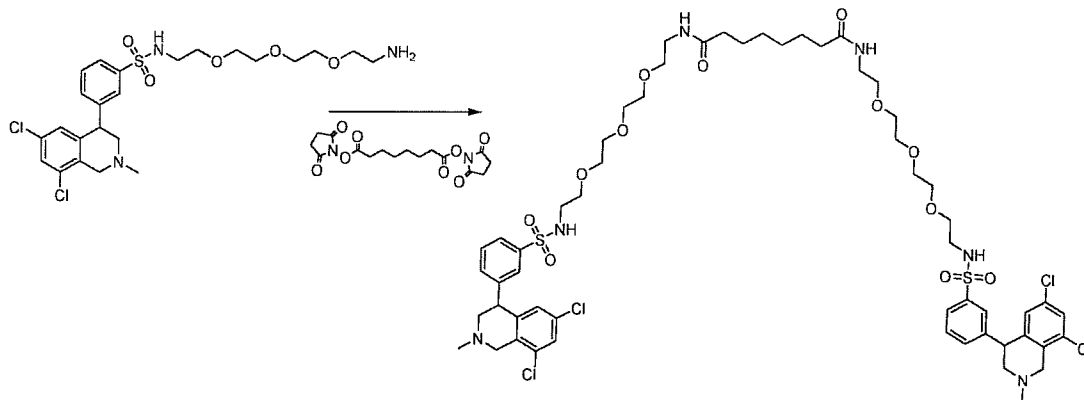
N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 28.1) (1,035g, assunte 1,41mmol) è stato sciolto in una soluzione 10:1 THF:acqua (26,5mL) e posta sotto N₂. E' stato aggiunto PMe₃ (165mg, 2,18 mmol) e la reazione è stata agitata per tutta la notte. Il solvente è stato allontanato ed il residuo ottenuto ripreso in EtOAc (100mL) e lavato con NaHCO₃ (100mL) e salamoia (100mL). Dopo essiccamento dello strato organico su Na₂SO₄, il solvente è stato allontanato a dare 446mg di composto del titolo (58% su due passaggi) come olio. Una porzione del prodotto grezzo è stata purificata per HPLC preparativa a dare il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,87 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,67 (t, j=7,7 Hz, 1H), 7,54 (m, 2H), 6,82 (s, 1H). 4,8-4,6 (m, 4H), 4,46 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,69 (m, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,61 (m, 2H), 3,55 (m, 2H), 3,12 (m, 4H), 3,03 (t, j=5,4Hz, 1H). MS (m/z): 546,18 (M+H).

Rif. Esempio 29

N1,N8-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ottandiammide

30

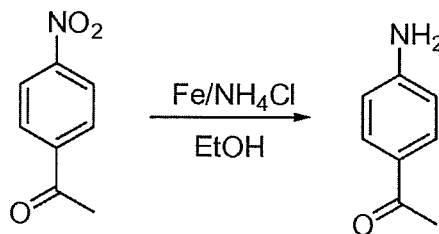
5



10 **Composto 29: N1,N8-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ottandiammide:** Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (composto 28) (54,5mg, 0,1mmol) in DMF (0,20mL) è stata
 15 aggiunta DIEA (15,5mg, 0,12 mmol) e bis(2,5-diosopirrolidin-1-il)ottandionato (18,4mg, 0,05mmol). La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore al qual punto è stato aggiunto ulteriore 0,03mmol di composto 28. Dopo un'ulteriore ora il solvente è stato allontanato ed il residuo ottenuto sciolto in acetonitrile/acqua (1:1) e purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (17,4mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHZ, CD₃OD): 7,89 (d, 2H), 7,78 (s, 2H), 7,64 (t, 2H), 7,52 (m, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,81 (m, 4H),
 20 4,45 (d, 2H), 3,89 (dd, 2H), 3,61 (m, 18H), 3,55 (m, 10H), 3,47 (m, 5H), 3,33 (m, 5H), 3,14 (s, 7H), 3,04 (t, 4H), 2,16 (t, 4H), 1,55 (m, 4H), 1,29 (m, 4H). MS (m/z): 1231,87 (M+H).

Rif. Esempio 30**acido 2-(N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)solfamoidammino)etilfosfonico**

25

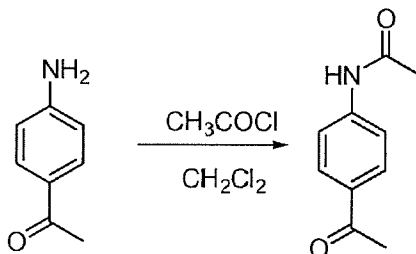


30

Intermedio 30.1: 1-(4-amminofenil)etanone: In un pallone a 3 colli da 100 mL, è stata
 35 posta una soluzione di 1-(4-nitrofenil)etanone (6 g, 36,36 mmol, 1,00 equiv) in etanolo(100 mL), acqua(15 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di NH₄Cl (3,85 g, 72,64 mmol, 2,00 equiv) in varie porzioni. A questo è stato aggiunto Fe (10,18 g, 181,79 mmol, 5,00 equiv) in varie porzioni, mentre la temperatura è stata mantenuta a riflusso. La miscela ottenuta è stata scaldata a riflusso per 2 h. I solidi sono stati filtrati via ed il filtrato ottenuto è stato

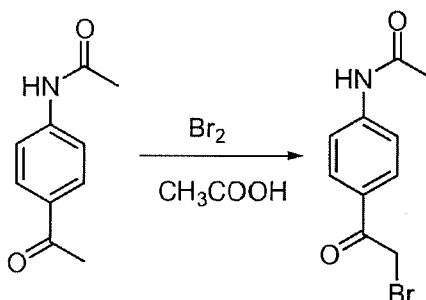
concentrato sotto vuoto. Il residuo è stato diluito con 50 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x50 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti ed essiccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto a dare 3,1 g (60%) di 1-(4-amminofenil)etanone come solido giallo.

5



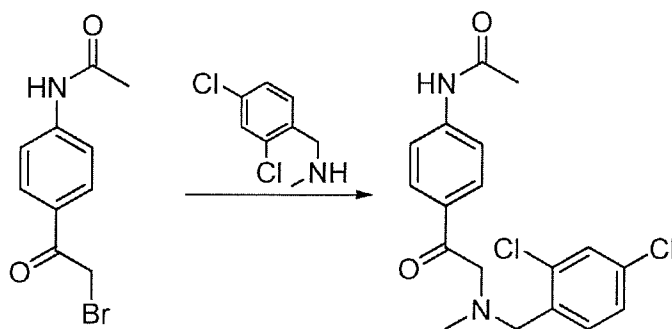
Intermedio 30.2: N-(4-acetilfenil)acetammide: In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 1-(4-amminofenil)etanone (3,1 g, 22,96 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (30 mL), trietilammina (4,64 g, 45,94 mmol, 2,00 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di acetil cloruro (1,79 g, 22,95 mmol, 1,00 equiv) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 30 min a 0°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 2 mL di acqua. La miscela ottenuta è stata lavata con 3x50 mL di sodio cloruro saturo acquoso. La miscela è stata essiccata su sodio solfato anidro e concentrata sotto vuoto a dare 3,0 g (74%) di N-(4-acetilfenil)acetammide come solido bianco.

20



Intermedio 30.3 : N-(4-(2-bromoacetil)fenil)acetammide: In un pallone a 3 colli da 100 mL, è stata posta una soluzione di N-(4-acetilfenil)acetammide (1 g, 5,65 mmol, 1,00 equiv) in acido acetico (10 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di bromo (910 mg, 5,69 mmol, 1,01 equiv) in acido acetico (2 mL) goccia a goccia con agitazione a 50°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 1,5 h a 50°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 100 mL di acqua/ghiaccio. I solidi sono stati raccolti per filtrazione ed essiccati sotto vuoto. Questo è risultato in 0,5 g (33%) of N-(4-(2-bromoacetil)fenil)acetammide come solido bianco.

5

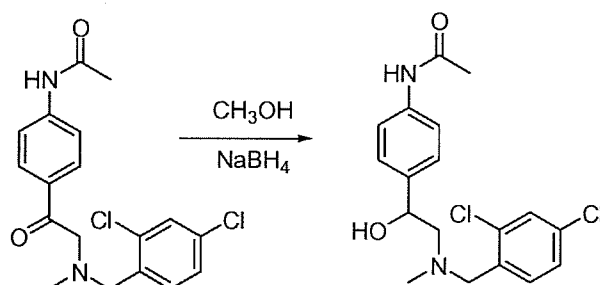


10

15

Intermedio 30.4: N-(4-(2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)acetil)fenil)acetammide: In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto a in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di N-(4-(2-bromoacetil)fenil)acetammide (1 g, 3,91 mmol, 1,00 equiv) in 1,4-diossano (40 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di trietilammina (1,58 g, 15,64 mmol, 4,00 equiv) goccia a goccia con agitazione a 20°C. A questo è stata aggiunta (2,4-diclorofenil)-N-metilmetanammina (880 mg, 4,63 mmol, 1,19 equiv) goccia a goccia con agitazione a 20°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 4 h a 20°C. I solidi sono stati filtrati via. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto a dare 1,5 g (84%) di N-(4-(2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)acetil)fenil)acetammide come solido bianco.

20

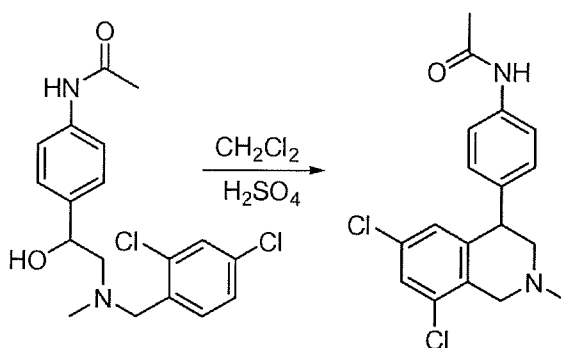


25

30

Intermedio 30.5: N-(4-(2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-idrossietil)fenil)acetammide: In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di N-(4-(2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)acetil)fenil)acetammide (1,5 g, 4,11 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (20 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di NaBH₄ (300 mg, 7,89 mmol, 2,06 equiv) in varie porzioni a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 0-5°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 5 mL di acetone. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:10-1:5). Questo è risultato in 1,2 g (76%) di N-(4-(2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-idrossietil)fenil)acetammide come olio giallo.

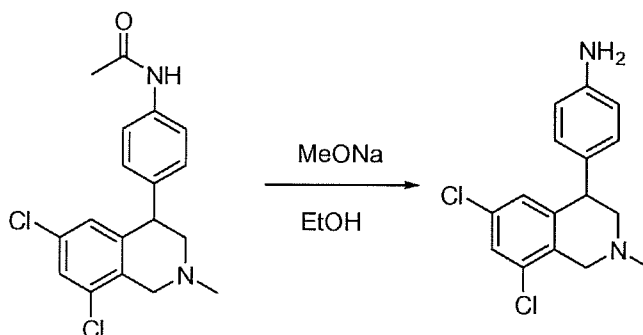
5



Intermedio 30.6: N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

il)fenil)acetammide: In un pallone a 3 colli da 100 mL, è stata posta una soluzione di N-(4-(2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-idrossietil)fenil)acetammide (500 mg, 1,36 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (3 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di acido solforico (3 mL) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 5 h a 0-5°C. La reazione è stata spenta per aggiunta di 20 mL di acqua/ghiaccio. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 7-8 con sodio idrossido. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x20 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti e concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:10-1:5). Questo è risultato in 25 mg (5%) di N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)acetammide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7,46-7,49(2H, d, J=8,4Hz), 7,23-7,29(1H, m), 7,12-7,15(2H, d, J=8,4Hz), 6,80 (1H, s), 4,314(1H, s), 3,92 (1H, d), 3,58-3,63(1H, d), 3,06(1H, s), 2,61-2,68(1H, m), 2,57(3H, s), 2,20(3H, s). MS (ES, m/z): 349 [M+H]⁺.

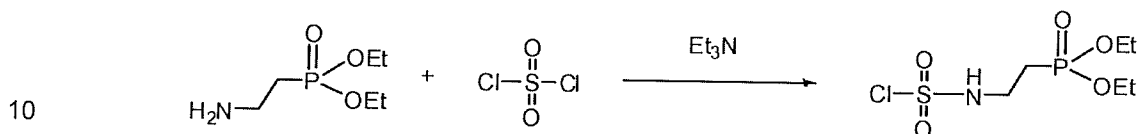
25



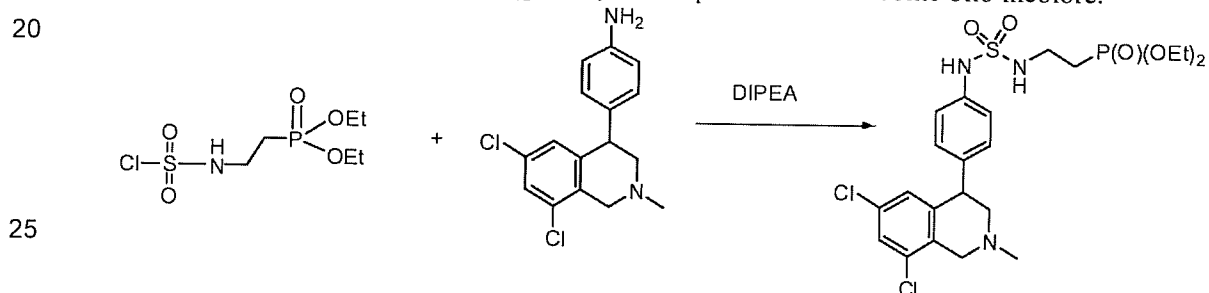
Intermedio 30.7: 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina:

In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)acetammide (2 g, 5,73 mmol 1,00 equiv) in etanolo (20 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di sodio metanolato (5 g, 95,29 mmol, 16,16 equiv) in varie porzioni, mentre la temperatura è stata mantenuta a riflusso. La soluzione ottenuta è stata scaldata a riflusso per

tutta la notte. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 50 mL di acqua/ghiaccio. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x50 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti e concentrati sotto vuoto. Questo è risultato in 1,5 g (85%) di 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina come olio giallo. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO, ppm): δ 7,42-7,42(1H, d, J=1,5Hz), 6,83-6,86(2H, d, J=8,1Hz), 6,78-6,78(1H, d, J=1,2Hz), 6,48-6,51(2H, d, J=8,4Hz), 4,98(2H, s), 4,02-4,06(1H, m), 3,62-3,67(1H, d, J=16,2Hz), 3,43-3,48(1H, d, J=15,9Hz), 2,80-2,86(1H, m), 2,37(3H, s). MS (ES, m/z):307 [M+H]⁺.

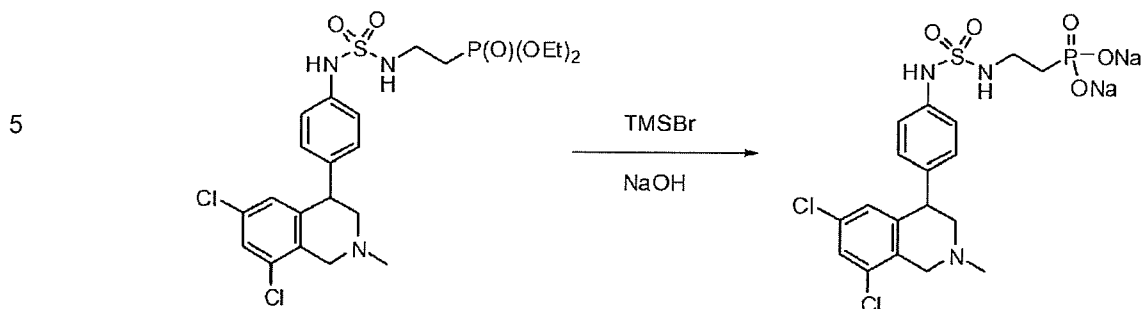


Intermedio 30.8: dietil 2-(clorosulfonilammino)etilfosfonato: In un pallone da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di solforil cloruro (1,1 g, 8,15 mmol, 1,47 equiv) in diclorometano (10 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di dietil 2-amminoetilfosfonato (intermedio 1.9) (1,0 g, 5,52 mmol, 1,00 equiv) e trietilammina (800 mg, 7,92 mmol, 1,43 equiv) in diclorometano (20 mL) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 0°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di acqua ghiacciata. Lo strato organico è stato lavato con sodio cloruro saturo (20 mL), essiccato su sodio solfato anidro e concentrato sotto vuoto. Questo è risultato in 0,5 g (grezzo) di composto del titolo come olio incolore.



Intermedio 30.9: dietil 2-(N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)etilfosfonato: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stato posto dietil 2-(clorosulfonilammino)etilfosfonato (intermedio 30.8) (670 mg, 2,40 mmol, 1,47 equiv), 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina (intermedio 30.7) (500 mg, 1,63 mmol, 1,00 equiv), N-etil-N-isopropilpropan-2-ammina (400 mg, 3,10 mmol, 1,91 equiv) in acetonitrile (20 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 60°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto ed il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito

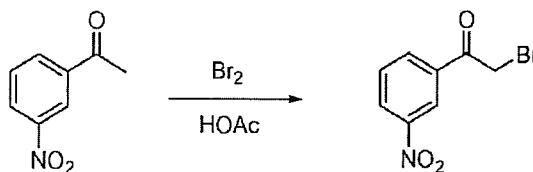
con diclorometano/metanolo (20:1). Questo è risultato in 150 mg (16%) di composto del titolo come solido giallino.



10 **Composto 30:** 2-(N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)etilfosfonico: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di dietil 2-(N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)-etilfosfonato (100 mg, 0,18 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (5 mL) e bromotrimetilsilano (275 mg, 1,80 mmol, 9,89 equiv).
15 La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 39°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto ed il residuo è stato sciolto in diclorometano (5 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di sodio idrossido (14,5 mg, 0,36 mmol, 2,00 equiv) in metanolo (0,2 mL) goccia a goccia con agitazione. I solidi sono stati raccolti per filtrazione ed essiccati sotto pressione ridotta. Questo ha dato 40 mg (40%) di un sale sodico del
20 composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, *d*₆-DMSO, ppm): δ 9,78 (1H, brs), 7,54 (1H, s), 7,47 (1H, brs), 7,09-7,17 (4H, m), 6,82 (1H, s), 4,31 (1H, brs), 3,88 (2H, brs), 3,13 (1H, brs), 3,04 (2H, brs), 2,90 (1H, brs), 2,58 (3H, s), 1,65-1,77 (2H, m). MS(m/z): 494 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 31

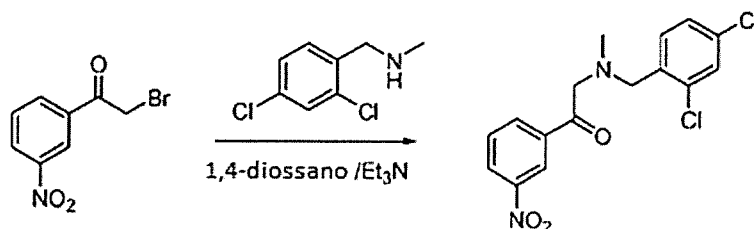
25 **acido 2-(N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)etilfosfonico**



Intermedio 31.1: 2-bromo-1-(3-nitrofenil)etanone: In un pallone a 3 colli da 500 mL, è stata posta una soluzione di 1-(3-nitrofenil)etanone (50 g, 303,03 mmol, 1,00 equiv) in acido acetico (300 mL), Br₂ (53,5 g, 331,6 mmol, 1,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 60°C in un bagno d'olio. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di ghiaccio ed i

solidi sono stati raccolti per filtrazione. Il prodotto grezzo è stato ri-cristallizzato da etil acetato/etere di petrolio in rapporto 1:10. Questo è risultato in 25 g (34%) di 2-bromo-1-(3-nitrofenil)etanone come solido bianco.

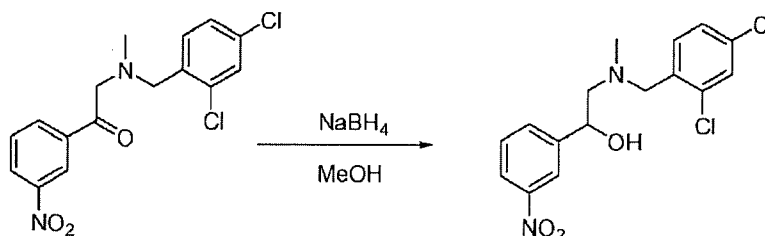
5



Intermedio 31.2: 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-nitrofenil)etanone: In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-bromo-1-(3-nitrofenil)etanone (2 g, 8,23 mmol, 1,00 equiv), trietilammina (3,4 g, 4,00 equiv), (2,4-diclorofenil)-N-metilmetanamina (1,9 g, 10,05 mmol, 1,20 equiv), 1,4-diossano (50 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente tempo al quale è stata ritenuta essere completa da LCMS. La miscela è stata concentrata sotto vuoto ed il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:100~1:50). Questo è risultato in 1,5 g (50%) di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-nitrofenil)etanone come solido giallo.

15

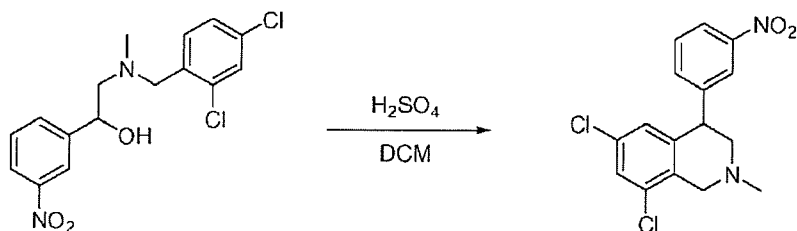
20



Intermedio 31.3: 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-nitrofenil)etanolo: In un pallone a 3 colli da 500 mL, è stata posta una soluzione di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-nitrofenil)etanone (28 g, 1,00 equiv, Grezzo) in metanolo (280 mL), NaBH₄ (6,38 mg, 0,17 mmol, 2,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 0,5 h a 0°C. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 10 mL di acetone. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:10~1:5). Questo è risultato in 14 g di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-nitrofenil)etanolo come solido giallo.

25

30

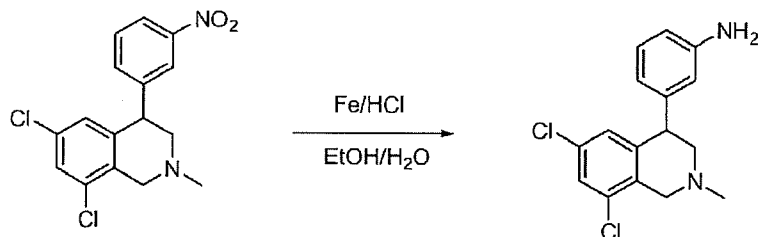


5

Intermedio 31.4: 6,8-dicloro-2-metil-4-(3-nitrofenil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolina: In un pallone a 3 colli da 500 mL, è stata posta una soluzione di 2-((2,4-diclorobenzil)(metil)ammino)-1-(3-nitrofenil)etanolo (14 g, 39,55 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (140 mL), acido solforico (140 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. La soluzione ottenuta è stata diluita con 100 mL di ghiaccio. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 8-9 con sodio idrossido sat. (100 mL). La soluzione ottenuta è stata estratta con 2x500 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti ed essiccati su sodio solfato. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:10~1:5). Questo è risultato in 7 g (51%) di 6,8-dicloro-2-metil-4-(3-nitrofenil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolina come solido giallo.

10

15

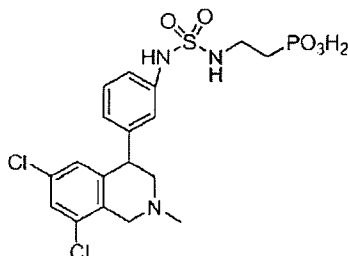


20

Intermedio 31.5: 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina:

In un pallone a 3 colli da 100 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta 6,8-dicloro-2-metil-4-(3-nitrofenil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (200 mg, 0,59 mmol, 1,00 equiv), Fe (360 mg, 6,43 mmol, 8,60 equiv), idrogeno cloruro (0,02 mL), etanolo (0,6 mL), acqua (0,2 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 0,5 h a 80°C in un bagno d'olio. I solidi sono stati filtrati via. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 0,2 g (grezzo) di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina come olio giallo.

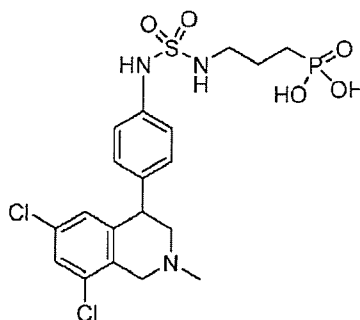
30



Composto 31: acido 2-(N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)etilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 30, sostituendo 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina (intermedio 31.5) per 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina è stato ottenuto il composto del titolo come sale sodico. ¹H-NMR(300MHz, D₂O+DMSO-d₆, ppm): δ 7,67 (s, 1H), 7,33 (t, J=8,1Hz, 1H), 7,07-7,15 (m, 2H), 6,81-6,86 (m, 2H), 4,39-4,66 (m, 3H), 3,75-3,81 (m, 1H), 3,45-3,50 (m, 1H), 3,02-3,08 (m, 5H), 1,67-1,78 (m, 2H). MS (ES, m/z): 494,0 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 32

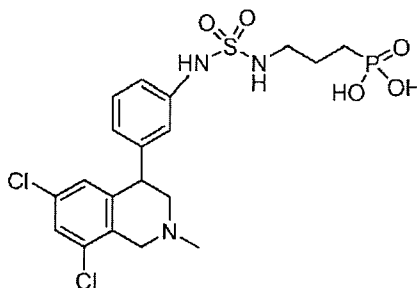
acido 3-(N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)propilfosfonico



Composto 32: acido 3-(N-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)propilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 30, sostituendo 3-dietil 3-amminopropilfosfonato (intermedio 4.1) per dietil 2-amminoetilfosfonato è stato ottenuto il composto del titolo come sale sodico. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,47(s, 1H), 7,28(s, 4H), 6,81(s, 1H), 4,73-4,77(m, 2H), 4,57(m, 1H), 3,81(s, 1H), 3,66(s, 1H), 3,18(s, 3H), 3,06(s, 2H), 1,74(m, 4H), 1,20-1,35(m, 1H). MS (ES, m/z): 508 [M+H]⁺

Rif. Esempio 33

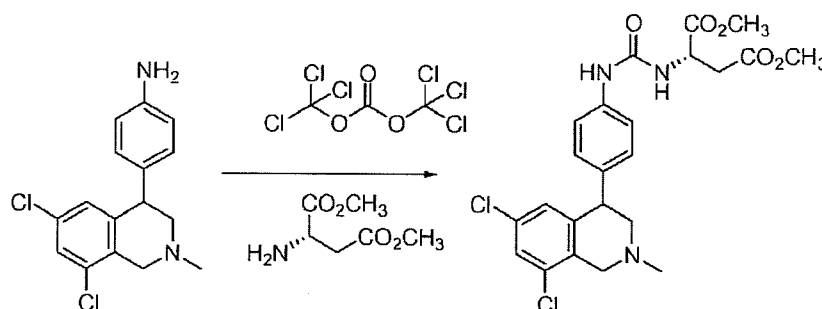
acido 3-(N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)propilfosfonico



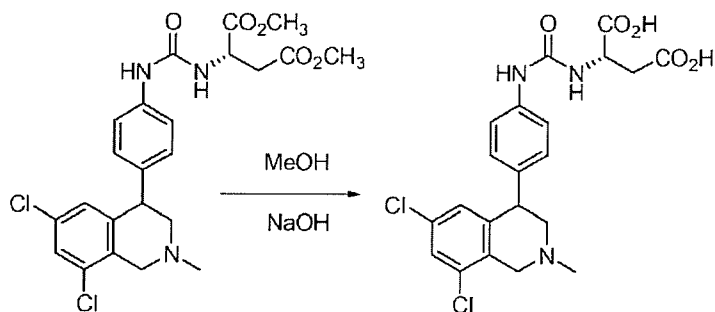
Composto 33: acido 3-(N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)sulfamoilammino)propilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 30, sostituendo 3-dietil 3-amminopropilfosfonato (intermedio 4.1) per dietil 2-amminoetilfosfonato e 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina (intermedio 31.5) per 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina è stato ottenuto il composto del titolo come sale sodico. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,54(s, 1H), 7,38(s, 1H), 7,25(s, 1H), 7,11(s, 1H), 6,94(m, 2H), 4,66(s, 1H), 4,55-4,51(m, 1H), 3,89(s, 1H), 3,65(m, 2H), 3,18(s, 3H), 3,05(s, 2H), 1,71(m, 4H). MS (ES, m/z): 508 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 34

acido (2S)-2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinico



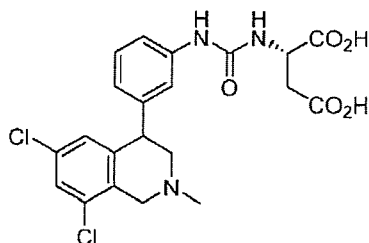
Intermedio 34.1: (2S)-dimetil 2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinato: In un pallone a 3 colli da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina (intermedio 30.7) (200 mg, 0,65 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (10 mL), trietilammina (1,2 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di bis(triclorometil) carbonato (200 mg, 0,67 mmol, 1,03 equiv) lentamente con agitazione a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a temperatura ambiente. A questa è stata aggiunta trietilammina (1 mL) seguita da (S)-dimetil 2-amminosuccinato (200 mg, 1,24 mmol, 1,91 equiv) in varie porzioni. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto ed il residuo caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:10-1:5). Questo è risultato in 50 mg (15%) di (2S)-dimetil 2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinato come olio giallo.



Composto 34: acido (2S)-2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinico: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di (2S)-
 10 dimetil 2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinato (100 mg, 0,20 mmol, 1,00 equiv) in metanolo(5 mL), acqua (1 mL), sodio idrossido (30 mg, 0,75 mmol, 3,71 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente e poi concentrata sotto vuoto. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 3-4 con acido cloridrico 1N. I solidi sono stati raccolti per filtrazione ed il residuo è stato liofilizzato.
 15 Questo è risultato in 16 mg (16%) di acido (2S)-2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinico come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 8,98(s, 1H), 7,66(s, 1H), 7,38-7,44(d, J=17,1Hz, 2H), 7,12-7,15(d, J=8,4Hz, 2H), 6,78(s, 1H), 6,60-6,63(s, 1H), 4,48-4,54(m, 4H), 3,63-3,66(s, 2H), 3,01(s, 1H), 2,51-2,84(m, 2H). MS (ES, m/z): 466 [M+H]⁺.

20 **Rif. Esempio 35**

acido (2S)-2-(3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinico

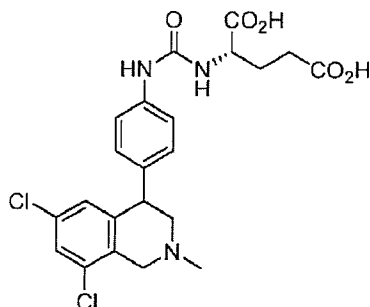


Composto 35: acido (2S)-2-(3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)succinico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 34, sostituendo
 30 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina (intermedio 31.5) per 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina è stato ottenuto, dopo purificazione per HPLC preparativa, il composto del titolo come sale TFA.. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 8,88(s, 1H), 7,54(s,1H), 7,31-7,18(m, 3H), 6,83-6,78(m, 2H), 6,53-6,51(m, 1H),

4,49-4,47(m, 1H), 4,29(m, 1H), 3,87(m, 2H), 3,32(m, 2H), 2,76-2,59(m, 2H), 2,50(s, 3H).
MS 466 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 36

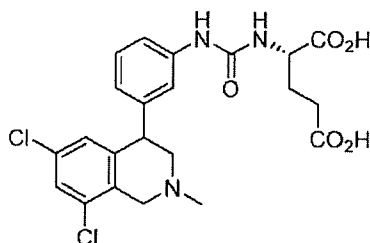
acido (2S)-2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)pentandioico



Composto 36: acido (2S)-2-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)pentandioico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 34, sostituendo (S)-dietil 2-amminopentandioato per (S)-dimetil 2-amminosuccinato è stato ottenuto il composto del titolo. ¹H-NMR(300MHz, DMSO, ppm) δ 12,32(s, 2H), 8,63(s, 1H), 7,47(s, 1H), 7,30-7,33(d, J=8,1Hz, 2H), 7,06-7,09(d, J=5,4Hz, 2H), 6,79(s, 1H), 6,45-6,48(d, J=8,1Hz, 1H), 4,19-4,20(s, 2H), 3,68(s, 2H), 2,95(s, 1H), 2,68(s, 1H), 2,45(s, 3H), 2,27-2,30(s, 2H), 1,99-2,02(s, 1H), 1,76-7,78(s, 1H). MS (ES, m/z):480 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 37

acido (2S)-2-(3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)pentandioico

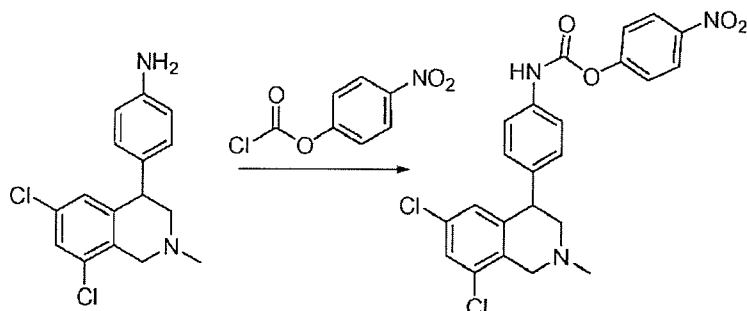


Composto 37: acido (2S)-2-(3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)pentandioico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 34, sostituendo 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina (intermedio 31.5) per 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina e (S)-dietil 2-amminopentandioato per (S)-dimetil 2-amminosuccinato è stato ottenuto, dopo purificazione per HPLC preparativa, il composto del titolo come sale TFA.. ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 8,74(s, 1H), 7,67(s, 1H), 7,42(m, 1H), 7,27-7,25(m, 2H), 6,79(m, 2H), 6,52-

6,49(m, 1H), 4,63-4,58(m, 1H), 4,44(m, 2H), 4,20-4,16(m, 1H), 3,72-3,64(m, 2H), 2,99(s, 3H), 2,34-2,27(m, 2H), 2,01-1,97(m, 2H), 1,82-1,77(m, 2H). MS 480 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 38

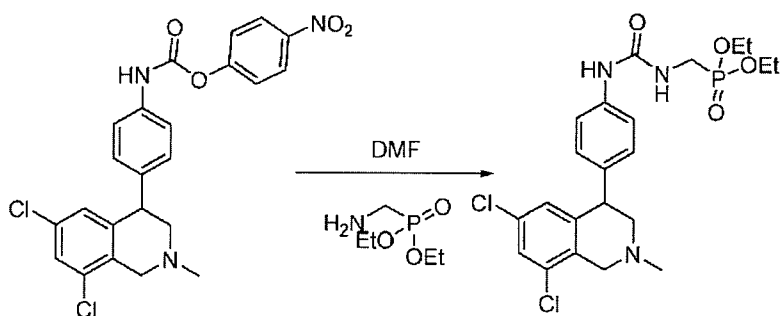
acido (3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)metilfosfonico



Intermedio 38.1: 4-nitrofenil 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilcarbammato: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina (intermedio 30.7) (300 mg, 0,98 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (10 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di 4-nitrofenil cloroformiato (230 mg, 1,14 mmol, 1,20 equiv) in varie porzioni a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente. I solidi sono stati raccolti per filtrazione. Questo è risultato in 0,3 g (65%) di 4-nitrofenil 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilcarbammato come solido giallo.

15

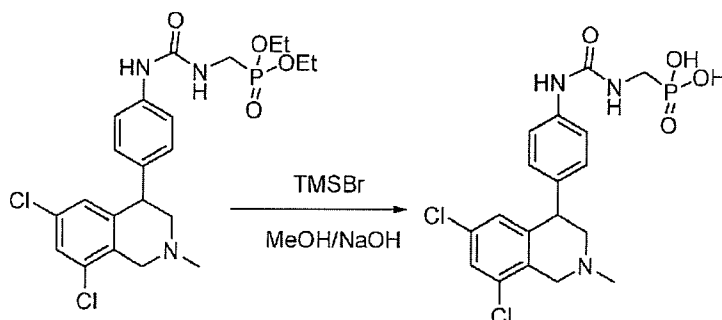
20



Intermedio 38.2: dietil (3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)metilfosfonato: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 4-nitrofenil 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilcarbammato (200 mg, 0,42 mmol, 1,00 equiv) in N,N-dimetilformammide (6 mL), una soluzione di dietil amminometilfosfonato (144 mg, 0,63 mmol, 1,50 equiv) in N,N-dimetilformammide (1 mL) e trietilammina (64 mg). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La reazione è stata poi

30

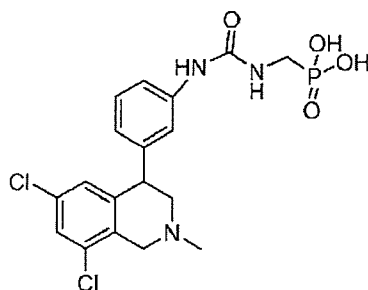
spenta per aggiunta di 10 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x10 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti ed essiccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Questo è risultato in 40 mg (17%) di dietil (3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)-metilfosfonato come solido.



Composto 38: acido (3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)metilfosfonico: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di dietil (3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)metilfosfonato (40 mg, 0,08 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (5 mL) e bromotrimetilsilano (0,15 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. A questa è stato aggiunto metanolo (5 mL) e sodio idrossido (5 mg). La miscela ottenuta è stata agitata 0,5 h a temperatura ambiente. I solidi sono stati raccolti per filtrazione ed il residuo è stato liofilizzato. Questo è risultato in 17,4 mg (42%) di un sale sodico del composto del titolo come solido giallo. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{DCl}$, ppm): δ 7,46-7,49(m, 3H), 7,20-7,23(d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H), 6,80(s, 1H), 4,77-4,83(d, $J=15,9\text{Hz}$, 1H), 4,65-4,71(m, 1H), 4,50-4,55(d, $J=16,2\text{Hz}$, 1H), 3,79-3,85(m, 1H), 3,56-3,69(m, 3H), 3,32(s, 3H). MS (ES, m/z): 444 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

25 **Rif. Esempio 39**

acido (3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)metilfosfonico



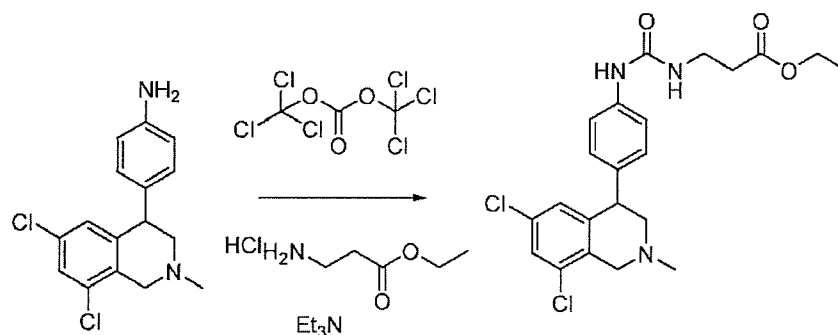
Composto 39: acido (3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)metilfosfonico: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 38, sostituendo 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina (intermedio 31.5) per 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina è stato ottenuto il composto del titolo come sale sodico. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD , ppm): δ 7,47 (s, 1H), 7,37 (m, 3H), 6,96 (m, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,81 (m, 1H), 4,70 (m, 1H), 4,54 (m, 1H), 3,83 (m, 1H), 3,65 (m, 3H), 3,19 (s, 3H).

Rif. Esempio 40

acido 2-(3-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)propil)malonico

10

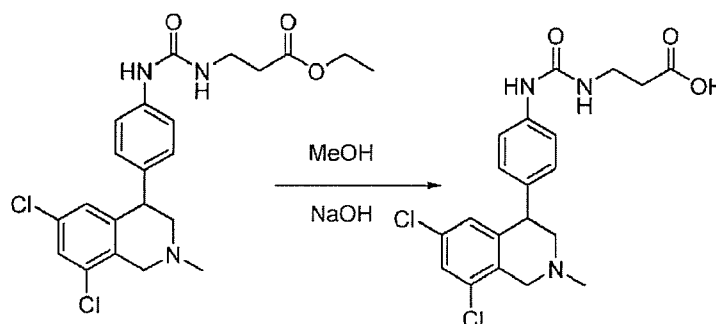
15



Intermedio 40.1: etil 3-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)propanoato: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 34, sostituendo etil 3-amminopropanoato per (S)-dimetil 2-amminosuccinato è stato ottenuto il composto del titolo come olio giallo.

20

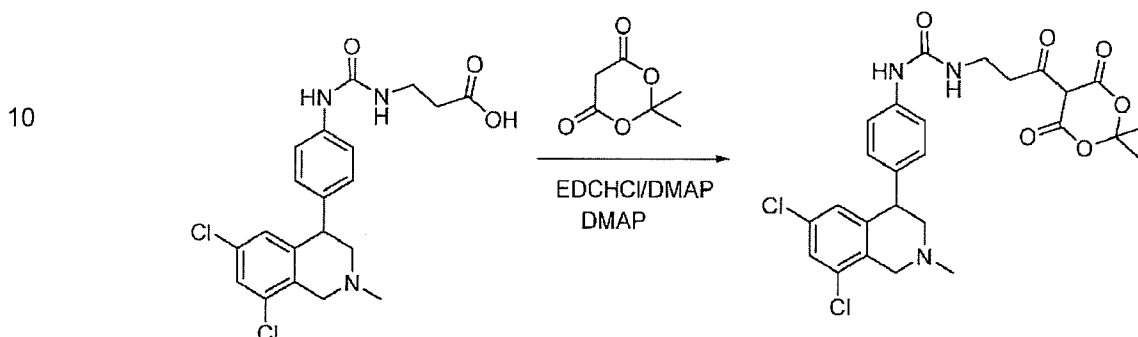
25



Intermedio 40.2: acido 3-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)propanoico: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di etil 3-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)-propanoato (150 mg, 0,33 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (10 mL), acqua (2 mL) e sodio idrossido (80 mg, 2,00 mmol). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 25°C e la miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 7-8 con idrogeno

30

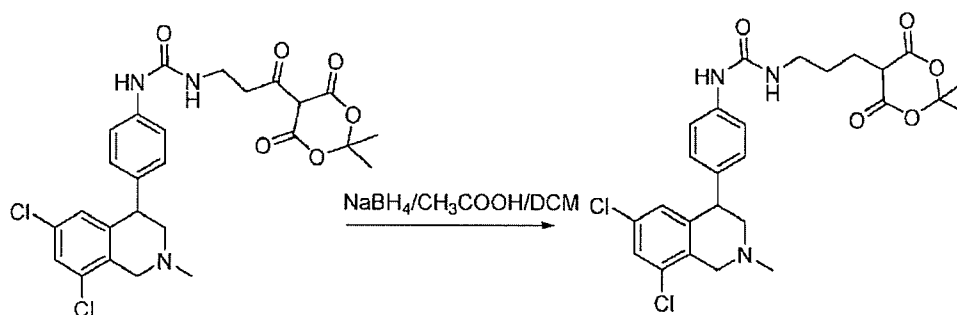
cloruro. La soluzione ottenuta è stata estratta con cloroformio (3x10 ml) e gli strati organici riuniti ed essiccati su sodio solfato. Questo è risultato in 31,5 mg (22%) di acido 3-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)propanoico come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 8,56(1H, s), 7,45(1H, s), 7,29-7,32(2H, d, J=8,1Hz), 7,04-7,07(2H, d, J=8,4Hz), 6,79(1H, s), 6,21(1H, s), 4,16(1H, m), 3,56-3,58(2H, d, J=5,4Hz), 3,27-3,29(2H, d, J=6Hz), 2,82-2,87(1H, m), 2,59(2H, s), 2,38-2,40(4H, m). MS (ES, m/z): 422 [M+H]⁺.



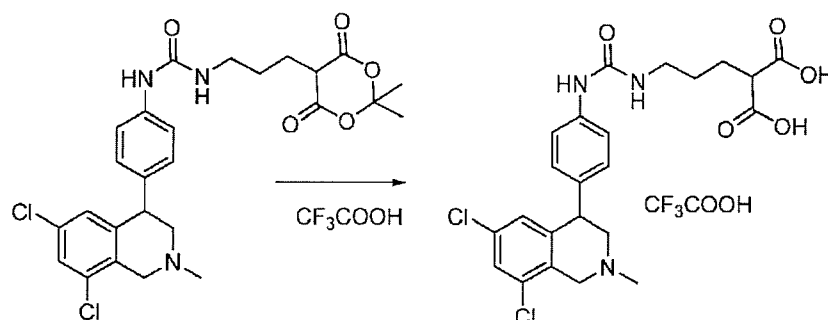
Intermedio 40.3: 1-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(3-(2,2-dimetil-4,6-diosso-1,3-diossan-5-il)-3-ossopropil)urea: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di acido 3-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)propanoico (200 mg, 0,47 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (20 mL), N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (136 mg, 0,71 mmol, 1,50 equiv) e 4-dimetilamminopiridina (115 mg, 0,94 mmol, 1,99 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di 2,2-dimetil-1,3-diossan-4,6-dione (102 mg, 0,71 mmol, 1,49 equiv) in diclorometano (2 mL) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata lavata con KHSO₄ (2x10 mL). La miscela è stata essiccata su sodio solfato anidro e concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 240 mg (92%) di 1-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(3-(2,2-dimetil-4,6-diosso-1,3-diossan-5-il)-3-ossopropil)urea come solido giallo.

20

25



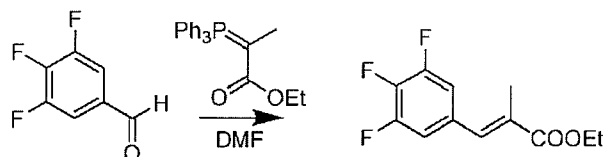
Intermedio 40.4: 1-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(3-(2,2-dimetil-4,6-diosso-1,3-diossan-5-il)propil)urea: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 1-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(3-(2,2-dimetil-4,6-diosso-1,3-diossan-5-il)-3-ossopropil)urea (150 mg, 0,27 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (10 mL) e acido acetico (1 mL). Sodio boridruro (42 mg, 1,11 mmol, 4,04 equiv) è stato aggiunto e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata lavata con sodio cloruro acquoso saturo (3x10 mL). La miscela è stata essiccata su solfato di sodio anidro e concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 30 mg (21%) di 1-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(3-(2,2-dimetil-4,6-diosso-1,3-diossan-5-il)propil)urea come solido giallo.



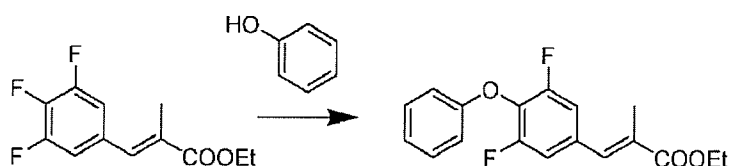
Composto 40: acido 2-(3-(3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)ureido)propil)malonico: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di 1-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(3-(2,2-dimetil-4,6-diosso-1,3-diossan-5-il)propil)urea (100 mg, 0,19 mmol, 1,00 equiv) in acido 2,2,2-trifluoroacetico (10 mL) e acqua (2 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con metanolo:acqua (60%). Il residuo è stato liofilizzato. Questo è risultato in 36,3 mg (30%) di sale TFA del composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 8,55(s, 1H), 7,64(s, 1H), 7,39-7,42(d, J=8,7Hz, 2H), 7,09-7,12(d, J=8,4Hz, 2H), 6,79(s, 1H), 6,23-6,27(m, 1H), 4,33-4,50(m, 3H), 3,62(s, 1H), 3,19(m, 1H), 3,08-3,10(d, J=5,7Hz, 2H), 2,94(s, 3H), 1,70-1,77(d, J=23,1Hz, 2H), 1,41-1,46(d, J=12Hz, 2H). MS (ES, m/z): 494 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 41

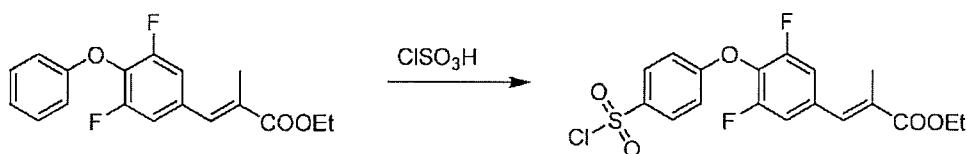
N,N'-(butan-1,4-diil)bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]



Intermedio 41.1 (E)-etil 2-metil-3-(3,4,5-trifluorofenil)acrilato: Ad una soluzione di DMF secco (50mL) sotto N₂ è stata aggiunta 3,4,5-trifluorobenzaldeide (4,26g, 26,6mmol) seguita da etil 2-(trifenilfosforanilidene)propionato (10,6g, 29,3mmol) in porzioni, tenendo la soluzione a temperatura ambiente. Dopo 1 ora, la TLC (10% EtOAc in Esani) ha mostrato conversione completa e il solvente è stato allontanato per evaporazione rotatoria. Il materiale ottenuto è stato ripreso in 50mL metil t-butil etere (MBTE) e il precipitato rimosso per filtrazione e lavato con ulteriore MBTE (3x50mL). Dopo concentrazione, il filtrato ottenuto è stato caricato su una colonna di gel di silice (25% EtOAc in esani) risultando in 6,0g di composto del titolo (93%) come polvere bianca.

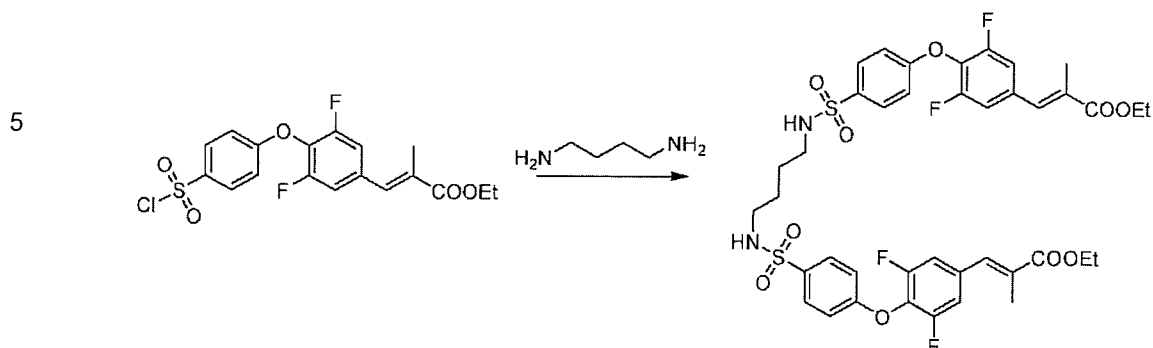


Intermedio 41.2 (E)-etil 3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilacrilato: Ad una soluzione di (E)-etil 2-metil-3-(3,4,5-trifluorofenil)acrilato (Intermedio 41,1, 6,0g, 24,56mmol) in DMF secco (25mL) sotto N₂ è stato aggiunto fenolo (2.774g, 29,5mmol) e K₂CO₃ (10,2g, 73,68mmol). La soluzione ottenuta è stata portata a 120°C ed agitata per 3 ore al qual punto la TLC ha indicato completa conversione. Il solvente è stato allontanato per evaporazione rotatoria ed il residuo ottenuto ripreso in EtOAc (200mL) e lavato con acqua (2x200mL), 1N NaOH (2x200mL) e salamoia (200mL). Lo strato organico è stato essiccato su Na₂SO₄ e concentrato a dare 6,94g (89%) di composto del titolo come cristalli marroncini.

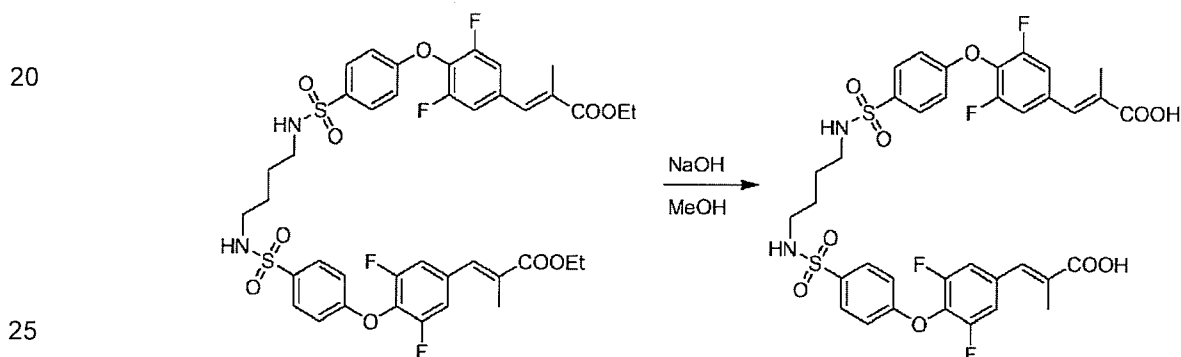


Intermedio 41.3 (E)-etil 3-(4-(4-(clorosolfonil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato: Ad una soluzione di (E)-etil 3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilacrilato (intermedio41.2) (1g, 3,14mmol) in DCM (3,14mL) sotto N₂ è stato aggiunto acido clorosolfonico (0,419mL, 6,28mmol) goccia a goccia. Dopo 1 ora è stato aggiunto un ulteriore 0,209mL di acido clorosolfonico. Dopo un'ulteriore ora, la miscela di reazione è stata spenta con acqua-ghiaccio ed estratta in EtOAc (2x200mL). Gli strati organici riuniti sono stati essiccati

brevemente (<10min) su Na₂SO₄ e concentrati per recuperare 1,283g di composto del titolo (98%) come olio giallo.

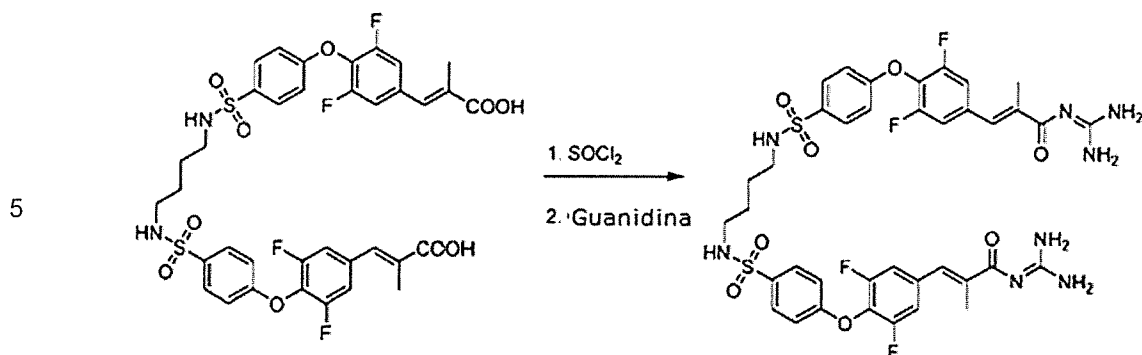


10 **Intermedio 41.4** **N,N'-(butan-1,4-diil)bis[4-(2,6-difluoro-4-(2-carboetossipropenil)fenossi)benzensolfonammide]:** Ad una soluzione di (E)-etil 3-(4-(4-clorosolfonil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (Intermedio 41.3) (104,3mg, 0,25mmol) in cloroformio (0,5mL) è stata aggiunta DIEA (0,0869mL, 0,5mmol) ed una soluzione di butan-1,4-diammina (12,6uL, 0,125mmol) e DIEA (0,087mL, 0,5mmol) in cloroformio (0,125mL). Dopo un'ora il solvente è stato allontanato e il residuo ottenuto ripreso in EtOAc (40mL), lavato con acqua (2x40mL), salamoia (40mL) ed essiccato su Na₂SO₄. Allontanando il solvente è stato ottenuto 118mg di composto del titolo che è stato usato senza ulteriore purificazione.



25 **Intermedio 41.5:** **N,N'-(butan-1,4-diil)bis[4-(2,6-difluoro-4-(2-carbossipropenil)fenossi)benzensolfonammide]:** Ad una soluzione di Intermedio 41.4 (118mg, 0,139mmol) in MeOH (1,39mL) è stato aggiunto NaOH (0,3M in acqua, 0,278mL, 0,835mmol). La reazione è stata posta sotto N₂ e scaldata a 60°C per 30 minuti. Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita con acqua (20mL), partizionata con EtOAc (20mL) ed acidificata con HCl. Dopo estrazione con EtOAc (2x20mL) le fasi organiche riunite sono state essiccate su Na₂SO₄ e il solvente allontanato a dare 40,7mg di composto del titolo.

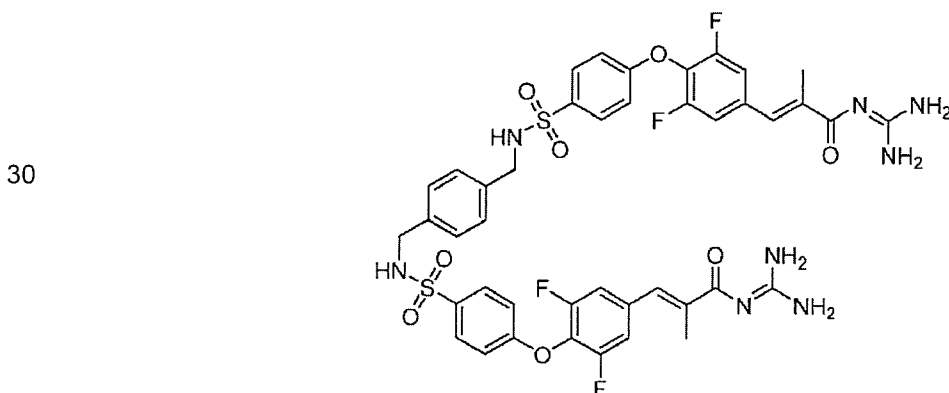
30



10 **Composto 41: N,N'-(butan-1,4-diil)bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]:** Tionil cloruro (2 mL) è stato aggiunto a
intermedio 41.5 (40,7 mg, 0,051 mmol) ed è stato scaldato a 80 C sotto N₂. Dopo 70 minuti,
il solvente è stato allontanato sotto vuoto. Il residuo è stato ripreso in toluene (2mL) ed anche
il toluene è stato allontanato sotto vuoto. Il bis-acido cloruro è stato sciolto in DME (0,5 mL)
15 e aggiunto a guanidina base libera (1,4 mmol, preparata come segue: Ad una miscela di
guanidina cloridrato (480 mg, 5,0 mmol) è stato aggiunto 25% NaOMe in MeOH (1,03 mL,
4,5 mmol). La miscela è stata agitata per 30 minuti e poi filtrata. Una porzione del filtrato
(0,40 mL) è stata concentrata a secchezza.) in DME (1mL). Dopo 15 minuti, è stata aggiunta
acqua (10 mL) e la miscela è stata estratta con EtOAc (3 x 25 mL). Lo strato organico è stato
20 seccato (Na₂SO₄) e concentrato. Il prodotto grezzo è stato purificato per HPLC preparativa a
dare il composto del titolo (7,8 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7,80 (d,
4H), 7,44 (s, 2H), 7,30 (d, 4H), 7,11 (d, 4H), 2,80 (m, 4H), 2,18 (s, 6H), 1,44 (m, 4H). MS
(*m/z*): 875,16 (M+H).

Rif. Esempio 42

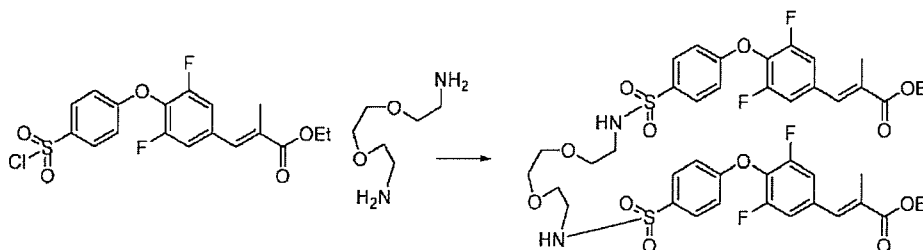
25 **N,N'-(1,4-fenilenebis(metilene))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]**



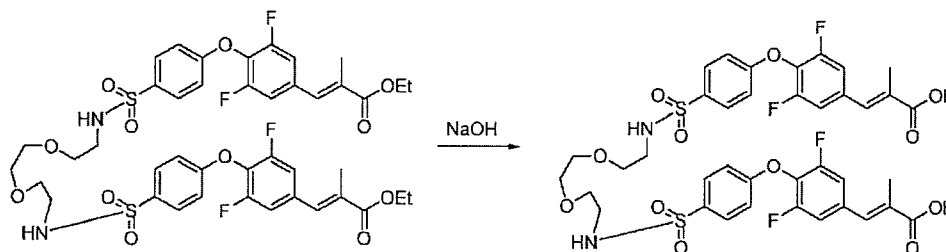
Composto 42: N,N'-(1,4-fenilenebis(metilene))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilamide]: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 41, è stato fatto composto 42 usando 1,4-fenilendimetanammina comem ammina. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7,87 (d, 4H), 7,44 (s, 2H), 7,31 (d, 4H), 7,06 (d, 6H), 7,04 (s, 2H), 4,02 (s, 4H), 2,19 (s, 6H). MS (m/z): 924,21 (M+H)

Rif. Esempio 43

N,N'-(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilamide]

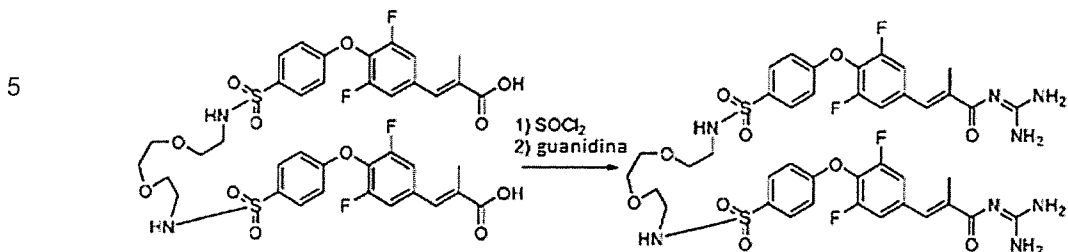


Intermedio 43.1 N,N'-(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis((E)-4-(2,6-difluoro-4-(2-carboetossipropenil)fenossi)benzensolfonammide): Ad una soluzione di (E)-etil 3-(4-(4-(clorosolfonil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato(intermedio 41.3) (225 mg, 0,54 mmol) in DCM (3 mL) è stata aggiunta una soluzione di 2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))dietanamina (38 mg, 0,26 mmol) e trietilammina (101 mg, 1,0 mmol) in DCM (2 mL) goccia a goccia. Dopo 30 minuti, è stato aggiunto 1N HCl (10 mL) e la miscela di reazione è stata estratta con DCM (3 x 15 mL). Gli strati organici riuniti sono stati seccati (Na₂SO₄) e concentrati a dare il composto del titolo (262 mg).



Intermedio 43.2 N,N'-(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis((E)-4-(2,6-difluoro-4-(2-carbossipropenil)fenossi)benzensolfonammide): Una soluzione dell'intermedio 43.1 (262 mg, 0,29 mmol) e 3N NaOH (0,6 mL, 1,8 mmol) in metanolo (3 mL) è stata scaldata a 65°C per 1 ora. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e il metanolo è stato allontanato a pressione ridotta ed è stato aggiunto 1N HCl (3 mL, 3 mmol) al residuo. Il prodotto è stato estratto in DCM (3 x 15 mL). Gli strati

organici riuniti sono stati seccati (Na_2SO_4) e concentrati a dare il composto del titolo (173 mg).



10 **Composto 43:** **N,N' -(2,2'-(etan-1,2-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]:**

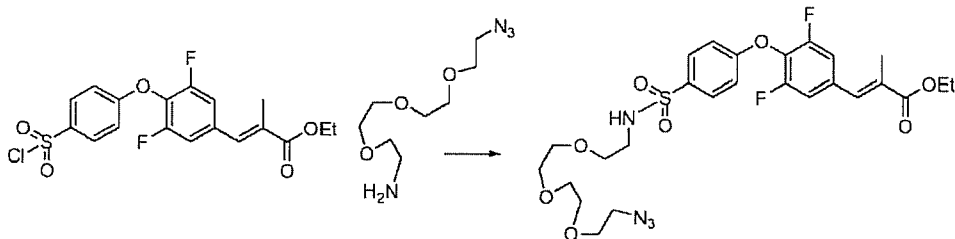
Tionil cloruro (1 mL) è stato aggiunto a intermedio 43.2 (63 mg, 0,074 mmol) ed è stato scaldato a 80° . Dopo 2 ore, il solvente è stato allontanato sotto vuoto. Il bis-acido cloruro è stato sciolto in DME (1 mL) ed aggiunto a guanidina base libera (1,4 mmol, preparata come segue: Ad una miscela di guanidina cloridrato (480 mg, 5,0 mmol) è stato aggiunto 25% NaOMe in MeOH (1,03 mL, 4,5 mmol). La miscela è stata agitata per 30 minuti e poi filtrata. Una porzione del filtrato (0,40 mL) è stata concentrata a secchezza.) in DME (1 mL). Dopo 15 minuti, è stata aggiunta acqua (10 mL) e la miscela è stata estratta con EtOAc (3 x 25 mL). Lo strato organico è stato seccato (Na_2SO_4) e concentrato. Il prodotto grezzo è stato purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (20 mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7,83 (d, $j = 8,8$ Hz, 4H), 7,43 (s, 2H), 7,30 (d, $j = 8,9$ Hz, 4H), 7,11 (d, $j = 8,6$ Hz, 4H), 3,42 (t, $j = 5,5$ Hz, 8H), 3,03 (t, $j = 5,4$ Hz, 4H), 2,17 (s, 6H). MS (m/z): 935,08 (M+H).

15

20

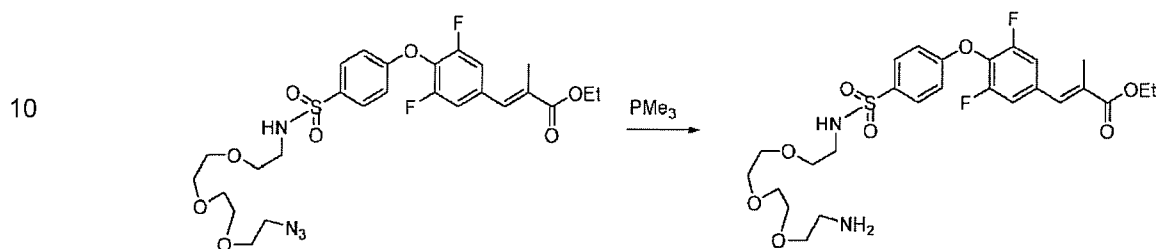
Rif. Esempio 44

25 **N,N' -(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]**



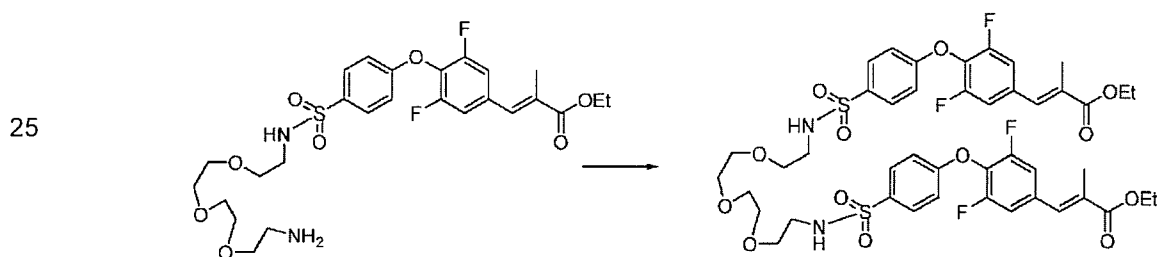
Intermedio 44.1: **(E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato:** Ad una soluzione di (E)-etil 3-(4-(4-(clorosolfonil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (intermedio 41.3) (250 mg, 0,60

mmol) in DCM (3 mL) è stata aggiunta una soluzione di 2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etanamina (157 mg, 0,72 mmol) e trietilammina (72 mg, 0,72 mmol) in DCM (2 mL). Dopo 15 minuti, è stata aggiunta acqua (10 mL) e la miscela di reazione è stata estratta con DCM (2 x 25 mL). Gli strati organici riuniti sono stati lavati con acqua (10 mL), salamoia (10 mL), seccati (Na_2SO_4) e concentrati. Il materiale grezzo è stato purificato per cromatografia flash su gel di silice eluendo con 50% EtOAc in DCM a dare il composto del titolo (169 mg).



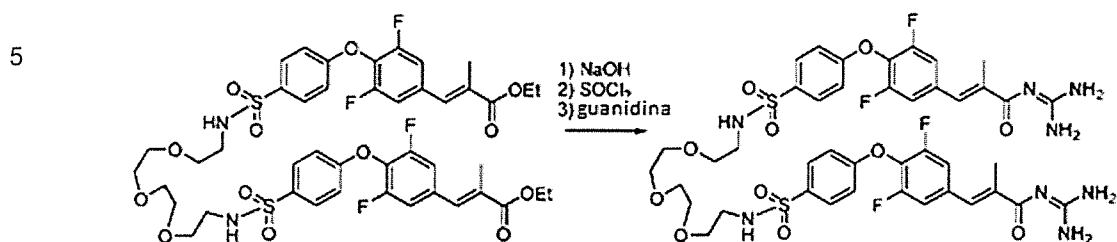
Intermedio 44.2: (E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato:

Ad una soluzione di (E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (169 mg, 0,28 mmol) in THF (6 ml) e acqua (0,6 mL) sotto azoto è stata aggiunta trimetilfosfina (26 mg, 0,34 mmol). Dopo agitazione per 3 ore, i solventi sono stati allontanati a pressione ridotta e. Il residuo è stato sciolto in acqua (5 mL) ed estratto con EtOAc (3 x 25 mL). Gli strati organici riuniti sono stati seccati (Na_2SO_4) e concentrati a dare il composto del titolo (162 mg).



Intermedio 44.3: N,N'-(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil)bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))-bis[4-(2,6-difluoro-4-(2-carboetossipropenil)fenossi)benzensolfonammide]: Una soluzione di (E)-etil 3-(4-(4-(clorosolfonil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (intermedio 41.3) (71 mg, 0,17 mmol) in EtOAc (1 mL) è stata aggiunta ad una soluzione di (E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (84 mg, 0,15 mmol) e trietilammina (22 mg, 0,22 mmol) in DCM (1 mL) con

agitazione. Dopo 30 minuti, è stata aggiunta acqua (10 mL) ed il prodotto estratto in DCM (3 x 15 mL). Gli strati organici riuniti sono stati seccati (Na_2SO_4) e concentrati a dare il composto del titolo (177 mg).



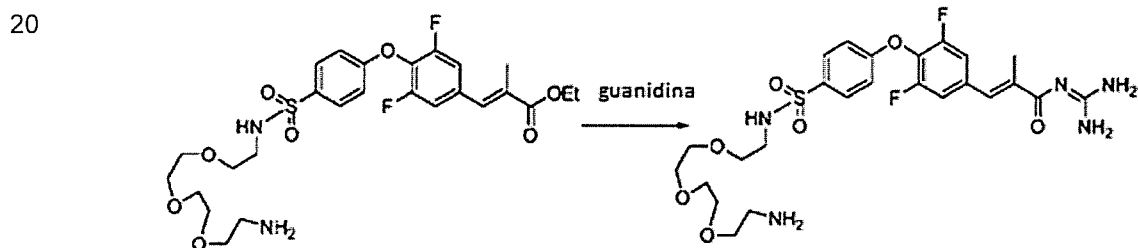
10 **Composto 44** N,N'-(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil)bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]:

Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 43, intermedio 44.3 è stato convertito alla bis-guanidina ed è stato ottenuto, dopo purificazione per HPLC preparativa, il composto del titolo (21 mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7,84 (d, $j = 8,8$ Hz, 4H), 7,44 (s, 2H), 7,30 (d, $j = 8,8$ Hz, 4H), 7,10 (d, $j = 8,8$ Hz, 4H), 3,54 (m, 4H), 3,48 (m, 4H), 3,43 (t, $j = 5,5$ Hz, 4H), 3,04 (t, $j = 5,5$ Hz, 4H), 2,17 (d, $j = 1,2$ Hz, 6H). MS (m/z): 979,05 (M+H).

15

Rif. Esempio 45

(E)-3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metilacrilammide



25

Composto 45: (E)-3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metilacrilammide: E' stata preparata una soluzione 4,3 M di guanidina base libera in metanolo. Una soluzione al 25% di NaOMe in MeOH (1,03 mL, 4,5 mmol) è stata aggiunta alla guanidina cloridrato (480 mg, 5,0 mmol) e la miscela è stata agitata per 30 minuti. La miscela è stata filtrata (0,2 μ , PTFE) a dare la soluzione di guanidina base libera. Una porzione (0,3 mL, 1,3 mmol) è stata aggiunta con agitazione a (E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (74 mg, 0,13 mmol). Dopo 15 minuti, è stata aggiunta acqua (10 mL) e il prodotto estratto con DCM

30

(4 x 20 mL). Gli strati organici riuniti sono stati seccati (Na_2SO_4) e concentrati. Il prodotto grezzo è stato purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (34 mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11,14 (s, 1H), 8,38 (br s, 4H), 7,78 (d, $j = 9,0$ Hz, 2H), 7,5 (m, 3H), 7,45 (d, $j=9,1$, 2H), 7,42 (s, 1H), 7,19 (d, $j=8,8$ Hz, 2H), 3,55 (m, 6H), 3,44 (m, 4H), 3,36 (m, 2H), 2,95 (m, 2H), 2,87 (m, 2H), 2,11 (s, 3H). MS (m/z): 586,11 (M+H).

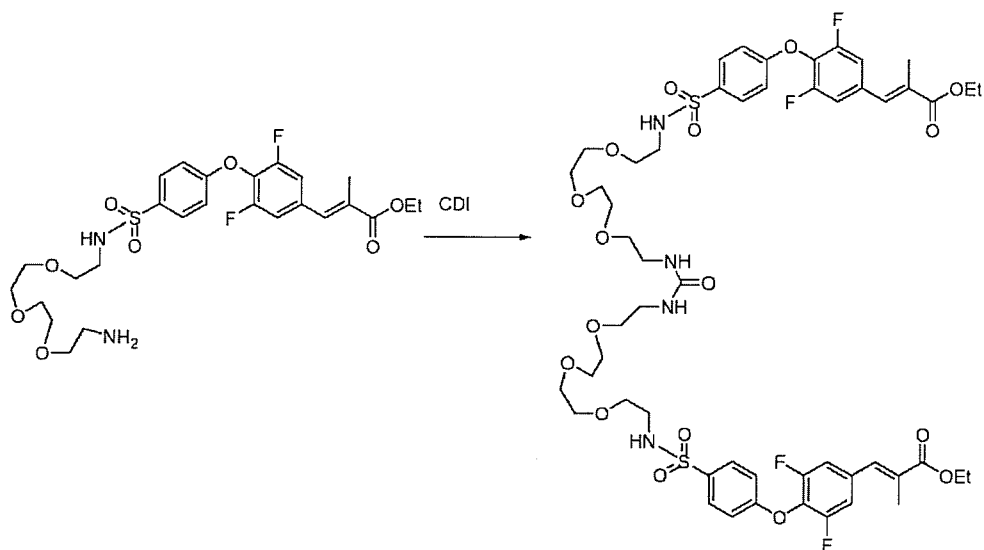
Rif. Esempio 46

N,N'-(13-osso-3,6,9,17,20,23-esaossa-12,14-diazapentacosan-1,25-diil)bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilamide]

10

15

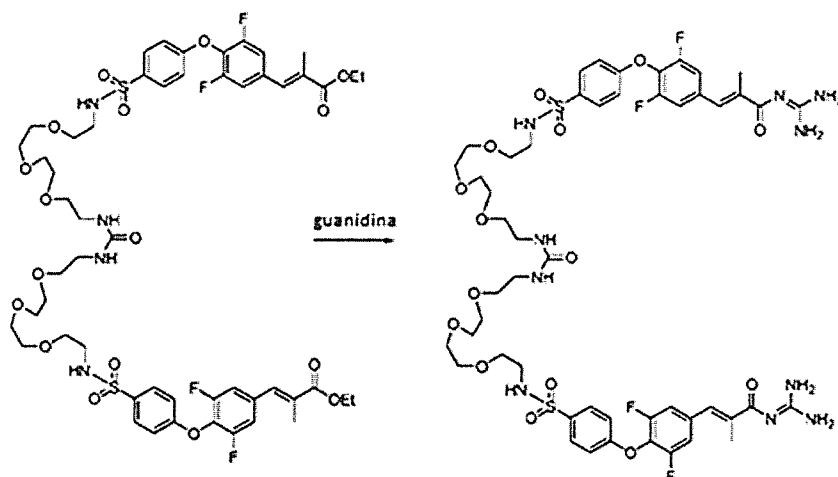
20



Intermedio 46.1 N,N'-(13-osso-3,6,9,17,20,23-esaossa-12,14-diazapentacosan-1,25-diil)bis [4-(2,6-difluoro-4-(2-carboetossipropenil)fenossi)benzen-solfonammide]:

Carbonildiimidisolo (16,2 mg, 0,10 mmol) è stato aggiunto ad una soluzione di (E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (intermedio 44.2) (125 mg, 0,22 mmol) in DMF (2 mL) ed agitato per 23 ore al qual tempo il solvente è stato allontanato sotto vuoto. Il residuo è stato sciolto in EtOAc, lavato con acqua (4 x 10 mL), seccato (Na_2SO_4) e concentrato a dare il composto del titolo (132 mg).

30

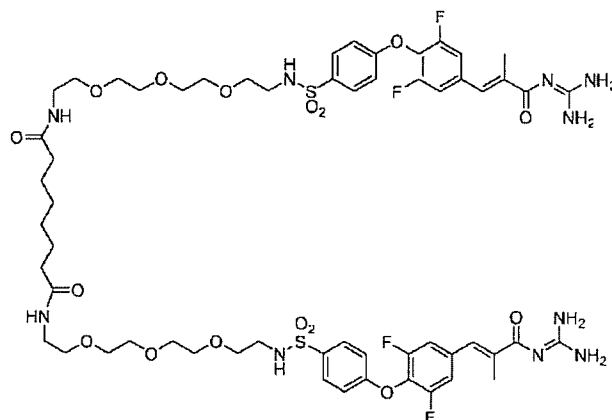


Composto 46: N,N'-(13-osso-3,6,9,17,20,23-esaossa-12,14-diazapentacosan-1,25-diil)bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoylphenyl)-2-

metilacrilammide]: Una soluzione 4,4 M di guanidina in metanolo (Rif. Esempio 45) (0,5 mL, 2,2 mmol) è stata aggiunta ad una soluzione di intermedio 46.1 (65 mg, 0,055 mmol) in DMF e agitata per 4 ore. La reazione è stata spenta con 50% AcOH acquoso e poi concentrata a secchezza. Il residuo è stato purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (35 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7,84 (d, j = 8,2 Hz, 4H), 7,43 (d, j=1,4 Hz, 2H), 7,30 (d, j = 9,0 Hz, 4H), 7,11 (d, j=9,0 Hz, 4H), 3,57(m, 12H), 3,46 (m, 12H), 3,26 (t, J=5,4 Hz, 4H), 3,04 (t, j=5,4 Hz, 4H), 2,17 (d, j=1,3 Hz, 6H). MS (m/z): 1197,07 (M+H).

Rif. Esempio 47

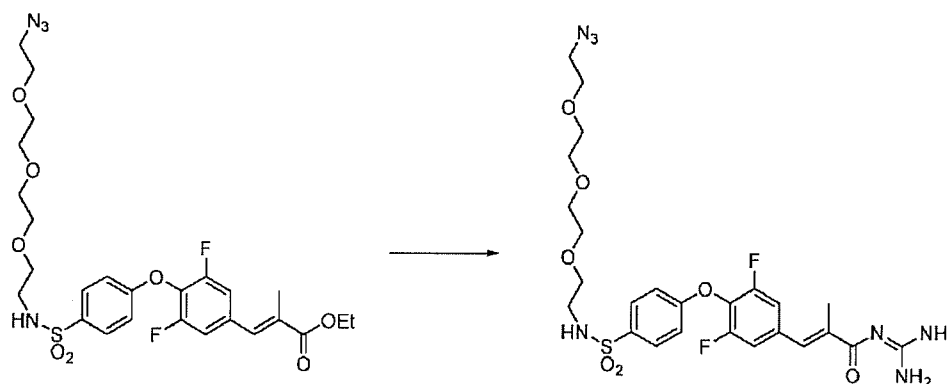
N,N'-(13,20 diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,21-diazadotricontan-1,32-diil)bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoylphenyl)fenil)-2-metilacrilammide]



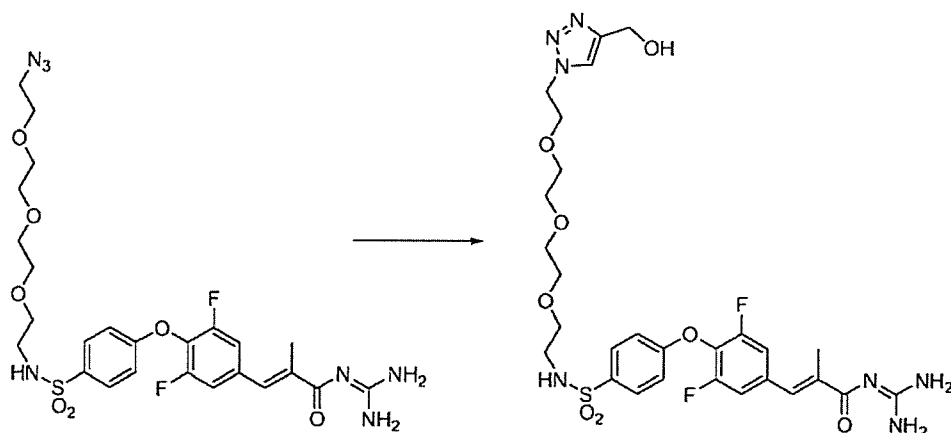
Composto 47: N,N'-(13,20 diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,21-diazadotricontan-1,32-diil)bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]: Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 46, sostituendo acido subarico bis(N-idrossisuccinimide estere) per carbonildiimidazolo è stato ottenuto il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD3OD) δ 7,84 (m, , 4H), 7,43 (m, 2H), 7,30 (m, 4H), 7,11 (m, 4H), 3,58 (m, 12H), 3,50 (m, 8H), 3,32 (m, 4H), 3,05 (t, j=5,4 Hz, 4H), 2,18 (d, j=1,6 Hz, 6H), 2,15 (m, 4H), 1,56 (m, 4H), 1,29 (m, 4H). MS (m/z): 1309,12 (M+H).

Rif. Esempio 48

(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-(4-(idrossimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)fenil)-2-metilacrilammide



Intermedio 48.1: (E)-3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-azido)etossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metilacrilammide: A (E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-azido)etossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (250 mg, 0,42 mmol) è stata aggiunta 4,4 M guanidina in in metanolo (come preparata in Rif. Esempio 45) (1,0 mL, 4,4 mmol) e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente. Dopo 30 minuti, è stata aggiunta acqua (10 mL) e la miscela è stata estratta con DCM (4 x 25 mL). La fase acquosa è stata corretta a pH 7 ed estratta con DCM (2 x 25 mL). Gli estratti organici riuniti sono stati seccati (Na₂SO₄) e concentrati a dare il composto del titolo (245 mg).

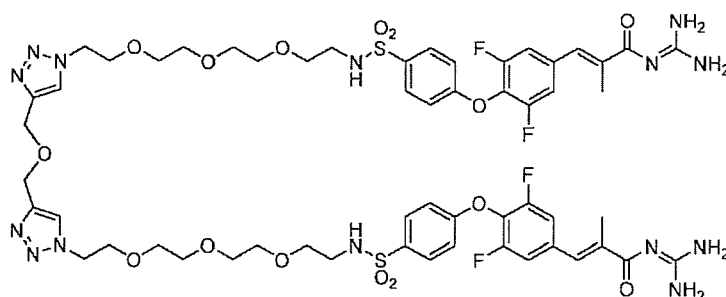


Composto 48: (E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-(4-(idrossimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-fenil)-2-

metilacrilammide: Ad una miscela di (E)-3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diammino-metilene)-2-metilacrilammide (70 mg, 0,11 mmol) ed alcol propargilico (6,4 mg, 0,11 mmol) in t-butanolo (0,22 mL) e acqua (0,22 mL) è stato aggiunto 1 M sodio ascorbato (11 μ L, 0,011 mmol) e 0,3 M rame solfato (3,6 μ L, 0,0011 mmol) e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente. Dopo 14 ore, il prodotto è stato purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (22 mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7,93 (s, 1H), 7,84 (m, , 2H), 7,44 (s, 1H), 7,30 (m, 2H), 7,11 (m, 2H), 4,64 (d, $j=0,6$ Hz, 2H), 4,55 (t, $j=5,0$ Hz, 2H), 3,86 (t, $j=5,0$ Hz, 2H), 3,57 (m, 4H), 3,52-3,42 (m, 6H), 3,03 (t, $j=5,4$ Hz, 2H), 2,18 (d, $j=1,3$ Hz, 3H). MS (m/z): 668,14 (M+H).

Rif. Esempio 49

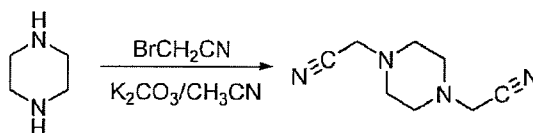
N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(4,4'-ossibis(metilene)bis(1H-1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilammide]



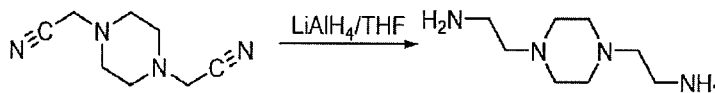
Composto 49: N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(4,4'-ossibis(metilene)bis(1H-1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis[(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilamide]: Seguendo le procedure in Rif. Esempio 48, sostituendo propargil etere per alcol propargilico è stato ottenuto il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400 mHz, CD₃OD) δ 8,00 (s, 2H), 7,83 (m, 4H), 7,43 (s, 2H), 7,30 (m, 4H), 7,10 (m, 4H), 4,61 (s, 4H), 4,55 (m, 4H), 3,86 (m, 4H), 3,58-3,50 (m, 8H), 3,50-3,40 (m, 12H), 3,01 (m, 4H), 2,17 (d, j=1,3 Hz, 6H). MS (m/z): 1317,09 (M+H).

Rif. Esempio 50

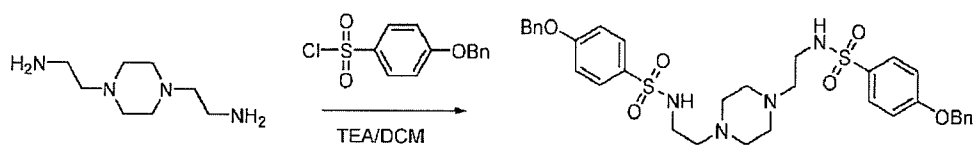
N,N'-(2,2'-(piperazin-1,4-diil)bis(etan-2,1-diil)di-((E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilamide)



Intermedio 50.1: 2,2'-(piperazin-1,4-diil)diacetonitrile. Ad una soluzione di piperazina (6 g, 69,77 mmol, 1,00 equiv) in acetonitrile (150 mL) è stato aggiunto potassio carbonato (19,2 g, 139,13 mmol, 2,00 equiv) e la miscela è stata agitata. A questo è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 2-bromoacetonitrile (16,7 g, 140,34 mmol, 2,00 equiv) in acetonitrile (100 mL) e la sospensione è stata agitata per 4 h a temperatura ambiente. I solidi sono stati filtrati via e la soluzione ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato per ri-cristallizzazione da metanolo risultando in 7,75 g (68%) di Intermedio 50.1 come solido bianco.

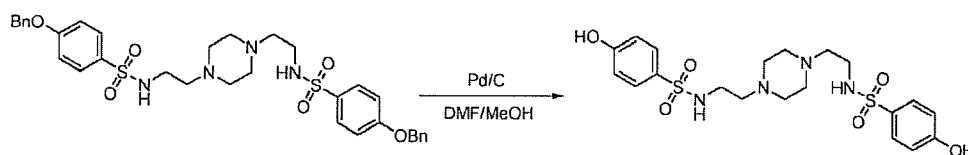


Intermedio 50.2: 2,2'-(piperazin-1,4-diil)diacetammina. Ad una sospensione di litio alluminio idruro (LiAlH₄; 700 mg, 18,42 mmol, 4,30 equiv) in tetraidrofurano (40 mL) raffreddata a 0°C è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di Intermedio 50.1 (700 mg, 4,27 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano (10 mL). La miscela è stata agitata per 15 minuti a 0°C e scaldata a riflusso per 3 h. La reazione è stata raffreddata, il pH corretto 8-9 con potassio idrossido (50%) e i solidi filtrati via. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto e i solidi ottenuti lavati con esano a dare 0,3 g (41%) di Intermedio 50.2 come solido giallo.



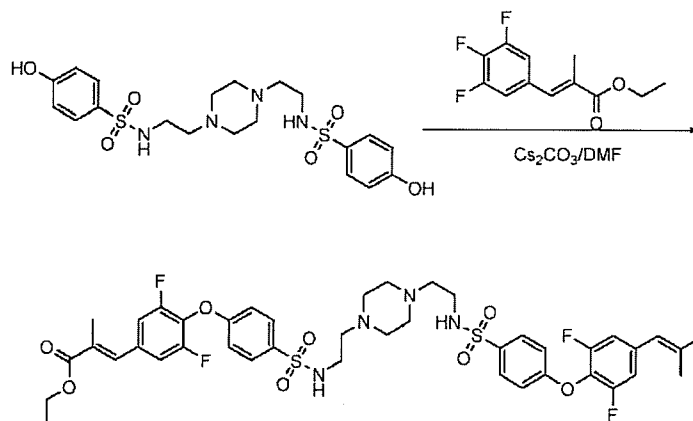
Intermedio 50.3: **N,N'-(2,2'-(piperazin-1,4-diil)bis(etan-2,1-diil))bis(4-(benzilossi)benzensolfonammide).** Ad Intermedio 50.2 (500 mg, 2,91 mmol, 1,00 equiv) in

diclorometano (10 mL) è stata aggiunta trietilammina (1,46 g, 0,01 mmol, 2,00 equiv) e 4-(benzilossi)benzen-1-solfonil cloruro (2,0 g, 0,01 mmol, 2,40 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente. La reazione è stata diluita con diclorometano, lavata con 3x10 mL di acqua, seccata su sodio solfato poi filtrata e concentrata sotto vuoto a dare 0,9 g (47%) di Intermedio 50.3 come solido giallo.



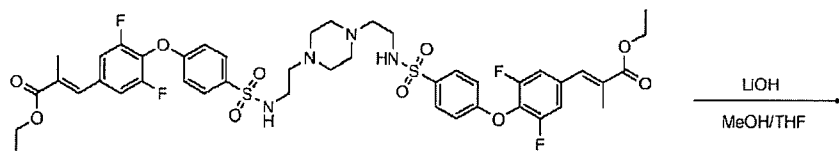
Intermedio 50.4: **N,N'-(2,2'-(piperazin-1,4-diil)bis(etan-2,1-diil))bis(4-idrossibenzensolfonammide).** Ad intermedio 50.3 (3 g, 4,52 mmol, 1,00 equiv) in N,N-dimetilformammide (500 mL) e metanolo (100 mL) è stato aggiunto Palladio su carbone (1 g) e la sospensione agitata sotto idrogeno gassoso per 4 h a temperatura ambiente. I solidi sono stati filtrati via e la miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto a dare 1,5 g (69%) di Intermedio 50.4 come solido grigio.

Ad intermedio 50.4 (1 g, 2,06 mmol, 1,00 equiv) in N,N-dimetilformammide (30 mL) è stato aggiunto Cs₂CO₃ (1,45 g, 4,45 mmol, 2,16 equiv) e la sospensione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente. A questa è stata aggiunta una soluzione di (E)-etil 2-metil-3-(3,4,5-trifluorofenil)acrilato (intermedio 41.1) (1,1 g, 4,51 mmol, 2,19 equiv) in N,N-

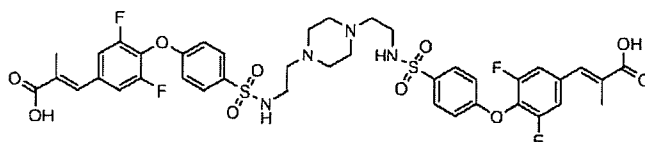


Intermedio 50.5: **N,N'-(2,2'-(piperazin-1,4-diil)bis(etan-2,1-diil))bis((E)-etil 3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilato).** Ad Intermedio 50.4 (1 g, 2,06 mmol, 1,00 equiv) in N,N-dimetilformammide (30 mL) è stato aggiunto Cs₂CO₃ (1,45 g, 4,45 mmol, 2,16 equiv) e la sospensione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente. A questa è stata aggiunta una soluzione di (E)-etil 2-metil-3-(3,4,5-trifluorofenil)acrilato (intermedio 41.1) (1,1 g, 4,51 mmol, 2,19 equiv) in N,N-

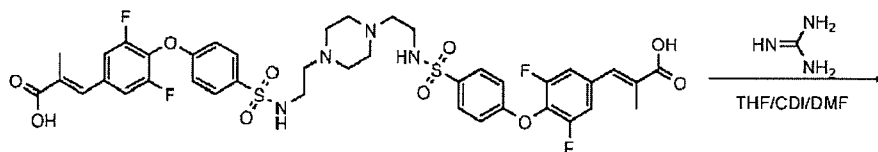
dimetilformammide (10 mL) goccia a goccia con agitazione. La reazione è stata agitata per 0,5 h a temperatura ambiente e poi per tutta la notte a 90°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto, il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice e poi eluita con diclorometano:metanolo (100:1) a dare 390 mg (20%) di Intermedio 50.5 come solido giallo.



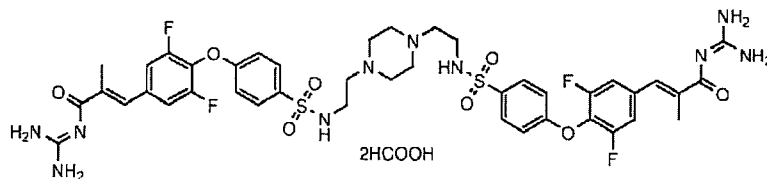
10

**Intermedio**

50.6: N,N'-(2,2'-(piperazin-1,4-diil)bis(etan-2,1-diil))di-(acido (E)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilico). Ad Intermedio 50.5 (170 mg, 0,16 mmol, 1,00 equiv, 90%) in 1:1 metanolo / tetraidrofurano (20 mL) è stato aggiunto litio idrossido (4 equiv, 30 mg) e la reazione è stata agitata per 2 h a 27°C. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 1~2 con acido cloridrico acquoso (6 mol/L) e i solidi sono stati raccolti per filtrazione. Il residuo è stato lavato con etil acetato(2x5 mL) e poi seccato sotto vuoto a dare 150 mg (94%) di Intermedio 50.6 come solido bianco.



25



30

Composto 50: N,N'-(2,2'-(piperazin-1,4-diil)bis(etan-2,1-diil))di-((E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metil-acrilammide):

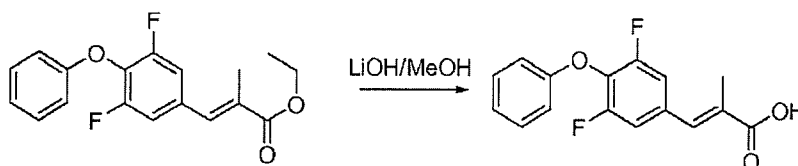
Ad una soluzione di Intermedio 50.6 (100 mg, 0,09 mmol, 1,00 equiv, 80%) in tetraidrofurano (30 mL) è stato aggiunto carbonil diimidazolo (CDI; 58 mg, 0,36 mmol, 4,00 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 25°C. A questa è stata aggiunta guanidina (2M in metanolo, 10 ml) e la soluzione ottenuta è stata agitata per ulteriori 14 h a

30°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto, il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con diclorometano:metanolo (10:1). Il prodotto grezzo (230 mg) è stato poi purificato per HPLC-preparativa (C18) in fase-inversa a dare 16 mg (17%) di un sale formiato del composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz,CD₃OD, ppm): 7,89-7,2(4H,d, J=8,7Hz), 7,50(2H,s), 7,34-7,36(4H,d,J=8,7Hz), 7,16-7,19(4H,d,J=8,7Hz), 2,88-3,16(16H,m), 2,20(6H,s); MS (ES, m/z): 959 [M+H]⁺

Rif. Esempio 51

acido (E)-4-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)fenilfosfonico

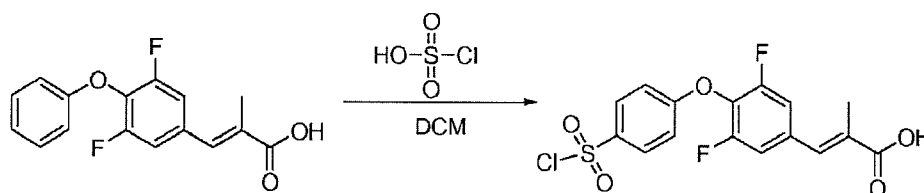
10



Intermedio 51.1: acido (E)-3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilacrilico. Ad una soluzione di (E)-etil 3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilacrilato (intermedio 41.2) (900 mg, 2,83 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (20 mL) è stato aggiunto 2M LiOH metanolico (50 mL) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto, il valore di pH della soluzione è stato corretto a 5-6 con HCl acquoso (6 mol/L) e la miscela è stata estratta con 3x20 mL di etil acetato. Gli strati organici sono stati riuniti, lavati con 2x10 mL di sodio cloruro (sat.) e poi seccati su sodio solfato anidro. I solidi sono stati filtrati via e la soluzione è stata concentrata a dare 0,7 g (85%) di Intermedio 51.1 come solido bianco.

15

20

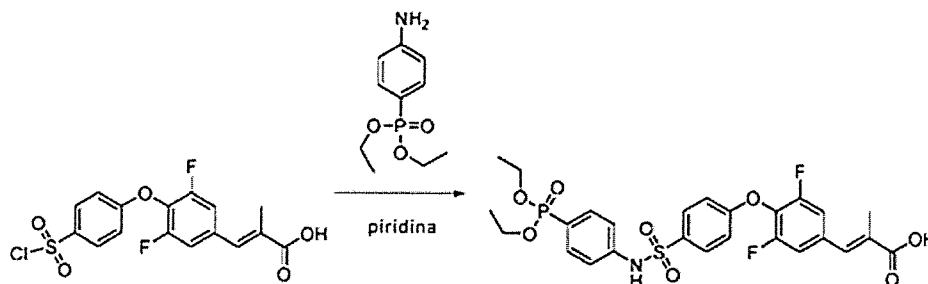


25

Intermedio 51.2: acido (E)-3-(4-(4-(clorosolfonil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilico. Ad Intermedio 51.1 (1 g, 3,14 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (15 mL) a 0-5°C è stata aggiunta una soluzione di acido solfurocloridrico (8,5 g, 73,28 mmol, 23,00 equiv) in diclorometano (5 mL). La reazione è stata agitata per tutta la notte a 25°C in un bagno d'olio e poi spenta per aggiunta di 200 mL di acqua/ghiaccio. La miscela è stata estratta con 4x50 mL di diclorometano e gli strati organici riuniti e seccati su sodio solfato anidro a dare 1,1 g (90%) di Intermedio 51.2 come solido giallo.

30

5

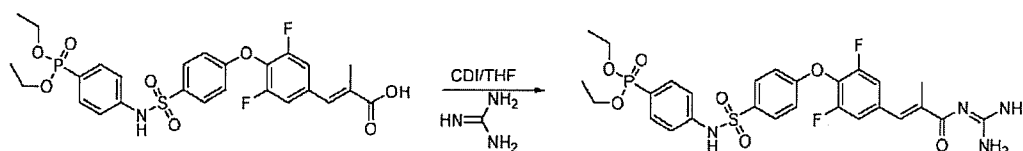


Intermedio 51.3: acido (E)-3-(4-(4-(N-(4-(dietossifosforil)fenil)sulfamoil)fenossi)-3,5-

10

difluorofenil)-2-metilacrilico. A dietil 4-amminofenilfosfonato (intermedio 2.2) (150 mg, 0,66 mmol, 1,00 equiv) in piridina (3 mL) è stato aggiunto Intermedio 51.2 (300 mg, 0,77 mmol, 1,22 equiv) in varie porzioni. La miscela è stata agitata per 3 h a 30°C e poi concentrata, il valore di pH della soluzione è stato corretto a 3 con HCl acquoso (1 mol/L) e la miscela ottenuta estratta con 3x30 mL di etil acetato. Gli strati organici sono stati riuniti, seccati su sodio solfato anidro, concentrati, caricati su una colonna di gel di silice ed eluiti con diclorometano:metanolo (50:1) a dare 100 mg (26%) di Intermedio 51.3 come solido giallastro.

15



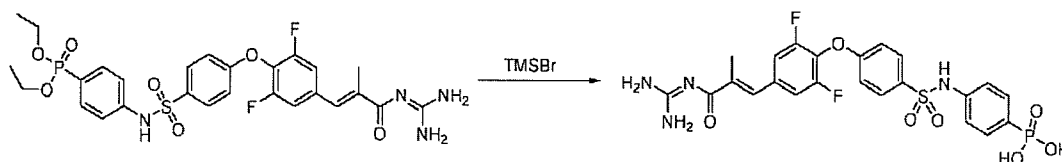
20

Intermedio 51.4: (E)-dietil 4-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-

enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)fenilfosfonato. A Intermedio 51.3 (150 mg, 0,26 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano (2 mL) è stato aggiunto CDI (120 mg, 0,74 mmol, 1,40 equiv) e la reazione agitata per 2 h a temperatura ambiente. A questa è stata aggiunta guanidina (1M in DMF; 0,8 ml) e la reazione è stata agitata per tutta la notte a 30°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto ed il prodotto grezzo è stato purificato per HPLC-Prep (C18) in fase inversa a dare 40 mg (25%) di Intermedio 51.4 come solido bianco.

25

30



Composto 51: acido (E)-4-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-

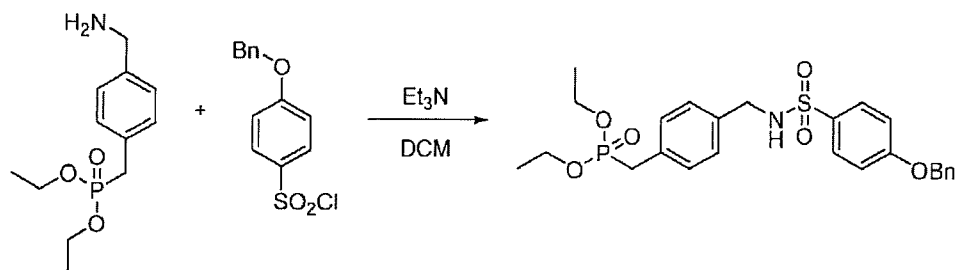
35

enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)fenilfosfonico: Ad Intermedio 51.4 (40 mg,

mg, 0,09 mmol, 1,37 equiv) goccia a goccia con agitazione e la soluzione ottenuta è stata agitata a 40°C per tutta la notte. La miscela ottenuta è stata concentrata, diluita con metanolo (2 mL) e poi concentrata sotto vuoto. Questa operazione è stata ripetuta quattro volte. Il prodotto grezzo (75 mg) è stato purificato per HPLC-Prep (C18) in fase inversa a dare 12,5 mg di un sale formiato del composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO, ppm): 10,54(s, 1H), 7,82-7,79(d, J=8,4Hz, 2H), 7,52-7,40(m, 5H), 7,18-7,10(m, 4H), 2,08(s, 3H); ³¹P-NMR (400 MHz, DMSO, ppm): 11,29; MS (ES, m/z): 567 [M +H]⁺

Rif. Esempio 52

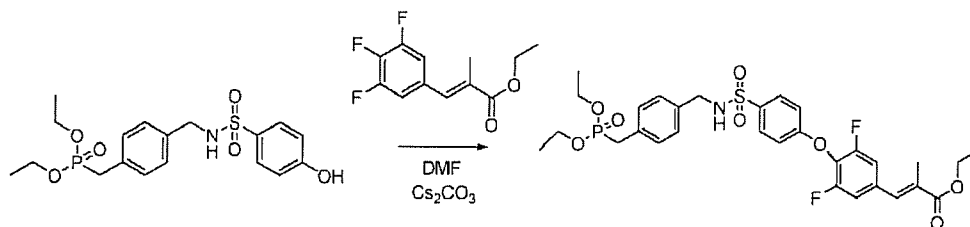
acido (E)-4-((4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)metil)benzilfosfonico



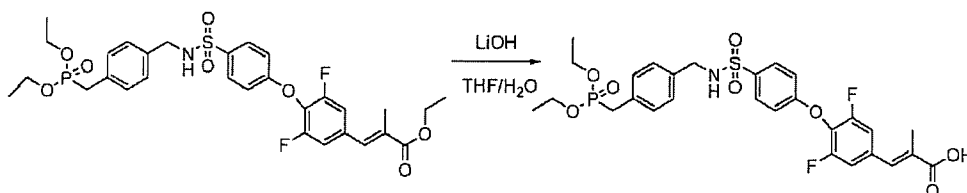
Intermedio 52.1: dietil 4-((4-(benzilossi)fenilsolfonammido)metil)benzil-fosfonato. A 4-dietil 4-(amminometil)benzilfosfonato (intermedio 6.1) (60 mg, 0,23 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (10 mL), trietilammina (47 mg, 0,47 mmol, 2,00 equiv) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 4-(benzilossi)benzen-1-solfonil cloruro (72 mg, 0,26 mmol, 1,10 equiv) in diclorometano (5 mL) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 25°C. La miscela di reazione è stata concentrata, il residuo caricato su una colonna di gel di silice e poi eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:1). Il prodotto isolato è stato lavato con 2x50 mL di n-esano risultando in 50 mg (43%) di Intermedio52.1 come solido bianco.



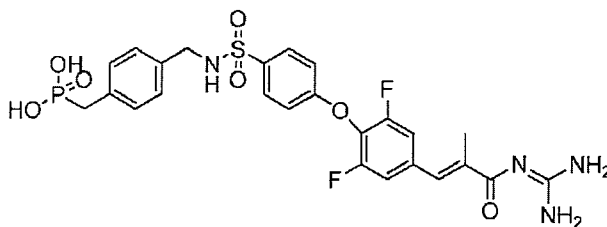
Intermedio 52.2: dietil 4-((4-idrossifenilsolfonammido)metil)benzil-fosfonato. Ad Intermedio 52.1 (1,2 g, 2,39 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (20 mL) in N,N-dimetilformammide (5 mL) è stato aggiunto Palladio su carbone (0,9 g) e la sospensione è stata agitata per tutta la notte a 30°C sotto atmosfera di idrogeno. La reazione è stata filtrata e concentrata sotto vuoto a dare 1 g (91%) di Intermedio 52.2 come olio marrone.



Intermedio 52.3: (E)-etil 3-(4-(4-(N-(4-((dietossifosforil)metil)benzil)-sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato. Ad Intermedio 52.2 (100 mg, 0,24 mmol, 1,00 equiv) in N,N-dimetilformammide (10 mL) è stato aggiunto Cs₂CO₃ (160 mg, 0,49 mmol, 2,10 equiv) e la miscela è stata agitata per 1,5 h a temperatura ambiente. A questa è stata aggiunta una soluzione di (E)-etil 2-metil-3-(3,4,5-trifluorofenil)acrilato (intermedio 41.1) (60 mg, 0,25 mmol, 1,10 equiv) in N,N-dimetilformammide (5 mL) e la reazione è stata agitata per tutta la notte a 90°C. I solidi sono stati filtrati via ed il filtrato è stato concentrato sotto vuoto, il residuo caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con diclorometano / metanolo (200:1) a dare 50 mg (23%) di Intermedio 52.3 come olio giallo.



Intermedio 52.4: acido (E)-3-(4-(4-(N-(4-((dietossifosforil)metil)benzil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilico. Ad Intermedio 52.3 (700 mg, 1,10 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano (20 mL) ed acqua (20 mL) è stato aggiunto LiOH (700 mg, 29,17 mmol, 30,00 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 25°C. La reazione è stata concentrata, il valore di pH della soluzione è stato corretto a 4-5 con HCl acquoso (2 mol/L) e la miscela è stata estratta con 2x150 mL di etil acetato. Gli strati organici sono stati riuniti, seccati su sodio solfato anidro, concentrati, il residuo caricato su una colonna di gel di silice e poi eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:1-2:1) a dare 250 mg (35%) di Intermedio 52.4 come solido bianco.



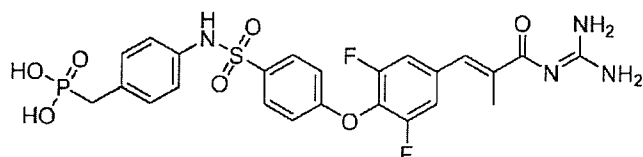
Composto 52: acido (E)-4-((4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)metil)benzilfosfonico. Composto 52 è stato preparato da Intermedio 52.4 usando le procedure descritte in Rif. Esempio 51, ad eccezione

della HPLC preparativa che non era richiesta, ottenendo 84 mg (89%) di un solido bianco. ;
¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,83-7,80(d, J=8,7Hz, 2H), 7,52(s, 1H), 7,38-7,36(d,
 J=8,7Hz, 2H), 7,23-7,20(m, 2H), 7,17-7,09(m, 4H), 4,06(s, 2H), 3,11(s, 1H), 3,04(s, 1H),
 2,23-2,23(s, 3H). MS (ES, m/z): 595 [M+H]⁺.

5

Rif. Esempio 53

**acido (E)-4-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-
 difluorofenossi)fenilsolfonammido)benzilfosfonico**



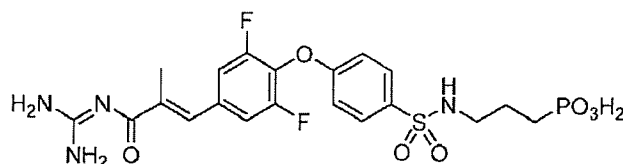
10

**Composto 53: acido (E)-4-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-
 enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)benzilfosfonico.** Composto 53 è stato
 preparato da dietil 4-amminobenzilfosfonato (intermedio 3.2) usando le procedure descritte
 in Rif. Esempio 52 ad eccezione del prodotto finale che è stato purificato per HPLC
 preparativa. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): 7,77-7,74(d, J=8,7Hz, 2H), 7,46(s, 1H),
 7,33-7,31(d, J=8,7Hz, 2H), 7,21-7,19(m, 2H), 7,06-7,11(m, 4H), 3,04-2,97(d, J=21,6Hz,
 2H), 2,19(s, 3H); ³¹P-NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm): 22,49. MS (ES, m/z):581 [M+H]⁺.

15

Rif. Esempio 54

**acido (E)-3-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-
 difluorofenossi)fenilsolfonammido)propilfosfonico**



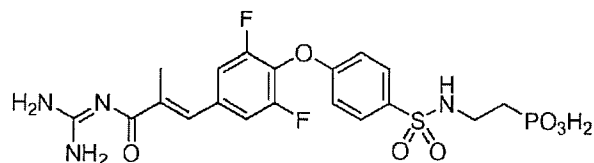
25

**Composto 54: acido (E)-3-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-
 enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)propilfosfonico.** Composto 54 è stato
 preparato da dietil 3-amminopropilfosfonato (intermedio 4.1) usando le procedure descritte
 in Rif. Esempio 51. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO, ppm): 7,81-7,78(d, J=8,4Hz, 2H), 7,57(s,
 1H), 7,42-7,39(d, J=9,3Hz, 2H), 7,22-7,19(d, J=8,7Hz, 2H), 2,75-2,77(q, 2H), 2,10(s, 3H),
 1,59-1,42(m, 4H). MS (ES, m/z): 533 [M+H]⁺

30

Rif. Esempio 55

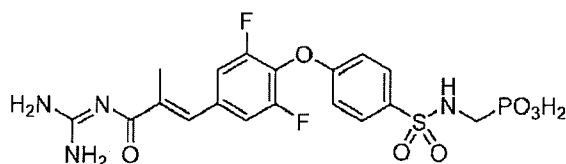
**acido (E)-2-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-
 difluorofenossi)fenilsolfonammido)etilfosfonico**



5 **Composto 55: (E)-2-(4-(4-(3-(diamminometilnammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-**
difluorofenossi)fenilsolfonammido)etilfosfonico. Composto 55 è stato preparato da dietil
 2-amminoetilfosfonato (intermedio 1.9) usando le procedure descritte in Rif. Esempio 51, ad
 eccezione della purificazione del prodotto finale per HPLC preparativa che non era richiesta.
 ; ¹H-NMR(400MHz, DMSO, ppm): 11,02(s, 1H), 8,28(s, 4H), 7,79-7,82(d, J=9,2Hz, 2H),
 10 7,62-7,65(t, 1H), 7,54-7,49(m, 3H), 7,26-7,24(d, J=8,8Hz, 2H), 3,42-3,58(m, 2H), 2,15(s,
 3H), 1,73-1,65(m, 2H); ³¹P-NMR (400MHz, DMSO, ppm): 21,36. MS (ES, m/z): 519
 [M+H]⁺

Rif. Esempio 56

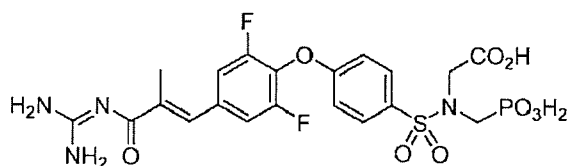
15 **acido (E)-4-(4-(3-(diamminometilnammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-**
difluorofenossi)fenilsolfonammido)metilfosfonico



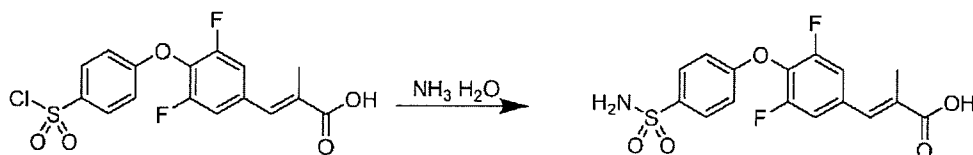
20 **Composto 56: acido (E)-4-(4-(3-(diamminometilnammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-**
2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)metilfosfonico. Composto 56 è stato preparato da
 dietil amminometilfosfonato (intermedio 5.3) usando le procedure descritte in Rif. Esempio
 51, tranne purificazione del prodotto finale per Flash-Prep-HPLC con CH₃CN:acqua
 (10:100). ¹H -NMR(300MHz, DMSO, ppm): δ 7.84-7.81(d, J=8.1Hz, 2H), 7.57(s, 1H), 7.45-
 25 7,42(d, J=9,3Hz, 3H), 7,18-7,15(d, J=8,4Hz, 2H), 3,04-3,01(m, 2H), 2,08(s, 3H). MS (ES,
 m/z): 505 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 57

30 **acido (E)-2-(4-(4-(3-(diamminometilnammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-**
difluorofenossi)-N-(fosfonometil)fenilsolfonammido)acetico

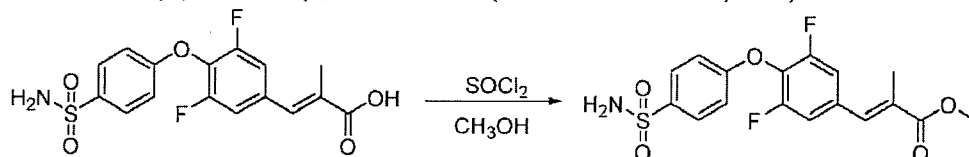


Composto 57: acido (E)-2-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)-N-(fosfonometil)fenil-solfonammido)acetico. Composto 57 è stato preparato da etil 2-((dietossifosforil)metilammino)acetato (intermedio 8.2) usando le procedure descritte in Rif. Esempio 51. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 8,33(s, 4H), 7,84-7,81(d, J=8,1Hz, 2H), 7,52-7,50(d, J=7,8Hz, 2H), 7,19-7,16(d, J=8,4Hz, 2H), 4,11(s, 2H), 2,14(s, 3H); MS (ES, m/z): 563 [M+H]⁺.

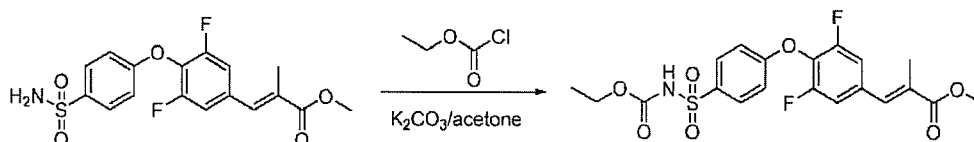
Rif. Esempio 58**(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-(N-(2-metossietilcarbamoil)sulfamoil)fenossi)fenil)-2-metilacrilammide****Intermedio 58.1: acido (E)-3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilico.**

Acido (E)-3-(4-(4-(clorosolfonil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilico (Intermedio 51.2) è stato convertito ad intermedio 58.1 usando le procedure delineate in Rif. Esempio 58, con ammoniaca acquosa come ammina. Il composto del titolo è stato ottenuto come solido giallo.

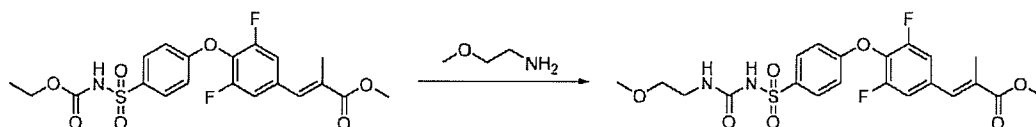
Intermedio 58.2: (E)-metil 3-(3,5-difluoro-4-(4-sulfamoilfenossi)fenil)-2-metilacrilato. In un



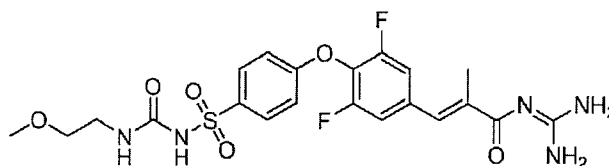
pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di intermedio 58.1 (2 g, 5,42 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (60 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di tionil cloruro (2,5 g, 21,19 mmol, 4,00 equiv) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 50°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 7 con ammoniaca (2 mol/L). La soluzione ottenuta è stata estratta con 10 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etere di petrolio/etil acetato (30:1-1:1). Questo è risultato in 2,1 g (97%) del composto del titolo come solido bianco.



Intermedio 58.3: (E)-metil 3-(4-(4-(N-(etossicarbonil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato. In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di intermedio 58.2 (280 mg, 0,73 mmol, 1,00 equiv) in acetone (20 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di potassio carbonato (200 mg, 1,45 mmol, 2,00 equiv). La miscela è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente. A questa è stato aggiunto etil cloroformiato (90 mg, 0,83 mmol, 1,20 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 6 h a 65°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 2-3 con idrogeno cloruro (1 mol/L). La soluzione ottenuta è stata estratta con 2x50 ml di etil acetato e gli strati organici riuniti. La miscela è stata seccata su sodio solfato anidro e concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 300 mg (72%) del composto del titolo come olio giallo.



Intermedio 58.4: (E)-metil 3-(3,5-difluoro-4-(4-(N-(2-metossietilcarbamoil)-sulfamoil)fenossi)fenil)-2-metilacrilato. In un pallone da 100 mL, è stata posta una soluzione di intermedio 58.3 (300 mg, 0,66 mmol, 1,00 equiv) in toluene (20 mL), 2-metossietanamina (100 mg, 1,33 mmol, 1,10 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a 110°C. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etere di petrolio/etil acetato (1:1). Questo è risultato in 0,3 g (92%) del composto del titolo come solido giallo.

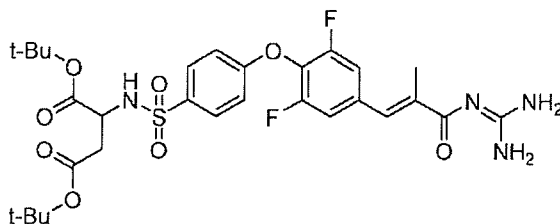


Composto 58: (E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-(N-(2-metossietilcarbamoil)sulfamoil)fenossi)fenil)-2-metilacrilammide. Intermedio 58.4 è stato convertito a composto 58 usando le procedure descritte in Rif. Esempio 52. Purificazione per HPLC preparativa ha dato un sale TFA del composto del titolo. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO, ppm): δ 10,62(s, 1H), 8,33(s, 3H), 7,94-7,91(d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H), 7,55-7,52(d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7,45(s, 1H), 7,26-7,22(d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 6,55(s, 1H), 3,37-3,27(m, 2H), 3,21(s, 3H), 3,15-3,12(m, 2H), 2,16(s, 3H). MS (ES, m/z): 512 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Rif. Esempio 59

acido (E)-2-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)succinico

5

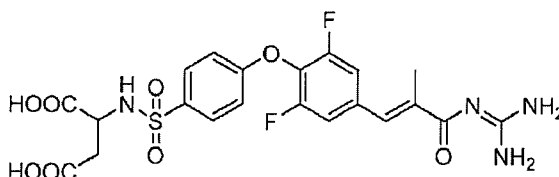


Intermedio 59.1: (E)-di-tert-butil 2-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)succinato.

10

Intermedio 59.1 è stato preparato da di-tert-butil 2-amminosuccinato usando le procedure descritte in Rif. Esempio 51.

15



Composto 59: acido (E)-2-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)succinico. In un pallone da 50 mL, è stata

20

posta una soluzione di intermedio 59.1 (100 mg, 0,16 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano (5 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di acido 2,2,2-trifluoroacetico (10 mL) goccia a goccia con agitazione. La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente.

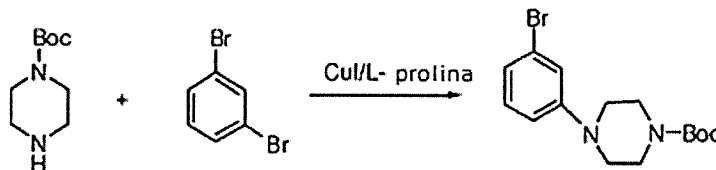
La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 63,6 mg (64%) di una sale TFA del composto del titolo come solido giallino. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 8,26(s, 4H), 7,82-7,79(d, J=8,7Hz, 2H), 7,49-7,45(m, 3H), 7,19-7,16(d, J=8,4Hz, 2H), 4,00-3,96(m, 1H), 2,65-2,60(m, 1H), 2,48-2,41(m, 1H), 2,13(s, 3H). MS (ES, m/z): 527 [M+H]⁺.

25

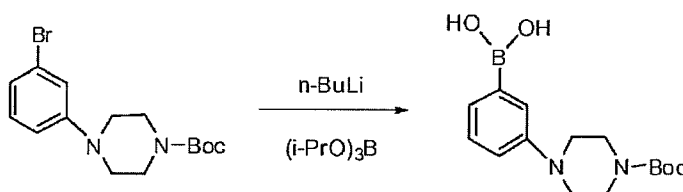
Rif. Esempio 60

4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-carbossimidamide

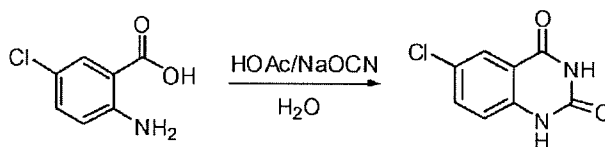
30



Intermedio 60.1: tert-butil 4-(3-bromofenil)piperazin-1-carbossilato: In un pallone da 250 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stato posto rame(I) ioduro (1,0 g, 5,26 mmol, 0,20 equiv), L-prolina (930 mg, 8,09 mmol, 0,30 equiv) in DMSO (50 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 15 min a temperatura ambiente. Poi è stato aggiunto tert-butil piperazin-1-carbossilato (5 g, 26,88 mmol, 1,00 equiv), 1,3-dibromobenzene (9,5 g, 40,25 mmol, 1,50 equiv), potassio carbonato (7,4 g, 53,62 mmol, 1,99 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 90°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 100 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 2x100 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:6). Questo è risultato in 2,9 g di tert-butil 4-(3-bromofenil)piperazin-1-carbossilato come solido bianco.

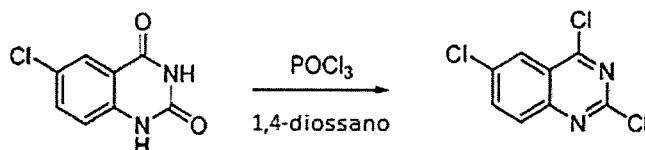


Intermedio 60.2: acido 3-(4-(tert-butossicarbonil)piperazin-1-il)fenilboronico: In un pallone a 3 colli da 250 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di tert-butil 4-(3-bromofenil)piperazin-1-carbossilato (3,8 g, 11,14 mmol, 1,00 equiv) in toluene/tetraidrofurano=1:1 (40 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di n-BuLi (4,9 mL, 2,5M/L) goccia a goccia a -70°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 30 min a -70°C. A questa è stato aggiunto triisopropil borato (2,5 g, 13,30 mmol, 1,19 equiv) goccia a goccia con agitazione a -70°C. La miscela è stata scaldata a 0°C, La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 13 mL di ammonio cloruro saturo e 3,4 mL di acqua. E' stato aggiunto acido fosforico (85 p %, 1,5g, 1,2 equiv) e la miscela è stata agitata per 30 min. Lo strato organico è stato separato e seccato su sodio solfato anidro e concentrato sotto vuoto. Il residuo è stato sciolto in 20 mL di toluene. Il prodotto è stato precipitato per aggiunta di 80 mL di eptano. I solidi sono stati lavati con 20 mL di eptano e raccolti per filtrazione. Questo è risultato in 2,9 g (85%) di acido 3-(4-(tert-butossicarbonil)piperazin-1-il)fenilboronico come solido bianco.

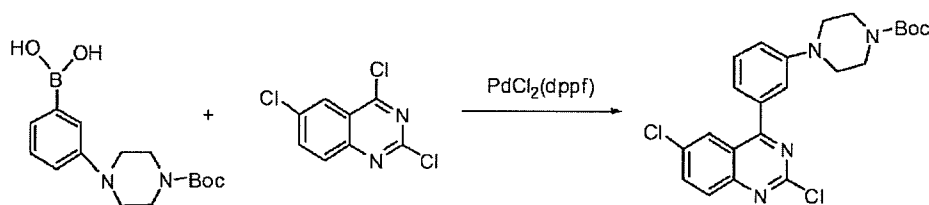


Intermedio 60.3: 6-clorochinazolin-2,4(1H,3H)-dione: In un pallone a 3 colli da 500 mL, è stata posta una soluzione di acido 2-ammino-5-clorobenzoico (10 g, 58,48 mmol, 1,00 equiv)

in acqua (100 mL), acido acetico (8 g, 133,33 mmol, 2,24 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di NaOCN (8,2 g, 126,15 mmol, 2,13 equiv). La miscela è stata agitata per 30 min a 30°C. A questa è stato aggiunto sodio idrossido (86 g, 2,15 mol, 37,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 30°C. I solidi sono stati raccolti per filtrazione. Il residuo è stato sciolto in acqua. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 7 con idrogeno cloruro (12 mol/L). I solidi sono stati raccolti per filtrazione. Questo è risultato in 5 g (44%) di 6-clorochinazolin-2,4(1H,3H)-dione come solido bianco.

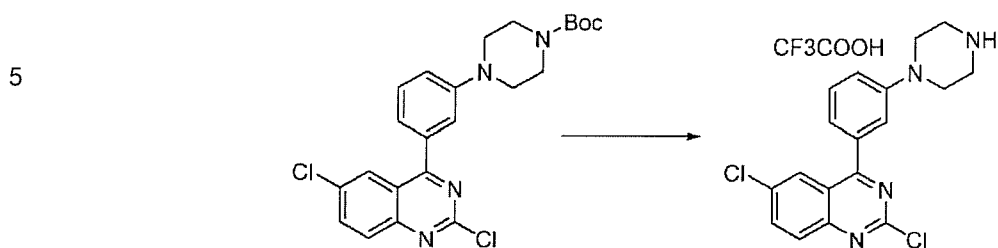


Intermedio 60.4: 2,4,6-triclorochinazolina: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di 6-clorochinazolin-2,4(1H,3H)-dione (2,2 g, 11,22 mmol, 1,00 equiv) in 1,4-diossano (20 mL), fosforil tricloruro (17 g, 111,84 mmol, 10,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 120°C in un bagno d'olio. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 200 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x200 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:50). Questo è risultato in 1,8 g (69%) di 2,4,6-triclorochinazolina come solido bianco.

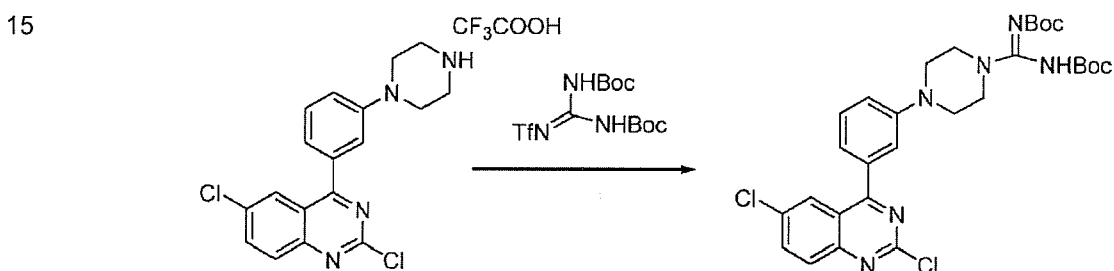


Intermedio 60.5: tert-butyl 4-(3-(2,6-diclorochinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-carbossilato: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto in atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di acido 3-(4-(tert-butossicarbonil)piperazin-1-il)fenilboronico (intermedio 60.2) (960 mg, 3,14 mmol, 1,00 equiv), 2,4,6-triclorochinazolina (800 mg, 3,43 mmol, 1,09 equiv), PdCl₂(dppf).CH₂Cl₂ (130 mg, 0,16 mmol, 0,05 equiv), Potassio Carbonato (860 mg, 6,23 mmol, 1,99 equiv) in N,N-dimetilformammide (30 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 85°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 50 mL di salamoia satura. La soluzione ottenuta è stata estratta con 2x30 mL di etil acetato e gli strati organici sono stati riuniti e seccati su sodio solfato anidro e concentrati

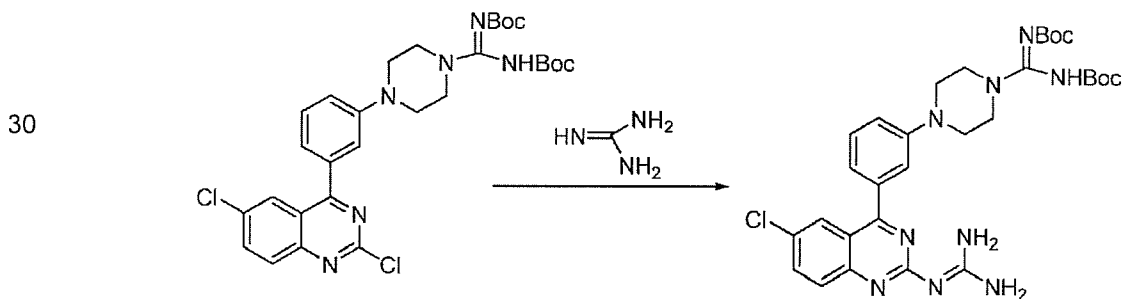
sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:6). Questo è risultato in 0,45 g (31%) di tert-butil 4-(3-(2,6-diclorochinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-carbossilato come solido giallo.



10 **Intermedio 60.6: 2,6-dicloro-4-(3-(piperazin-1-il)fenil)chinazolina 2,2,2-trifluoroacetato.** Ad intermedio 60.5 (100 mg, 0,22 mmol, 1,00 equiv) è stato aggiunto diclorometano (10 mL) ed acido 2,2,2-trifluoroacetico (124 mg, 1,09 mmol, 5,00 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 40°C. La reazione è stata poi concentrata sotto vuoto a dare 70 mg di Intermedio 60.6 come solido giallo.

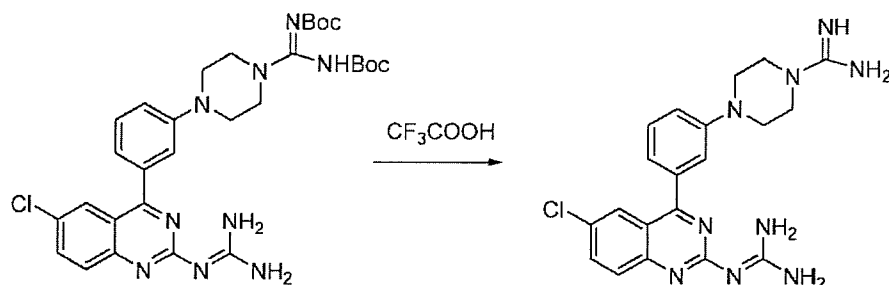


20 **Intermedio 60.7: tert-butil (4-(3-(2,6-diclorochinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)metandiilidencarbammato.** Ad Intermedio 60.6 (70 mg, 0,15 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (10 mL) è stata aggiunta N-tert-butossicarbonil-N'-tert-butossicarbonil-N''-trifluorometansolfonilguanidina (91 mg, 0,23 mmol, 1,57 equiv) e trietilammina (38 mg, 0,38 mmol, 2,54 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a 40°C. La miscela è stata poi concentrata sotto vuoto, il residuo caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:8) a dare 70 mg (77%) di Intermedio 60.7 come solido giallo.



Intermedio 60.8: tert-butil (4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)metandiilidenedicarbammato. Ad Intermedio 60.7 (70 mg, 0,12 mmol, 1,00 equiv) in NMP (1,5 mL) è stata aggiunta guanidina (0,24 mL, 2,00 equiv, 1 mol/L) e 1,4-diaza-biciclo[2.2.2]ottano (26 mg, 0,23 mmol, 1,99 equiv) e la soluzione
5
ottenuta agitata per 1,5 h a 25°C. La reazione è stata spenta per aggiunta di 20 mL di acqua e la soluzione ottenuta è stata estratta con 2x20 mL di etil acetato. Gli strati organici sono stati riuniti, seccati su sodio solfato anidro, concentrati, il residuo caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con diclorometano/metanolo (5:1) a dare 30 mg (41%) di Intermedio 60.8 come solido giallo.

10



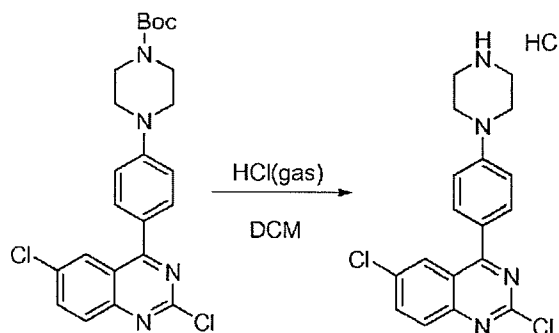
15

Composto 60: 4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-carbossimmidamide. Ad Intermedio 60.8 (30 mg, 0,05 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (5 mL) è stato aggiunto acido 2,2,2-trifluoroacetico (0,2 mL) e la soluzione ottenuta agitata per 6 h a 30°C. La miscela è stata poi concentrata sotto vuoto ed il residuo liofilizzato a dare 20 mg (75%) di una sale TFA del composto del titolo come solido
20
biancastro. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): 7,97-8,08 (m, 3H), 7,54-7,59 (m, 1H), 7,28-7,39 (m, 3H), 3,71 (d, J=4,8 Hz, 4H), 3,44 (d, J=4,8 Hz, 4H). MS (ES, m/z): 424,0 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 61

acido 2-(4-(4-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)acetico

25

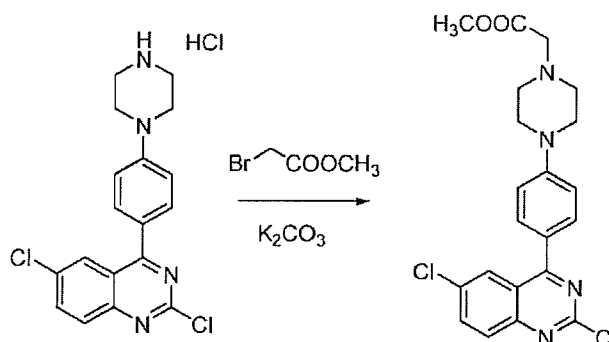


30

Intermedio 61.1: 2,6-dicloro-4-(4-(piperazin-1-il)fenil)chinazolina cloridrato. Seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 60, sostituendo 1,4-dibromobenzene per 1,3-

dibromobenzene, è stato ottenuto 2,6-dicloro-4-(4-(piperazin-1-il)fenil)chinazolina cloridrato come solido rosso.

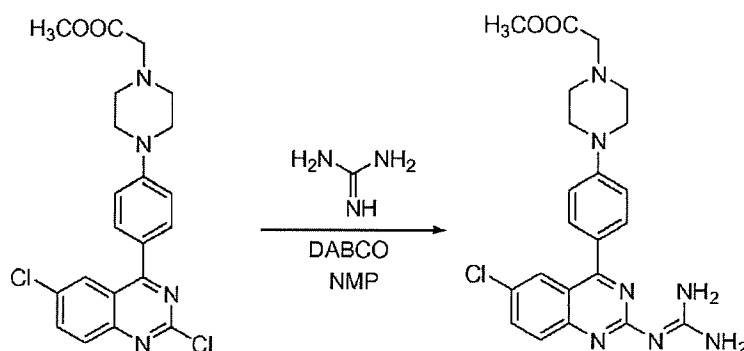
5



10

Intermedio 61.2: metil 2-(4-(4-(2,6-diclorochinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)acetato. A metil 2-bromoacetato (116 mg, 0,76 mmol, 3,00 equiv) in N,N-dimetilformammide (10 mL) è stato aggiunto potassio carbonato (140 mg, 1,01 mmol, 4,00 equiv) seguito dall'aggiunta a porzioni di Intermedio 61.1 (100 mg, 0,25 mmol, 1,00 equiv) e la reazione è stata agitata per 4 h a 30°C. La miscela è stata concentrata sotto vuoto ed il residuo caricato su una colonna di gel di silice, eluendo con etil acetato/etere di petrolio (1:5) a dare 60 mg (55%) di Intermedio 61.2 come solido giallo.

15



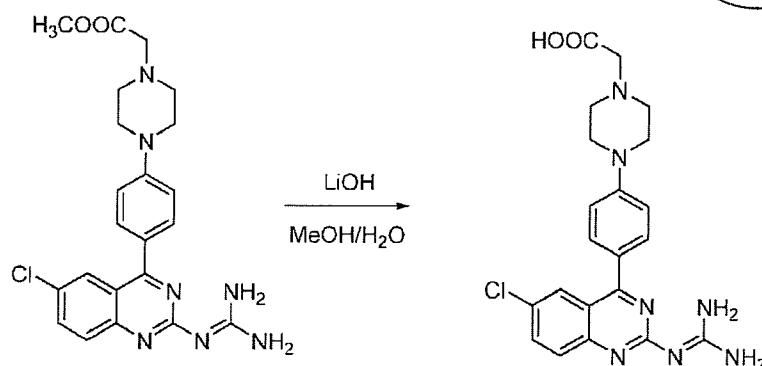
20

25

Intermedio 61.3: metil 2-(4-(4-(6-cloro-2-(diamminometilnammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)acetato. Ad Intermedio 61.2 (60 mg, 0,14 mmol, 1,00 equiv) in NMP (5 mL) è stato aggiunto 1,4-diaza-biciclo[2.2.2]ottano (DABCO; 15 mg, 0,13 mmol, 1,00 equiv), guanidina (0,3 mL di una soluzione 1M in NMP, 2,00 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 30°C. La reazione è stata diluita con 10 mL di acqua, estratta con 4x10 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti e seccati su sodio solfato anidro e poi concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con diclorometano/metanolo (50:1-20:1) a dare 30 mg (47%) di Intermedio 61.3 come solido giallo.

30

5

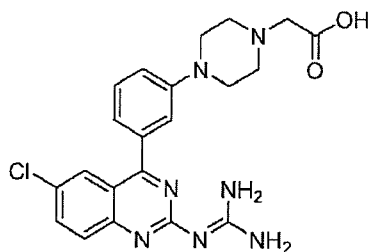


Composto 61: acido 2-(4-(4-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)acetico. Ad Intermedio 61.3 (20 mg, 0,04 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (5 mL) è stata aggiunta una soluzione di LiOH (32 mg, 1,33 mmol, 30,00 equiv) in acqua (1 mL) e la reazione è stata agitata per 3 h a 25°C. La soluzione è stata concentrata sotto vuoto, il valore di pH della soluzione corretto a 6 con HCl acquoso (1 mol/L) e i solidi ottenuti sono stati raccolti per filtrazione a dare 15,6 mg (80%) di composto 61 come solido giallo. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO *ppm*): 8,07-8,06(t, 1H), 7,96-7,93(t, 2H), 7,72-7,69(d, *J*=8,7Hz, 2H), 7,22-7,19(d, *J*=8,7Hz, 2H), 3,58-3,54(m, 4H), 3,43-3,36(m, 6H). MS (ES, *m/z*): 440 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 62

acido 2-(4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)acetico

20



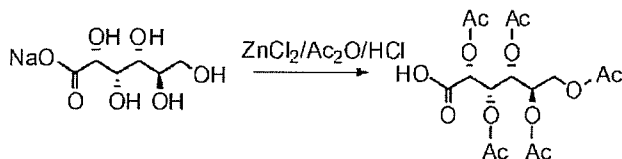
25

Composto 62: acido 2-(4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)acetico. Composto 62 è stato preparato da intermedio 60.6, usando le procedure descritte per Rif. Esempio 61. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, *ppm*): 7,80-7,86 (m, 3H), 7,41-7,46 (m, 1H), 7,16-7,22 (m, 2H), 7,08-7,10 (m, 1H), 3,13 (brs, 4H), 2,71 (brs, 4H). MS (ES, *m/z*): 440 [M+H]⁺;

30

Rif. Esempio 63

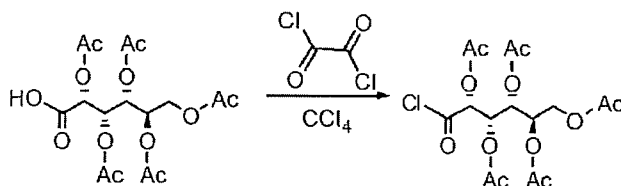
2-(6-cloro-4-(3-(4-((2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentaidrossiesanoil)piperazin-1-il)fenil)chinazolin-2-il)guanidina



5 **Intermedio 63.1: acido (2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentaacetossiesanoico:** In un pallone a 3 colli da 50 mL, è stato posto $ZnCl_2$ (0,5 g, 0,50 equiv), anidride acetica (5 mL). A questo è stato aggiunto sodio (2S,3R,4S,5R)-2,3,4,5,6-pentaidrossiesanoato (1,6 g, 6,97 mmol, 1,00 equiv, 95%) a $-5^\circ C$. HCl anidro vi è stato introdotto per 0,5 h a $0^\circ C$. La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata

10 raffreddata a $0^\circ C$. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 8 g di ghiaccio. La miscela è stata agitata per 1 h a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata diluita con 20 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x20 mL di diclorometano e gli strati organici riuniti e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Questo è risultato in 1,0 g (35%) di acido (2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentaacetossiesanoico come liquido giallo.

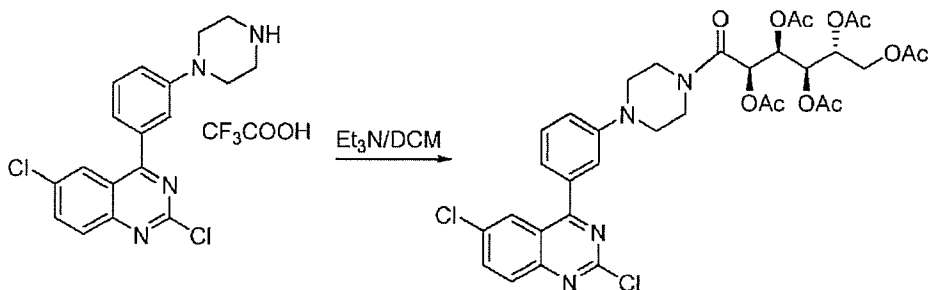
15



20 **Intermedio 63.2: (2R,3R,4S,5R)-6-cloro-6-ossosesan-1,2,3,4,5-pentail pentaacetato:** In un pallone a 3 colli da 50 mL, è stata posta una soluzione di acido (2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentaacetossiesanoico (intermedio 63.1) (610 mg, 1,35 mmol, 1,00 equiv, 90%) in CCl_4 (30 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di ossalil dicloruro (3 mL) goccia a goccia con agitazione. La soluzione ottenuta è stata scaldata a refluxo per 3 h in un bagno d'olio. La

25 miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 0,62 g (grezzo) di intermedio 63.2 come olio giallo.

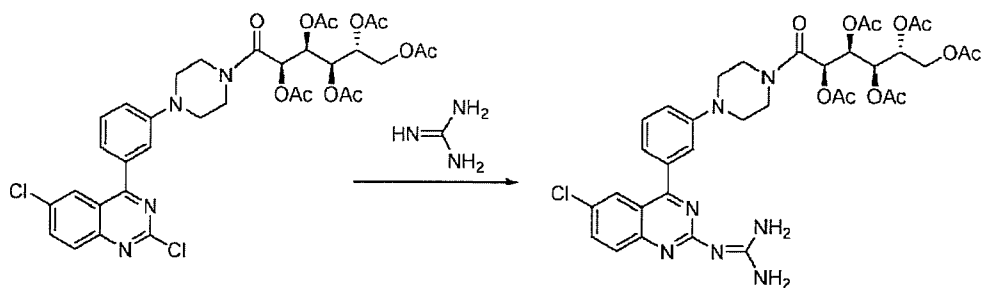
30



Intermedio 63.3: 2-(6-cloro-4-(3-(4-((2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentaidrossiesanoil)piperazin-1-il)fenil)chinazolin-2-il)guanidina 2,2,2-trifluoroacetato.

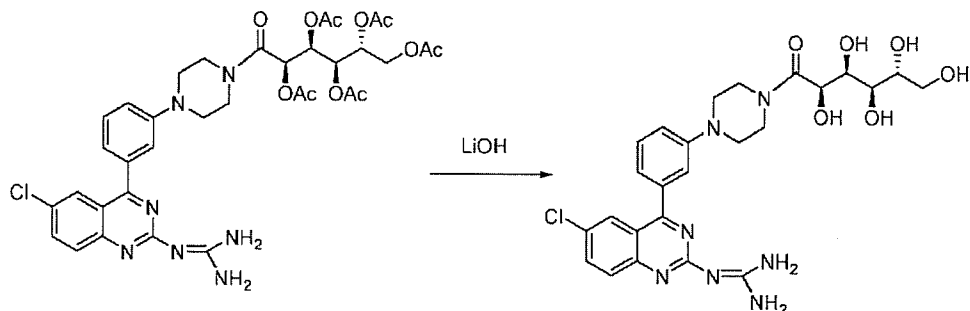
Ad Intermedio 60.6 (150 mg, 0,32 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (5 mL) è stata aggiunta trietilammina (96 mg, 0,95 mmol, 2,99 equiv) e la soluzione raffreddata a 0°C.

5 Intermedio 63.2 (407 mg, 0,96 mmol, 3,02 equiv) in diclorometano (5 mL) è stato poi aggiunto goccia a goccia e la reazione è stata agitata per 1 h a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto, il residuo caricato su una colonna di gel di silice e poi eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:2) a dare 150 mg (62%) di Intermedio 63.3 come solido giallo.



Intermedio 63.4: (2R,3R,4S,5R)-6-(4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)-chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)-6-ossoesan-1,2,3,4,5-pentail pentaacetato.

Ad Intermedio 63.3 (150 mg, 0,20 mmol, 1,00 equiv) in NMP (5 mL) è stata aggiunta guanidina (0,8 mL di una soluzione 1 mol/L in NMP; 4,0 equiv) e 1,4-diaza-biciclo[2.2.2]ottano (DABCO; 44,8 mg, 0,40 mmol, 2,00 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 1,5 h a 30°C. La reazione è stata spenta per aggiunta di 10 mL di acqua e poi estratta con 2x10 mL di etil acetato. Gli strati organici riuniti, seccati su sodio solfato anidro, concentrati, caricati su una colonna di gel di silice e poi eluiti con diclorometano/metanolo (10:1) a dare 30 mg (19%) di Intermedio 63.4 come solido giallo.

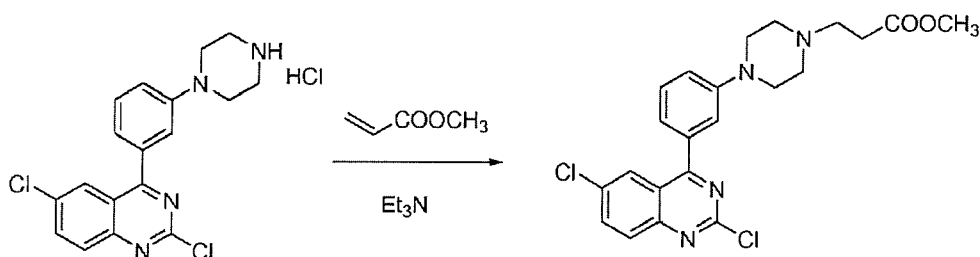


Composto 63: 2-(6-cloro-4-(3-(4-((2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentaidrossiesanoil)piperazin-1-il)fenil)chinazolin-2-il)guanidina. Ad Intermedio 63.4 (25 mg, 0,03 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (5 mL), è stata aggiunta una soluzione di LiOH (3,9 mg, 0,16 mmol, 5,03 equiv) in

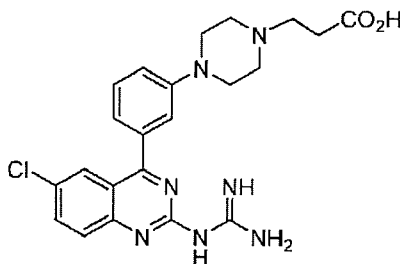
acqua (0,2 mL) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 0,5 h a 0°C. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 7 con HCl acquoso (5 %), la miscela risultante è stata concentrata sotto vuoto e poi purificata per Prep-HPLC a dare 10 mg (45%) di un sale TFA di composto 63 come solido giallo. LCMS (ES, m/z): 560,0 $[M+H]^+$; 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): 7,96-8,09 (m, 3H), 7,52-7,57 (m, 1H), 7,25-7,39 (m, 3H), 4,73 (d, $J=5,1$ Hz, 1H), 4,07-4,09 (m, 1H), 3,62-3,89 (m, 8H). MS (ES, m/z): 560,0 $[M+H]^+$

Rif. Esempio 64

acido 3-(4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)propanoico



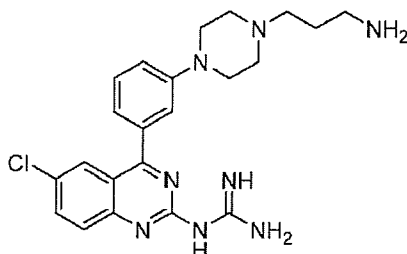
Intermedio 64.1: metil 3-(4-(3-(2,6-diclorochinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)propanoato. Ad Intermedio 60.6 (200 mg, 0,51 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano (10 mL) è stato aggiunto metil acrilato (253 mg, 2,94 mmol, 5,81 equiv) e trietilammina (253 mg, 2,50 mmol, 4,95 equiv) e la miscela ottenuta è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente. La reazione è stata concentrata sotto vuoto, il residuo caricato su una colonna di gel di silice e poi eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:3) a dare 100 mg (44%) di Intermedio 64.1 come solido giallo.



Composto 64: acido 3-(4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)propanoico. Composto 64 è stato preparato da Intermedio 64.1 usando le procedure descritte in Rif. Esempio 61, ottenendo 25 mg di composto del titolo come solido giallo. ; 1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$, ppm): δ 7,89-7,92 (m, 3H), 7,42-7,47 (m, 1H), 7,35(brs, 1H), 7,15-7,24 (m, 2H), 3,25 (brs, 4H), 2,63-2,74 (m, 6H), 2,31-2,35 (m, 2H). LCMS (ES, m/z): 454,0 $[M+H]^+$

Rif. Esempio 65**1-(4-(3-(4-(3-amminopropil)piperazin-1-il)fenil)-6-clorochinazolin-2-il)guanidina**

5

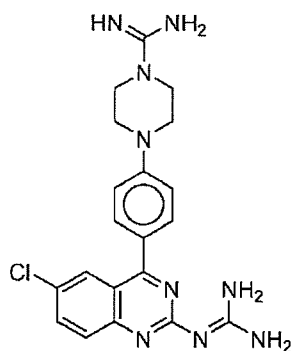


Composto 65: 1-(4-(3-(4-(3-amminopropil)piperazin-1-il)fenil)-6-clorochinazolin-2-il)guanidina. Un sale cloridrato del composto del titolo è stato preparato usando procedure simili a quelle delineate in Rif. Esempio 61, partendo da intermedio 60.6 e tert-butil 3-bromopropilcarbammato. MS (ES, m/z): 439 $[M+H]^+$

Rif. Esempio 66**4-(4-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-carbossimmidamide**

15

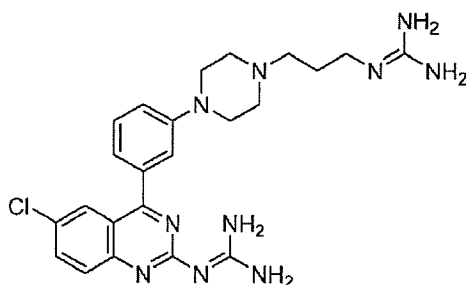
20



Composto 66: 4-(4-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-carbossimmidamide. Un sale TFA di Composto 66 è stato preparato da Intermedio 61.1, usando le procedure descritte in Rif. Esempio 60. MS (ES, m/z):424 $[M+H]^+$

Rif. Esempio 67**2-(4-(3-(4-(3-guanidinopropil)piperazin-1-il)fenil)-6-clorochinazolin-2-il)guanidine**

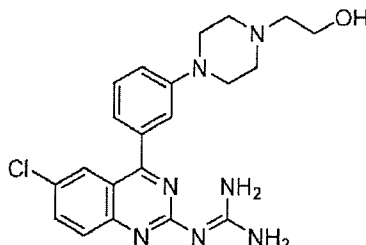
30



Composto 67: 2-(4-(3-(4-(3-guanidinopropil)piperazin-1-il)fenil)-6-clorochinazolin-2-il)guanidina. Un sale cloridrato di Composto 67 è stato preparato da Composto 65 usando le procedure delineate in Rif. Esempio 60. MS (ES, m/z): 481 $[M+H]^+$

Rif. Esempio 68

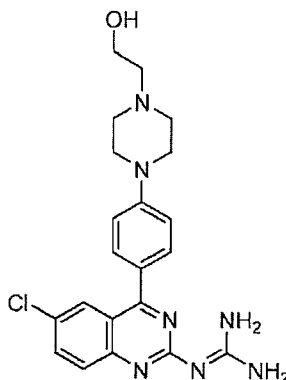
5 **2-(6-cloro-4-(3-(4-(2-idrossietil)piperazin-1-il)fenil)chinazolin-2-il)guanidina**



Composto 68: 2-(6-cloro-4-(3-(4-(2-idrossietil)piperazin-1-il)fenil)chinazolin-2-il)guanidina. Un sale TFA di Composto 68 è stato preparato da Composto 60.6 ed ossido di etilene usando le procedure delineate in Rif. Esempio 61. MS (ES, m/z): 426 $[M+H]^+$

Rif. Esempio 69

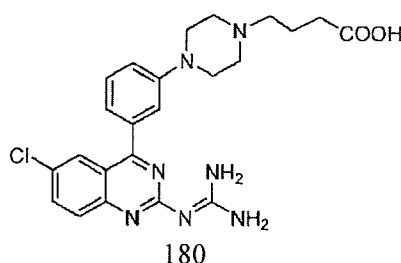
15 **2-(6-cloro-4-(4-(4-(2-idrossietil)piperazin-1-il)fenil)chinazolin-2-il)guanidina**



20 **Composto 69:** 2-(6-cloro-4-(4-(4-(2-idrossietil)piperazin-1-il)fenil)chinazolin-2-il)guanidina. Un sale TFA di Composto 69 è stato preparato da Intermedio 61.1 usando le procedure descritte in Rif. Esempio 68. MS (ES, m/z): 426 $[M+H]^+$

Rif. Esempio 70

25 **acido 4-(4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)butanoico sale di acido 2,2,2-trifluoroacetico**



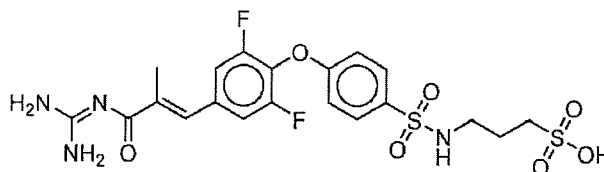
Composto 70: acido 4-(4-(3-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)butanoico. Composto 70 è stato preparato da Intermedio 60.6 e metil 4-bromobutanoato usando le procedure descritte in Rif. Esempio 61. Purificazione per colonna di gel di silice con metanolo:acqua (0~0.04) ha dato un sale TFA del composto del titolo come solido giallo. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 11,33(s, 1H), 8,09-8,19(m, 2H), 7,96-7,96(s, 1H), 7,53-7,58(m, 1H), 7,25-7,37(m, 3H), 4,0(s, 4H), 3,16(s, 6H), 2,34-2,39(m, 2H), 1,92(s, 2H); MS (ES, m/z): 468 [M+H]

Esempi 71-104

Esempi 71 - 104 sono stati preparati usando metodi descritti in Esempi 1-70. I dati di caratterizzazione (spettri di massa) per composti 71-104 sono forniti in Tabella 3.

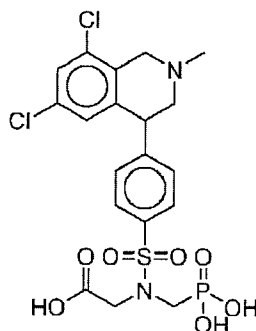
Rif. Esempio 71

acido (E)-3-(4-(4-(3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)propan-1-solfonico



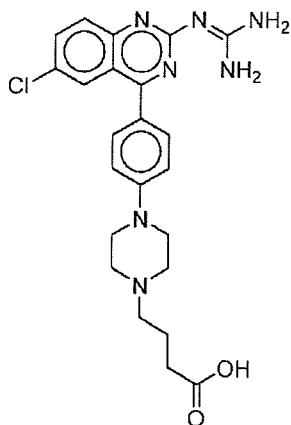
Rif. Esempio 72

acido 2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-(fosfonometil)fenilsolfonammido)acetico



Rif. Esempio 73

acido 4-(4-(4-(6-cloro-2-(diamminometilenammino)chinazolin-4-il)fenil)piperazin-1-il)butanoico

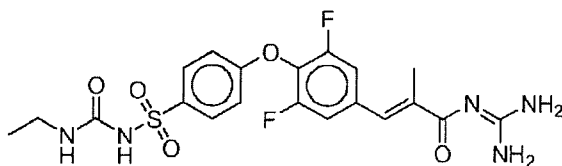


5

10

Rif. Esempio 74

(E)-N-(diamminometilene)-3-(4-(4-(N-(etilcarbamoil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilammide

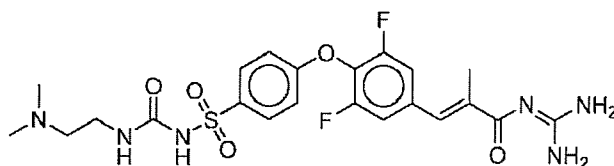


15

Rif. Example 75

(E)-N-(diamminometilene)-3-(4-(4-(N-(2-(dimetilammino)etilcarbamoil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilammide

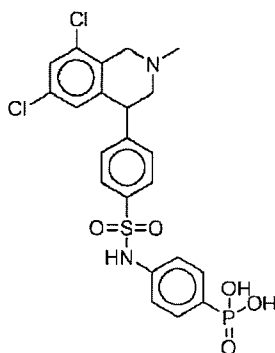
20



25

Rif. Esempio 76

acido 4-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)fenilfosfonico

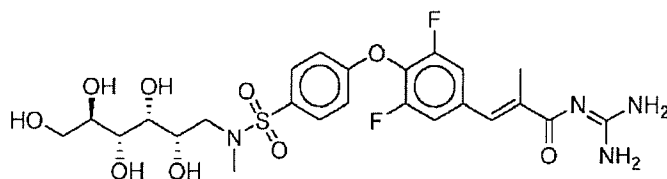


30

Rif. Esempio 77

(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-(N-metil-N-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentaidrossiesil)sulfamoil)fenossi)fenil)-2-metilacrilamide

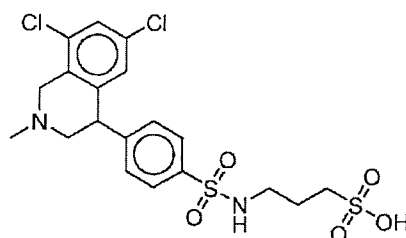
5



Rif. Esempio 78

acido 3-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propan-1-solfonico

10

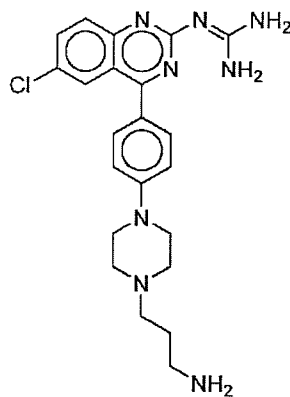


15

Rif. Esempio 79

2-(4-(4-(4-(3-amminopropil)piperazin-1-il)fenil)-6-clorochinazolin-2-il)guanidina

20

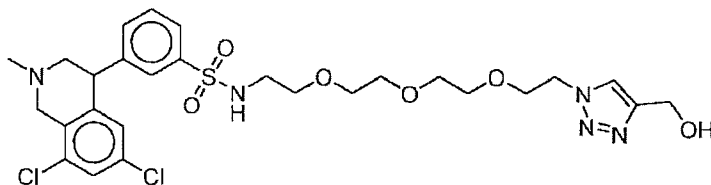


25

Rif. Esempio 80

3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(idrossimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etossi)etossi)etossi)etil)benzensolfonammide

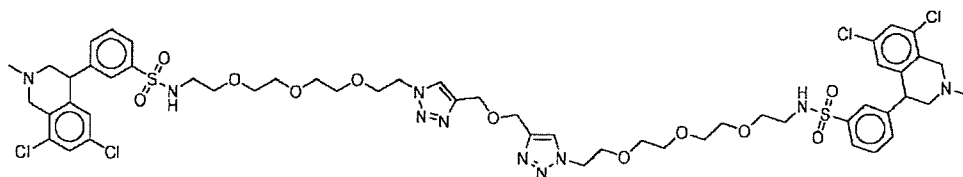
30



Rif. Esempio 81

N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(4,4'-ossibis(metilene)bis(1H-1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

5

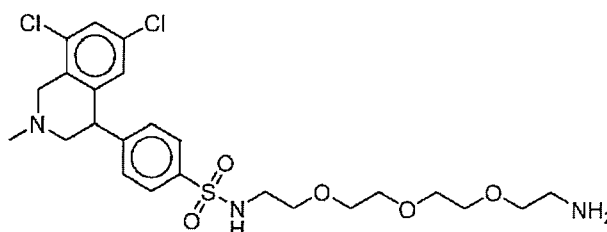


10

Rif. Esempio 82

N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide

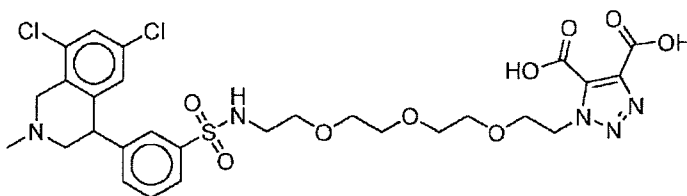
15



Rif. Esempio 83

acido 1-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonamido)etossi)etossi)etossi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4,5-dicarbossilico

20

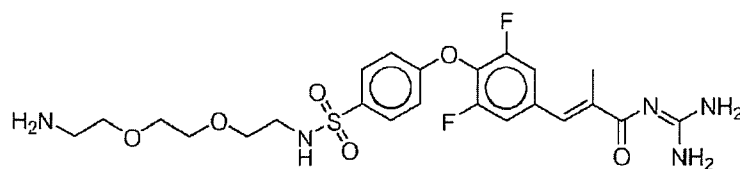


25

Rif. Esempio 84

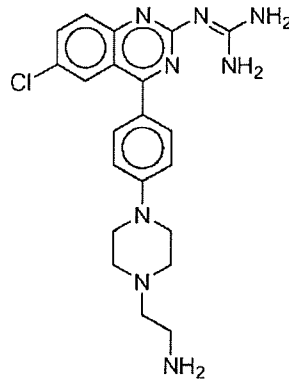
(E)-3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metilacrilammide

30



Rif. Esempio 85

2-(4-(4-(4-(2-amminoetil)piperazin-1-il)fenil)-6-clorochinazolin-2-il)guanidina

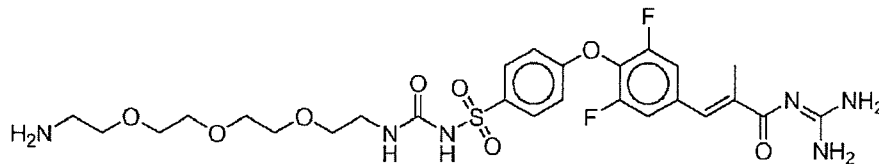


5

Rif. Esempio 86

10

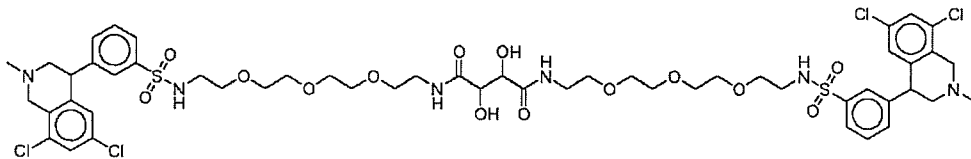
(E)-3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etilcarbamoil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metilacrilammide



15

Esempio 87

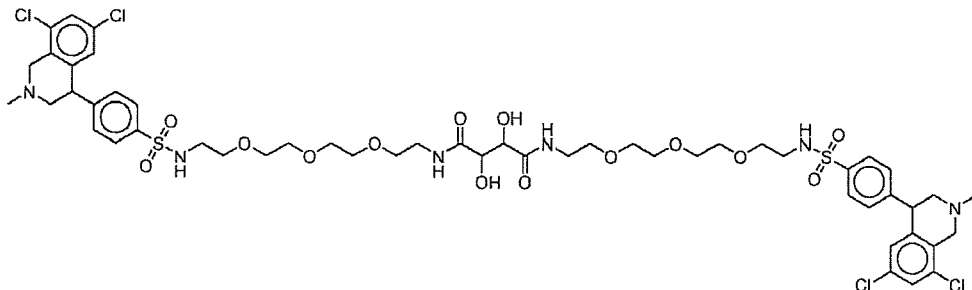
N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide



20

Esempio 88

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

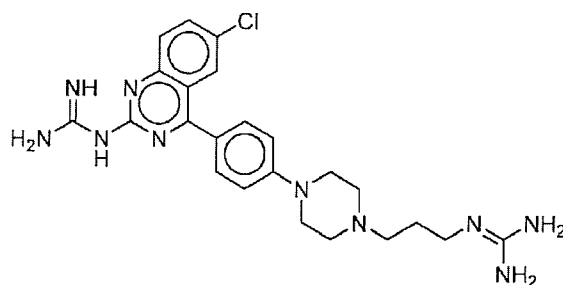


25

30

Rif. Esempio 89

1-(4-(4-(4-(3-guanidinopropil)piperazin-1-il)fenil)-6-clorochinazolin-2-il)guanidina



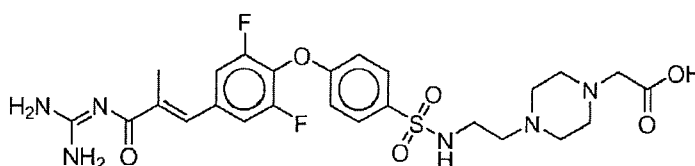
5

Rif. Esempio 90

acido (E)-2-(4-(2-(4-(4-(3-(diamminometilnammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-

10

difluorofenossi)fenilsolfonamido)etil)piperazin-1-il)acetico

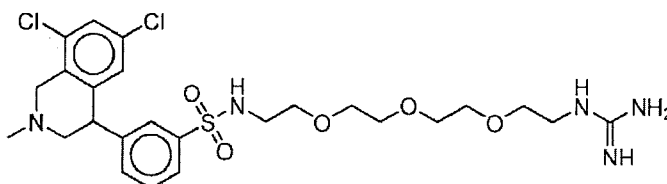


15

Rif. Esempio 91

N-(1-ammino-1-immino-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13-il)-3-(6,8-dicloro-2-metil-

1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide

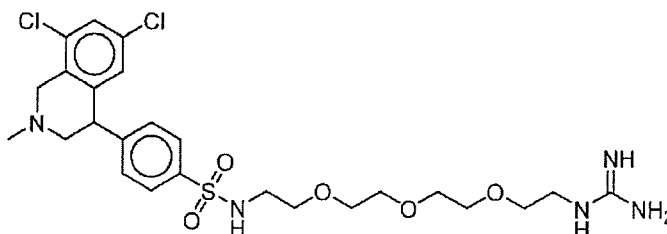


20

Rif. Esempio 92

N-(1-ammino-1-immino-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13-il)-4-(6,8-dicloro-2-metil-

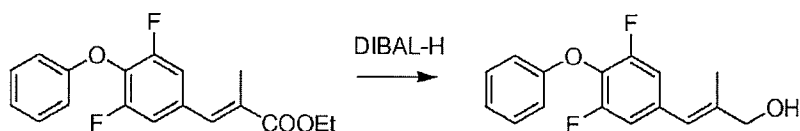
1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide



25

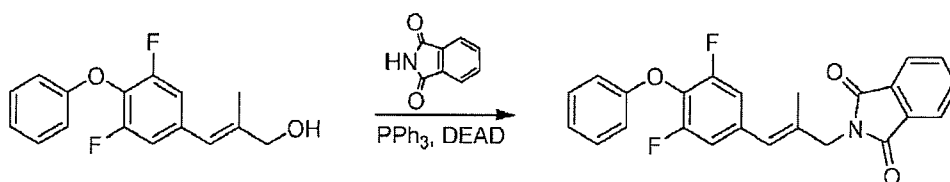
Rif. Esempio 93

(E)-1-(3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilallil)guanidina

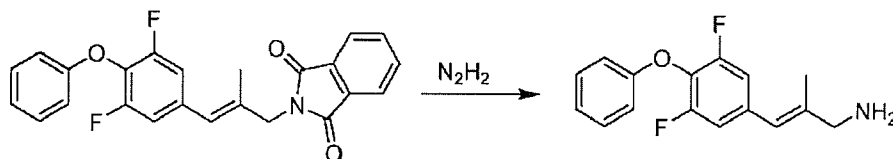


30

Intermedio 93.1 (E)-3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilprop-2-en-1-olo: Ad una soluzione di (E)-etil 3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilacrilato (Intermedio 41.2) (800mg, 2,51mmol) in DCM secco (25mL) sotto N₂ a -78°C è stata aggiunta una soluzione di DIBAL-H (8,79mL, 1M in DCM) goccia a goccia in parecchi minuti. La reazione è stata lasciata scaldare a temperatura ambiente in 2 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C, spenta con 25 mL di soluzione di sale di Rochelle (10% p/v in acqua) e agitata vigorosamente per 1 ora. La sospensione ottenuta è stata diluita con acqua (20mL) ed estratta con DCM (3x30mL). Gli strati organici combinati sono seccati su Na₂SO₄ e concentrati. L'olio ottenuto è stato caricato su una colonna di gel di silice (50% EtOAc in esani) a dare 566mg di composto del titolo (82%) come olio giallo.

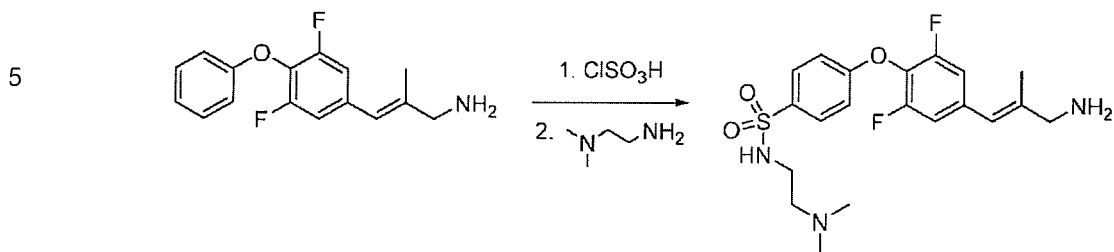


Intermedio 93.2 (E)-2-(3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilallil)isoindolin-1,3-dione: Ad una soluzione di (E)-3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilprop-2-en-1-olo (Intermedio 93.1) (410mg, 1,49mmol) in toluene secco (7,45mL) sotto N₂ è stata aggiunta PPh₃ e ftalimmide. La soluzione ottenuta è stata raffreddata a 0°C e dietil azodicarbossilato (DEAD, 0,748mL) è stato aggiunto goccia a goccia in parecchi minuti. La reazione è stata lasciata scaldare a temperatura ambiente ed agitata per tutta la notte. Dopo diluizione con EtOAc (20mL), lo strato organico è stato lavato con acqua (2x30mL), salamoia (30mL) e seccato su Na₂SO₄. Dopo allontanamento del solvente, il residuo ottenuto è stato caricato su una colonna di gel di silice (15% EtOAc in esani) a dare 385mg di composto del titolo (63%) come olio.



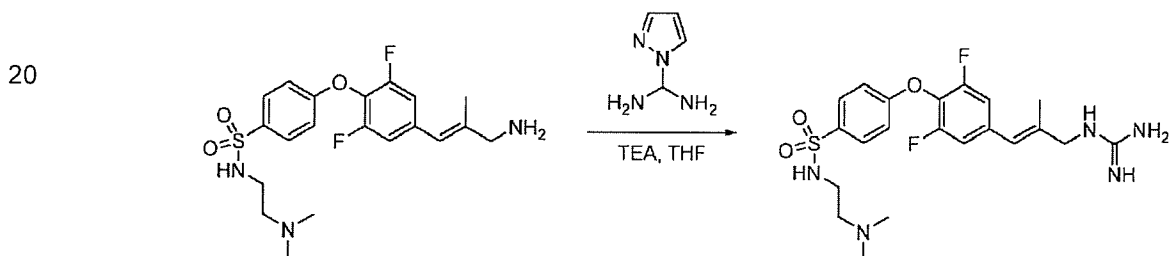
Intermedio 93.3 (E)-3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilprop-2-en-1-ammina: Ad una soluzione di (E)-2-(3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilallil)isoindolina-1,3-dione (Intermedio 93.2, 100mg, 0,25mmol) in metanolo (1mL) è stata aggiunta idrazina idrata (25mg, 0,5mmol) e la reazione agitata a 50°C per tutta la notte. Il solido bianco è stato filtrato con DCM e il solvente allontanato dal filtrato. Il residuo è stato ripreso in DCM e filtrato. Questo è stato ripetuto finchè non si è formato più ulteriore precipitato a dare 49,5mg del composto del titolo (71%) come olio giallo, una porzione da 10mg del quale è

stata diluita con 1N HCl e liofilizzata a dare 7,8mg di composto del titolo come sale HCl.
¹H-NMR (400MHz, d₆-DMSO): δ 8,25 (s, 2H), 7,37 (t, 2H), 7,20 (d, 2H), 7,12 (t, 1H), 6,97 (s, 1H), 3,57 (s, 2H), 1,96 (s, 3H). MS (*m/z*): 258,96 (M-NH₂).



Intermedio 93.4: (E)-4-(4-(3-ammino-2-metilprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)-N-(2-

10 **(dimetilammino)etil)benzensolfonammide:** Ad una soluzione di (E)-3-(3,5-difluoro-4-fenossifenil)-2-metilprop-2-en-1-ammina (intermedio 93.3, 100mg, 0,364mmol) in DCM (0,364 mL, 1M) è stato aggiunto acido clorosolfonico (2,91mmol, 194,3uL) in 4 porzioni goccia a goccia ogni 20 minuti. La reazione è stata agitata per ulteriori 20 minuti e poi spenta in una soluzione di N1,N1-dimetiletan-1,2-diammina (3,78mL) in DCM (12mL) a 0°C. La
 15 soluzione ottenuta è stata scaldata a temperatura ambiente ed agitata per 30 minuti. Dopo completamento il solvente è stato allontanato ed il residuo ripreso in soluzione 1:1 Acetonitrile:acqua e purificato per HPLC preparativa a dare 74,5mg di composto del titolo (31%) come sale TFA.



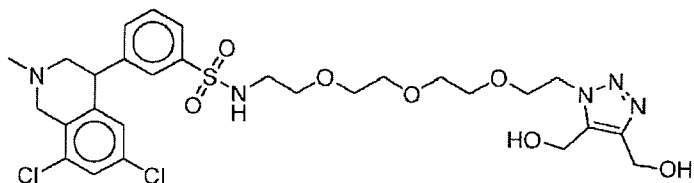
Composto 93: (E)-4-(2,6-difluoro-4-(3-guanidino-2-metilprop-1-enil)fenossi)-N-(2-

25 **(dimetilammino)etil)benzen-solfonammide:** Ad una soluzione di (E)-4-(4-(3-ammino-2-metilprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)-N-(2-(dimetilammino)etil)benzen-solfonammide (Intermedio 93.4, 39,3mg, 0,092mmol) in THF secco (460uL, 0,2M) sotto N₂ è stata aggiunta TEA (0,276mmol, 27,9mg) e (1H-pirazol-1-il)metandiammina cloridrato (0,102mmol, 14,9mg). La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 ora, al qual punto LCMS ha
 30 indicato conversione completa. Il solvente è stato allontanato e il residuo ottenuto ripreso in 1:1 ACN:acqua e purificato per HPLC preparativa a dare 16,9mg di composto del titolo (26%) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₄OD): δ 7,87 (d, 2H), 7,12 (d, 2H), 7,08 (d, 2H), 3,92 (s, 2H), 3,62 (m, 2H), 3,29 (m, 2H), 3,17 (t, 2H), 2,01 (s, 6H), 1,91 (s, 3H). MS (*m/z*): 468,12 (M+H)⁺.

Rif. Esempio 94

N-(2-(2-(2-(2-(4,5-bis(idrossimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide

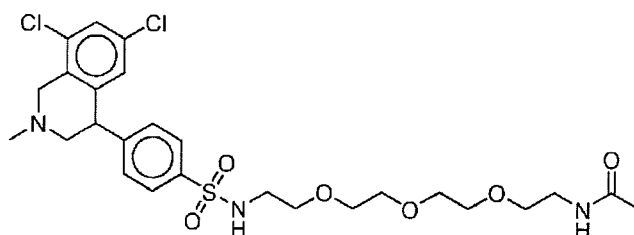
5



Rif. Esempio 95

N-(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)acetammide

10

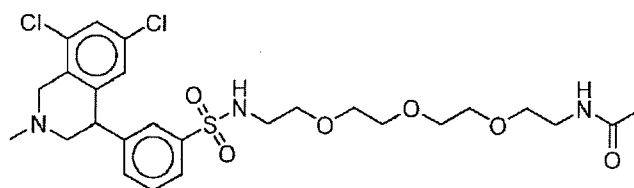


15

Rif. Esempio 96

N-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)acetammide

20

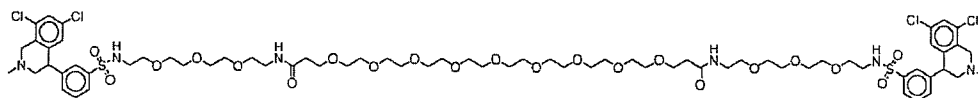


25

Rif. Esempio 97

N1,N31-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaossatriacontan-1,31-diammide

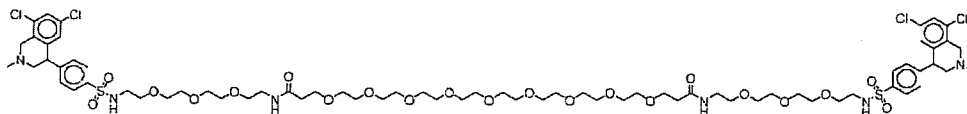
30



Rif. Esempio 98

N1,N31-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaossaentriacontan-1,31-diammide

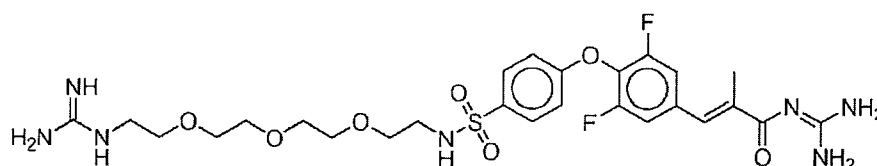
5



Rif. Esempio 99

(E)-3-(4-(4-(N-(1-ammino-1-immينو-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13-il)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metilacrilammide

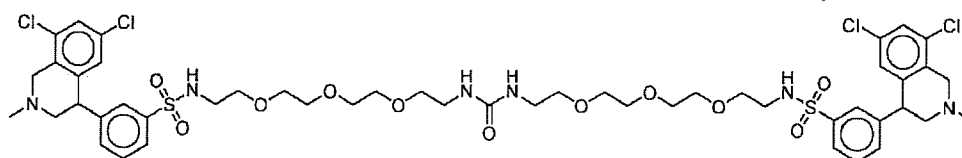
10



Esempio 100

N,N'-(13-osso-3,6,9,17,20,23-esaossa-12,14-diazapentacosan-1,25-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

15

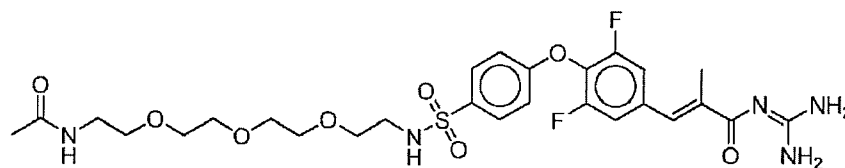


20

Rif. Esempio 101

(E)-N-(diamminometilene)-3-(3,5-difluoro-4-(4-(N-(2-osso-6,9,12-triossa-3-azatetradecan-14-il)sulfamoil)fenossi)fenil)-2-metilacrilammide

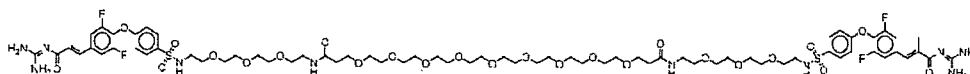
25



Rif. Esempio 102

N1,N31-bis(2-(2-(2-(2-(4-(4-((E)-3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaossaentriacontan-1,31-diammide

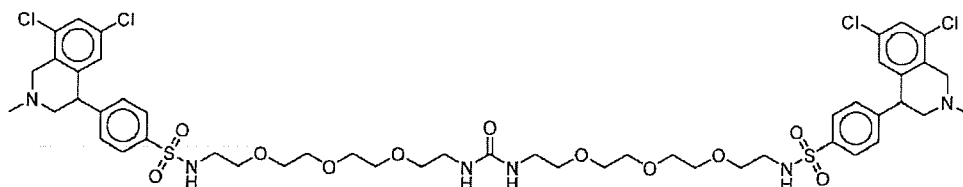
30



Esempio 103

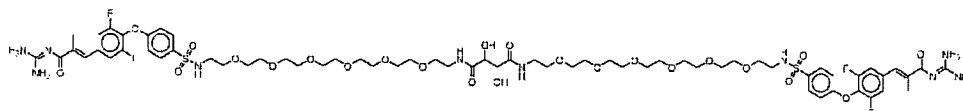
N,N'-(13-osso-3,6,9,17,20,23-esaossa-12,14-diazapentacosan-1,25-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

5

**Rif. Esempio 104**

N1,N4-bis(20-(4-(4-((E)-3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)-3,6,9,12,15,18-esaossaicosil)-2,3-diidrossisuccinammide

10

**Tabella 3**

**Dati Analitici per Composti
Esempi 71-104**

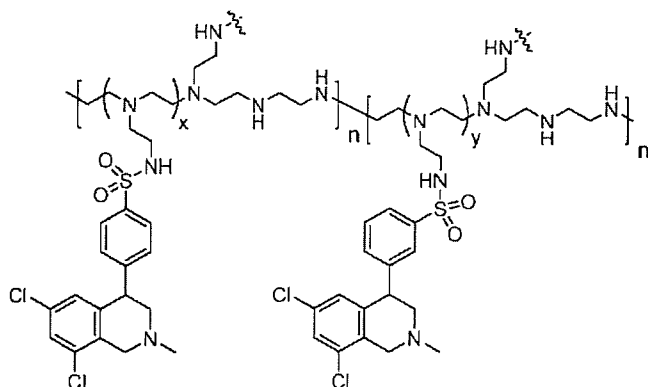
Esempi	[M+H] ⁺
71	533
72	523
73	468
74	482
75	525
76	527
77	589
78	493
79	439
80	628
81	1239,1
82	546,3
83	686
84	542
85	425
86	629
87	604 [M+2]/2
88	604 [M+2]/2
89	481
90	581
91	588
92	581
93	588
94	658
95	588

96	588
97	1571
98	1571
99	628
100	1117
101	628
102	1649
103	1117
104	1549

5

Rif. Esempio 105**4-/3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-polietilimmino-solfonammide**

10



15

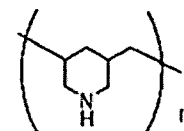
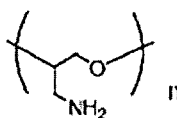
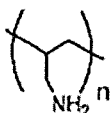
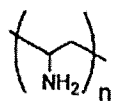
Rif. Esempio 105 è preparato da polietilammina secondo le procedure descritte in Esempi 1-20
70, dove "x," "y," "n" ed "m" sono determinati dalla stechiometria del solfonilcloruro e polietilammina.

Rif. Esempio 106

Come illustrato sotto, altri nucleofili polimerici sono impiegati usando le procedure descritte in Esempi 1-70 per preparare composti polivalenti:

25

Altri nucleofili polimerici

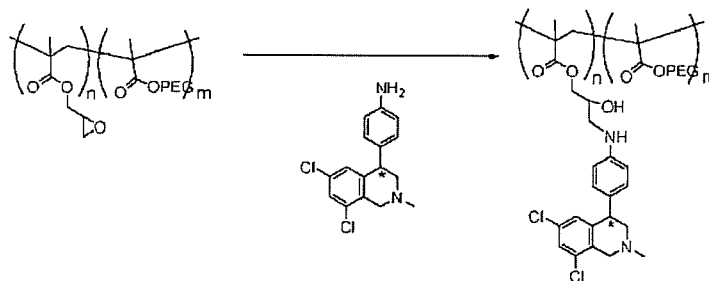


30

Rif. Esempio 107

Come illustrato sotto, elettrofili polimerici sono usati con Intermedi nucleofili per preparare composti polivalenti usando, per esempio, le procedure delineate in Rif. Esempio 68.

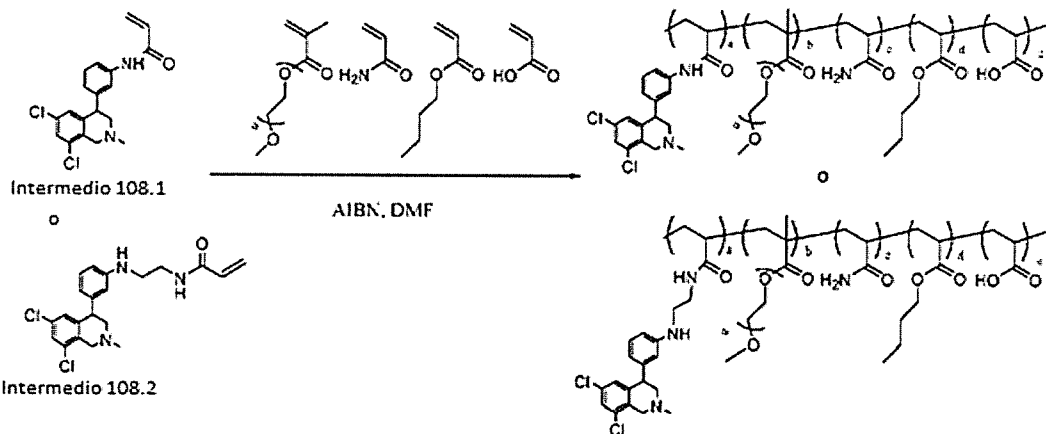
5



Rif. Esempio 108-147

**Procedura Generale per copolimerizzazione di Intermedio 108.1 ed Intermedio 108.2
con altri monomeri**

10



15

20

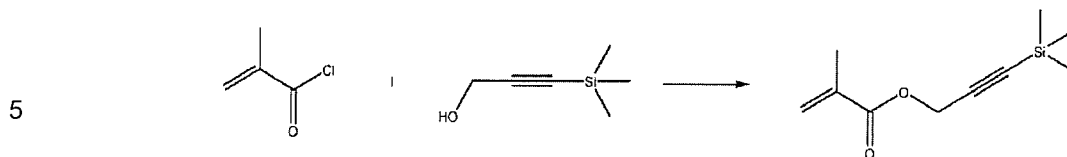
Intermedio 108.1: N-(3-(6,8-dichloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)acrilammide. Intermedio 108.1 (Int 108.1) è stato preparato da intermedio 30.7 ed acido acrilico usando procedure descritte in Esempi 1 - 70. MS (m/z): 361,1 (M+H)

Intermedio 108.2: N-(2-(3-(6,8-dichloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)etil)acrilammide. Intermedio 108.2 (Int 108.2) è stato preparato da intermedio 30.7 usando procedure descritte in Esempi 1 - 70. MS (m/z): 404,1 (M+H)

Una fiala da 20 mL è stata caricata con un totale di 1g di Intermedio 108.1 o Intermedio 108.2 ed altri monomeri, un totale di 9g di miscela solvente isopropanolo/dimetilformammide e 20 mg di azobisisobutirronitrile. La miscela è degasata per 1 min ed è sigillata sotto atmosfera di azoto. La stechiometria per ciascun esempio è mostrata in Tabella 1. La miscela di reazione è scaldata in un bagno d'olio a 70°C sotto agitazione. Dopo 8 h a 70°C la miscela di reazione è raffreddata a temperatura ambiente e poi 10 mL di acqua sono aggiunti. La soluzione è poi trasferita ad una sacca per dialisi (MWCO 1000) per dialisi contro acqua DI per 2 giorni. La soluzione ottenuta è stata liofilizzata per ottenere copolimeri.

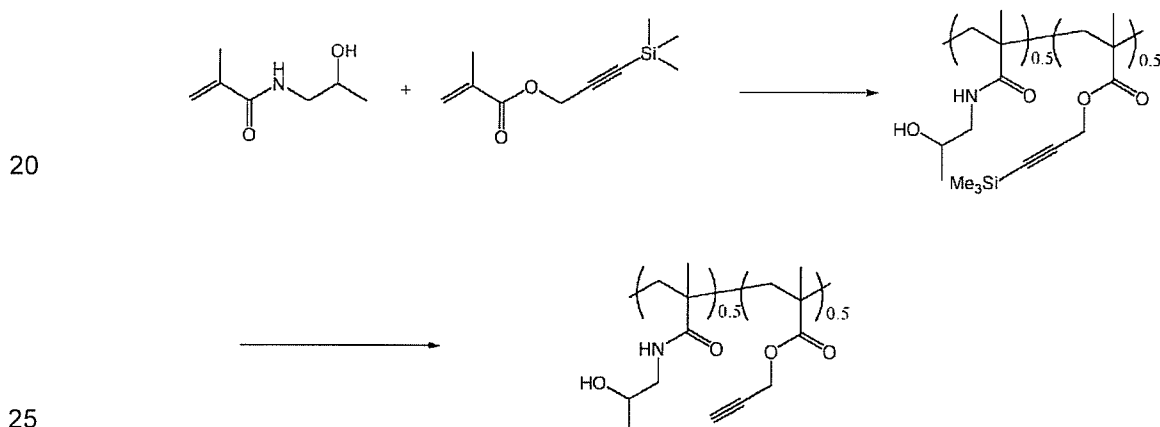
35

Tabella 4						
Esempio di condizioni che possono essere usate per creare copolimeri da inibitori NHE acrilammide-funzionalizzati ed acrilammidi e metacrilati sostituiti						
Esempio	Monomero (mg)					Solvente (g)
	Int 108.1 o Int 102.2	Acrilammide	Poli(etilene glicol) metil etere metacrilato	Butil acrilato	Acido acrilico	IPA/DMF
108	10	990	0	0	0	0/9
109	50	950	0	0	0	0/9
110	100	900	0	0	0	0/9
111	250	750	0	0	0	0/9
112	500	500	0	0	0	0/9
113	10	990	0	0	0	2,25/6,75
114	50	950	0	0	0	2,25/6,75
115	100	900	0	0	0	2,25/6,75
116	250	750	0	0	0	2,25/6,75
117	500	500	0	0	0	2,25/6,75
118	10	990	0	0	0	4,5/4,5
119	50	950	0	0	0	4,5/4,5
120	100	900	0	0	0	4,5/4,5
121	250	750	0	0	0	4,5/4,5
122	500	500	0	0	0	4,5/4,5
123	10	990	0	0	0	6,75/2,25
124	50	950	0	0	0	6,75/2,25
125	100	900	0	0	0	6,75/2,25
126	250	750	0	0	0	6,75/2,25
127	500	500	0	0	0	6,75/2,25
128	10	990	0	0	0	9/0
129	50	950	0	0	0	9/0
130	100	900	0	0	0	9/0
131	250	750	0	0	0	9/0
132	500	500	0	0	0	9/0
133	10	0	990	0	0	6,75/2,25
134	50	0	950	0	0	6,75/2,25
135	100	0	900	0	0	6,75/2,25
136	250	0	750	0	0	6,75/2,25
137	500	0	500	0	0	6,75/2,25
138	100	775	0	25	0	6,75/2,25
139	100	750	0	50	0	6,75/2,25
140	100	700	0	100	0	6,75/2,25
141	100	650	0	150	0	6,75/2,25
142	100	600	0	200	0	6,75/2,25
143	100	800	0	0	10	6,75/2,25
144	100	800	0	0	25	6,75/2,25
145	100	800	0	0	50	6,75/2,25
146	100	800	0	0	100	6,75/2,25
147	100	800	0	0	150	6,75/2,25

Rif. Esempio 148**Sintesi di acido 2-metil-acrilico 3-trimetilsilanil-prop-2-inil estere**

Una soluzione di trimetilsilil propin-1-olo (1 g, 7,8 mmol) ed Et_3N (1,4 mL, 10 mmol) in Et_2O (10 mL) è raffreddata a -20°C e una soluzione di metacrililoil cloruro (0,9 mL, 9,3 mmol) in Et_2O (5 mL) è aggiunta goccia a goccia in 1 h. La miscela è agitata a questa

10 temperatura per 30 min e poi lasciata scaldare alla temperatura ambiente per tutta la notte. Ogni sale di ammonio precipitato può essere allontanato per filtrazione e componenti volatili possono essere allontanati sotto pressione ridotta. Il prodotto grezzo è poi purificato per cromatografia flash.

Esempi 149-154**Procedura Generale per sintesi di poli N-(2-idrossipropil)metacrilammide-co-prop-2-inil metacrilato**

Procedura generale per copolimerizzazione di N-(2-idrossipropil)metacrilammide e 3-(trimetilsilil)prop-2-inil metacrilato

Un pallone da 100 mL equipaggiato con un condensatore di riflusso è caricato con un totale di 5g di N-(2-idrossipropil)metacrilammide e 3-(trimetilsilil)prop-2-inil metacrilato, 45g di miscela solvente isopropanolo/dimetilformammide e 100 mg di azobisisobutirronitrile. La miscela è degasata per 1 min e mantenuta sotto atmosfera di azoto durante la reazione.

30 Stechiometria per ogni esempio è mostrata in Tabella 5. La miscela di reazione è scaldata in un bagno d'olio a 70°C sotto agitazione e dopo 8 h la miscela di reazione è raffreddata a temperatura ambiente e poi 30 mL di solvente è evaporato sotto vuoto. La soluzione ottenuta

è poi precipitata in 250 mL di Et₂O. Il precipitato è raccolto, ridisciolto in 10 mL di DMF e precipitato di nuovo in 250 mL di Et₂O. Il precipitato ottenuto è seccato sotto vuoto ad ottenere copolimeri.

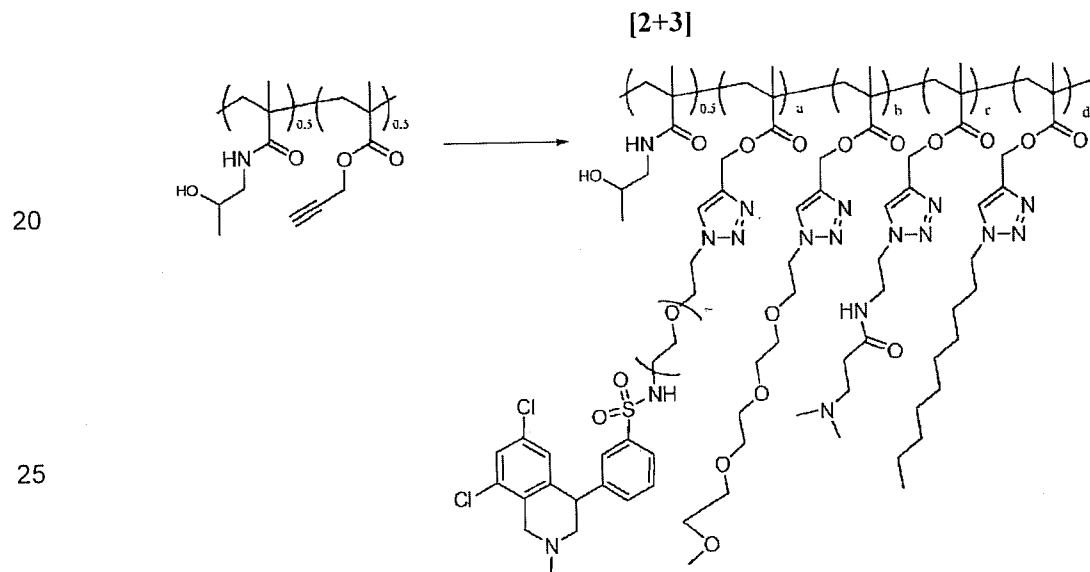
Procedura generale per rimuovere il gruppo trimetil silile

- 5 Il polimero trimetil silil protetto (4g), acido acetico (1,5 equiv. mol/mol rispetto ai gruppi alchin-trimetilsilil), e 200 mL di THF è miscelato in una beuta da 500 mL. La miscela è raffreddata a -20°C in atmosfera di azoto e seguita dall'aggiunta di soluzione 0,20 M di tetra-
- 10 n-butilammonio fluoruro triidrato (TBAF·3H₂O) in THF (1,5 equiv. mol/mol rispetto ai gruppi alchin-trimetilsilil) in un periodo di 5 min. La soluzione è agitata a questa temperatura per 30 min e poi scaldata a temperatura ambiente per ulteriori 8 ore. La miscela ottenuta è
- passata attraverso un corto tampone di silice e poi precipitata in Et₂O. Il precipitato ottenuto è seccato sotto vuoto ad ottenere copolimeri.

Tabella 5			
Esempi di condizioni di copolimerizzazione che possono essere usate per preparare polimetacrilati			
Esempio	Monomero (g)		Solvente (g)
	N-(2-idrossipropil metacrilammide)	3-(trimetilsilil) prop-2-inil metacrilato	IPA/DMF
149	2,5	2,5	0/45
150	2,5	2,5	11,25/33,75
151	2,5	2,5	22,5/22,5
152	2,5	2,5	33,75/11,25
153	2,5	2,5	45/0

Esempi 154-167

- 15 **Procedura Generale per post-modifica di Esempi 149-153 mediante cicloadizione**

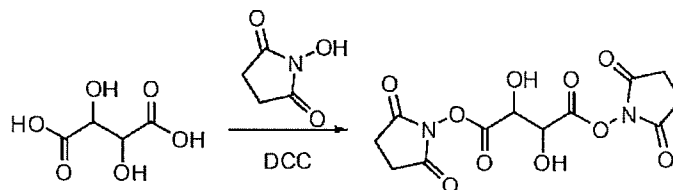


Polimero **154** (54 mg) contenente 0,1 mmol di porzione alchino, un totale di 0,1 mmol di azido-composti (Intermedio 28.1, 13-azido-2,5,8,11-tetraossatridecano, N-(2-azidoetil)-3-(dimetilammino)propanammide e 1-azidodecano, rapporti corrispondenti mostrati in Tabella 6), 0,05 mmol di diisopropilettilammina ed 1 mL di DMF è miscelato a temperatura ambiente e degasato per 1 min. Mantenendo un'atmosfera di azoto, ioduro di rame (10 mg, 0,01 mmol) è poi aggiunto alla miscela. La soluzione è agitata a temperatura ambiente per 3 giorni e poi passata attraverso un corto tampone di allumina neutra. La soluzione ottenuta è diluita con 10 mL di acqua DI, dializzata contro acqua DI per 2 giorni e liofilizzata ad ottenere copolimeri.

Tabella 6				
Esempi di composti che possono essere preparati da alchini polimerici e variando i rapporti di azidi sostituite via cicloaddizione [3+2]				
Esempio	Azido composti (mmol)			
	Intermedio 28.1	13-azido-2,5,8,11-tetraossatridecano	N-(2-azidoetil)-3-(dimetilammino)propanammide	1-azidodecano
155	0,002	0,098	0	0
156	0,005	0,095	0	0
157	0,01	0,09	0	0
158	0,025	0,075	0	0
159	0,05	0,05	0	0
160	0,01	0,088	0,002	0
161	0,01	0,085	0,005	0
162	0,01	0,08	0,01	0
163	0,01	0,07	0,02	0
164	0,01	0,088	0	0,002
165	0,01	0,085	0	0,005
166	0,01	0,08	0	0,01
167	0,01	0,07	0	0,02

Esempio 168

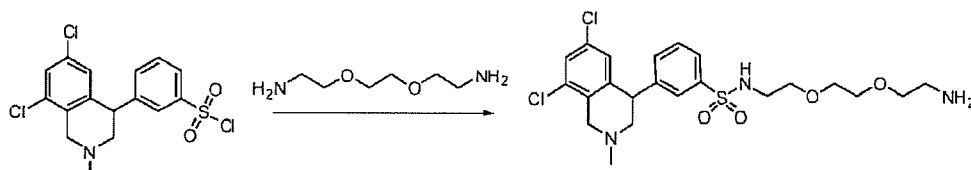
N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide



Intermedio 168.1, bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato: In un pallone a 3 colli da 500 ml è stato aggiunto acido 2,3-diidrossisuccinico (10,0 g, 66,62 mmol, 1,00 equiv), N,N'-Dicicloesil carbodiimide (DCC; 30,0 g, 145,42 mmol, 2,18 equiv) e tetraidrofurano (THF; 100 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di N-

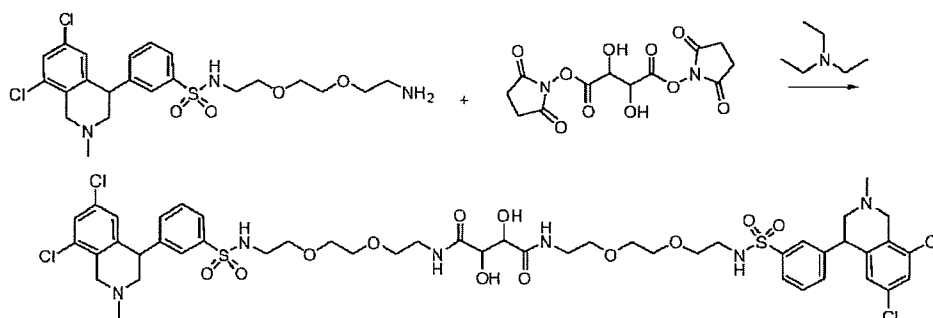
idrossisuccinimide (NHS; 16,5 g, 143,35 mmol, 2,15 equiv) in THF (100 mL) a 0-10°C. La soluzione ottenuta è stata scaldata a temperatura ambiente ed agitata per 16 h. I solidi sono stati filtrati via ed il filtrato è stato concentrato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ricristallizzato da N,N-dimetilformamide (DMF) / etanolo in rapporto di 1:10. Questo è risultato in 5,2 g (22%) di composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm) δ 6,70(d, J=7,8Hz, 2H), 4,89(d, J=7,2Hz, 2H), 2,89(s, 8H). MS (m/z): 367 [M+Na]⁺.

10



Intermedio 168.2 N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide: In un pallone a 3 colli da 50 mL è stata aggiunta 2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etanamina (3,2 g, 21,59 mmol, 21,09 equiv) e diclorometano (DCM; 20 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (Intermedio 1.6) (400 mg, 1,02 mmol, 1,00 equiv) in DMF (5 mL) goccia a goccia con agitazione. La soluzione ottenuta è stata agitata per 5 h tempo al quale è stata diluita con 100 mL di etil acetato. La miscela ottenuta è stata successivamente lavata con 2x10 mL di acqua e 1x10 mL di salamoia. Lo strato organico è stato seccato su sodio solfato anidro e concentrato sotto vuoto. Questo è risultato in 300 mg (58%) di N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio giallo.

25



30

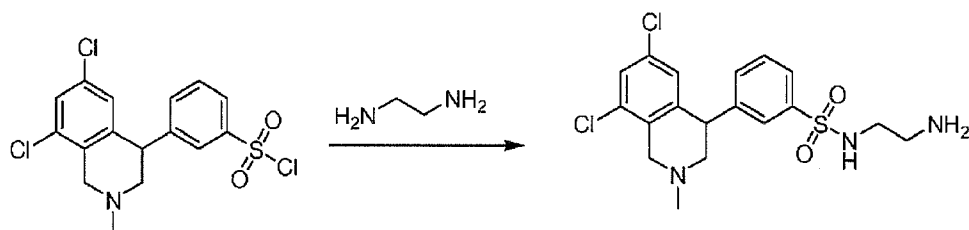
Composto 168, N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonamido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossi-succinammide: In un pallone da 50 mL è stata posta una soluzione di N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (300 mg, 0,60 mmol, 1,00 equiv) in DMF (5 mL), bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (92,5 mg, 0,27

mmol, 0,45 equiv) e trietilammina (TEA; 1,0 g, 9,88 mmol, 16,55 equiv). La soluzione
 ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente e poi concentrata sotto
 vuoto. Il prodotto grezzo (300 mg) è stato purificato per Prep-HPLC con le seguenti
 condizioni: Colonna, SunFire Prep C18, 5µm, 19*150mm; fase mobile, acqua con
 5 0,05%TFA e CH₃CN (20% CH₃CN fino a 40% in 5 min, fino a 100% in 2 min); Rilevatore,
 uv 220&254nm. Questo è risultato in 192,4 mg (28%) di un sale TFA del composto del titolo
 come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm) δ 7,92 (d, J=7,8Hz, 2H), 7,82 (m,
 2H), 7,67 (t, J=7,8Hz, 2H), 7,57 (m, 2H), 7,55 (d, J=6,9Hz, 2H), 6,86 (m, 2H), 4,84(s, 2H),
 4,79(s, 2H), 4,54(d, 2H), 4,48(s, 2H), 3,92(m, 2H), 3,53(m, 2H), 3,18(s, 6H), 3,07(t,
 10 J=5,4Hz, 4H). MS (m/z): 1119 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 169

N1,N4-bis(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4- il)fenil)solfoamido)etil)-2,3-diidrossisuccinamide

15

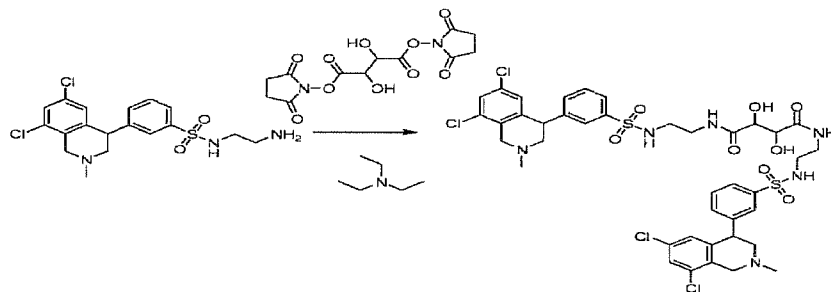


Intermedio 169.1, N-(2-aminoetil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin- 4-il)benzenesolfonamide:

20

In un pallone a 3 colli da 50 mL purgato e mantenuto con
 atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-
 tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (intermedio 1.6) (100 mg, 0,26 mmol,
 1,00 equiv) in DCM (5 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di etan-
 1,2-diammina (307 mg, 5,11 mmol, 19,96 equiv) in DCM / DMF (10/1 mL). La soluzione
 25 ottenuta è stata agitata per 5 h a temperatura ambiente. La miscela è stata concentrata sotto
 vuoto. La soluzione ottenuta è stata diluita con 50 mL di etil acetato e lavata con 2x10 mL di
 acqua e poi 1x10 mL di salamoia. Lo strato organico è stato seccato su sodio solfato anidro e
 concentrato sotto vuoto per ottenere 90 mg (76%) di N-(2-amminoetil)-3-(6,8-dicloro-2-
 metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenesolfonamide come olio giallo.

30



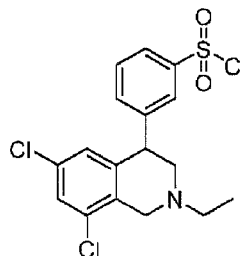
Composto 169, N1,N4-bis(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etil)-2,3-diidrossisuccinammide: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di N-(2-amminoetil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide (250 mg, 0,60 mmol, 1,00 equiv) in DMF (5 mL), bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (Intermedio 168.1) (92 mg, 0,27 mmol, 0,44 equiv) e trietilammina (280 mg, 2,77 mmol, 4,55 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto, il residuo diluito con 100 mL di etil acetato e poi lavato con 2x10 mL di acqua. Lo strato organico è stato seccato su sodio solfato anidro e concentrato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con le seguenti condizioni: Colonna, SunFire Prep C18, 5µm, 19*150mm; fase mobile, acqua con 0,05%TFA e CH₃CN (25% CH₃CN fino a 35% in 5 min, fino a 100% in 2,5 min); Rilevatore, uv 220&254nm. Questo è risultato in 88,4 mg (15%) di un sale TFA di N1,N4-bis(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etil)-2,3-diidrossisuccinammide come solido bianco. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD, ppm) δ 7,67 (d, J=7,6Hz, 2H), 7,61(s, 2H), 7,44 (t, J=7,6Hz, 2H), 7,37 (d, J=7,6Hz, 2H), 7,25 (d, J=2Hz, 2H), 6,72 (s, 2H), 4,33 (t, J=6,4Hz, 2H), 4,30 (s, 2H), 3,64 (m, 4H), 3,21(s, 4H), 2,98 (m, 2H), 2,90(m, 4H), 2,65 (m, 2H), 2,42 (s, 6H). MS (m/z): 943 [M+H]⁺.

20

Rif. Esempio 170

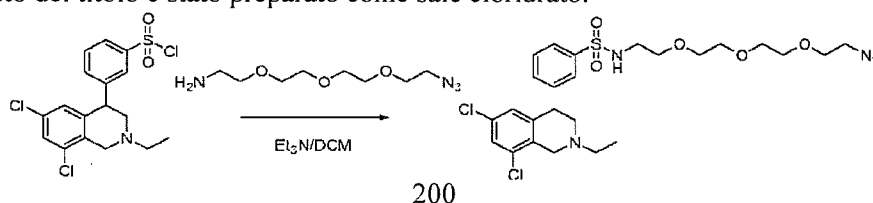
N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

25



30

Intermedio 170.1, 3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro: Usando procedure delineate in Rif. Esempio 1 per preparare intermedio 1.6, sostituendo N-(2,4-diclorobenzil)etanammina per 1-(2,4-diclorofenil)-N-metilmetanamina, il composto del titolo è stato preparato come sale cloridato.

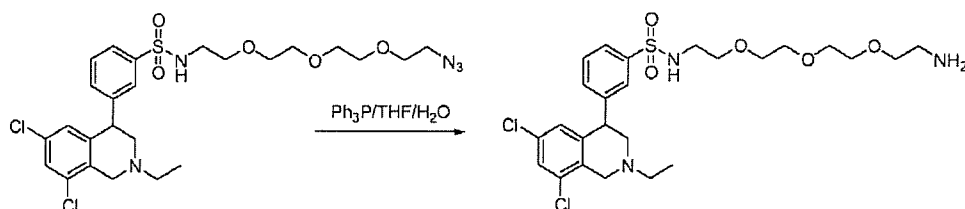


Intermedio 170.2 N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:

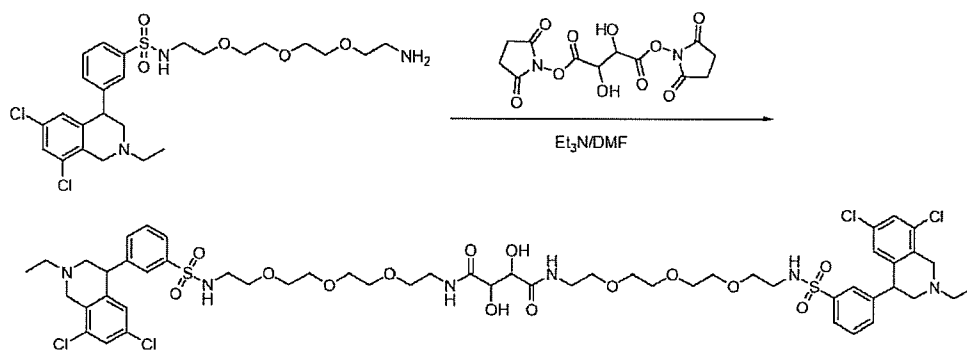
A

2-(2-(2-(2-

azidoetossi)etossi)etossi)etanamina (300 mg, 1,51 mmol, 1,00 equiv) in DCM (10 mL) è stata aggiunta TEA (375 mg, 3,00 equiv) seguita dall'aggiunta a porzioni di 3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (500 mg, 1,23 mmol, 1,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 1 h a temperatura ambiente e poi concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice e diluito con etil acetato/etere di petrolio (1:2) ad ottenere 0,4 g (41%) di N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio giallo.

**Intermedio 170.3, N-(2-(2-(2-(2-aminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:**

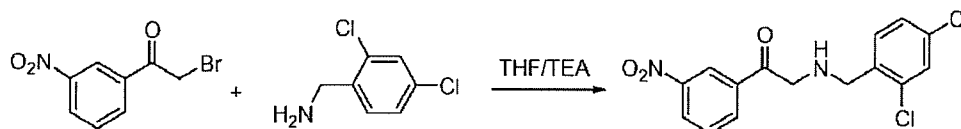
In un pallone da 100 mL, è stata posta N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (400 mg, 0,68 mmol, 1,00 equiv), trifenilfosfina (400 mg, 2,20 equiv), THF (10 mL) ed acqua(1 mL) e la reazione è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto e caricata su una piastra per cromatografia su strato sottile (TLC) preparativa, eluendo con DCM:metanolo(5:1). Questo è risultato in 350 mg (73%) di N-(2-(2-(2-(2-aminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio giallo.



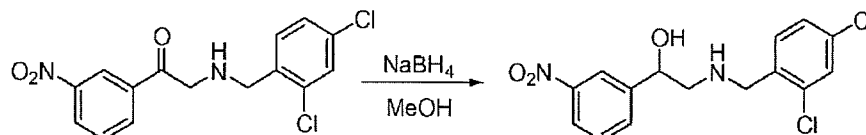
Composto 170, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide: In un pallone a 3 colli da 50 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (100 mg, 0,18 mmol, 1,00 equiv) in DMF (3 mL), bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (Intermedio 168.1) (25 mg, 0,07 mmol, 0,45 equiv) e trietilammina (75 mg, 4,50 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con acqua: metanolo (1:10-1:100). Questo è risultato in 12,1 mg (5%) di N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-etil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide come olio giallo. ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 7,70-7,60(m, 8H), 7,53-7,49(m, 6H), 6,88(s, 2H), 5,61-5,59(m, 2H), 4,38(m, 2H), 4,24-4,22(m, 2H), 3,78-3,72(m, 2H), 3,58-3,48(m, 2H), 3,43(m, 7H), 3,43-3,40(m, 11H), 3,27-3,20(m, 5H), 2,91-2,87(m, 6H), 2,76-2,70(m, 2H), 2,61-2,55(m, 3H), 1,04-0,99(m, 6H). MS (m/z): 1235 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 171

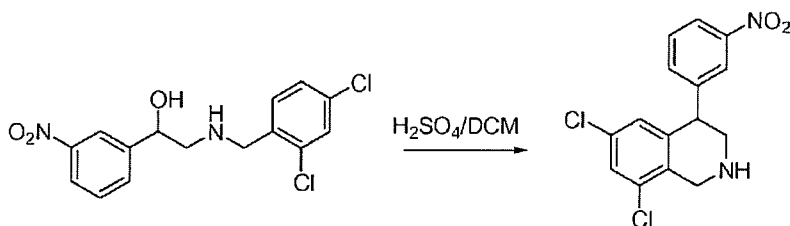
3,3'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil)bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(6,8-dicloro-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4,2-diil)dianilina



Intermedio 171.1, 2-(2,4-diclorobenzilammino)-1-(3-nitrofenil)etanone: In un pallone a 3 colli da 250 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-bromo-1-(3-nitrofenil)etanone (10,0 g, 41,15 mmol, 1,00 equiv) in THF (150 mL), (2,4-diclorofenil)metanamina (7,16 g, 40,91 mmol, 1,00 equiv) e trietilammina (5,96 g, 59,01 mmol, 1,50 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 25°C. I solidi sono stati filtrati via. Il filtrato è stato concentrato a secchezza ed usato per il passaggio successivo, assumendo resa teorica.

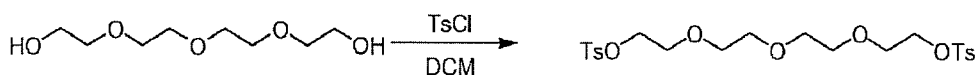


Intermedio 171.2, 2-(2,4-diclorobenzilammino)-1-(3-nitrofenil)etanolo: In un pallone a 3 colli da 500 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata aggiunta una soluzione di intermedio 171.1 (40,91 mmol, 1,00 equiv) in metanolo (150 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di NaBH₄ (2,5 g, 65,79 mmol, 1,50 equiv) in varie porzioni a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 25°C. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di NH₄Cl acquoso. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto e i solidi sono stati raccolti per filtrazione. Il prodotto grezzo è stato purificato per ri-cristallizzazione da etil acetato. Questo è risultato in 3,5 g (23%) di 2-(2,4-diclorobenzilammino)-1-(3-nitrofenil)etanolo come solido giallastro.



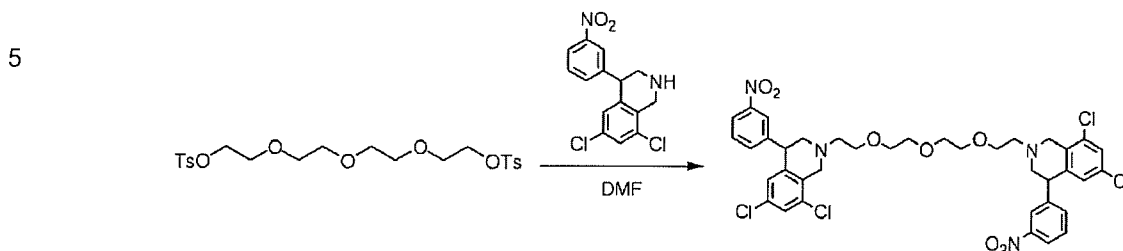
15 **Intermedio 171.3, 6,8-dicloro-4-(3-nitrofenil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolina:** A 2-(2,4-diclorobenzilammino)-1-(3-nitrofenil)etanolo (intermedio 171.2) (500 mg, 1,47 mmol, 1,00 equiv) in DCM (10 mL) è stato aggiunto acido solforico conc. (4 mL) goccia a goccia con agitazione a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per 12 h a temperatura ambiente. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di acqua/ghiaccio. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 10 con sodio idrossido. La soluzione ottenuta è stata estratta con 2x50 mL di DCM e gli strati organici riuniti e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Questo è risultato in 300 mg (63%) di 6,8-dicloro-4-(3-nitrofenil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolina come olio giallo.

20



30 **Intermedio 171.4, 2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil)bis(ossi))bis(etan-2,1-diil) bis(4-metilbenzensolfonato):** In un pallone a 3 colli da 250 mL, è stata posta una soluzione di tetraetilene glicole (10 g, 51,55 mmol, 1,00 equiv) in DCM (100 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di 4-metilbenzen-1-solfonil cloruro (21,4 g, 112,63 mmol, 2,20 equiv) in DCM (50 mL) goccia a goccia con agitazione a 5°C. A questo è stata aggiunta N,N-dimetilpiridin-4-ammina (15,7 g, 128,69 mmol, 2,50 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente al qual tempo è stata diluita con 100 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x100 mL di DCM e gli strati organici

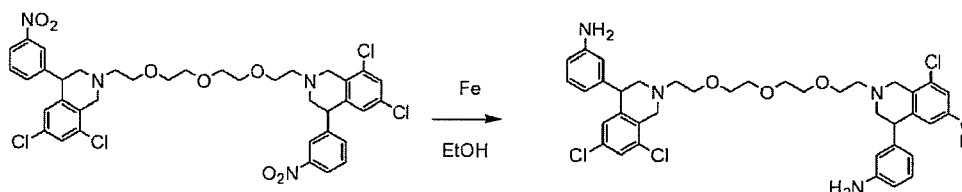
riuniti. La miscela ottenuta è stata lavata con 1x100 mL di salamoia e poi concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:2) ad ottenere 11 g (43%) di composto del titolo come olio bianco.



10 **Intermedio 171.5, 2,2'-(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(6,8-dicloro-4-(3-nitrofenil))-1,2,3,4-tetraidroisochinolina:** A 6,8-dicloro-4-(3-nitrofenil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (intermedio 171.3) (171 mg, 0,53 mmol, 2,50 equiv) in DMF (2 mL) è stato aggiunto potassio carbonato (87 mg, 0,63 mmol, 3,00 equiv) e intermedio 171.4 (106 mg, 0,21 mmol, 1,00 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata a 50°C. Dopo

15 agitazione per tutta la notte, la soluzione ottenuta è stata diluita con 20 ml di acqua. La miscela ottenuta è stata estratta con 3x20 ml di etil acetato e gli strati organici riuniti e concentrati sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con metanolo:acqua (1:1). Questo è risultato in 10 mg (2%) di 2,2'-(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))-bis(6,8-dicloro-4-(3-nitrofenil))-1,2,3,4-tetraidroisochinolina

20 come solido giallo chiaro.



25 **Composto 171, 3,3'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(6,8-dicloro-1,2,3,4-tetraidroisochinol-4,2-diil))dianilina:** A intermedio 171.5 (50 mg, 0,06 mmol, 1,00 equiv) in etanolo (5 mL) è stato aggiunto ferro (34 mg, 0,61 mmol, 9,76 equiv) seguito dall'aggiunta di idrogeno cloruro (5 mL) goccia a goccia con agitazione. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente e poi per ulteriori 4 h a

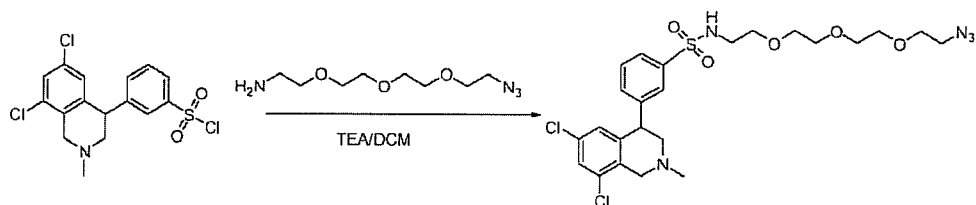
30 55°C. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. I solidi sono stati filtrati via e la soluzione ottenuta è stata diluita con 10 mL di acqua. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto ed il pH della soluzione corretto a 9-10 con sodio carbonato. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x50 mL di etil acetato e gli strati organici riuniti, lavati con 50 mL di salamoia e poi concentrati sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato

purificato per Prep-HPLC con H₂O:CH₃CN (10:1). Questo è risultato in 5 mg (11%) di 3,3'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-ossibis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(6,8-dicloro-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4,2-diil))dianilina come solido giallo. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD, ppm) δ 7,27 (m, 2H), 7,06 (m, 2H), 6,80 (s, 2H), 6,63 (d, 2H), 6,54 (m, 4H), 4,14 (m, 2H), 4,02 (d, 2H), 3,65(m, 12H), 3,19 (m, 3H), 2,81(s, 4H), 2,71 (m, 2H). MS (m/z): 745 [M+H]⁺.

Esempio 172

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide

10



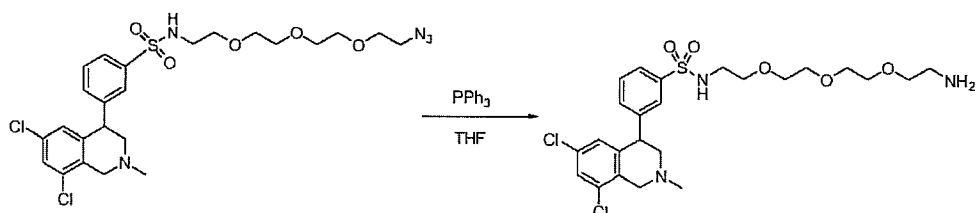
Intermedio 28.1: N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:

15

A 2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etanamina (1,5 g, 6,87 mmol, 1,79 equiv) in DCM (20 mL) è stata aggiunta trietilammina (1,5 g, 14,82 mmol, 3,86 equiv) e 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (1,5 g, 3,84 mmol, 1,00 equiv). La reazione è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente al qual tempo la miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato sciolto in 100 mL di etil acetato e poi è stato lavato con 2x20 mL di acqua, seccato su sodio solfato anidro e concentrato sotto vuoto. Questo è risultato in 1,8 g (85%) di N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio giallo.

20

25



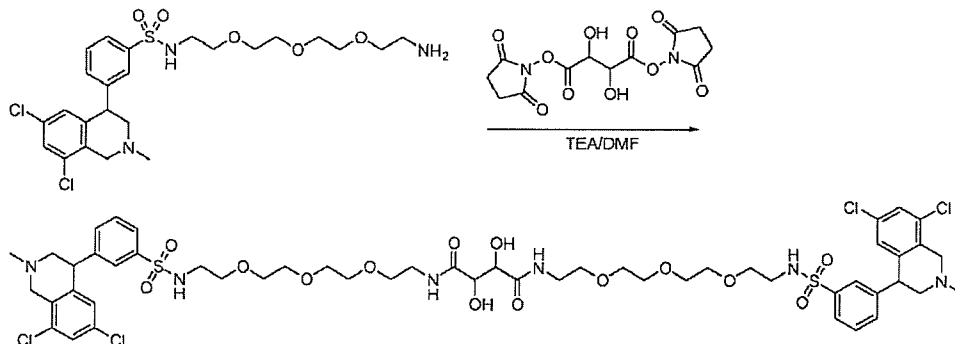
Composto 28, N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:

30

A N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (1,8 g, 3,26 mmol, 1,00 equiv) in THF (30 mL) è stata aggiunta trifetilfosfina (2,6 g, 9,91 mmol, 3,04 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente e poi concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo (5,0 g) è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni: Colonna, gel di silice; fase

mobile, metanolo:acqua=1:9 aumentando a metanolo:acqua=9:1 entro 30 min; Rilevatore, UV 254 nm. 1,2 g di prodotto sono stati ottenuti. Questo è risultato in 1,2 g (64%) di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio giallo.

5



10

Composto 172, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide: A N-(2-(2-

15

(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (composto 28) (1,2 g, 2,28 mmol, 1,00 equiv) in DMF (8 mL) è stato aggiunto bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (intermedio 168.1) (393 mg,

1,14 mmol, 0,50 equiv) e trietilammina (1,5 g, 14,82 mmol, 6,50 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela è stata

20

concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni: Colonna, gel di silice; fase mobile, metanolo:acqua=1:9 aumentando a metanolo:acqua=9:1 entro 30 min; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 591 mg

(43%) di N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide come solido giallo

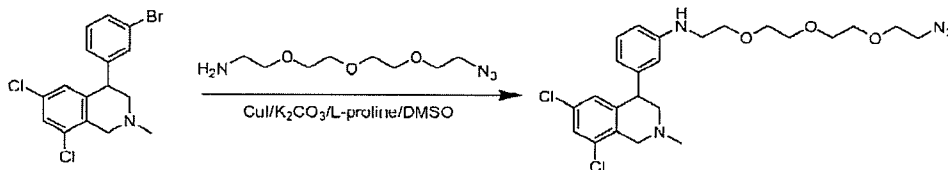
25

chiaro. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,92 (d, *J*=7.8Hz, 2H), 7,81 (m, 2H), 7,67 (t, *J*=7,8Hz, 2H), 7,57 (m, 2H), 7,55 (d, *J*=6,9Hz, 2H), 6,85 (m, 2H), 4,78 (s, 2H), 4,77 (s, 2H), 4,54(d, *J*=40,2Hz, 2H), 4,48(s, 2H), 3,92(m, 2H), 3,53(m, 30H), 3,18(s, 6H), 3,07 (t, *J*=5,4Hz, 4H). MS (*m/z*): 603 [1/2M+H]⁺.

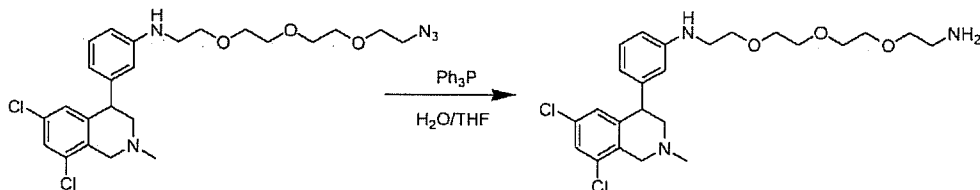
Rif. Esempio 173

30

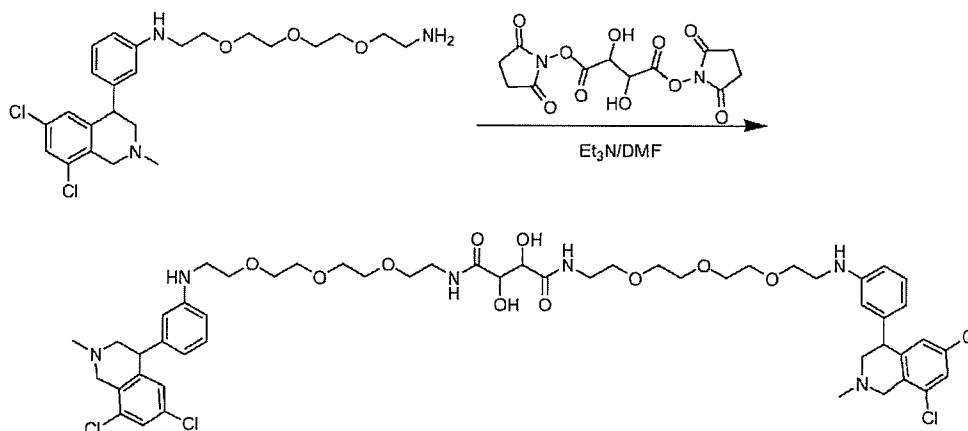
N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide



Intermedio 173.1, N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina: In un pallone da 10 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (intermedio 1.4) (400 mg, 1,08 mmol, 1,00 equiv) in DMSO (6 mL), 2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etanammina (236,11 mg, 1,08 mmol, 1,00 equiv), acido (S)-pirrolidin-2-carbossilico (24,79 mg, 0,21 mmol, 0,20 equiv), ioduro di rame(I) (20,48 mg, 0,11 mmol, 0,10 equiv) e potassio carbonato (223,18 mg, 1,62 mmol, 1,50 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata a 90°C in un bagno d'olio e il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. Dopo agitazione per tutta la notte la miscela di reazione è stata raffreddata con un bagno acqua/ghiaccio e poi diluita con acqua ghiacciata. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x30 mL di etil acetato e gli estratti organici sono stati riuniti e lavati con 2x20 mL di salamoia. La miscela è stata seccata su sodio solfato anidro e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (2:1). Questo è risultato in 130 mg (24%) di N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzenammina come olio giallo.



Intermedio 173.2, N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina: In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di intermedio 173.1 (350 mg, 0,69 mmol, 100 equiv) in THF/acqua (4/0,4 mL) e trifetilfosfina (205 mg, 0,78 mmol, 1,20 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 40°C in un bagno d'olio. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il pH della soluzione è stato corretto a 2-3 con idrogeno cloruro 1N (10 ml). La soluzione ottenuta è stata estratta con 2x10 mL di etil acetato e gli strati acquosi riuniti. Il valore di pH della soluzione è stato corretto a 11 con NH₃.H₂O. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x30 mL di DCM e gli strati organici riuniti. La miscela ottenuta è stata lavata con 30 mL di salamoia. La miscela è stata essiccata su sodio solfato anidro e concentrata sotto vuoto. Questo è risultato in 250 mg (75%) di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)anilina come olio giallo.



5

10 **Composto 173, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossi-succinammide:** A intermedio 173.2 (240 mg, 0,50 mmol, 1,00 equiv) in DMF (5 mL) è stata aggiunta TEA (233 mg, 2,31 mmol, 4,50 equiv) e bis(2,5-diospirrolidin-1-il) 2,3-diidrossibutandioato (intermedio 168.1) (62 mg, 0,18 mmol, 0,35 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte

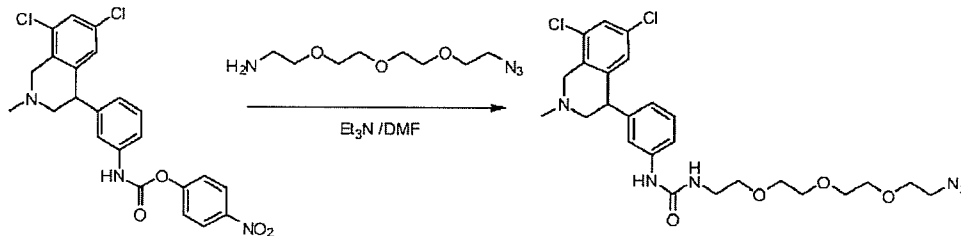
15 a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con metanolo:acqua (1:10). Questo è risultato in 140 mg (26%) di N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil-ammino)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide come solido bianco.

20 ¹H-NMR (300MHz, DMSO, ppm): δ 7,65 (m, 4H), 7,11 (m, 2H), 6,83 (m, 2H), 6,58 (m, 2H), 6,41 (m, 4H), 4,09 (m, 32H), 3,45 (m, 17H), 3,43 (m, 5H), 3,31 (m, 9H), 2,51 (m, 6H). MS (*m/z*): 1079 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 174

N1,N4-bis(1-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)-1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13-il)-2,3-diidrossisuccinammide

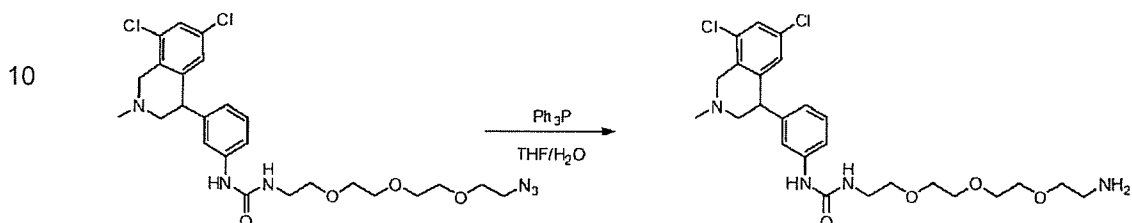
25



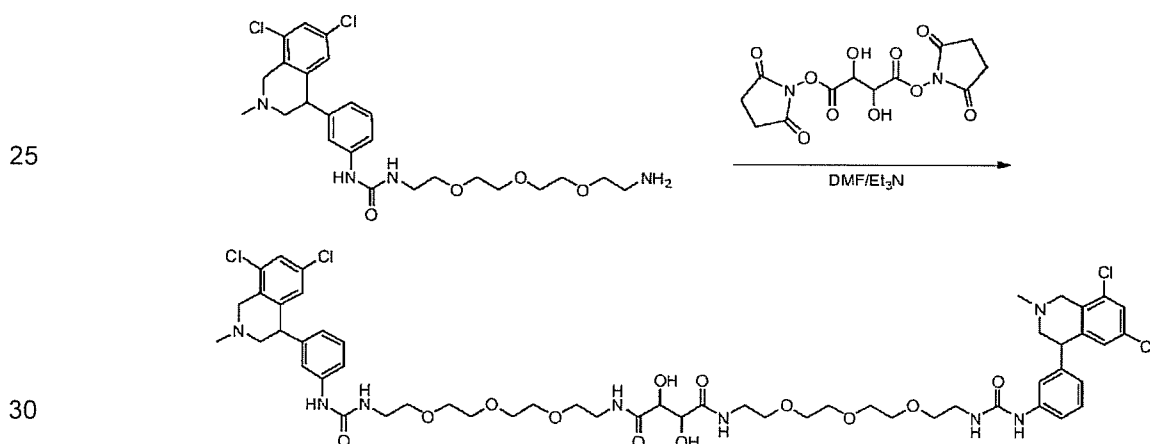
30

Intermedio 174.1, 1-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)urea: A 4-nitrofenil 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilcarbammato (preparato con la procedura descritta in Rif. Esempio 38) (200 mg, 0,40 mmol, 1,00 equiv, 95%) in DMF (5 mL) è stata aggiunta TEA

(170 mg, 1,60 mmol, 4,00 equiv, 95%) e 2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etanammina (90 mg, 0,39 mmol, 1,00 equiv, 95%) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h. La miscela è stata poi concentrata sotto vuoto, diluita con 10 mL di acqua e poi estratta con 3x30 mL di etil acetato. Gli strati organici sono stati riuniti, lavati con 3x30 mL di salamoia, seccati su sodio solfato anidro e poi evaporati. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:5~1:1). Questo è risultato in 160 mg (72%) di 1-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenil)urea come olio giallo pallido.



15 **Intermedio 174.2 1-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)urea:** Intermedio 174.2 è stato preparato da 1-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)urea (intermedio 174.1) usando la procedura descritta per preparare intermedio 173.2. Il prodotto grezzo è stato purificato per cromatografia su gel di silice, eluendo con DCM/metanolo (50:1). Questo è risultato in 230 mg di 1-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)urea come olio giallo pallido.



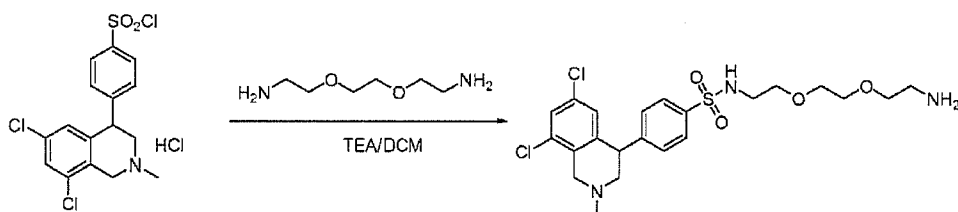
Composto 174, N1,N4-bis(1-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)-1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13-il)-2,3-diidrossi-succinammide:

Composto 174 è stato preparato da 1-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(3-(6,8-

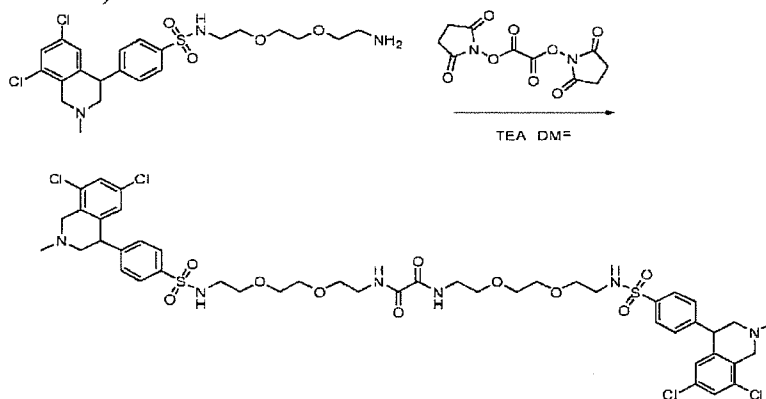
dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)urea (intermedio 174.2) usando le procedure descritte in esempio 172. Il prodotto grezzo (400 mg) è stato purificato per Prep-HPLC con metanolo: acetonitrile = 60:40. Questo è risultato in 113 mg (23%) di N1,N4-bis(1-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)-1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13-il)-2,3-diidrossisuccinammide come solido bianco. ¹H-NMR (400MHz, DMSO, ppm): δ 8,68 (s, 2H), 7,68 (s, 2H), 7,64 (t, 2H), 7,39 (s, 2H), 7,24-7,28 (m, 6H), 6,77-6,78 (m, 4H), 6,23 (s, 2H), 4,47 (s, 4H), 4,23 (s, 2H), 3,76 (s, 4H), 3,42-3,69 (m, 24H), 3,28-3,36 (m, 4H), 3,20-3,24 (m, 6H), 3,02 (s, 6H). MS (m/z): 583 [1/2M+1]⁺.

Esempio 175

N1,N2-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ossalamide



Intermedio 175.1, N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide: A 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro cloridrato (intermedio 10.6) (9 g, 20,02 mmol, 1,00 equiv, 95%) in DCM (200 mL) è stata aggiunta 2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etanamina (15,6 g, 105,41 mmol, 5,00 equiv) e trietilammina (4,26 g, 42,18 mmol, 2,00 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata diluita con 100 mL di DCM e poi lavata con 2x50 mL di salamoia. La miscela è stata seccata su sodio solfato anidro e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con DCM/metanolo (10:1). Questo è risultato in 3 g (28%) di N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio marrone.

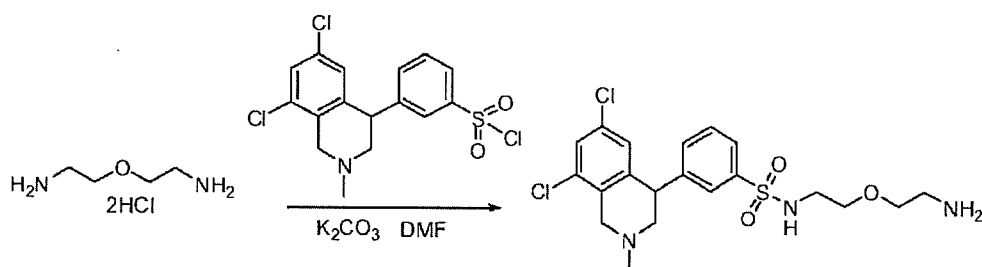


Composto 175, N1,N2-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ossalamide:

In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-benzensolfonammide (intermedio 175.1) (150 mg, 0,28 mmol, 2,50 equiv, 92%) in DMF (5 mL), bis(2,5-diossopirrolidin-1-il)ossalato (34 mg, 0,12 mmol, 1,00 equiv) e trietilammina (49 mg, 0,49 mmol, 4,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH) (10%-100%). Questo è risultato in 97 mg (68%) di un sale TFA di N1,N2-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ossalamide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,90 (m, 4H), 7,56 (s, 2H), 7,50 (m, 4H), 6,85 (s, 2H), 4,77 (m, 4H), 4,53 (d, 2H), 3,90(m, 2H), 3,88 (m, 10H), 3,58 (m, 12H), 3,31(s, 6H), 3,12 (m, 4H). MS (m/z): 530 [1/2M+1]⁺.

Esempio 176

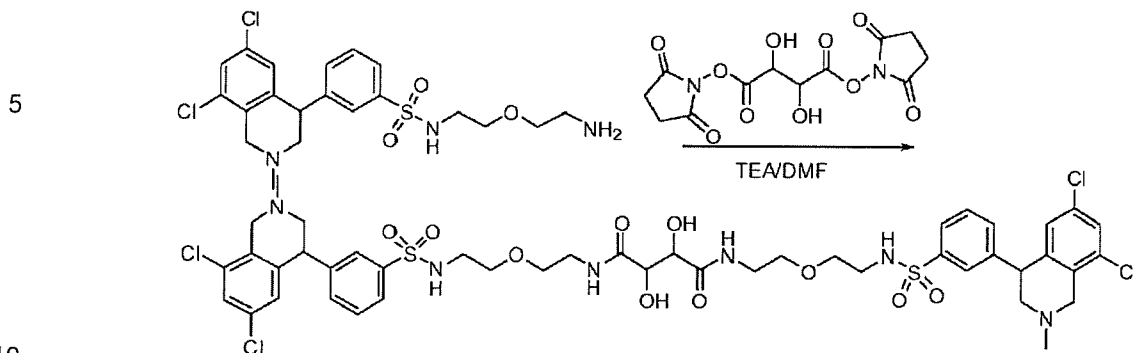
N1,N4-bis(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide



Intermedio 176.1, N-(2-(2-amminoetossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:

In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di 2-(2-amminoetossi)etanamina dicloridato (1,0 g, 5,65 mmol, 5,52 equiv) in DMF (20 mL), potassio carbonato (2,0 g, 14,39 mmol, 14,05 equiv) e 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (intermedio 1.6) (400 mg, 1,02 mmol, 1,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente tempo al quale è stata diluita con 100 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata estratta con 3x30 mL di etil acetato e gli strati organici sono stati riuniti e seccati su sodio solfato e concentrati sotto vuoto. Questo è risultato in 60 mg (13%) di N-(2-(2-amminoetossi)etil)-3-

(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-benzensolfonammide come solido giallo.



Composto 176, N1,N4-bis(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide: In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di N-(2-(2-

15 il)benzensolfonammide (intermedio 176.1) (60 mg, 0,13 mmol, 1,00 equiv) in DMF (3 mL), bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossibutandioato (intermedio 168.1) (21 mg, 0,06 mmol, 0,47 equiv) e trietilammina (50 mg, 0,49 mmol, 3,77 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente al qual tempo la miscela è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH) (10%-100%). Questo è risultato in 21 mg (13%) di un sale TFA di N1,N4-bis(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

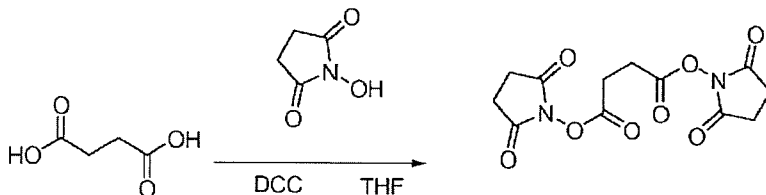
20 il)fenilsolfonammido)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,92 (d, J=7,8Hz, 2H), 7,81(m, 2H), 7,67 (t, J=7,8Hz, 2H), 7,57(m, 2H), 7,55 (d, J=6,9Hz, 2H), 6,85(m, 2H), 4,78(s, 2H), 4,77(s, 2H), 4,54(d, J=40,2Hz, 2H), 4,48(s, 2H), 3,92(m, 2H), 3,53(m, 10H), 3,18(s, 6H), 3,07(t, J=5,4Hz, 4H). MS (m/z): 517 [1/2M+1]⁺.

25

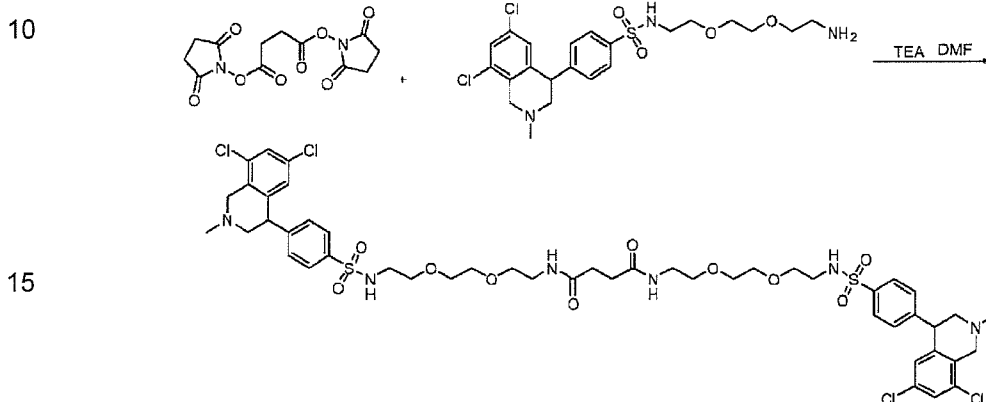
Esempio 177

N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etil)succinammide

30



Intermedio 177.1, bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) succinato: Ad acido succinico (3,0 g, 25,42 mmol, 1,00 equiv) in THF (50 mL) è stata aggiunta una soluzione di 1-idrossipirrolidin-2,5-dione (6,4 g, 55,65 mmol, 2,20 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di DCC (11,5 g, 55,83 mmol, 2,20 equiv) in THF (50 mL) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. I solidi sono stati riuniti per filtrazione ed il filtrato è stato concentrato a dare il prodotto grezzo. I solidi ottenuti sono stati lavati con THF ed etanolo. Questo è risultato in 2,4 g (27%) di bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) succinato come solido bianco.



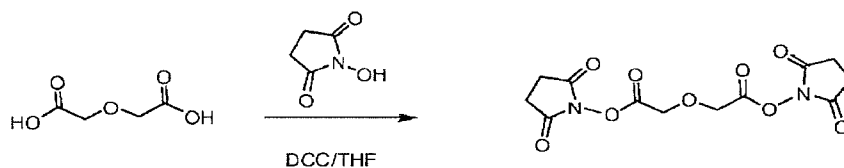
Composto 177, N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide:

20 Composto 177 è stato preparato usando la procedura descritta in esempio 175, sostituendo (2,5-diossopirrolidin-1-il) succinato (intermedio 177.1) per bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) ossalato. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH) (10%-100%). Questo è risultato in 32,8 mg (8%) di N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil-

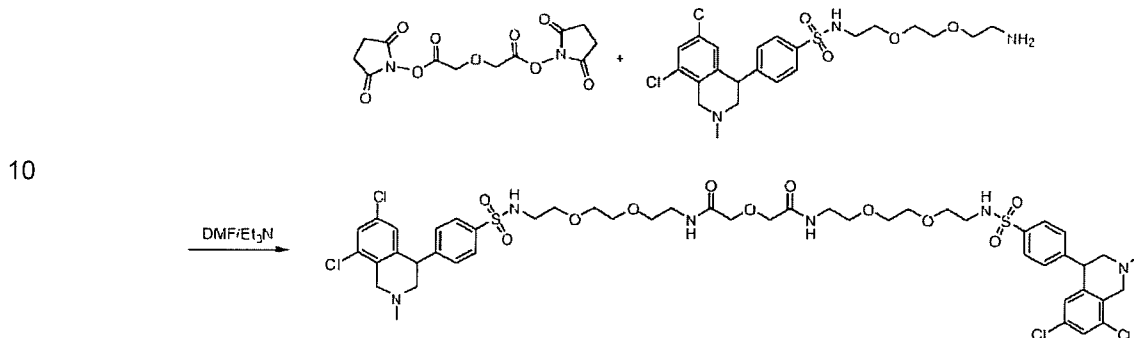
25 solfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,93-7,91 (d, *J*=8,1Hz, 4H), 7,57-7,56 (d, *J*=1,8Hz, 2H), 7,50-7,47 (d, *J*=8,4Hz, 4H), 6,86 (s, 2H), 4,78-4,73 (d, *J*=13,5Hz, 4H), 4,52 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,59-3,47 (m, 18H), 3,15-3,09 (m, 10H), 2,49 (s, 4H). MS (*m/z*): 544 [1/2M+1]⁺.

Esempio 178

30 **2,2'-oxybis(N-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide)**



Intermedio 178.1, bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2'-ossidiacetato: Intermedio 178.1 è stato preparato usando la procedura delineata in esempio 177, sostituendo acido 2,2'-ossidiacetico per acido succinico. Il prodotto grezzo è stato lavato con etil acetato. Questo è risultato 1,5 g (19%) di Intermedio 178.1 come solido bianco.

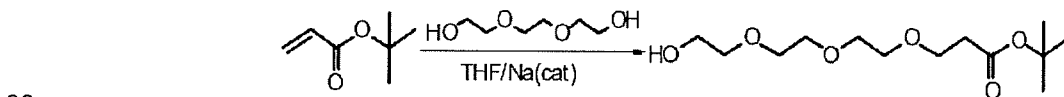


Composto 178, 2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide):

15 Composto 178 è stato preparato usando la procedura descritta in esempio 175, sostituendo bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2'-ossidiacetato (intermedio 178.1) per bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) ossalato. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH) (10%-100%). Questo è risultato in 39,1 mg (7%) di un sale TFA di 2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide) come un solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,94-7,91(m, 4H), 7,57-7,56(m, 2H), 7,51-7,48(m, 4H), 6,87(m, 2H), 4,82-4,76(m, 4H), 4,54-4,49(m, 2H), 3,93-3,91(s, 4H), 3,89-3,87(m, 2H), 3,66-3,42(m, 22H), 3,17(s, 6H), 3,13-3,09(m, 4H). MS (m/z): 552 [1/2M+1]⁺.

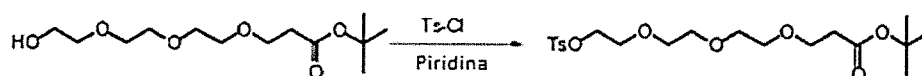
25 **Rif. Esempio 179**

(2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)-3-ossopropossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

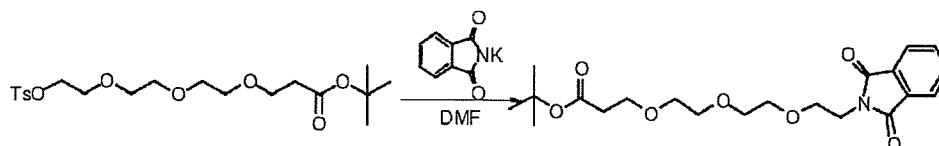


Intermedio 179.1, tert-butil 3-(2-(2-(2-idrossietossi)etossi)etossi)propanoato: A trietilenglicole (17,6 g, 117,20 mmol, 3,00 equiv) in THF anidro (70 mL), è stato aggiunto sodio (30 mg, 1,25 mmol, 0,03 equiv). Tert-butil acrilato (5,0 g, 39,01 mmol, 1,00 equiv) è stato aggiunto dopo che il sodio si è sciolto. La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la

notte a temperatura ambiente e poi neutralizzata con idrogeno cloruro 1,0 N. Dopo allontanamento del solvente, il residuo è stato sospeso in 50 mL di salamoia ed estratto con 3x50 mL di etil acetato. Gli strati organici riuniti sono stati lavati con salamoia satura e seccati su sodio solfato anidro. Dopo evaporazione del solvente, il tert-butil 3-(2-(2-(2-idrossietossi)-etossi)etossi)propanoato (9,6 g) è stato isolato come olio incolore, che è stato usato direttamente per il successivo passaggio di reazione senza ulteriore purificazione.



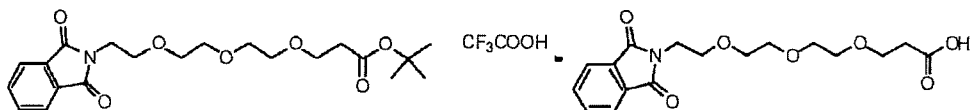
Intermedio 179.2, tert-butil 3-(2-(2-(2-(tosilossi)etossi)etossi)etossi)propanoato: In un pallone da 250 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di tert-butil 3-(2-(2-(2-idrossietossi)etossi)etossi)propanoato (intermedio 179.1) (9,6 g, 34,49 mmol, 1,00 equiv) in piridina anidra (12 mL). La miscela è stata raffreddata a 0°C e 4-metilbenzen-1-solfonil cloruro (7,9 g, 41,44 mmol, 1,20 equiv) è stato aggiunto lentamente in varie porzioni. La soluzione ottenuta è stata agitata a 0°C per 1-2 h e poi il pallone contenente la miscela di reazione è stato sigillato e posto in frigorifero a 0°C per tutta la notte. La miscela è stata versata in 120 mL di acqua ghiaccio e lo strato acquoso è stato estratto con 3x50 mL di DCM. Gli strati organici riuniti sono stati lavati con 2x50 mL di idrogeno cloruro 1,0 N freddo e salamoia satura e seccati su sodio solfato anidro. Il solvente è stato allontanato sotto vuoto a dare 13,4 g (90%) di tert-butil 3-(2-(2-(2-(tosilossi)etossi)etossi)-etossi)propanoato come olio giallo pallido.



Intermedio 179.3, tert-butil 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanoato: In un pallone da 250 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di tert-butil 3-(2-(2-(2-(tosilossi)etossi)etossi)etossi)propanoato (13,4 g, 30,98 mmol, 1,00 equiv) in DMF anidro (100 mL) seguito da potassio ftalimide (7,5 g, 40,49 mmol, 1,31 equiv). La soluzione ottenuta è stata scaldata a 100°C ed agitata per 3 h. Il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. Il DMF è stato allontanato sotto vuoto per fornire un residuo oleoso marrone. Al residuo è stata aggiunta 200 mL acqua e la miscela è stata estratta con 3x50 mL di etil acetato. Gli strati organici riuniti sono stati lavati con salamoia satura e seccati su sodio solfato anidro. Dopo evaporazione del solvente, il residuo è stato caricato su una

colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (0~1:3). Il solvente è stato allontanato da frazioni contenenti ftalimmide ed il residuo è stato lavato con 20% etil acetato/etere di petrolio a dare 10,1 g (78%) di tert-butil 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanoato come olio giallo pallido.

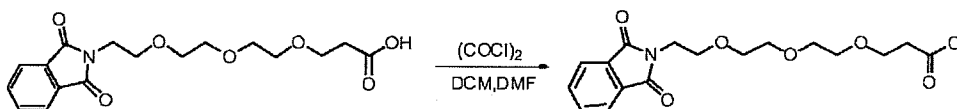
5



Intermedio 179.4, acido 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanoico: In un pallone da 10 mL purgato e mantenuto con

atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di tert-butil 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanoato (intermedio 179.3) (1,5 g, 3,68 mmol, 1,00 equiv) in acido 2,2,2-trifluoroacetico pulito (TFA; 2,0 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per 40 min a temperatura ambiente. Il TFA in eccesso è stato allontanato sotto vuoto ad ottenere un residuo giallo pallido che è stato purificato su una colonna di gel di silice eluendo con etil acetato/etere di petrolio (1:5~1:2~2:1) a dare 1,1 g (84%) di acido 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)-etossi)propanoico come solido bianco.

15



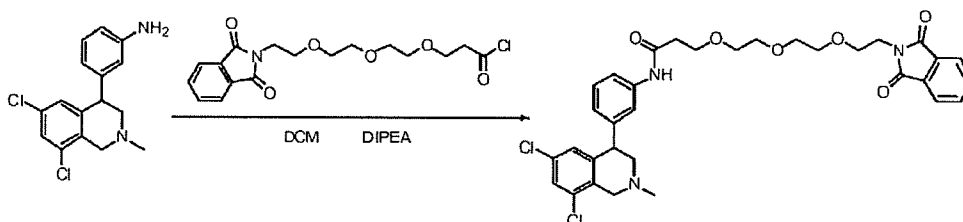
Intermedio 179.5, 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)-etossi)propanoil

20

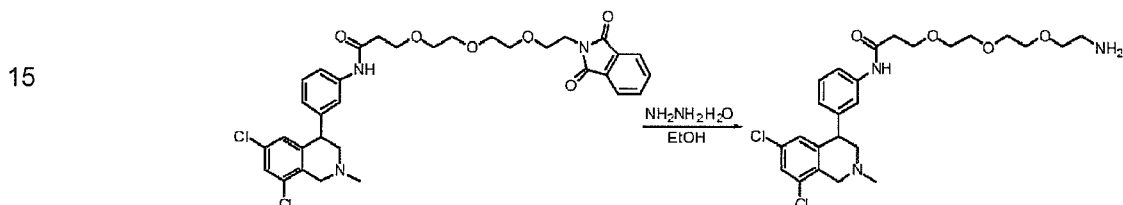
cloruro: In un pallone da 50 mL pulito e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di acido 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanoico (700 mg, 1,99 mmol, 1,00 equiv) in DCM anidro (30,0 mL), poi ossalil dicloruro (0,7 mL) è stato aggiunto goccia a goccia a temperatura ambiente. Due gocce di DMF anidro sono state poi aggiunte. La soluzione ottenuta è stata scaldata a riflusso per 40 min. Il solvente è stato allontanato sotto vuoto a dare 750 mg di 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanoil cloruro come olio giallo pallido, che è stato usato direttamente per il passaggio di reazione successivo senza ulteriore purificazione.

25

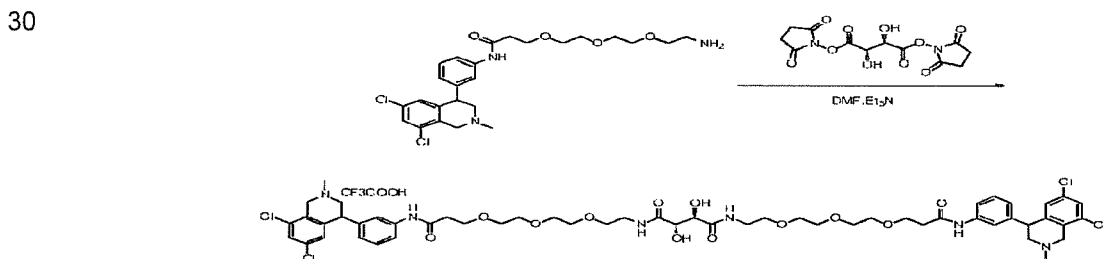
30



Intermedio 179.6, N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanammide: A 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-benzenammina (intermedio 31.5) (600,0 mg, 1,95 mmol, 1,00 equiv) in DCM anidro (5,0 mL) è stata aggiunta N-etil-N,N-diisopropilammina (DIEA; 0,5 mL). Poi una soluzione di 3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanoil cloruro (intermedio 179.5) (794 mg, 2,15 mmol, 1,10 equiv) è stata aggiunta goccia a goccia con agitazione a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente e poi concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con DCM/metanolo (100~50:1).
 5
 10 Questo è risultato in 870 mg (66%) di N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanammide come sciroppo giallo pallido. Le altre frazioni sono state riunite ed evaporate ad ottenere ulteriori 200 mg di prodotto impuro.



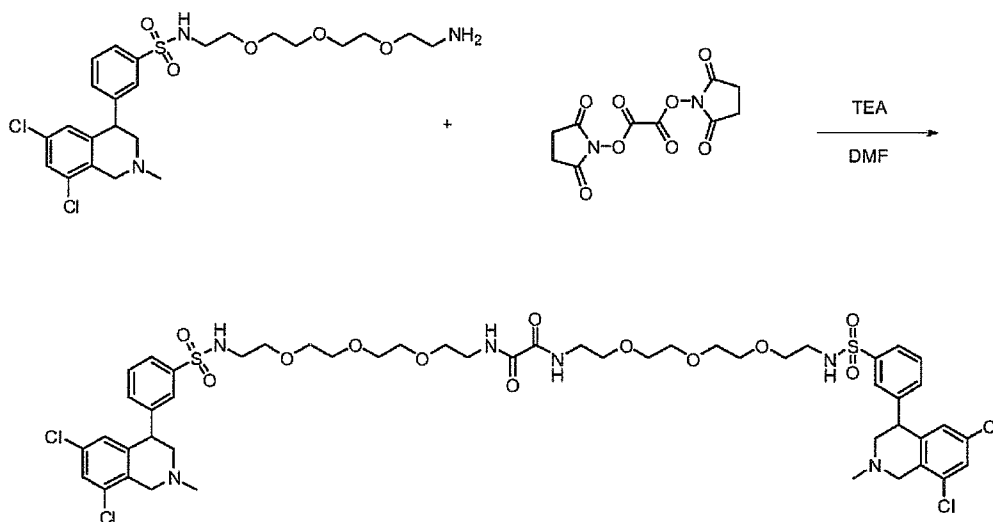
Intermedio 179.7, 3-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)-N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)propanammide: In un pallone da 100 mL, è stata posta N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)-3-(2-(2-(2-(1,3-diossoisindolin-2-il)etossi)etossi)etossi)propanammide (870,0 mg, 1,36 mmol, 1,00 equiv) e idrazina monoidrata 1M in etanolo (30,0 mL, 30,0 mmol). La soluzione ottenuta è stata scaldata a riflusso per 1 ora. La miscela ottenuta è stata raffreddata a temperatura ambiente e concentrata sotto vuoto. La soluzione residua è stata diluita con 30 mL di acqua e poi estratta con 3x50 mL di DCM. Gli strati organici riuniti sono stati lavati con salamoia, seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con DCM/metanolo (100~50:1~10:1~1:1). Questo è risultato in 600 mg (85%) di 3-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)-N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)propanammide come sciroppo giallo pallido.



Composto 179, (2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)-3-ossopropossi)etossi)etossi)etil)-2,3-di-idrossisuccinammide: A 3-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)-N-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenil)propanammide (intermedio 179.7) (270 mg, 0,53 mmol, 2,00 equiv) in DMF anidra (5,0 mL) è stato aggiunto (2R,3R)-bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (preparato da acido (2R,3R)-tartarico come descritto in esempio 168) (91,0 mg, 0,26 mmol, 1,00 equiv) e trietilammina (0,3 mL) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a 35°C. La miscela ottenuta è stata poi concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato purificato per Prep-HPLC a dare 170 mg (56%) di un sale TFA di (2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilammino)-3-ossopropossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide come solido biancastro. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,92 (s, 1H), 7,65 (s, 2H), 7,54 (d, *J*=1,5Hz, 2H), 7,36-7,46 (m, 4H), 7,02 (dd, *J*=7,5, 1,2Hz, 2H), 6,90 (s, 2H), 4,83-4,75 (m, 2H), 4,65-4,60 (m, 2H), 4,53 (s, 1H), 4,46 (m, 3H), 3,88-3,80 (m, 6H), 3,64-3,51 (m, 22H), 3,41-3,35 (m, 4H), 3,16 (s, 6H), 2,64 (t, *J*=6,0Hz, 4H). MS (*m/z*): 1136 [M+H]⁺.

Esempio 180

N1,N2-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)ossalammide

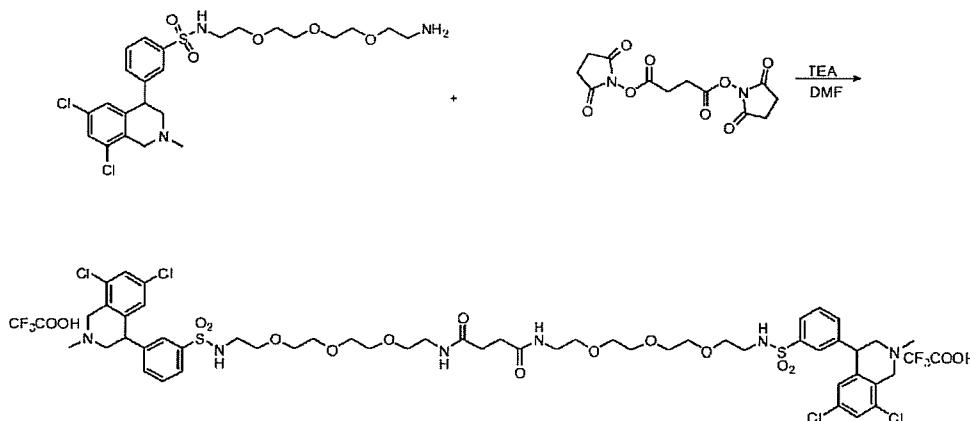


Composto 180, N1,N2-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)-etil)ossalamide: Composto 180 è stato preparato da composto 28 seguendo la procedura delineata in esempio 175. Il prodotto grezzo (400 mg) è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni:

5 Colonna, gel di silice C18; fase mobile, CH₃CN/H₂O/CF₃COOH=39/100/0,05 aumentando a CH₃CN/H₂O/CF₃COOH=39/100/0,05 entro min; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 113,4 mg (11%) di un sale TFA di N1,N2-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-ossalamide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, DMSO+DCl, ppm): δ 7,766(d, J=7,5Hz, 2H), 7,683(s, 2H), 7,586~7,637(m, 4H), 7,537(d, J=7,8Hz, 2H), 6,644(s, 2H), 4,834~4,889(m, 2H), 4,598(d, J=16,2Hz, 2H), 4,446(d, J=15,0Hz, 2H), 3,602~3,763(m, 4H), 3,299~3,436(m, 24H), 3,224~3,263(m, 4H), 2,975(s, 6H), 2,825~2,863(m, 4H). MS (m/z): 574 [M/2+H]⁺.

Esempio 181

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)succinammide



Composto 181, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-succinammide: Composto 181 è stato preparato da composto 28 e (2,5-diossopirrolidin-1-il) succinato seguendo la procedura delineata in esempio 175. Il prodotto grezzo (200 mg) è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni: Colonna, gel di silice C18; fase mobile, CH₃CN/H₂O/CF₃COOH=0,05/100/0,05 aumentando a CH₃CN/H₂O/CF₃COOH=90/100/0,05 entro 19 min; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 201 mg (78%) di un sale TFA di N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-succinammide come solido bianco. ¹H-NMR

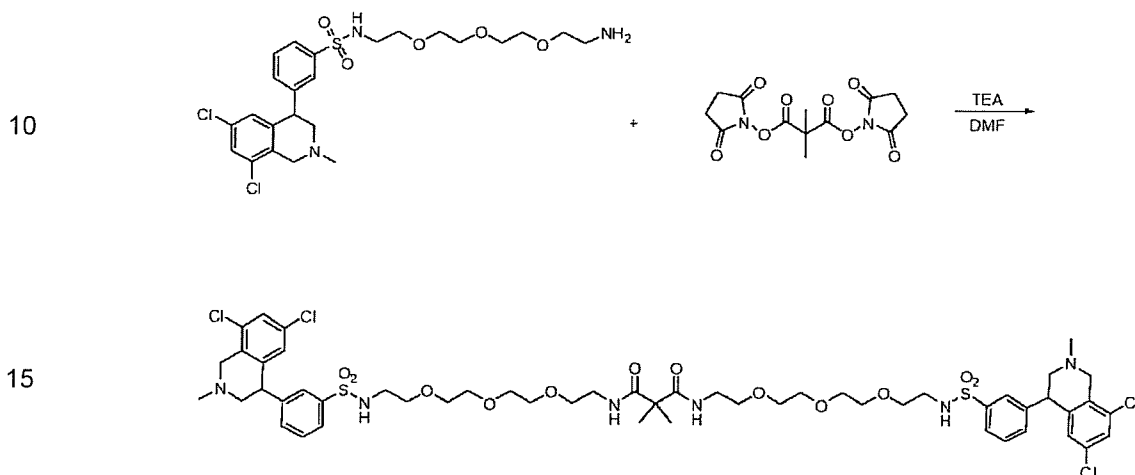
30

(300MHz, DMSO+DCI, ppm): δ 7,76(d, $J=7,5$ Hz, 2H), 7,68(s, 2H), 7,63~7,52(m, 6H), 6,64(s, 1H), 4,88~4,82(m, 2H), 4,62~4,42(m, 4H), 3,76~3,60(m, 4H), 3,43~3,30(m, 25H), 3,14~3,10(m, 4H), 2,97(s, 6H), 2,86~2,82(m, 4H), 2,27(s, 4H). MS (m/z): 589 [$M/2+1$]⁺.

5

Rif. Esempio 182

N1,N3-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,2-dimetilmalonammide



Composto 182, N1,N3-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,2-dimetilmalonammide: Composto 182

20

è stato preparato da composto 28 e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2-dimetilmalonato (preparato usando i metodi delineati in esempio 168) seguendo la procedura delineata in esempio 175. Il prodotto grezzo (250 mg) è stato purificato per Prep-HPLC con le seguenti condizioni: Colonna, gel di silice C18; fase mobile, MeCN/H₂O/CF₃COOH=39/100/0,05; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 152,3 mg (47%) di un sale TFA di N1,N3-

25

bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

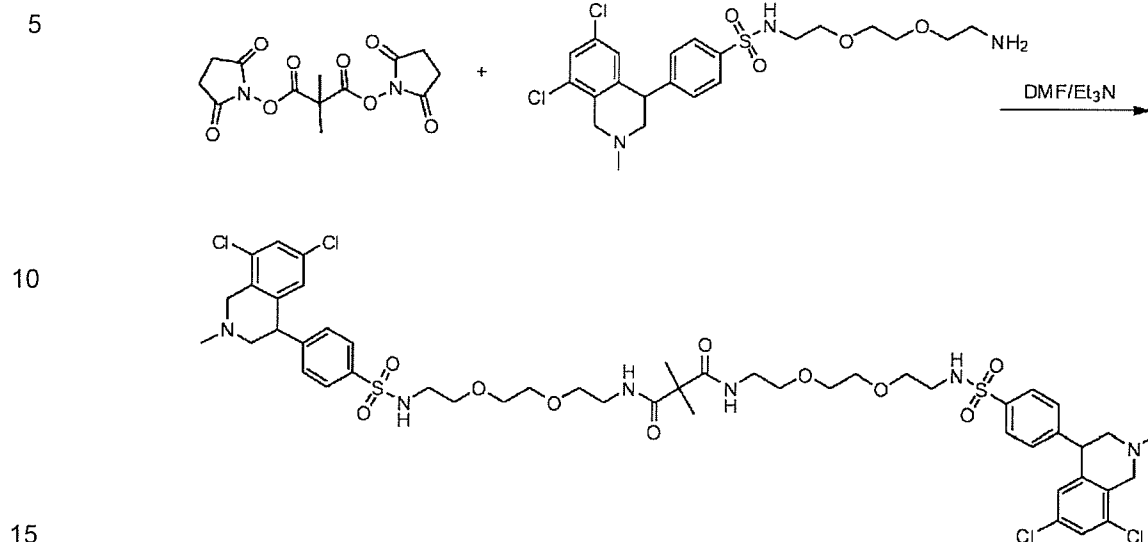
il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)-etossi)etil)-2,2-dimetilmalonammide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7,92~7,89(d, $J=8,1$ Hz, 2H), 7,79 (s, 2H), 7,69~7,64 (m, 2H), 7,57~7,55 (d, $J=7,5$ Hz, 4H), 3,68 (s, 2H), 4,87~4,75 (m, 4H), 4,54~4,49 (m, 2H), 3,90~3,88 (m, 2H), 3,67~3,45 (m, 20H), 3,39~3,32 (m, 4H), 3,31 (s, 6H), 3,17~3,05 (m,

30

4H), 1,41(s,1H). MS (m/z): 1189 [$M+H$]⁺.

Rif. Esempio 183

N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,2-dimetilmalonammide



Rif. Esempio 183, N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,2-dimetil-malonamide: Composto 183 è stato preparato da intermedio 175.1 e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2-dimetilmalonato (preparato usando i metodi delineati in esempio 168) seguendo la procedura delineata in esempio 175. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH)(10%-100%). Questo è risultato in 29,5 mg (5%) di un sale TFA di N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)-etil)-2,2-dimetilmalonamide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,94-7,92(m, 4H), 7,57(m, 2H), 7,51-7,49(m, 4H), 6,87(m, 2H), 4,83-4,74(m, 4H), 4,55-4,50(m, 2H), 3,92-3,87(m, 2H), 3,67-3,48(m, 8H), 3,40-3,38(m, 4H), 3,18(s, 6H), 3,14-3,00(m, 4H), 1,41(s, 6H). MS (m/z): 551 [1/2M+H]⁺.

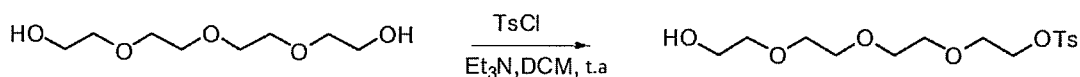
20

25

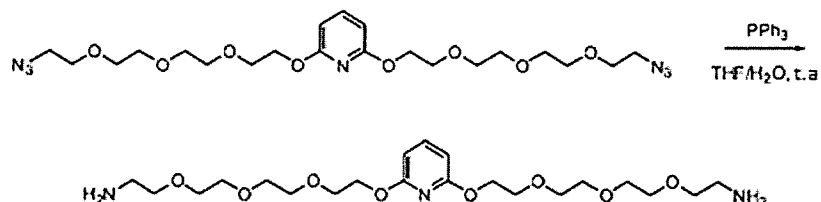
Rif. Esempio 184

N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(piridin-2,6-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonamide)

30

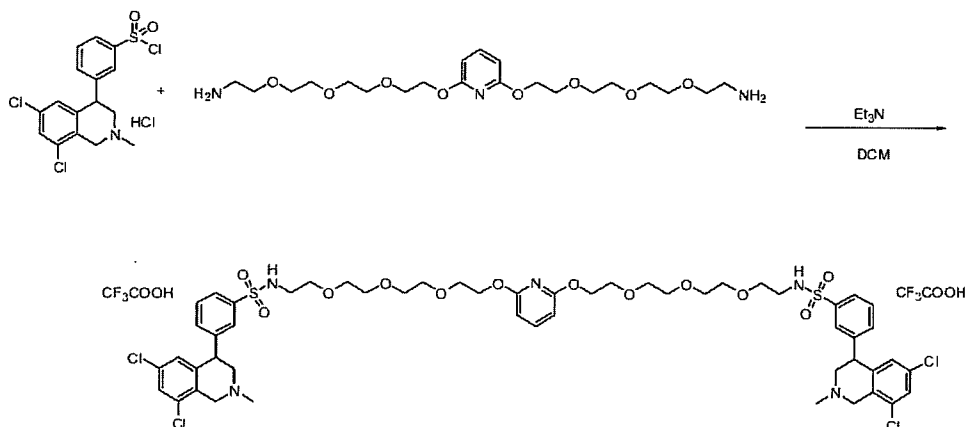


a temperatura ambiente, tempo al quale è stata aggiunta 2,6-dibromopiridina (100 mg, 0,42 mmol, 1,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per ulteriori 2 h a 80°C e poi è stata



concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con DCM/etanolo (50:1-30:1). Questo è risultato in 180 mg (83%) di 2,6-bis(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etossi)piridina come olio giallino.

Intermedio 184.4, 2-(2-(2-(2-(6-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etossi)-piridin-2-ilossi)etossi)etossi)etossi)etanammina: A intermedio 184.3 (180 mg, 0,35 mmol, 1,00 equiv) in THF/acqua (30/3 mL) è stata aggiunta trifenilfosfina (400 mg, 1,52 mmol, 4,35 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 40°C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata estratta con 4x50 mL di DCM e gli strati organici riuniti e seccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice con DCM/metanolo (80:1~20:1). Questo è risultato in 100 mg (62%) di 2-(2-(2-(2-(6-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etossi)piridin-2-ilossi)etossi)etossi)-etossi)etanammina come olio giallino.



Composto 184, N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(piridin-2,6-diilbis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi))bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide): A intermedio 184.4 (100 mg, 0,22 mmol, 1,00 equiv) in DCM (50 mL) è stata aggiunta

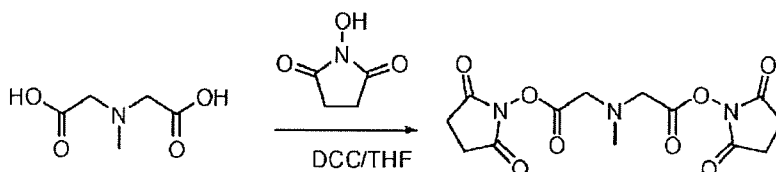
trietilammina (70 mg, 0,69 mmol, 3,20 equiv) e 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (350 mg, 0,90 mmol, 4,13 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente e poi concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato purificato per Prep-HPLC con CH₃CN:H₂O(0,05% CF₃COOH)=35%-40%. Questo è risultato in 88,4 mg (29%) di un sale TFA del composto del titolo come solido bianco.. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,91-7,88(d, 2H), 7,78(s, 2H), 7,67-7,50(m, 7H), 6,86(s, 2H), 6,34-6,31(d, 2H), 4,90-4,75(m, 4H), 4,52-4,46(m, 2H), 4,42-4,39(t, 4H), 3,90-3,81(m, 6H), 3,71-3,43(m, 22H), 3,16(s, 6H), 3,07-3,03(t, 4H). MS (m/z): 1170 [M+H]⁺

10

Rif. Esempio 185

2,2'-(metilazandiil)bis(N-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide) tris(2,2,2-trifluoroacetato)

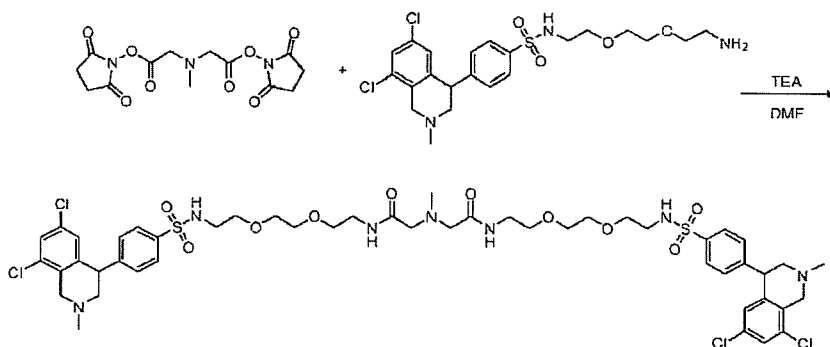
15



20

Intermedio 185.1, bis(2,5-diosopirrolidin-1-il) 2,2'-(metilazandiil)diacetato: Ad acido 2-[(carbossimetil)(metil)ammino]acetico(2,0 g, 13,60 mmol, 1,00 equiv) in THF (30 mL) è stata aggiunta DCC (6,2 g, 30,05 mmol, 2,21 equiv) ed una soluzione di NHS (3,5 g, 30,41 mmol, 2,24 equiv) in THF (30 mL) e la reazione agitata a 0-10°C per 2 h. La soluzione ottenuta è stata lasciata scaldare alla temperatura ambiente ed agitata per 16 h. I solidi sono stati poi filtrati via e la miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ri-cristallizzato da etil acetato/etere di petrolio in rapporto 1:10. ad ottenere 2,0 g (21 %) di composto del titolo come solido bianco.

25



30

Composto

185, 2,2'-(metilazandiil)bis(N-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-acetammide) tris(2,2,2-trifluoroacetato): A N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-

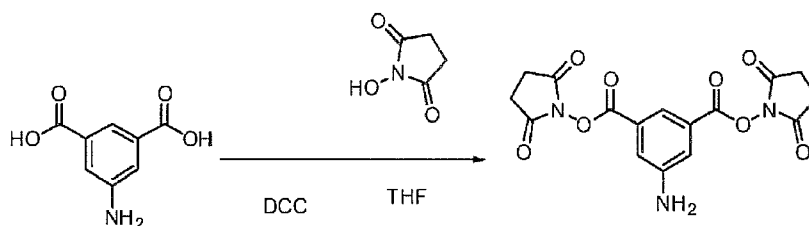
tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (150 mg, 0,30 mmol, 1,00 equiv) in DMF (3 mL) è stato aggiunto intermedio 185.1 (106 mg, 0,15 mmol, 0,50 equiv, 48%) e trietilammina (150 mg, 1,48 mmol, 4,97 equiv) e la reazione è stata agitata per tutta la notte. La miscela è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con CH₃CN:H₂O (0,05% CF₃COOH) per fornire 26,4 mg (12%) di un sale TFA del composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,92 (m, 4H), 7,5 (m, 2H), 7,50 (m, 4H), 6,85 (s, 2H), 4,81 (m, 4H), 4,50 (m, 2H), 4,06 (s, 4H), 3,89 (m, 2H), 3,66-3,44 (m, 22H), 3,32 (s, 6H), 3,15 (m, 4H), 3,01 (s, 3H). MS (m/z): 559 [(M+2H)/2]⁺

10

Rif. Esempio 186

5-ammino-N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)isofalammide tris(2,2,2-trifluoroacetato)

15

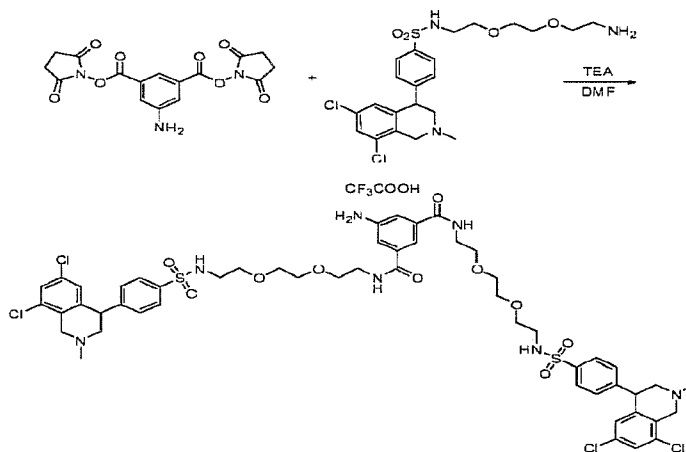


20

Intermedio 186.1, bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 5-amminoisofalato: In un pallone a 3 colli da 50 mL, è stata posta una soluzione di acido 5-amminoisofalico (300 mg, 1,66 mmol, 1,00 equiv) in THF (5 mL) e 1-idrossipirrolidin-2,5-dione (420 mg, 3,65 mmol, 2,20 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di DCC (750 mg, 3,64 mmol, 2,20 equiv) in THF (5 mL) goccia a goccia con agitazione a 0°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. I solidi sono stati allontanati per filtrazione ed il filtrato è stato concentrato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato per ricristallizzazione da etanolo. Questo è risultato in 70 mg (11%) di composto del titolo come solido giallino.

25

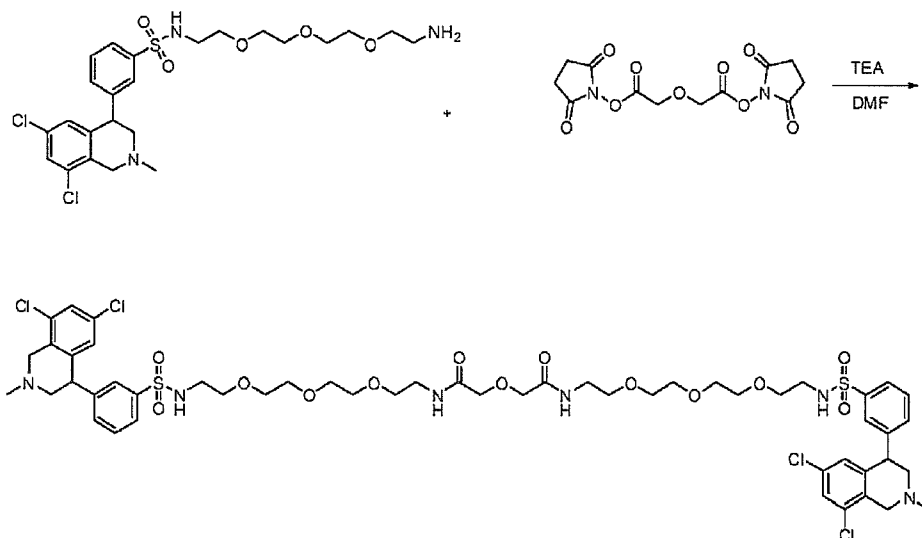
30



Composto 186, 5-ammino-N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)isoftalamide tris(2,2,2-trifluoroacetato): A N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (100 mg, 0,20 mmol, 1,00 equiv) in DMF (5
5 mL) è stato aggiunto intermedio 186.1 (44,8 mg, 0,12 mmol, 0,60 equiv) e trietilammina (60,4 mg, 0,60 mmol, 3,00 equiv) e la reazione è stata agitata per tutta la notte. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con CH₃CN:H₂O (0,05% CF₃COOH) per fornire 32,4 mg (19%) di un sale TFA del composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,90-7,87 (d, *J*=8,4Hz, 4H), 7,60-7,54 (3H, m), 7,46-7,44(d, *J*=8,4Hz, 4H), 7,34 (d, *J*=1,2Hz, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,89-4,71 (m, 4H), 4,53-4,48 (d, *J*=16,2Hz, 2H), 3,91-3,85 (m, 2H), 3,67-3,45 (m, 22H), 3,33-3,32 (m, 6H), 3,18-3,01 (m, 4H). MS (*m/z*): 575 [(M+2H)/2]⁺

Esempio 187

2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide)

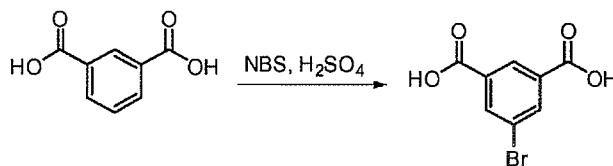


Composto 187, 2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-acetammide): In un pallone da 50 mL, è stata posta una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (composto 28) (150 mg, 0,28 mmol, 1,00 equiv) in DMF(5 mL), trietilammina (56 mg, 0,55 mmol, 2,01 equiv) e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2'-ossidiacetato (intermedio 178.1) (44 mg, 0,14 mmol, 0,49 equiv). La soluzione ottenuta è

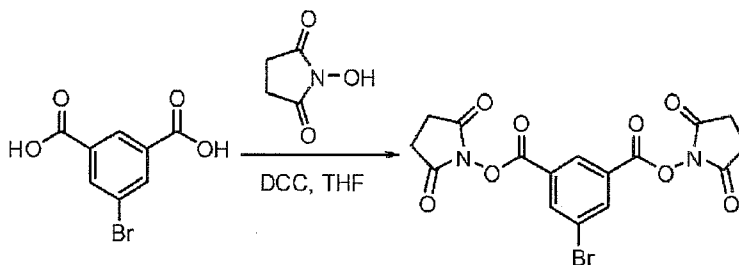
stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente, tempo al quale la miscela è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo (150 mg) è stato purificato per HPLC preparativa con le seguenti condizioni: Colonna, gel di silice C18; fase mobile, metanolo/acqua = 0,05/100 aumentando a metanolo/acqua = 90/100 entro 19 min; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 72,4 mg (44%) di composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,79 (d, J=7,2Hz, 2H), 7,71 (s, 2H), 7,49~7,58 (m, 4H), 7,36~7,37 (m, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,39~4,44 (m, 2H), 4,06 (s, 4H), 3,80 (d, J=16,2Hz, 2H), 3,65 (d, J=16,2Hz, 2H), 3,55~3,61 (m, 16H), 3,43~3,52 (m, 12H), 3,02-3,08 (m, 6H), 2,65~2,70 (m, 2H), 2,49 (s, 6H). MS (m/z): 1190 [M+H]⁺

Rif. Esempio 188

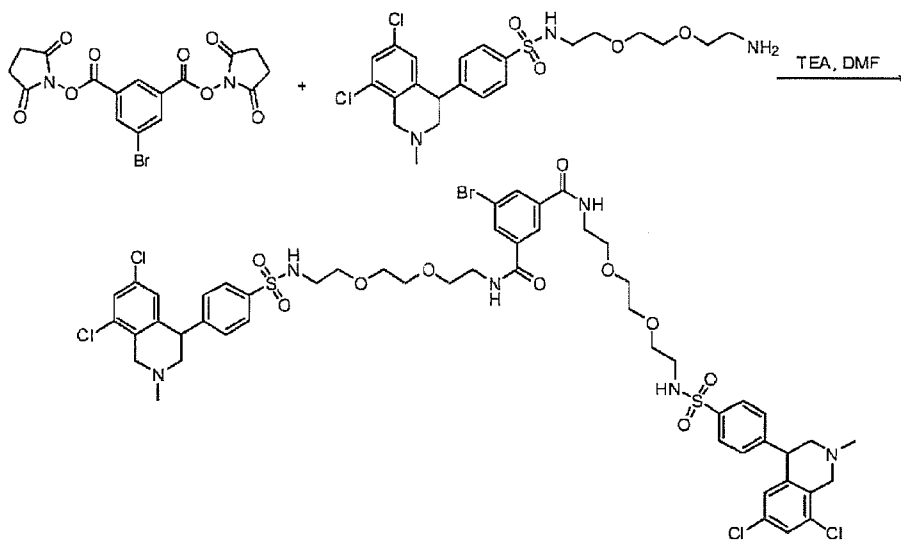
5-bromo-N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)isofalammide bis(2,2,2-trifluoroacetato)



Intermedio 188.1, acido 5-bromoisofalico: In un pallone da 100 mL, è stata posta una soluzione di acido isofalico (10 g, 60,24 mmol, 1,00 equiv) in 98% H₂SO₄ (60 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di N-bromosuccinimide (12,80 g, 72,32 mmol, 1,20 equiv), in porzioni a 60°C in 10 min. La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 60°C in un bagno d'olio. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e poi spenta per aggiunta di acqua/ghiaccio. I solidi sono stati raccolti per filtrazione e lavati con 2x60 mL di esano. Il solido è stato seccato in un forno a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato per ri-cristallizzazione da etil acetato a dare 3 g (20%) di acido 5-bromoisofalico come solido bianco.



Intermedio 188.2, bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 5-bromoisoftalato: In un pallone da 100 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di acido 5-bromoisoftalico (3 g, 11,76 mmol, 1,00 equiv, 96%) in THF (20 mL) seguito da NHS (3 g, 26,09 mmol, 2,20 equiv) a 0-5°C. A questo è stata aggiunta una soluzione di DCC (5,6 g, 27,18 mmol, 2,20 equiv) in THF (20 mL) goccia a goccia con agitazione a 0-5°C. La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. I solidi sono stati filtrati via ed il filtrato è stato concentrato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ricristallizzato da DCM/etanolo in rapporto 1:10. Questo è risultato in 4 g (75%) di composto del titolo come solido bianco.



Composto 188, 5-bromo-N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)isoftalamide bis(2,2,2-trifluoroacetato): In un pallone da 50 mL purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-benzensolfonammide (intermedio 175.1) (100 mg, 0,19 mmol, 2,50 equiv, 95%) in DMF (8 mL), intermedio 188.1 (35 mg, 0,08 mmol, 1,00 equiv, 98%) e trietilammina (32 mg, 0,32 mmol, 4,00 equiv). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente e poi concentrata a secchezza. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05%CF₃COOH) = 30%~42%. Questo è risultato in 86 mg (75%) di un sale TFA del composto del titolo come solido

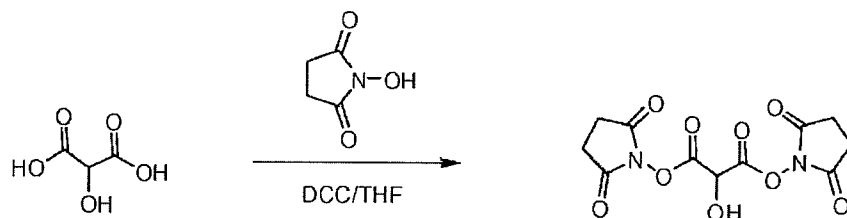
bianco. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 8,26 (s, 1H), 8,13 (s, 2H), 7,90 (d, $J=9\text{Hz}$, 4H), 7,55 (s, 2H), 7,48 (d, $J=9\text{Hz}$, 4H), 6,84 (s, 2H), 4,76 (m, 4H), 4,54 (m, 2H), 3,89 (m, 2H), 3,68 (m, 18H), 3,53 (m, 4H), 3,33 (s, 6H), 3,18 (m, 4H). MS (m/z): 609 $[(M+2H)/2]^+$

5

Rif. Esempio 189

N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2-idrossimalonamide bis(2,2,2-trifluoroacetato)

10

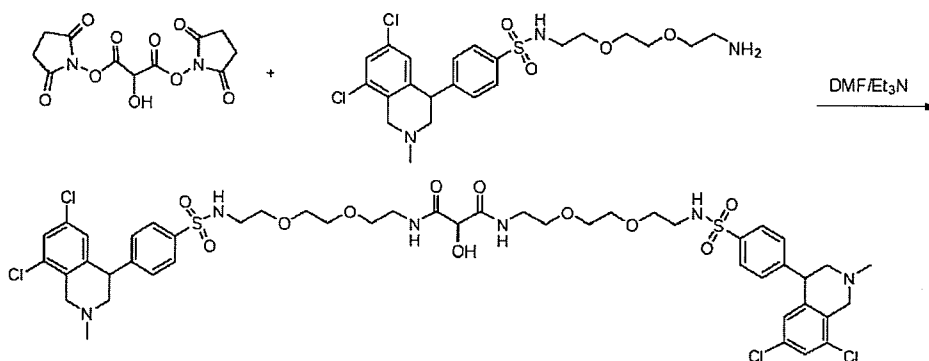


15

Intermedio 189.1, bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2-idrossimalonato: In un pallone a 3 colli da 100 ml purgato e mantenuto con atmosfera inerte di azoto, è stata posta una soluzione di acido 2-idrossimalonico (1,6 g, 13,32 mmol, 1,00 equiv) in THF (30 mL) e DCC (6,2 g, 30,05 mmol, 2,26 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di una soluzione di NHS (3,5 g, 30,41 mmol, 2,28 equiv) in THF (30 mL) a 0-10°C in 2 h. La soluzione ottenuta è stata agitata per 16 h a temperatura ambiente. I solidi sono stati poi filtrati via ed il filtrato è stato concentrato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato ri-cristallizzato da etanolo a dare 0,5 g (12%) di composto del titolo come solido bianco.

20

25



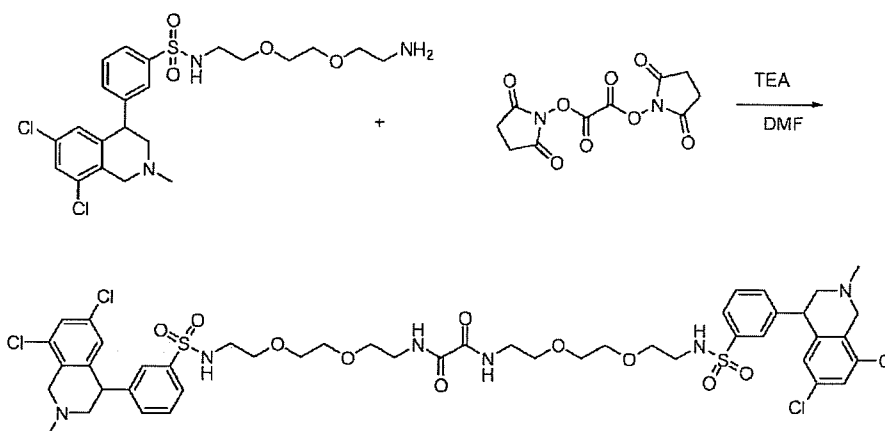
30

Composto 189, N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2-idrossimalonamide bis(2,2,2-trifluoroacetato): A N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-benzensolfonammide (intermedio 175.1) (100 mg, 0,20 mmol, 1,00

equiv) in DMF (2 mL), è stato aggiunto Intermedio 189.1 (29 mg, 0,10 mmol, 0,45 equiv) e trietilammina (90 mg, 4,50 equiv) e la reazione è stata agitata per 3 h a 30°C. La miscela è stata concentrata sotto vuoto ed il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH) (10%-100%) ad ottenere 36,5 mg (30%) di un sale TFA del composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,94-7,91 (m, 4H), 7,57-7,56 (m, 2H), 7,51-7,48 (m, 4H), 6,87 (m, 2H), 4,82-4,76 (m, 4H), 4,54-4,49 (m, 2H), 3,93-3,91 (s, 4H), 3,89-3,87 (m, 2H), 3,66-3,42 (m, 22H), 3,17 (s, 6H), 3,13-3,09 (m, 4H). MS (m/z): 546 [(M+2H)/2]⁺

Esempio 190

N1,N2-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ossalamide



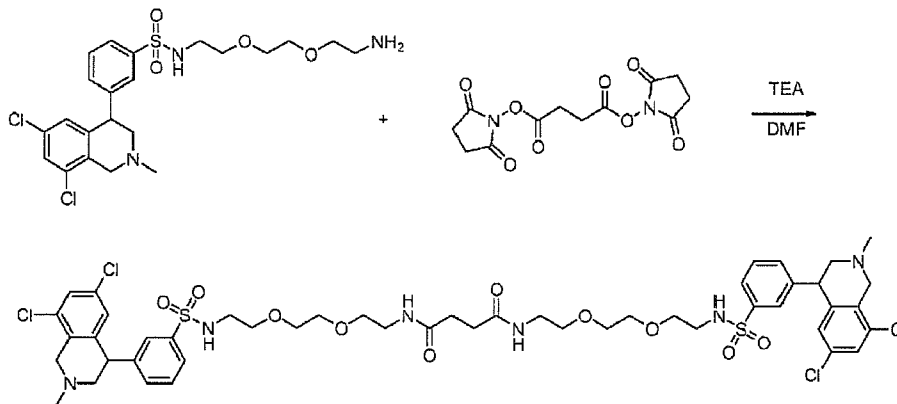
Composto 190, N1,N2-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ossalamide:

A N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-benzensolfonammide (Intermedio 168.2) (200 mg, 0,40 mmol, 1,00 equiv) in DMF (2 mL) è stata aggiunta trietilammina (81 mg, 0,80 mmol, 2,01 equiv) e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il)ossalato (57 mg, 0,20 mmol, 0,50 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte. La miscela è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo (200 mg) è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni: Colonna, gel di silice C18; fase mobile, metanolo/acqua=0,05/100 aumentando a metanolo/acqua=90/100 entro 25 min; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 72,3 mg (34%) di N1,N2-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)ossalamide come solido giallino. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,77-7,81 (m, 2H), 7,72 (s, 2H), 7,48-7,57 (m, 4H), 7,35-7,36 (m, 2H), 6,81-6,82 (m, 2H), 4,39-4,43 (m, 2H), 3,79 (d, J=16,5 Hz, 2H), 3,65 (d, J=16,2Hz,

2H), 3,55-3,60 (m, 8H), 3,43-3,50 (m, 12H), 3,02-3,09 (m, 6H), 2,64-2,71 (m, 2H), 2,49 (s, 6H). MS (m/z): 1059 [M+H]⁺

Esempio 191

N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide

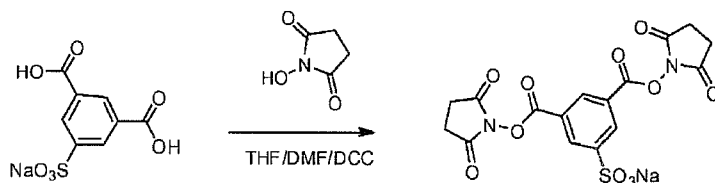


Composto 191, N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide:

A N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 168.2) (150 mg, 0,30 mmol, 1,00 equiv) in DMF (2 mL) è stata aggiunta trietilammina (60 mg, 0,59 mmol, 1,98 equiv) e intermedio 177.1 (47 mg, 0,15 mmol, 0,50 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte. La miscela è stata poi concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo (150 mg) è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni: colonna, gel di silice C18; fase mobile, metanolo/acqua=0,05/100 aumentando a metanolo/acqua=90/100 entro 25 min; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 53,1 mg (33%) di N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide come solido bianco. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,77-7,80 (m, 2H), 7,71 (s, 2H), 7,48-7,57 (m, 4H), 7,36-7,37 (m, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,39-4,44 (m, 2H), 3,79 (d, J=15,9Hz, 2H), 3,66 (d, J=16,2Hz, 2H), 3,45-3,57 (m, 16H), 3,35-3,37 (m, 4H), 3,03-3,08 (m, 6H), 2,65-2,71 (m, 2H), 2,49-2,50 (m, 10H). MS (m/z): 1089 [M+H]⁺

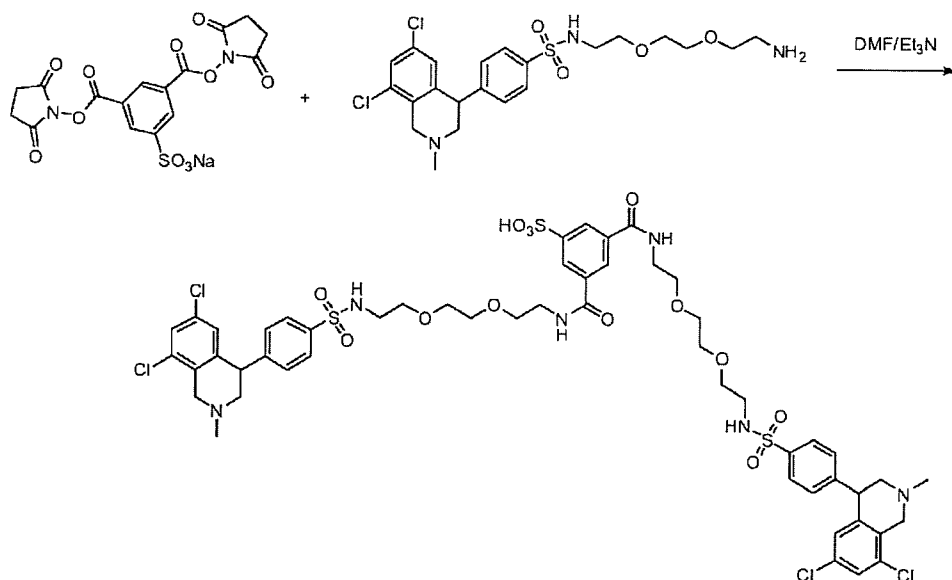
Rif. Esempio 192

acido 3,5-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etilcarbamoil)benzensolfonico



Intermedio 192.1, sodio 3,5-bis((2,5-diossopirrolidin-1-ilossi)carbonil)benzensolfonato:

5 A sodio 3,5-dicarbossibenzensolfonato (1 g, 3,73 mmol, 1,00 equiv) e NHS (940 mg, 8,17 mmol, 2,20 equiv) in DMF (10 mL) a 0°C è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di DCC (1,69 g, 8,20 mmol, 2,20 equiv) in THF (10 mL) e la reazione è stata agitata per tutta la notte. I solidi sono stati allontanati per filtrazione e il filtrato è stato concentrato sotto vuoto ad ottenere 500 mg (29%) di composto del titolo come solido bianco.

**Composto 192, acido 3,5-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etil-carbamoil)benzensolfonico:**

A N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

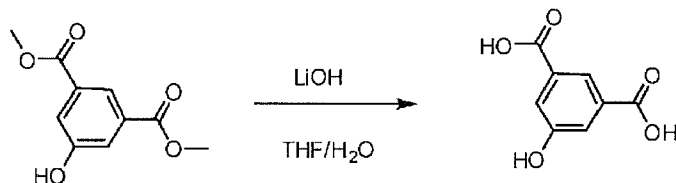
25 il)benzensolfonammide (intermedio 175.1) (100 mg, 0,20 mmol, 1,00 equiv) in DMF (2 mL) è stato aggiunto intermedio 192.1 (45 mg, 0,10 mmol, 0,50 equiv) e trietilammina (90 mg, 4,50 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte. La miscela è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH)(10%-100%) ad ottenere 30,6 mg (22%) di un sale

30 TFA del composto del titolo come solido bianco. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): δ 8,35-8,34 (m, 3H), 7,84-7,81 (m, 4H), 7,48 (m, 2H), 7,41-7,38 (m, 4H), 6,75 (m, 2H), 4,87-4,70 (m, 4H), 4,56-4,50 (m, 2H), 3,92-3,85 (m, 2H), 3,70-3,42 (m, 22H), 3,37-3,32 (m, 6H), 3,20-3,06 (m, 4H). MS (m/z): 608 [(M+2H)/2]⁺

Rif. Esempio 193

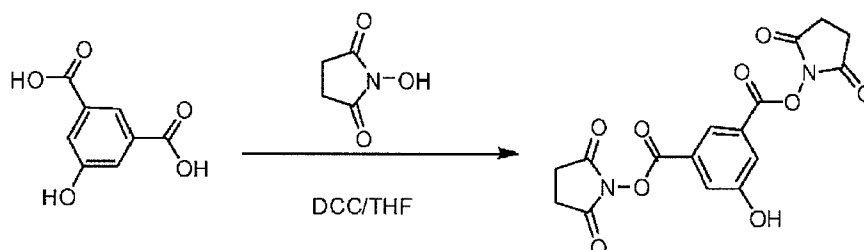
N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-5-idrossiisoftalamide

5



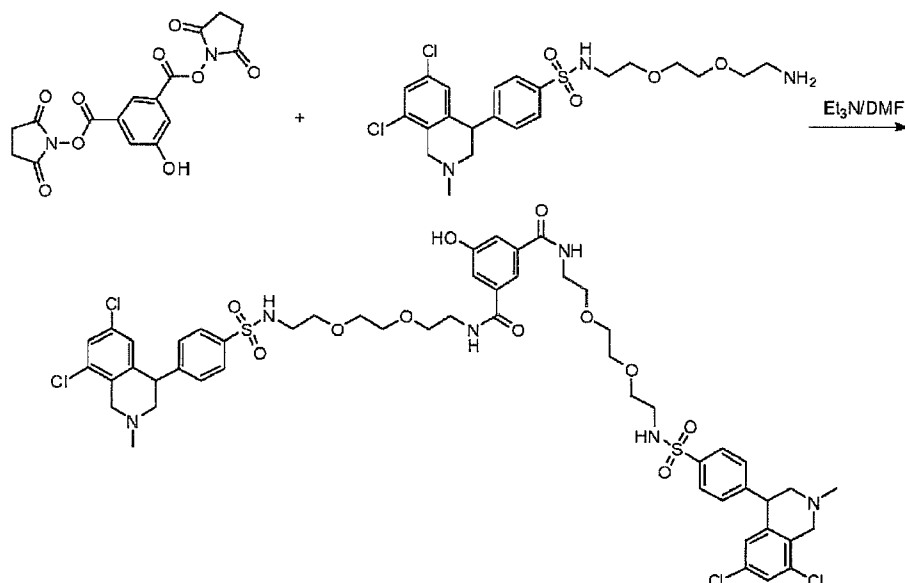
Intermedio 193.1, acido 5-idrossiisoftalico: A dimetil 5-idrossiisoftalato (4,0 g, 19,03 mmol, 1,00 equiv) in THF (10 mL) è stato aggiunto litio idrossido (20 mL, 2M in acqua) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a 40°C. La miscela è stata concentrata sotto vuoto per allontanare i solventi organici e poi il pH della soluzione è stato corretto a ~2 con acido cloridrico 6N. I solidi ottenuti sono stati raccolti per filtrazione e seccati in un forno sotto vuoto ad ottenere 2,0 g (58%) di acido 5-idrossiisoftalico come solido bianco.

15



20

Intermedio 193.2, bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 5-idrossiisoftalato: Ad acido 5-idrossiisoftalico (Intermedio 193.1; 1 g, 5,49 mmol, 1,00 equiv) e NHS (1,39 g, 2,20 equiv), in THF (5 mL) a 0°C è stata aggiunta una soluzione di DCC (2,4 g, 2,20 equiv) in THF (5 mL). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente, poi filtrata e concentrata sotto vuoto a dare 0,5 g (22%) di composto del titolo come solido bianco.



Composto 193, N1,N3-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-5-idrossi-isoftalamide: A N-(2-(2-(2-

amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

il)benzensolfonammide (intermedio 175.1) (100 mg, 0,20 mmol, 1,00 equiv) in DMF (2 mL)

5 è stato aggiunto Intermedio 193.2 (34 mg, 0,09 mmol, 0,45 equiv) e trietilammina (90 mg, 4,50 equiv) e la reazione è stata agitata per tutta la notte. La miscela è stata concentrata sotto

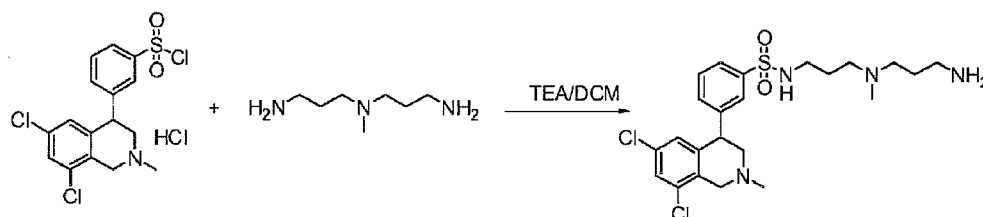
vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF_3COOH)(10%-100%) per ottenere 30 mg (24%) di un sale TFA del composto del titolo

10 come solido bianco. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD , ppm): δ 7,91-7,88 (m, 4H), 7,71-7,70 (m, 1H), 7,56-7,55 (m, 2H), 7,47-7,44 (m, 4H), 7,37-7,36 (m, 2H), 6,84 (m, 2H), 4,87-4,70 (m, 4H), 4,53-4,48 (m, 2H), 3,92-3,85 (m, 2H), 3,67-3,46 (m, 22H), 3,37-3,32 (m, 6H), 3,17-3,07 (m, 4H). MS (m/z): 576 $[[\text{M}+2\text{H}]/2]^+$

Rif. Esempio 194

(2R,3R)-N1,N4-bis(3-((3-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propil)(metil)ammino)propil)-2,3-diidrossisuccinammide

15



20

Intermedio 194.1, N-(3-((3-aminopropil)(metil)ammino)propil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide: Ad una soluzione di N1-(3-

amminopropil)-N1-metilpropan-1,3-diammina (560 mg, 3,85 mmol) sciolta in DCM (20

mL), è stata aggiunta trietilammina (300 mg, 2,96 mmol) e 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-

25

tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (300 mg, 0,77 mmol). La soluzione

ottenuta è stata agitata per 3 h a temperatura ambiente. Dopo allontanamento del solvente, il

residuo ottenuto è stato diluito con EtOAc (50 mL), lavato con acqua (2x10 mL) e seccato su

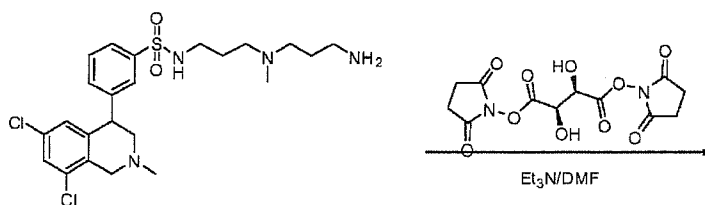
sodio solfato anidro. Il prodotto grezzo è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con

$\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:4) per ottenere 300 mg (74%) di N-(3-((3-

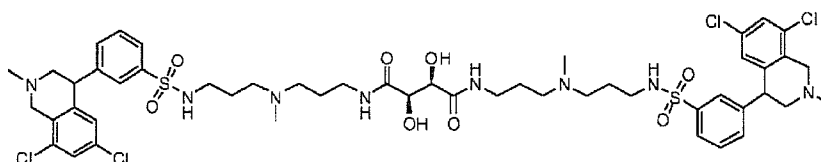
30

amminopropil)(metil)ammino)propil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

il)benzensolfonammide come olio giallo.



5



Composto 194, (2R,3R)-N1,N4-bis(3-((3-(3-(6,8-dichloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)propil)(metilammino)propil)-2,3-di-

idrossisuccinamide: Ad una soluzione di N-(3-((3-ammino-propil)(metilammino)propil)-3-(6,8-dichloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-benzensolfonammide (Intermedio 194.1, 300 mg, 0,60 mmol) in DMF (2 mL) è stato aggiunto (2R,3R)-bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (preparato da acido (2R,3R)-tartarico come descritto in esempio 168) (91 mg, 0,27 mmol) e trietilammina (270 mg, 2,67 mmol) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente e il progredire della reazione è stato controllato per LCMS. Dopo completamento, la miscela è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH) (20%-29%) per ottenere 30,9 mg (8%) di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): 7,90-7,88 (m, 2H), 7,80 (m, 2H), 7,69-7,65 (m, 2H), 7,58-7,56 (m, 4H), 6,85 (m, 2H), 4,87-4,71 (m, 4H), 4,54-4,44 (m, 4H), 3,88-3,82 (m, 2H), 3,62-3,53 (m, 4H), 3,22 (m, 6H), 3,13-3,09 (m, 6H), 3,01-2,97 (m, 4H), 2,88 (m, 6H), 2,00-1,96 (m, 8H). LCMS (ES, m/z): 1114 [M+H]⁺.

10

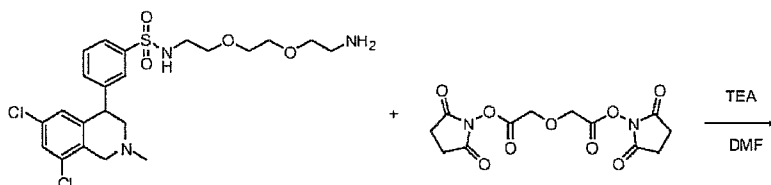
15

20

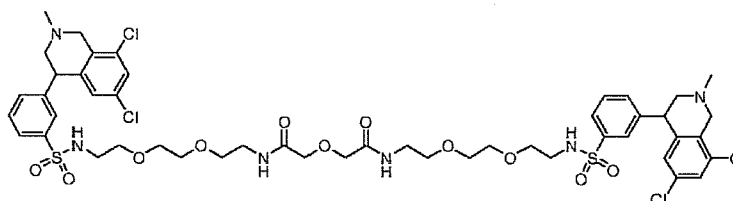
Esempio 195

25

2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(3-(6,8-dichloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide)



30



235

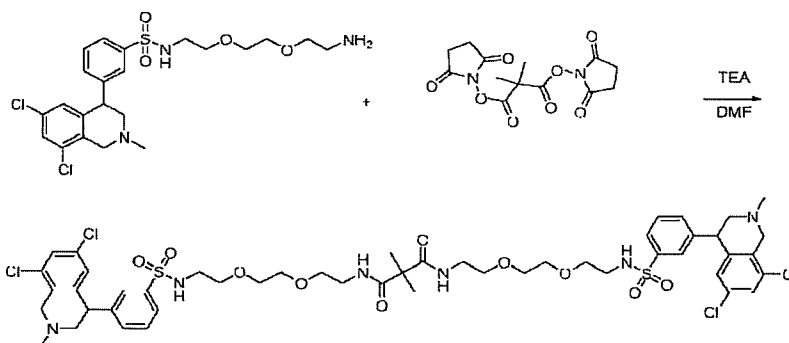
Composto 195, 2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide):

5 Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (150 mg, 0,30 mmol) in DMF (2 mL) è stata aggiunta trietilammina (60 mg, 0,59 mmol) e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2'-ossidiacetato (intermedio 178.1) (49 mg, 0,15 mmol) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte. Dopo allontanamento del solvente, il prodotto grezzo (150 mg) è stato purificato per
10 Flash-Prep-HPLC (gel di silice C18; metanolo/acqua=0,05/100 aumentando a metanolo/acqua=90/100 entro 25 min) a dare 44,4 mg (27%) di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃CD, ppm): 7,79~7,76 (m, 2H), 7,70 (s, 2H), 7,57-7,50 (m, 4H), 7,36 (d, J=Hz, 2H), 4,89-4,41 (m, 2H), 4,06 (m, 4H), 3,81-3,62 (m, 5H), 3,59-3,42 (m, 11H), 3,33-3,31 (m, 8H), 3,07-3,01 (m, 6H), 2,71-2,64 (m, 2H), 2,48(s, 6H). LCMS (ES, m/z): 1103[M+H]⁺.
15

Rif. Esempio 196

N1,N3-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,2-dimetilmalonammide

20



25

Composto 196, N1,N3-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)eti)-2,2-dimetilmalonammide:

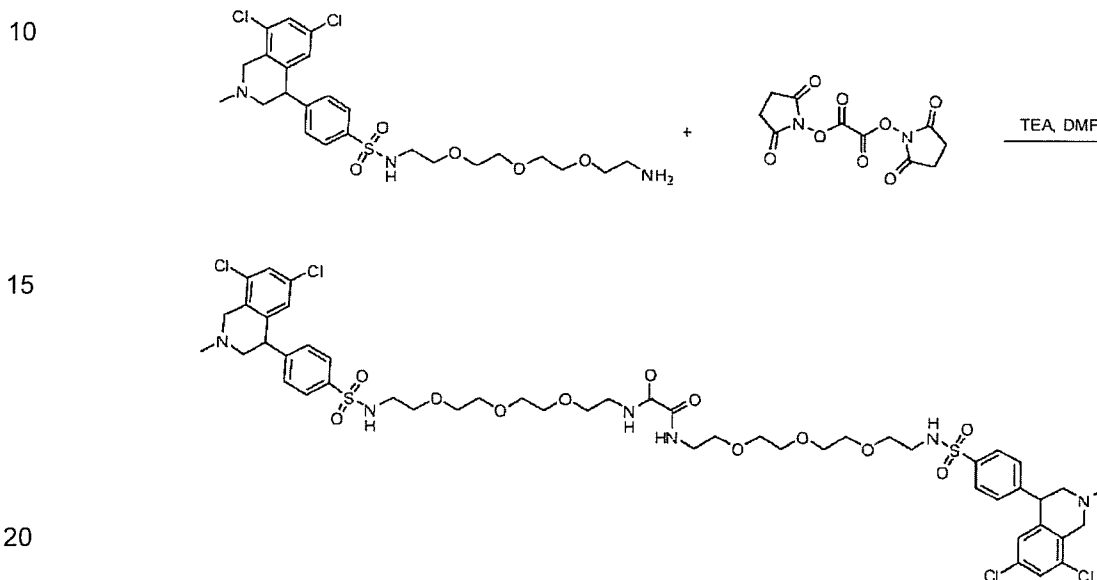
30

A N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide (150 mg, 0,30 mmol) in DMF (2 mL) è stata aggiunta trietilammina (60 mg, 0,59 mmol) e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2-dimetilmalonato (preparato da acido 2,2-dimetilmalonico come descritto in Esempio 168) (49 mg, 0,15 mmol) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte. La miscela è stata concentrata e poi purificata per

Flash-Prep-HPLC (gel di silice C18, metanolo/acqua=0,05/100 aumentando a metanolo/acqua=90/100 entro 25 min) a dare 75,1 mg di composto del titolo (46%) come sale TFA. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7.80~7.77 (m, 2H), 7.71 (s, 2H), 7.57-7.48 (m, 4H), 7.36-7.35 (d, J=2,1Hz, 2H), 6,81 (d, J=1,2Hz, 2H), 4,43-4,38 (m, 2H), 3,82-3,62 (m, 4H), 3,57~3,31 (m, 18H), 3,07-3,02 (m, 6H), 2,71-2,64 (m, 2H), 2,49 (s, 6H), 1,41 (s, 6H).
 5 LC-MS (ES, m/z): 1101[M+H]⁺.

Esempio 197

N1,N2-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)ossalamide



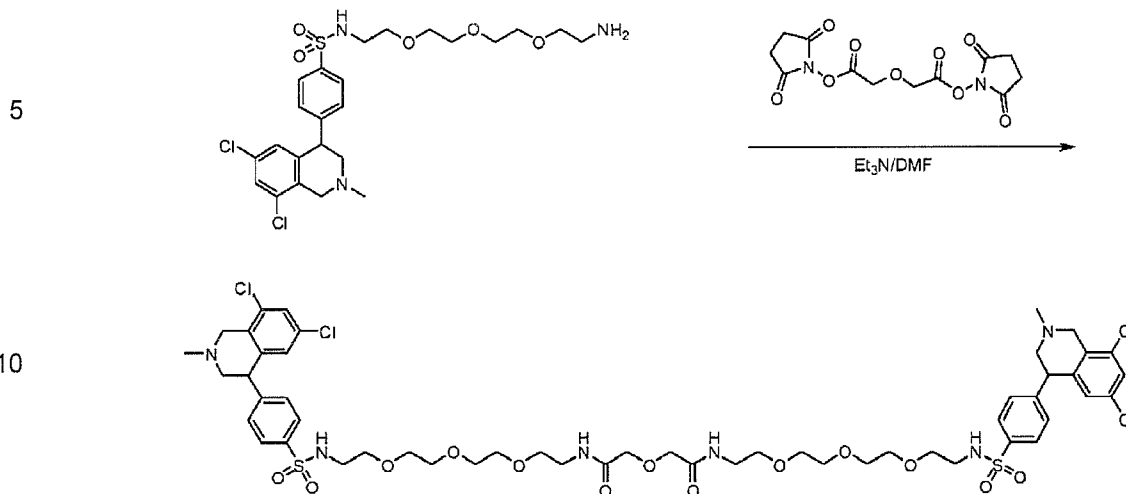
Composto 197, N1,N2-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)-etil)ossalamide: Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)-etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide (composto 82) (148 mg, 0,26 mmol) in DMF (5 mL) sotto N₂ è stato aggiunto bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) ossalato (preparato da acido ossalico come descritto in Esempio 168) (31 mg, 0,11 mmol) e trietilammina (44 mg, 0,44 mmol) e la soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con CH₃CN:H₂O(0,05%CF₃COOH)(28%-35%) per ottenere 101,8 mg (68%) di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300Hz, CD₃OD, ppm): 7,94 (d, J = 9Hz, 4H), 7,58 (s, 2H), 7,50 (d, J = 9Hz, 4H), 6,88 (s, 2H), 4,80 (m, 4H), 4,53 (m, 2H), 3,90 (m, 2H), 3,59 (m, 16H), 3,52 (m, 2H), 3,49 (m, 12H), 3,13 (s, 6H), 3,09 (m, 4H). LC-MS (ES, m/z): 574 [(M+2H)/2]⁺.

25

30

Esempio 198

2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)acetammide)



15 **Composto 198, 2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-acetammide):** Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 82) (200 mg, 0,37 mmol) in DMF (2 mL) è stato aggiunto bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2'-ossidiacetato (intermedio

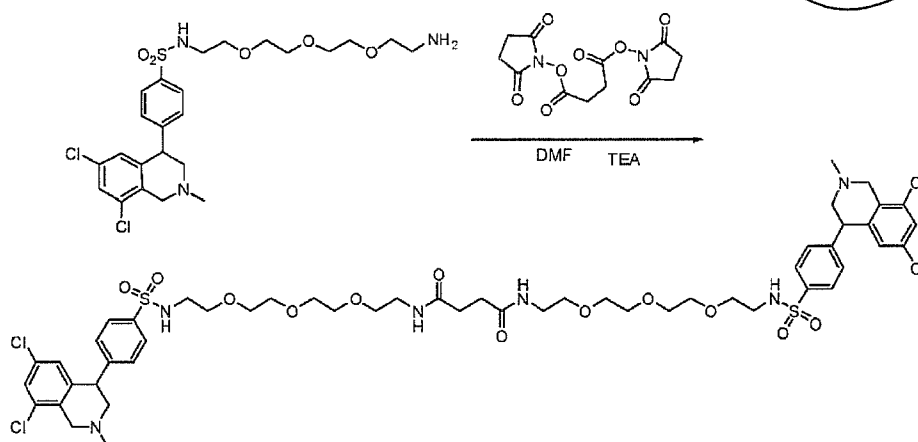
20 178.1) (60 mg) e trietilammina (184 mg). La soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h a temperatura ambiente al qual punto LCMS ha indicato conversione completa. La miscela è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH)(25%-35%). Questo è risultato in 79,6 mg (31%) di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,94-7,91 (m, 4H),

25 7,58-7,57 (m, 2H), 7,51-7,48 (m, 4H), 6,88 (m, 2H), 4,82-4,74 (m, 4H), 4,52-4,47 (m, 2H), 4,06 (m, 4H), 3,90 (m, 2H), 3,64-3,42 (m, 34H), 3,15-3,13 (s, 6H), 3,11-3,09 (m, 4H). LC-MS(ES, m/z): 596 [(M+2H)/2]⁺.

Esempio 199

30 **N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)succinammide**

5

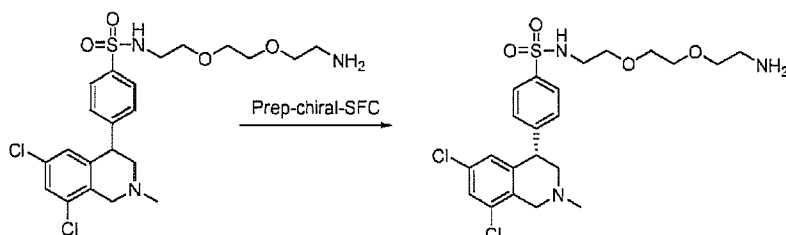


Composto 199, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succin-ammide: Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonamide (composto 82) (200 mg, 0,37 mmol) in DMF secca (10 mL) sotto N₂ è stato aggiunto bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) succinato (intermedio 177.1) (57,1 mg, 0,18 mmol) e trietilammina (111 mg, 1,10 mmol). La soluzione ottenuta è stata agitata per 4 h a 25°C in un bagno d'olio e controllata per LCMS. La miscela ottenuta è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con acetonitrile:acqua (0,05% CF₃COOH)(28%-35%). Questo è risultato in 113,8 mg (45%) di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): 7,93-7,91 (d, J=8,1Hz, 4H), 7,58-7,57 (m, 2H), 7,50-7,48(m, 4H), 6,87 (s, 2H), 4,88-4,74 (m, 4H), 4,55-4,49 (d, J=16,2Hz, 2H), 3,94-3,88 (m, 2H), 3,67-3,59 (m, 14H), 3,55-3,45 (m, 12H), 3,35-3,09 (m, 10H), 2,48 (s, 4H). LC-MS (ES, m/z): 588 [(M+2H)/2]⁺.

Esempio 200

N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide sale bis-cloridrato

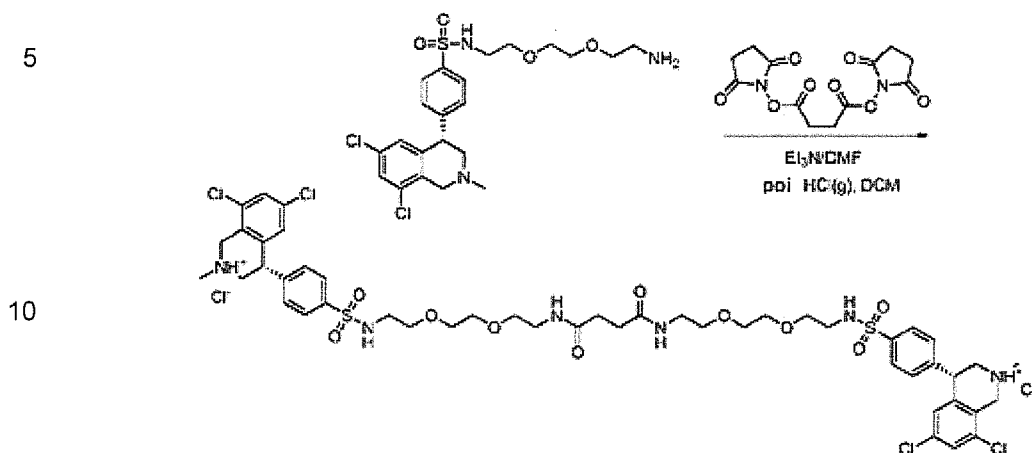
25



30

Intermedio 200.1, (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide: Intermedio 175.1 (3 g) è stato purificato per Prep-SFC con le seguenti condizioni: Colonna, Chiralpak IA, 2*25cm, 5µm; fase mobile, CO₂ (50%), iso-propanolo (50%); Rilevatore, UV 254nm Questo è risultato in 1

g di (S o R)-N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 200.1) come solido giallo.



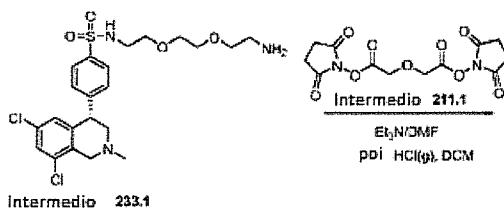
15 **Composto 200, N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide sale bis-cloridrato:** A Intermedio 200.1 (280 mg, 0,56 mmol, 2,00 equiv) in DMF (10 mL) è stato aggiunto intermedio 177.1 (87 mg, 0,28 mmol, 1,00 equiv) e trietilammina (94,3 mg, 0,93 mmol, 4,00 equiv) e la reazione è stata agitata per tutta la notte. La miscela ottenuta è stata concentrata

20 sotto vuoto e il prodotto grezzo (300 mg) è stato purificato per Prep-HPLC con CH₃CN:H₂O (35-55%). Il prodotto è stato poi sciolto in 15 mL di diclorometano e acido cloridrico gassoso è stato introdotto per 20 minuti, poi la miscela è stata concentrata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato lavato con 3x10 mL di etere per ottenere 222,4 mg di Composto 200 come solido giallino. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm): 7,94-7,92 (d, J= 8Hz, 4H), 7,56-7,52 (m, 6H), 6,82 (s, 2H), 4,89-4,84 (m, 4H), 4,52-4,48 (d, J=16,4Hz, 2H), 3,91-3,90 (d, J=4Hz, 2H), 3,62-3,48 (m, 18H), 3,39-3,32 (m, 4H), 3,19-3,10 (m, 10H), 2,57-2,55 (d, J=

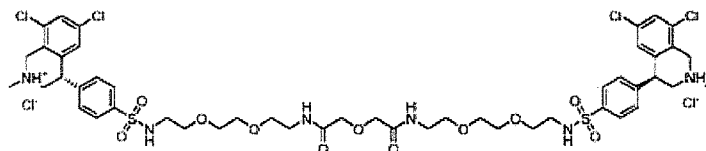
25 5,2Hz, 4H). LCMS (ES, m/z): 544 [M-2HCl]/2+H⁺.

Esempio 201

30 **2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide) sale bis-cloridrato**



5



10

Composto 201, 2,2'-ossibis(N-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-

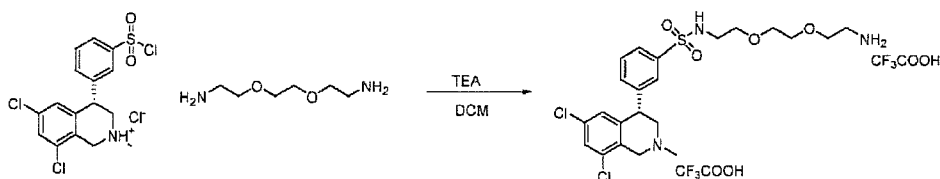
tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)acetammide) sale bis-cloridrato: A intermedio 200.1 (500 mg, 1,00 mmol, 1,00 equiv) in DMF (3 mL) è stato aggiunto intermedio 178.1 (150 mg, 0,46 mmol, 0,45 equiv) e trietilammina (0,4 g, 4,50 equiv) e la soluzione ottenuta è stata agitata per 2 h. Il prodotto grezzo è stato purificato per Prep-HPLC con CH₃CN/H₂O (0,05% TFA) (28%-34%). Il prodotto è stato sciolto in 15 mL di diclorometano e poi acido cloridrico gassoso è stato introdotto per 20 min. La miscela è stata concentrata sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato lavato con 3x10 mL di etere per ottenere 101,1 mg (18%) di Composto 201 come solido bianco. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): 7,94-7,92 (m, 4H), 7,57-7,51 (m, 6H), 6,84 (s, 2H), 4,88-4,70 (m, 4H), 4,50 (s, 2H), 4,08 (s, 4H), 3,92-3,91 (m, 2H), 3,90-3,54 (m, 9H), 3,50-3,49 (m, 5H), 3,47-3,44 (m, 8H), 3,18 (s, 6H), 3,12-3,10 (m, 4H). LCMS (ES, m/z): 552 [M-2HCl]/2+H⁺.

15

Esempio 202

(S o R)-N,N'-(10,17-diosso-3,6,21,24-tetraossa-9,11,16,18-tetrazaesacosan-1,26-diil)bis(3-((S)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide) sale bis-cloridrato

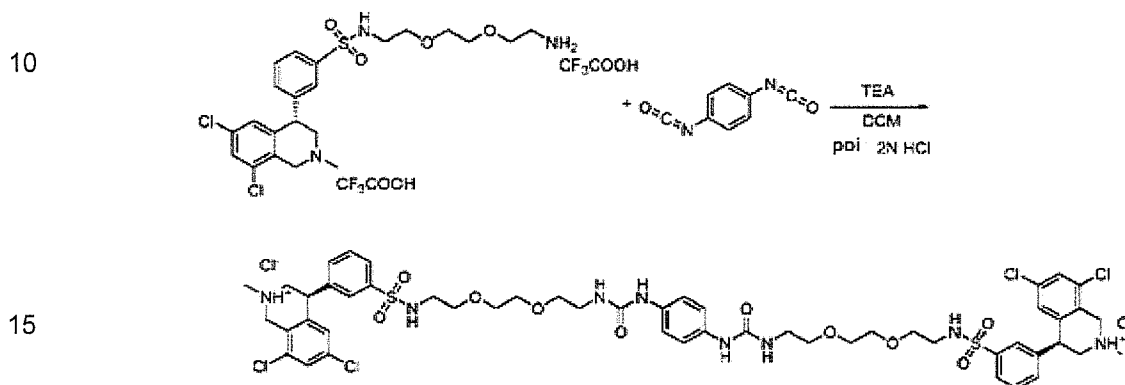
25



30

Intermedio 202.1, (S o R)-N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide sale bis(2,2,2-trifluoroacetato): A 2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etanammina (30,4 g, 205,41 mmol, 8,01 equiv) in diclorometano (1000 mL) è stata aggiunta trietilammina (5,2 g, 51,49 mmol, 2,01 equiv). Questo è stato seguito dall'aggiunta di (S)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro cloridrato (10 g, 23,42 mmol, 1,00 equiv;

preparato da intermedio 244.1 e le procedure descritte in Rif. Esempio 1) in porzioni a 10°C in 1 h. La soluzione ottenuta è stata agitata per 15 min a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata lavata con 3x500 mL di salamoia, seccata su sodio solfato anidro e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato purificato per by Flash-Prep-HPLC con le seguenti
5 condizioni: Colonna, gel di silice C18; fase mobile, metanolo/acqua/TFA (4/100/0,0005) aumentando a 8/10/0,0005 entro 30 min; Rilevatore, UV 254 nm. Questo è risultato in 7,2 g (42%) di intermedio 202.1 come solido bianco

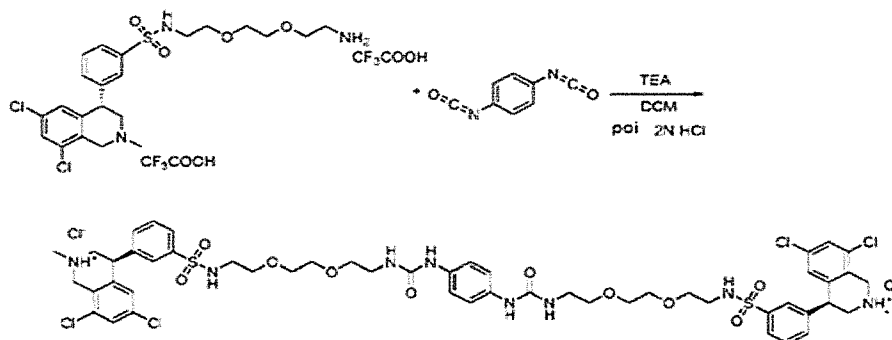


Composto 202, (S o R)-N,N'-(10,17-diosso-3,6,21,24-tetraosso-9,11,16,18-tetrazaesacosan-1,26-diil)bis(3-((S)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide) sale bis-cloridrato: A intermedio 202.1 (500 mg, 0,69 mmol, 1,00
20 equiv) in DCM (10 mL) è stata aggiunta trietilammina (138 mg, 1,37 mmol, 1,99 equiv) seguita dall'aggiunta di 1,4-diisocianatobutano (48 mg, 0,34 mmol, 0,50 equiv) in porzioni. La soluzione ottenuta è stata agitata per 10 min a temperatura ambiente poi il prodotto grezzo (500 mg) è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni:
25 Colonna, gel di silice C18; fase mobile, metanolo/acqua=0,05/100 aumentando a 90/100 entro 30 min; Rilevatore, UV 254 nm. Al prodotto è stato aggiunto 0,2 mL di acido cloridrico (2 N) e la soluzione liofilizzata ad ottenere 246,7 mg (59%) di Composto 202 come solido bianco. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): 7,92 (d, J=7,2Hz, 2H), 7,83 (s, 2H), 7,69-7,65 (m, 2H), 7,60-7,55 (m, 4H), 6,81 (s, 2H), 4,87-4,83 (m, 4H), 4,54-4,50 (m, 2H), 3,94-3,91 (m, 2H), 3,69-3,49 (m, 18H), 3,39-3,32 (m, 4H), 3,21-3,15 (m, 10H), 3,08-3,05
30 (m, 4H), 1,57 (s, 4H). LCMS (ES, m/z): 1145 [M-2HCl+1]⁺.

Esempio 203

(S o R)-N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenbis(azandiil))bis(ossometilene)bis(azandiil)bis(etan-2,1-dil))bis(ossi)bis(etan-2,1-

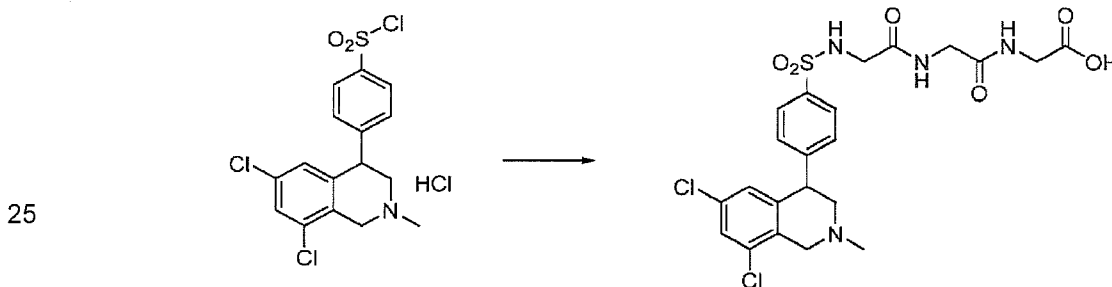
diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide) sale bis-cloridrato



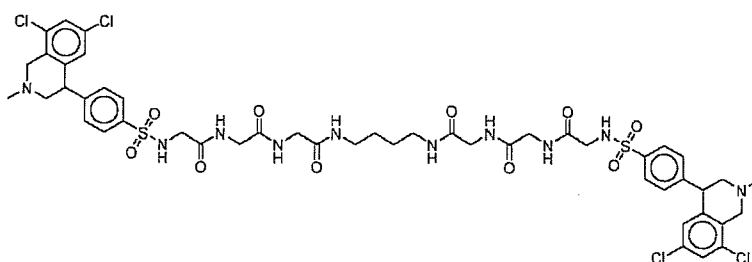
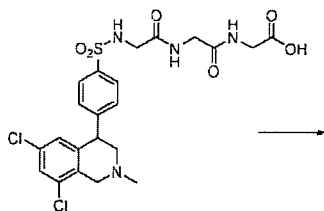
5 **Composto 203, (S o R)-N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenbis(azandiil))bis(ossometilen)bis(azandiil)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)-bis(etan-2,1-diil))bis(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide) sale bis-cloridrato:** A intermedio 202.1 (400 mg, 0,55 mmol, 1,00 equiv) in DCM (10 mL) è stata aggiunta trietilammina (111 mg, 1,10 mmol, 2,00 equiv) seguita dall'aggiunta a porzioni di 1,4-diisocianatobenzene (44 mg, 0,28 mmol, 0,50 equiv).
10 La soluzione ottenuta è stata agitata per 10 min e il prodotto grezzo (400 mg) è stato purificato per Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni: Colonna, gel di silice C18; fase mobile, metanolo/acqua (0,05/100) aumentando a 90/100 entro 30 min; Rilevatore, UV 254 nm. Al prodotto è stato aggiunto 0,2 mL di acido cloridrico (2 N) e la soluzione liofilizzata per ottenere 201,7 mg (59%) di Composto 203 come solido bianco. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): 7,84 (d, J=7,6Hz, 2H), 7,71 (s, 2H), 7,60-7,56 (m, 2H), 7,48-7,45 (m, 4H), 7,16 (s, 4H), 6,76 (s, 2H), 4,70-4,66 (m, 4H), 4,42-4,38 (m, 2H), 3,78-3,74 (m, 2H), 3,53-3,48 (m, 18H), 3,44-3,26 (m, 4H), 3,06-2,99 (m, 10H). LCMS (ES, m/z): 1163[M-2HCl+1]⁺.

Rif. Esempio 204

20 **N,N'-(butan-1,4-diil)bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)-acetammido)acetammido)acetammide)**



Intermedio 204.1, acido 2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenilsolfonammido)acetammido)acetammido)acetico: Ad un impasto di 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro cloridrato (Intermedio 1.6) (283 mg, 0,66 mmol) e triglicina (152 mg, 0,80 mmol) in THF (1,5 mL) a 0°C è stata aggiunta acqua (1,0 mL) seguita da trietilammina (202 mg, 2,0 mmol). La reazione è stata lasciata scaldare a temperatura ambiente e agitata per 15 ore. I solventi sono stati allontanati a pressione ridotta e il residuo è stato purificato per HPLC preparativa a dare Intermedio 204.1 (122 mg) come sale TFA.



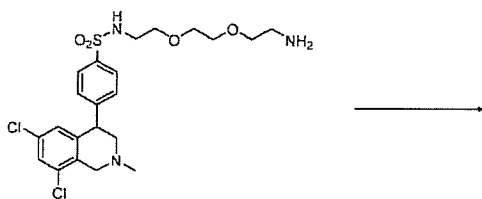
Composto 204, N,N'-(butan-1,4-diil)bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)acetammido)acetammido)-acetammide):

Intermedio 204.1 (60 mg, 0,091 mmol) è stato sciolto in DMF (0,90 mL) seguito da N-idrossisuccinimide (12,6 mg, 0,11 mmol) e 1,4-diamminobutano (4,0 mg, 0,045 mmol). N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimide cloridrato (21 mg, 0,11 mmol) è stata aggiunta e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 16 ore, tempo al quale ulteriori 1,4-diamminobutano (1 uL) e N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimide cloridrato (5 mg) sono stati aggiunti. Due ore dopo l'aggiunta, il solvente è stato allontanato a pressione ridotta e il residuo è stato purificato per HPLC preparativa. Il composto del titolo è stato ottenuto come sale TFA (26 mg). ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7,90 (d, j=8,6 Hz, 4H), 7,52 (d, j=1,8 Hz, 2 H), 7,47 (d, j=8,6 Hz, 4H), 6,84 (s, 2H), 7,75 (m, 6H), 4,44 (d, J=15,6 Hz, 2H), 3,86 (s, 4H), 3,81 (s, 4H), 3,61 (s, 4H), 3,54 (m, 2H), 3,16 (m, 4H), 3,16 (s, 6H), 1,49 (m, 4H). MS (m/z): 1636,98 [M+H]⁺.

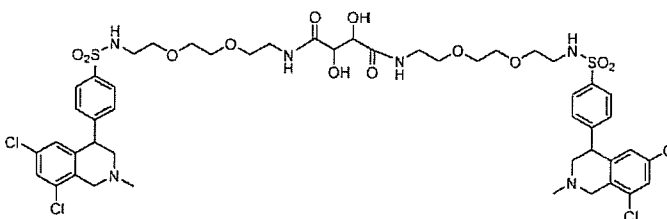
Esempio 205

N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonamido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

5



10



Composto 205, N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

15

il)fenilsolfonamido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossi-succinammide: Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 175.1) (110 mg, 0,22 mmol) in DMF (2,0 mL) è stato aggiunto bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (Intermedio 168.1) (34 mg, 0.10 mmol) e la reazione è stata agitata per 10 minuti. Il solvente è stato allontanato sotto vuoto e il residuo è stato purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (23 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD3OD) δ 7,81 (m, 4H), 7,44 (s, 1H), 7,37 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 4,64 (m, 4H), 4,37 (m, 4H), 3,72 (m, 2H), 3,46 (m, 10H), 3,38 (m, 12H), 3,02 (m, 10H). MS (*m/z*): 1117,02 [M+H]⁺.

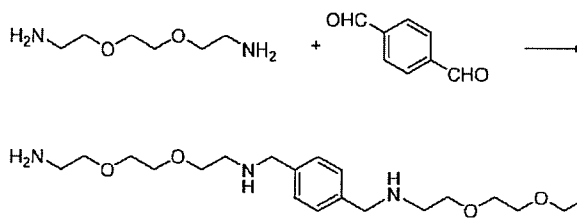
20

Rif. Esempio 206

25

N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenbis(metilene))bis(azandiil))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

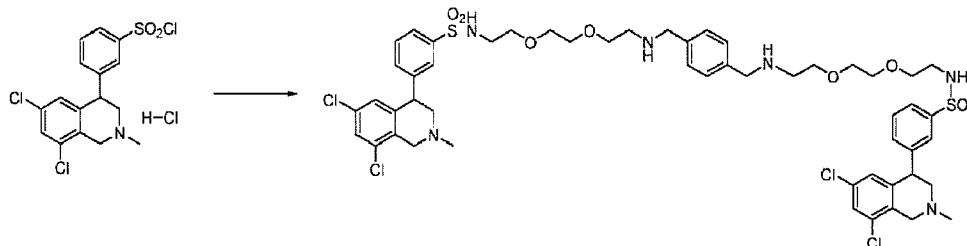
30



Intermedio 206.1, N,N'-(1,4-fenilenbis(metilene))bis(2-(2-(2-amminoetossi)-etossi)etanammide): Una soluzione di tereftalaldeide (134 mg, 1,0 mmol) e 2,2'-(etan-1,2-

diilbis(ossi)dietanammina (1,48 g, 10,0 mmol) in DCM (10 mL) è stata agitata a temperatura ambiente. Dopo 15 minuti sodio triacetossiboroidruro (636 mg, 3,0 mmol) è stato aggiunto e la reazione è stata agitata per 1,5 ore. Acido acetico (600 mg, 10 mmol) è stato poi aggiunto. Dopo agitazione per ulteriori 1,5 ore, acido acetico (600 mg, 10 mmol) e sodio triacetossiboroidruro (636 mg, 3,0 mmol) sono stati aggiunti e l'agitazione è stata continuata a temperatura ambiente. Un'ora più tardi un'ulteriore porzione di sodio triacetossiboroidruro (636 mg, 3,0 mmol) è stata aggiunta. Venti ore più tardi la reazione è stata spenta con 1N HCl (5 mL) e concentrata a secchezza. Metanolo (10 mL) e 12N HCl (3 gocce) sono stati aggiunti e la miscela è stata concentrata a secchezza. Il residuo è stato sciolto in acqua (10 mL) e una porzione (1,0 mL) è stata purificata per HPLC preparativa a dare un sale TFA del composto del titolo (25 mg) come sale TFA.

15



Composto 206, N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenbis(metilene)))bis(azandiil)-bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-

20

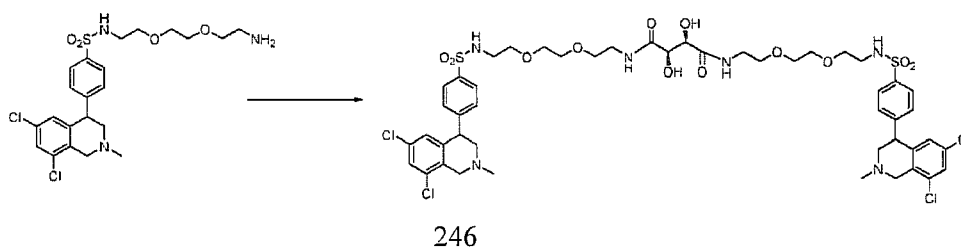
1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide): Ad una soluzione di un sale TFA di intermedio 206.1 (25 mg, 0,029 mmol) in DCM (05 mL) è stato aggiunto 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (intermedio 1.6) (25 mg, 0,06 mmol) seguito da trietilammina (24,2 mg, 0,24 mmol) e la reazione è stata lasciata ad agitare a temperatura ambiente per 18 ore. La reazione è stata concentrata a secchezza e poi purificata per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (8 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7,85 (m, 2H), 7,74 (m, 2H), 7,62 (m, 6H), 7,53 (m, 4H), 6,80 (s, 1H), 4,74 (m, 6H), 4,44 (m, 2H), 4,30 (s, 4H), 3,83 (m, 2H), 3,76 (m, 4H), 3,62 (m, 8H), 3,50 (m, 4H), 3,23 (m, 4H), 3,10 (s, 6H), 3,02 (m, 4H). MS (*m/z*): 1105,05 [M+H]⁺.

25

Esempio 207

(2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

30



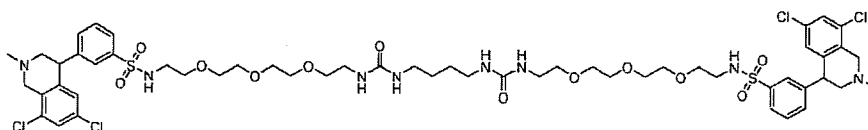
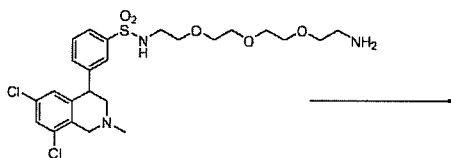
246

Composto 207, (2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-

tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossi-
 5 **succinammide:** Seguendo le procedure delineate in esempio 205, composto 207 è stato
 preparato usando (2R,3R)-bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato. Purificazione
 per HPLC preparativa ha dato un sale TFA del composto del titolo. ¹H-NMR (400 mHz,
 CD3OD) δ 7,82 (m, 4H), 7,45 (m, 1H), 7,38 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 4,64 (m, 4H), 4,37 (m,
 4H), 3,74 (m, 2H), 3,46 (m, 10H), 3,38 (m, 12H), 3,02 (m, 10H). MS (*m/z*): 1117,07
 10 [M+H]⁺.

Esempio 208

N,N'-(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraazadotriacontan-1,32-
diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)



Composto 208, N,N'-(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraaza-
dotriacontan-1,32-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

il)benzensolfonammide): Ad una soluzione di un sale TFA di N-(2-(2-(2-(2-

amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

il)benzensolfonammide (composto 28) (47 mg, 0,061 mmol) in DMF (0,20 mL) è stato

aggiunto 1,4-diisocianatobutano (4,0 mg, 0,03 mmol) seguito da diisopropiletilammina (15

mg, 0,12 mmol). Dopo agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti, la reazione è stata

purificata per HPLC preparativa a dare il composto del titolo (31 mg) come sale TFA. ¹H-

NMR (400 mHz, CD3OD) δ 7,88 (m, 2H), 7,75 (m, 2H), 7,63 (m, 2H), 7,54 (m, 4H), 6,83

(m, 2H), 4,74 (m, 4H), 4,48 (m, 2H), 3,87 (m, 2H), 3,62-3,55 (m, 14H), 3,51-3,43 (m, 12H),

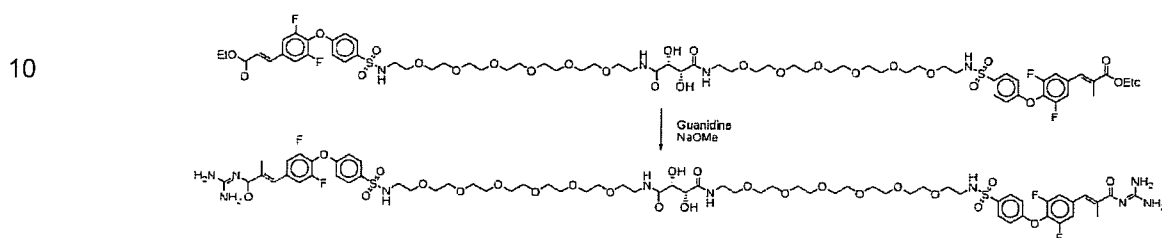
3,24 (m, 4H), 3,14 (s, 6H), 3,05 (m, 8H), 1,43 (m, 4H). MS (*m/z*): 1230,99 [M+H]⁺.

Esempio 209

N,N'-(1,1'-(1,4-fenilenbis(azandiil))bis(1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13,1-
diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

Intermedio 210.2, (2R,3R)-N1,N4-bis(20-(4-(4-((E)-4-(2-carbossiprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonamido)-3,6,9,12,15,18-esaossaicosil)-2,3-diidrossisuccinammide. Intermedio 210.2 è stato preparato seguendo la procedura delineata in

5 Esempio 168 usando (2R,3R)-bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (22,4mg, 0,065mmol) e (E)-etil 3-(4-(4-(N-(20-ammino-3,6,9,12,15,18-esaossaicosil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (91,5mg, 0,13mmol). Il composto del titolo è stato recuperato con resa 60% come semisolido limpido.



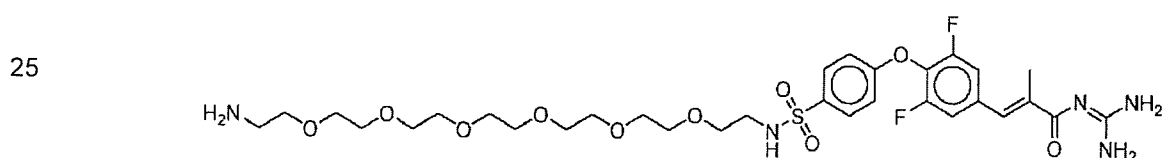
Composto 210, (2R,3R)-N1,N4-bis(20-(4-(4-((E)-3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonamido)-3,6,9,12,15,18-esaossaicosil)-2,3-diidrossisuccinammide. Composto 210 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 45 usando Intermedio 210.2 (59,6mg). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (10mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ7,64 (d, 4H), 7,48 (s, 1H), 7,32 (d, 4H), 7,12 (d, 4H), 3,62-3,58 (m, 17H), 3,55-3,52 (m, 9H), 3,48-3,41 (m, 13H), 3,06 (s, 3H), 2,72 (s, 6H). MS (*m/z*): 1549,23 [M+H]⁺.

15

20

Composto 211

(E)-3-(4-(4-(N-(20-ammino-3,6,9,12,15,18-esaossaicosil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metilacrilammide



Composto 211, (E)-3-(4-(4-(N-(20-ammino-3,6,9,12,15,18-esaossaicosil)sulfamoil)fenoss)-3,5-difluorofenil)-N-(diamminometilene)-2-metil-acrilammide:

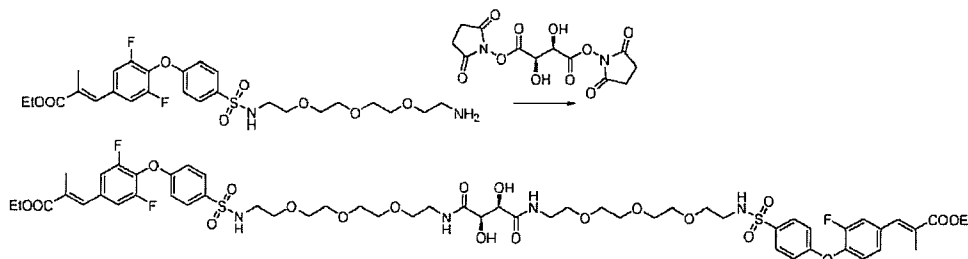
Composto 211 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 45 usando

30 (E)-etil 3-(4-(4-(N-(20-ammino-3,6,9,12,15,18-esaossaicosil)sulfamoil)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato (Intermedio 210.2, 13,2mg). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (8,7mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,184 (d, 2H), 7,52 (s, 1H), 7,35 (d, 2H), 7,12 (d, 2H), 3,74-3,70 (m, 2H), 3,69-

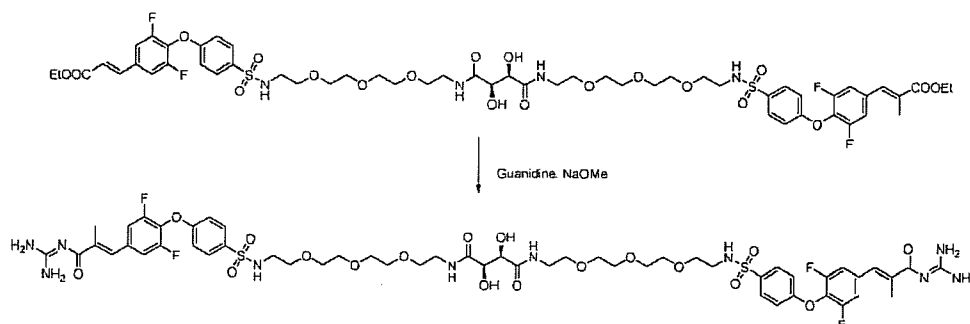
3,58 (m, 24H), 3,55-3,51 (m, 2H), 3,49-3,46 (m, 2H), 3,15-3,12 (m, 2H), 3,07-3,04 (m, 2H).
MS (*m/z*): 718,28 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 212

(2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(4-((E)-3-(diamminometilenammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide



Intermedio 212.1, (E)-etil 3-(4-(4-(N-(2-(2-(2-(2-amminoeossi)etossi)etossi)etil)-sulfamoi)fenossi)-3,5-difluorofenil)-2-metilacrilato: Composto 44.2 (100mg, 0,175mmol) e (2R,3R)-bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (30,1mg, 0,087mmol) sono stati sciolti in DMF (0,35mL) con DIEA (67,7mg, 0,525mmol) e agitati per 2 ore a temperatura ambiente. Il solvente è stato allontanato e il materiale ottenuto suddiviso tra EtOAc (20mL) e acqua (20mL). Lo strato organico è stato lavato con NaHCO₃ saturo (20mL), salamoia (20mL) e seccato su Na₂SO₄ a dare il prodotto (87,7mg) come olio giallo che è stato usato senza ulteriore purificazione.



Composto 212, (2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(4-((E)-3-(diamminometilen-ammino)-2-metil-3-ossoprop-1-enil)-2,6-difluorofenossi)fenilsolfonammido)-

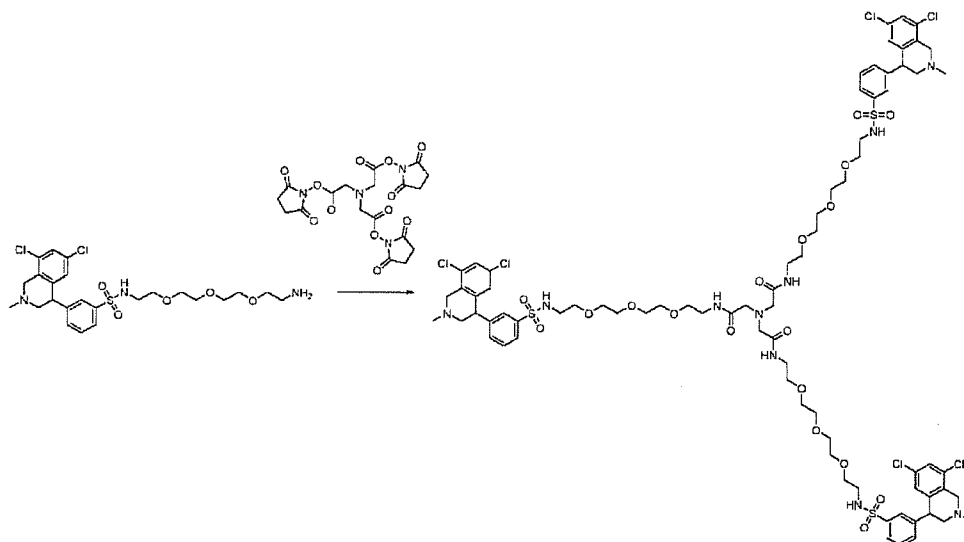
etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide: Composto 212 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 45. Purificazione per HPLC preparativa ha dato 9,6mg di composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,86 (d, 4H), 7,44 (s, 2H), 7,31 (d, 4H), 7,11 (d, 4H), 4,44 (s, 2H), 3,61-3,53 (m, 21H), 3,50-3,41 (m, 15H), 3,05 (t, 4H), 2,17 (s, 6H). MS (*m/z*): 1286,11 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 213

2,2',2''-nitritotris(N-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)acetammide)

5

10



15

Composto 213, 2,2',2''-nitritotris(N-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-acetammide):

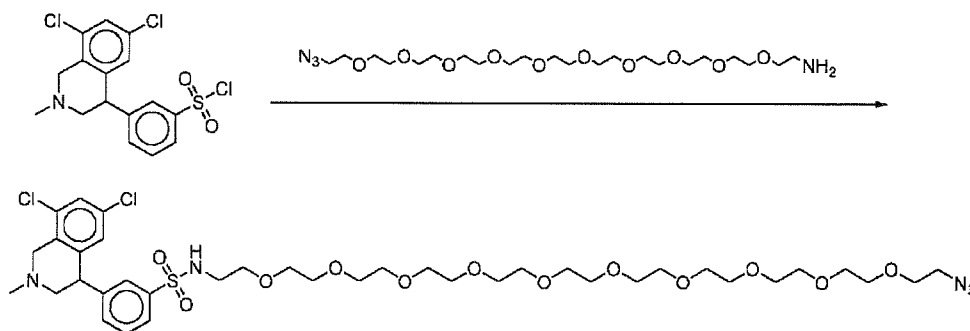
Composto 213 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 168 usando tris(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2',2''-nitritotriacetato (75mg, 0,156mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 28, 254mg, 0,467mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (32,0mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 7,88 (d, 3H), 7,75 (s, 3H), 7,63 (t, 3H), 7,54 (t, 6H), 6,82 (s, 3H), 4,84-4,75 (m, 6H), 4,48 (d, 3H), 3,86 (m, 3H), 3,85-3,37 (m, 54H), 3,14 (s, 9H), 3,02 (t, 6H). MS (m/z): 1777,07 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

25

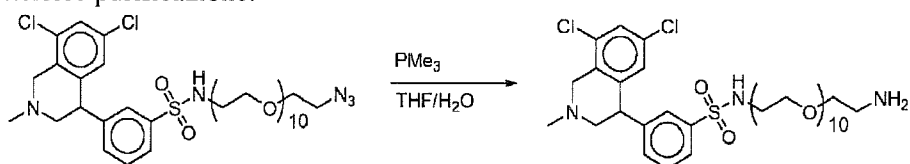
Rif. Esempio 214

N-(32-ammino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide

30



Intermedio 214.1, N-(32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide: Una soluzione di 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontan-1-ammina (436,9mg, 0,777mmol) in DMF secca (3,5mL) sotto N₂ è stata raffreddata a 0°C. Una soluzione di 3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-1-solfonil cloruro (300mg, 0,706mmol) e DIEA (273,2mg, 2,118mmol) in DMF (3mL) è stata aggiunta goccia a goccia. Dopo 60 minuti LCMS ha indicato conversione completa e il solvente è stato allontanato a dare N-(32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (620mg) come olio giallo che è stato usato senza ulteriore purificazione.



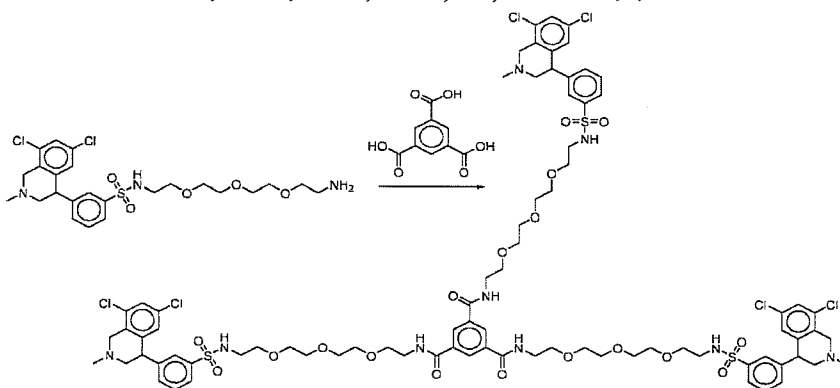
Composto 214, N-(32-ammino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide: Ad una soluzione di N-(32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Intermedio 214.1, 620mg, 0,706mmol) in THF/H₂O (10:1 v/v, 14,3mL) sotto N₂ è stata aggiunta trimetilfosfina (214,8mg, 2,82mmol). La soluzione ottenuta è stata agitata per tutta la notte punto al quale LCMS ha indicato completa conversione. Il solvente è stato allontanato a dare 819 mg di un olio arancio, una porzione del quale è stato purificato per HPLC preparativa a dare il composto del titolo come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,90 (d, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,62 (t, 1H), 7,55 (m, 2H), 6,82 (s, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,78 (q, 3H), 3,70-3,58 (m, 55H), 3,52 (m, 2H), 3,46 (t, 3H), 3,18 (t, 3H), 3,11 (s, 3H), 3,03 (t, 2H). MS (m/z): 855,24 [M+H]⁺.

25

Rif. Esempio 215

N1,N3,N5-tris(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)benzen-1,3,5-tricarbossammide

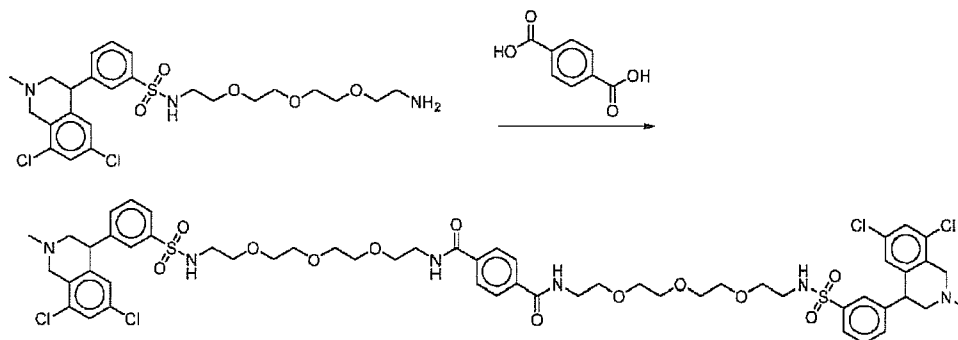
30



Composto 215, N1,N3,N5-tris(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)benzen-1,3,5-tricarbossamide: Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)-etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonamide (Composto 28, 75mg, 0,0968) in DMF (0,5mL) è stato aggiunto acido benzen-1,3,5-tricarbossilico (6,7mg, 0,0319mmol), DIEA (37,5mg, 0,291mmol) ed infine HATU (40,4mg, 0,107mmol). La reazione è stata agitata per 60 minuti a temperatura ambiente punto al quale LCMS ha indicato completa conversione. La soluzione ottenuta è stata diluita con soluzione acetone/acqua (1:1 v/v) e filtrata. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (37,7mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 8,37 (s, 3H), 7,84 (d, 2H), 7,83 (s, 2H), 7,62 (t, 2H), 7,51-7,50 (m, 4H), 6,79 (s, 2H), 4,83-4,70 (m, 5H), 4,46 (d, 2H), 3,86 (q, 2H), 3,67-3,53 (m, 27H), 3,45 (t, 5H), 3,39 (t, 5H), 3,14 (s, 7H), 2,98 (t, 4H). MS (m/z): 1797,15 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 216

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)tereftalammide

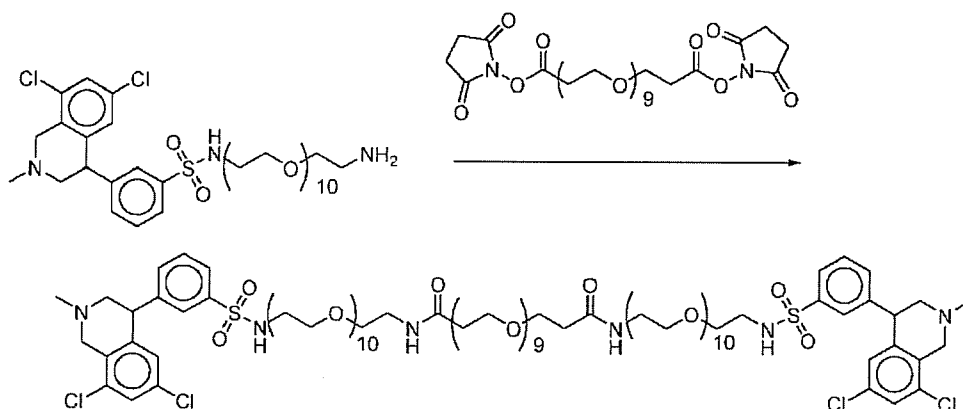


Composto 216, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)tereftalammide: Composto 216 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 215 usando acido tereftalico (10,7mg, 0,0646mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-

metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 28, 100mg, 0,129mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (46,3mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,87 (m, 6H), 7,73 (s, 2H), 7,59 (t, 2H), 7,52-7,49 (m, 4H)m, 6,80 (s, 2H), 4,77-4,69 (m, 4H), 4,49 (d, 2H), 3,587 (qs, 2H), 3,67-3,54 (m, 27H), 3,45 (t, 5H), 3,40 (t, 5H), 3,13 (s, 7H), 2,99 (t, 4H). MS (m/z): 1224,34 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 217

N1,N31-bis(32-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontil)-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaossaentriacontan-1,31-diammide



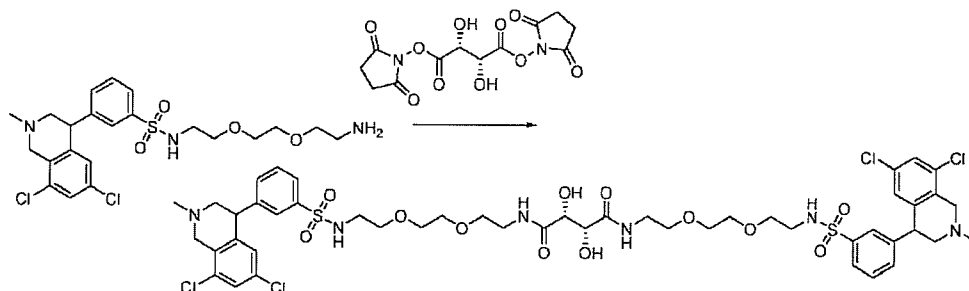
Composto 217, N1,N31-bis(32-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenilsolfonammido)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossado-triacontil)-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaossaentriacontan-1,31-diammide:

Composto 217 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 168 usando bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaossaentriacontan-1,31-dioato (69,1mg, 0,0975mmol) e N-(32-ammino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaossadotriacontil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide (Composto 214, 166,2mg, 0,195mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (106,3mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,88 (d, 2H), 7,76 (s, 2H), 7,66 (t, 2H), 7,56 (m, 4H), 6,86 (s, 2H), 3,90 (m, 2H), 3,82 (t, 2H), 3,76 (m, 6H), 3,62-3,41 (m, 28H), 3,38 (m, 6H), 3,35-3,28 (m, 56H), 3,15 (s, 6H), 3,05 (t, 4H), 2,43 (t, 4H). MS (m/z): 1094,37 [(M+2H)/2]⁺.

Esempio 218

(2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide:

5



10

Composto 218, (2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-

diidrossisuccinamide: Composto 218 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 168 usando (2R,3R)-bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (10,2mg, 0,0298mmol) e N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-

15

tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 168,2, 30mg, 0,0597mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (5,1mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,92 (d, J=7,8Hz, 2H), 7,82(m, 2H), 7,67 (t, J=7,8Hz, 2H), 7,57(m, 2H), 7,55 (d, J=6,9Hz, 2H), 6,86 (m, 2H), 4,84(s, 2H), 4,79(s, 2H), 4,54(d, 2H), 4,48(s, 2H), 3,92(m, 2H), 3,53(m, 22H), 3,18(s, 6H), 3,07(t, J=5,4Hz, 4H). MS (m/z):

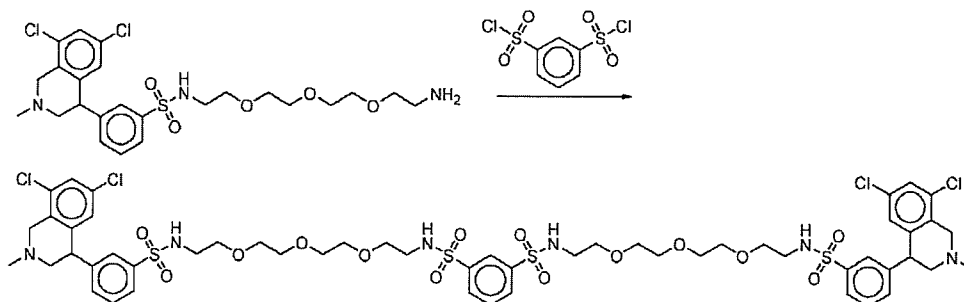
20

1119,04 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 219

N1,N3-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)benzen-1,3-disolfonammide

25



30

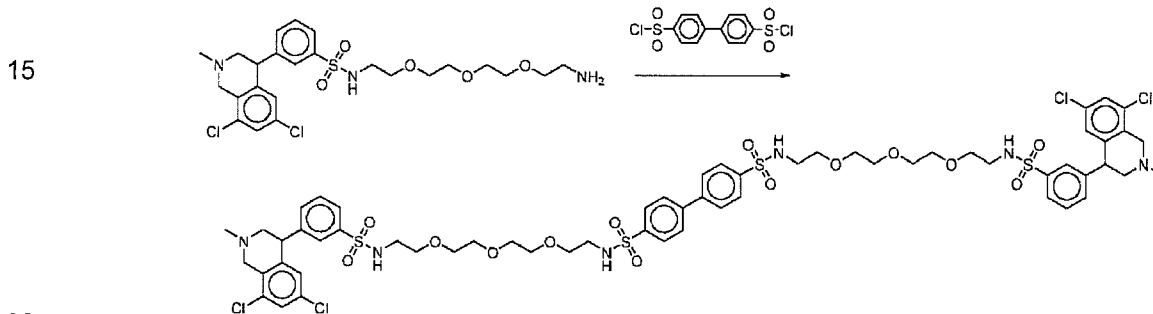
Composto 219, N1,N3-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)benzen-1,3-disolfonammide:

Ad una soluzione di N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-

1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 28, 50mg, 0,0917mmol) e DIEA (35,5mg, 0,275mmol) in DCM secco (0,183mL) sotto N₂ è stato aggiunto benzen-1,3-disolfonil dicloruro (12,7mg, 0,0459mmol) in DCM (0,183mL). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 60 minuti punto al quale LCMS ha indicato conversione completa. Il solvente è stato allontanato e il residuo ottenuto ripreso in 4 mL soluzione ACN/H₂O (1:1). Filtrazione e purificazione per HPLC preparativa hanno dato il composto del titolo (16,6mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 8,28 (s, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,85 (d, 2H), 7,75 (d, 2H), 7,70 (s, 1H), 7,63 (t, 2H), 7,53 (m, 3H), 6,82 (s, 1H), 4,52 (d, 1H), 3,85 (d, 1H), 3,61-3,46 (m, 28H), 3,13 (s, 6H), 3,09-3,03 (m, 7H). MS (*m/z*): 1294,99 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 220

N₄,N₄'-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)bifenil-4,4'-disolfonammide

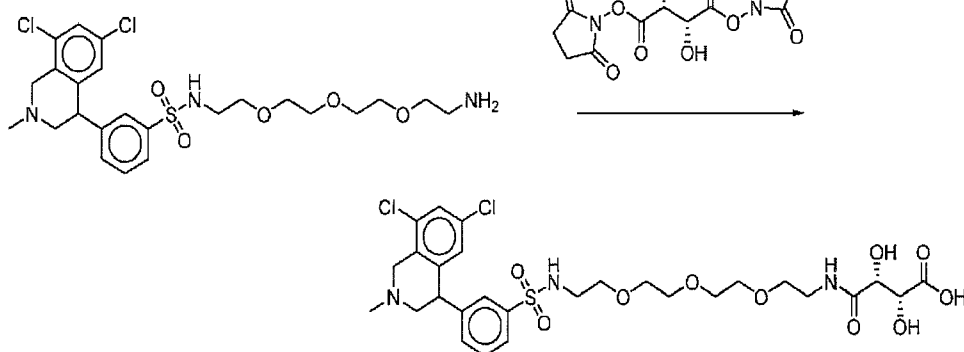


Composto 220, N₄,N₄'-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)bifenil-4,4'-disolfonammide:

Composto 220 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 219 usando bifenil-4,4'-disolfonil dicloruro (16,1mg, 0,0459mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 28, 50mg, 0,0917mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (16,7mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,96 (d, 4H), 7,88-7,85 (m, 5H), 7,78 (s, 2H), 7,61 (t, 2H), 7,47 (d, 2H), 6,78 (s, 2H), 4,74-4,69 (m, 3H), 4,45 (d, 2H), 3,88-3,83 (m, 2H), 3,62-3,59 (m, 2H), 3,55-3,53 (m, 9H), 3,52-3,43 (m, 17H), 3,13 (s, 6H), 3,11-3,03 (m, 8H). MS (*m/z*): 1371,02 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 221

acido (14R,15R)-1-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)-14,15-diidrossi-13-osso-3,6,9-triossa-12-azaesadecan-16-oico



5

Composto 221, acido (14R,15R)-1-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)-14,15-diidrossi-13-osso-3,6,9-triossa-12-azaesadecan-16-oico:

10

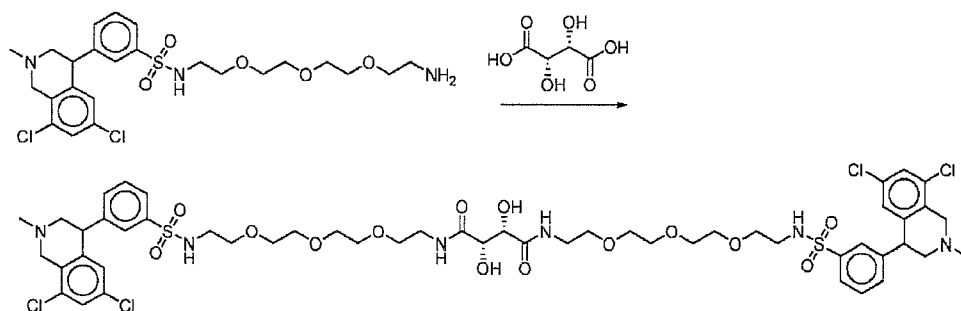
Composto 221 è stato preparato isolando il sottoprodotto di mono-addizione dalla procedura delineata in Esempio 168 usando (2R,3R)-bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (70,4mg, 0,205mmol) e Composto 28 (223mg, 0,409mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (44,4mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,89 (d, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,63 (t, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,50 (t, 1H), 6,84 (s, 0,5H), 3,88-3,84 (m, 1H), 3,64-3,34 (m, 22H), 3,14 (s, 4H), 3,07 (m, 2H). MS (*m/z*): 677,36 [M+H]⁺.

15

Esempio 222

(2S,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

20



25

Composto 222, (2S,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-

30

diidrossisuccinammide: Composto 222 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 215 usando acido (2S,3S)-2,3-diidrossisuccinico (15,5mg, 0,103mmol) e N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzonsolfonammide (Composto 28, 112mg, 0,206mmol). Purificazione per HPLC

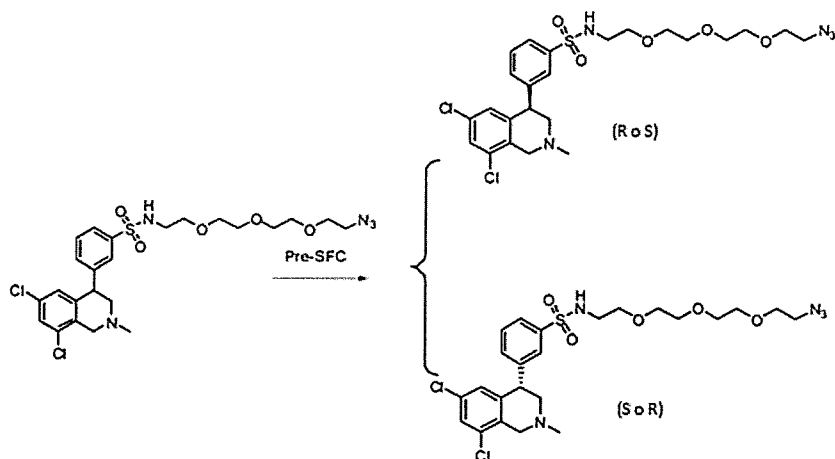
preparativa ha dato il composto del titolo (39,9mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 7,87 (d, 2H), 7,77 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,54-7,50 (m, 4H), 6,82 (s, 2H), 4,34 (s, 2H), 3,90-3,85 (m, 1H), 3,62-3,30 (m, 47H), 3,14 (m, 8H), 3,05 (t, 4H). MS (m/z): 1206,95 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5

Esempio 223

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-((R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide

10



15

Intermedio 223.1a, (R o S)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide e 223.1b (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:

20

N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide (intermedio 28.1, 4,5 g, 7,88 mmol, 1,00 equiv) è stato separato nei suoi enantiomeri per Cromatografia a Fluido Supercritico preparativa a fase chirale (Prep-SFC) con le seguenti condizioni: Colonna, Chiralpak IA, 2*25cm, 5um; fase mobile, CO_2 (80%), metanolo (20%); Rilevatore, UV 254nm.

25

Questo è risultato in 1,61 g di (R o S)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio giallo. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CD_3OD , ppm): δ 7,79 (d, $J=7,5\text{Hz}$, 1H), 7,711 (s, 1H), 7,49-7,58 (m, 2H), 7,36-7,37 (m, 1H), 6,83 (s, 1H), 4,40-4,44 (m, 1H), 3,80 (d, $J=16,2\text{Hz}$, 1H), 3,58-3,69 (m, 9H), 3,40-3,52 (m, 4H), 3,33-3,38 (m, 3H), 3,03-3,09 (m, 3H), 2,66-2,72 (m, 1H), 2,50 (s, 3H). MS (m/z): 572 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

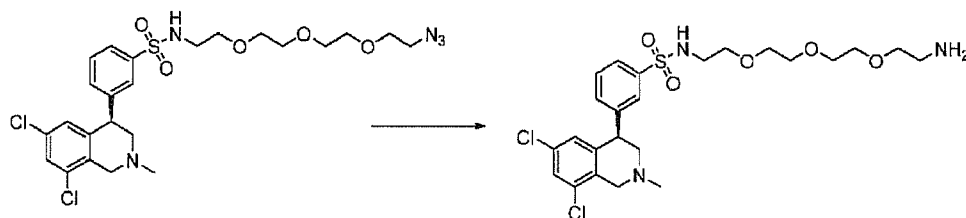
30

Questo ha dato anche 1,81 g di (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio giallo. $^1\text{H-NMR}$

35

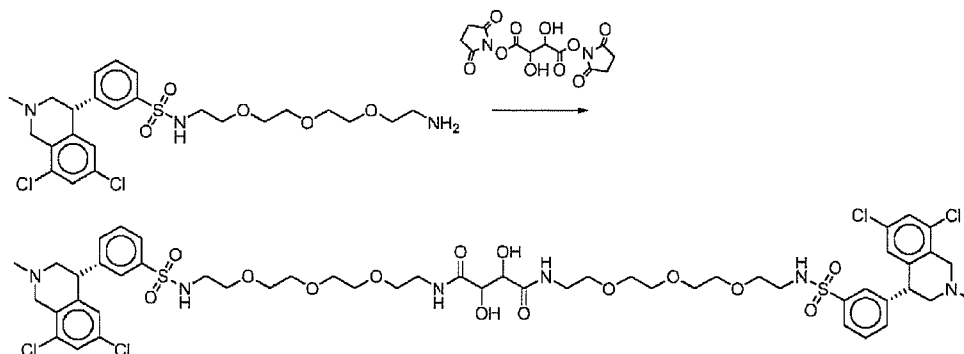
NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,78-7,81 (m, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,49-7,58 (m, 2H), 7,36-7,37 (m, 1H), 6,83 (s, 1H), 4,40-4,44 (m, 1H), 3,80 (d, $J=15,9$ Hz, 1H), 3,57-3,70 (m, 9H), 3,44-3,53 (m, 4H), 3,37-3,40 (m, 3H), 3,03-3,09 (m, 3H), 2,66-2,72 (m, 1H), 2,50 (s, 3H).
MS (m/z): 572 [M+H]⁺.

5



10 **Intermedio 223.2, (R o S)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:** Seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 170, intermedio 223.1a è stato convertito a Intermedio 223.2.

15



20

Composto 223, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-((R o S)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-

diidrossisuccinammide: Composto 223 è stato preparato seguendo le procedure delineate in

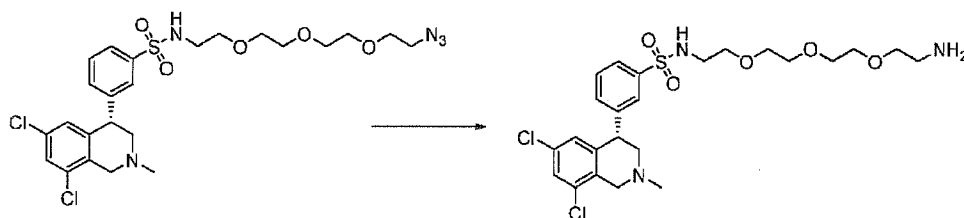
25

Esempio 168 usando (R o S)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)-etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide (intermedio 223.2, 239mg, 0,439mmol) e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (75,5mg, 0,219mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (135,5mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,89 (d, 2H), 7,68 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,54-7,52 (m, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,83-4,75 (m, 5H), 4,50-4,48 (m, 2H), 4,43 (d, 2H), 3,89-3,82 (m, 2H), 3,63-3,35 (m, 34H), 3,14 (s, 6H), 3,04 (t, 4H). MS (m/z): 1208,11 [M+H]⁺.

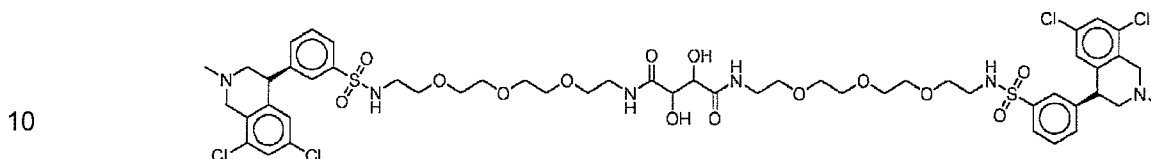
30

Esempio 224

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide



- 5 **Intermedio 224.1, (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:** Seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 170, intermedio 223.1b è stato convertito a Intermedio 224.1.



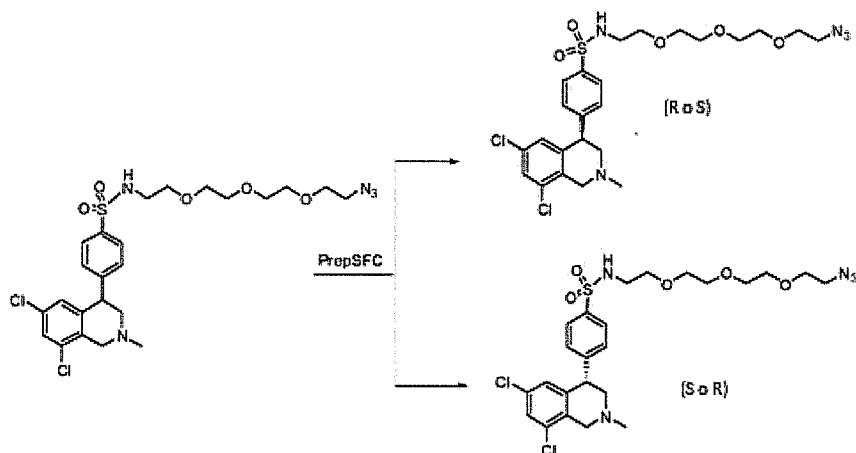
- 10 **Composto 224, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide:** Composto 224 è stato preparato seguendo le procedure delineate in
 15 Esempio 223 usando (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)-etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide (intermedio 224.1, 274mg, 0,502mmol) e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (86,4mg, 0,251mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (159mg) come sale TFA.
 20 ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,87 (d, 2H), 7,77 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 6,54-6,51 (m, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,84-4,75 (m, 4H), 4,50-4,43 (m, 4H), 3,90-3,85 (m, 4H), 3,62-3,28 (m, 35H), 3,14 (s, 6H), 3,04 (t, 4H). MS (*m/z*): 1207,11 [M+H]⁺.

Esempio 225

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

25

30

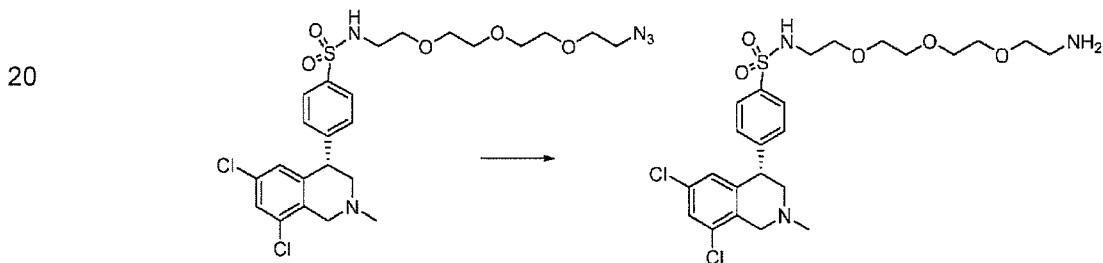


Intermedio 225.1a, (R o S)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide e intermedio 225.1b, (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:

5 N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (5 g, 8,76 mmol, 1,00 equiv) è stata separata nei suoi enantiomeri per Prep-SFC con le seguenti condizioni: Colonna, Chiralpak IA, 2*25cm, 5µm; fase mobile, CO₂ (80%), etanolo (20%); Rilevatore, UV 254nm.

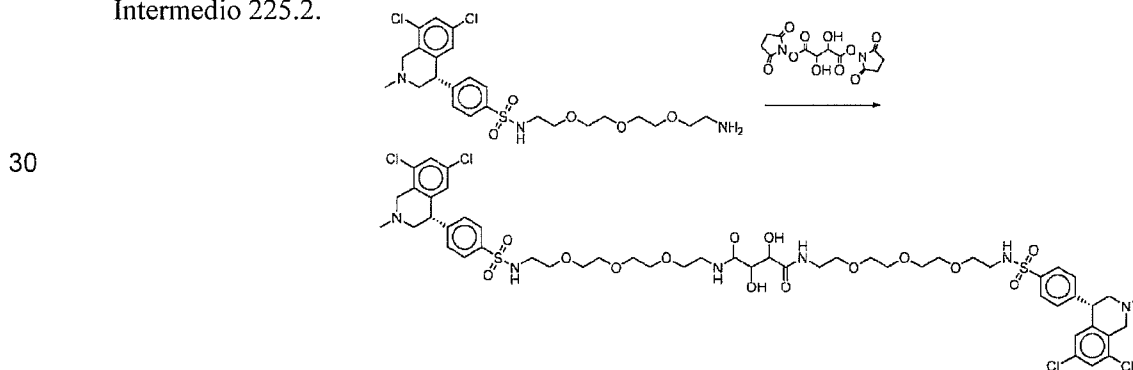
10 Questo è risultato in 1,69 g di (R o S)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio marrone. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,85 (d, J=8,4Hz, 2H), 7,40 (d, J=8,1Hz, 2H), 7,36 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,43 (t, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,67 (m, 9H), 3,48 (m, 4H), 3,33 (m, 2H), 3,01 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 2,49 (s, 3H). MS (m/z): 572 [M+H]⁺.

15 È stato anche isolato 1,65 g di (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide come olio marrone. ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ 7,84 (d, J=8,4Hz, 2H), 7,43 (d, J=8,1Hz, 2H), 7,36 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,42 (t, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,67 (m, 10h), 3,59 (m, 4H), 3,49 (m, 2H), 3,11 (m, 2H), 2,72 (m, 1H), 2,49 (s, 3H). MS (m/z): 572 [M+H]⁺.



25 **Intermedio 225.2, (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide:**

Seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 170, intermedio 225.1b è stato convertito a Intermedio 225.2.



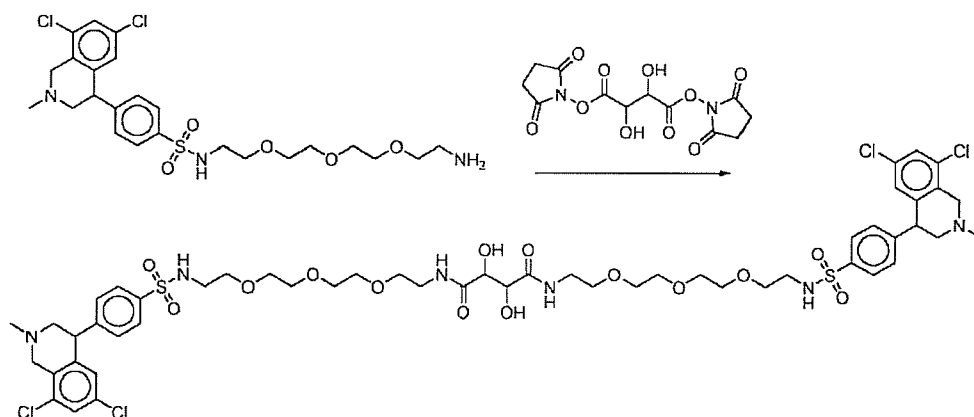
Composto 226, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((R o S)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-

diidrossisuccinamide: Composto 226 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 168 usando (R o S)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)-etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonamide (intermedio 226.1, 267,5 mg, 0,491mmol) e bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (84,5mg, 0,245mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (145,4mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,89 (d, 5H), 7,54 (s, 2H), 7,48 (d, 4H), 6,84 (s, 2H), 4,84-4,73 (m, 4H), 4,50-4,43 (d, 2H), 4,18 (d, 2H), 3,85-3,80 (m, 2H), 3,64-3,40 (m, 32H), 3,13 (s, 6H), 3,08 (t, 3H). MS (*m/z*): 1207,10 [M+H]⁺.

Esempio 227

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide

15



20

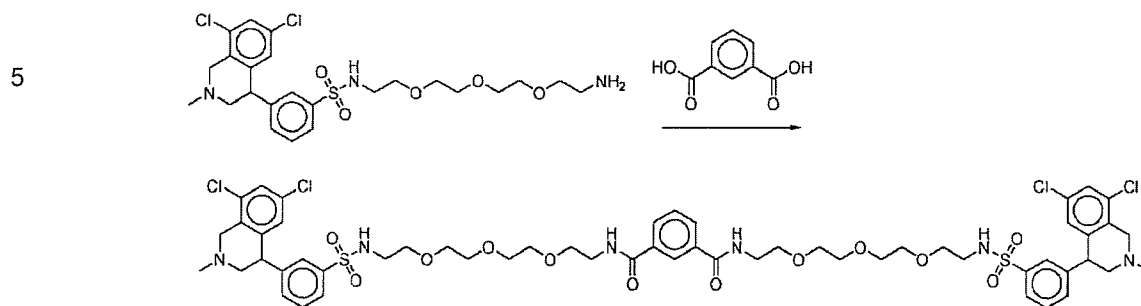
25

Composto 227, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide: Composto

227 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 168 usando bis(2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,3-diidrossisuccinato (49,6mg, 0,144mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonamide (Composto 82, 157mg, 0,288mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (34,5mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,89 (d, 4H), 7,53 (s, 2H), 7,45 (d, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,77-4,74 (m, 6H), 4,46 (d, 2H), 4,43 (t, 2H), 3,89-3,84 (m, 2H), 3,62-3,53 (m, 19H), 3,49-3,41 (m, 13H), 3,14 (s, 6H), 3,08 (t, 4H). MS (*m/z*): 1206,94 [M+H]⁺.

30

Rif. Esempio 228

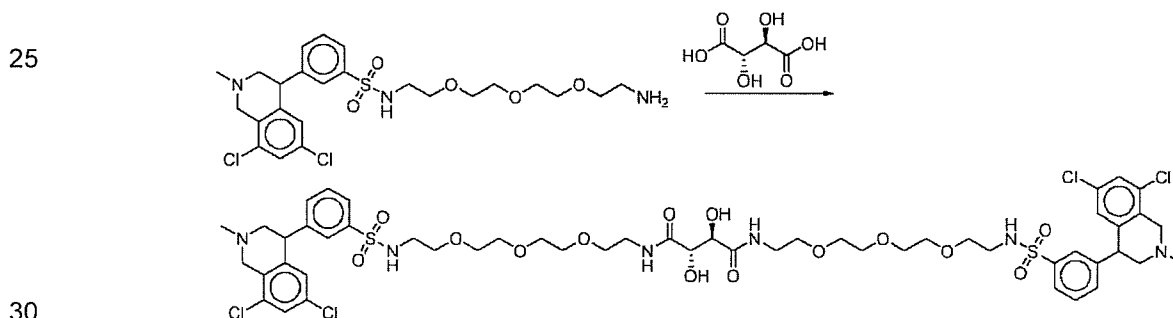
N1,N3-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)isoftalamide

Composto 228, N1,N3-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)-etil)isoftalamide: Composto 228 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 215 usando acido isoftalico (8,0 mg, 0,0484 mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 28, 75mg, 0,0968mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (45,6mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8,25 (s, 1H), 7,92 (d, 2H), 7,85 (d, 2H), 7,73 (s, 2H), 7,58 (t, 2H), 7,49 (m, 5H), 6,81 (s, 2H), 4,83-4,71 (m, 4H), 4,49 (d, 2H), 3,87 (m, 2H), 3,67-3,54 (m, 28H), 3,45 (t, 5H), 3,44 (q, 5H), 3,14 (s, 7H), 2,99 (t, 4H). MS (*m/z*): 1223,19 [M+H]⁺.

15

20

Esempio 229

(2R,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide

Composto 229, (2R,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide: N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-

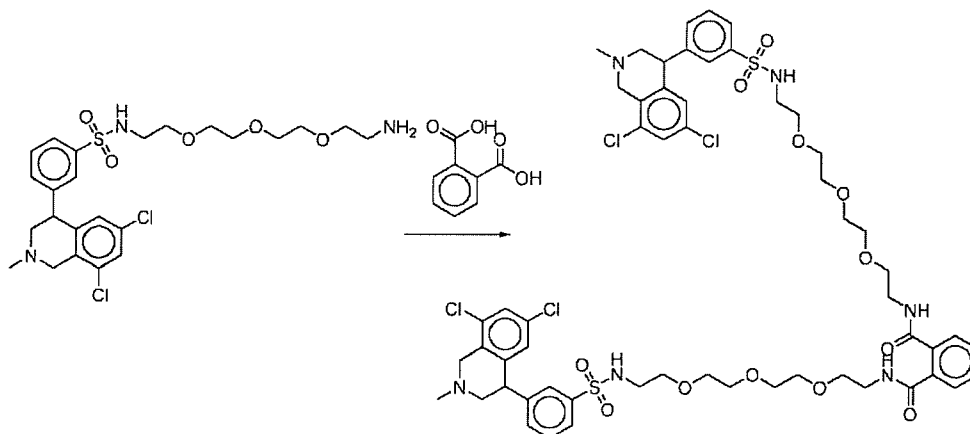
metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 28, 25mg, 0,0322mmol) è stato sciolto in DMF (0,161mL) con DIEA (12,4mg, 0,0966mmol) e acido (2R,3S)-2,3-diidrossisuccinico (2,7mg, 0,0161mmol). Benzotriazol-1-il-ossitripirrolidinofosfonium esafluorofosfato (PyBOP) (18,4mg, 0,0354mmol) è stato aggiunto e la soluzione ottenuta agitata per 60 minuti, punto al quale LCMS ha indicato conversione completa. La miscela di reazione è stata diluita a 2 mL con acetonitrile/acqua (1:1) e filtrata. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (8,7mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,80 (d, 2H), 7,69 (s, 2H), 7,55 (t, 2H), 7,43 (m, 4H), 6,75 (s, 2H), 4,80-4,75 (m, 3H), 4,39 (d, 2H), 4,24 (d, 2H), 3,76 (m, 2H), 3,64-3,25 (m, 33H), 3,04 (s, 7H), 2,95 (t, 4H). MS (*m/z*): 1207,10 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 230

N1,N2-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)etil)ftalamide

15

20

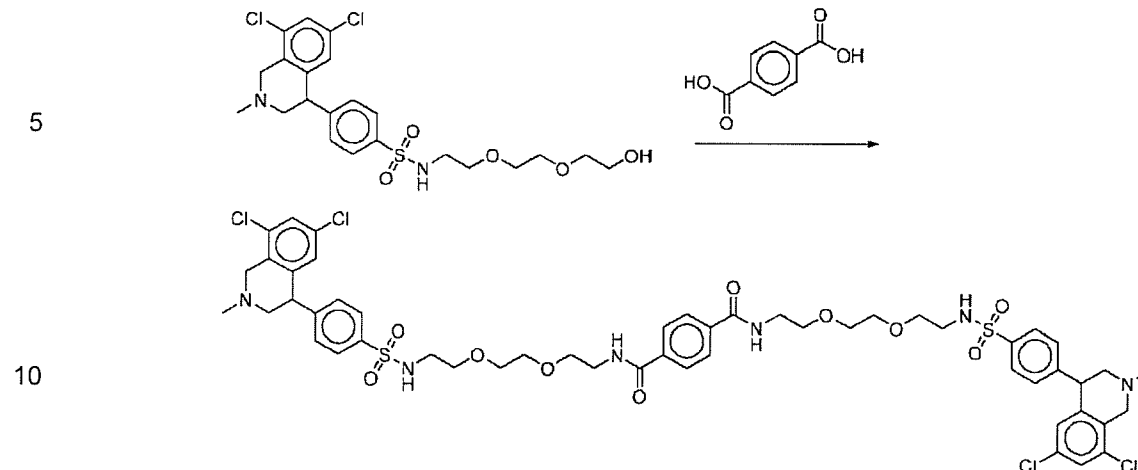


30

Composto 230, N1,N2-bis(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etossi)-etil)ftalamide: Composto 230 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Ri. Esempio 215 usando acido ftalico (8,0mg, 0,0484mmol) e N-(2-(2-(2-(2-ammino)etossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 28, 75mg, 0,0968 mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (35,4mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,87 (d, 2H), 7,76 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,50 (m, 8H), 6,79 (s, 2H), 4,83-4,73 (m, 4H), 4,65 (d, 2H), 3,85 (q, 2H), 3,62-3,39 (m, 36H), 3,10 (s, 6H), 3,02 (t, 4H). MS (*m/z*): 1223,00 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 231

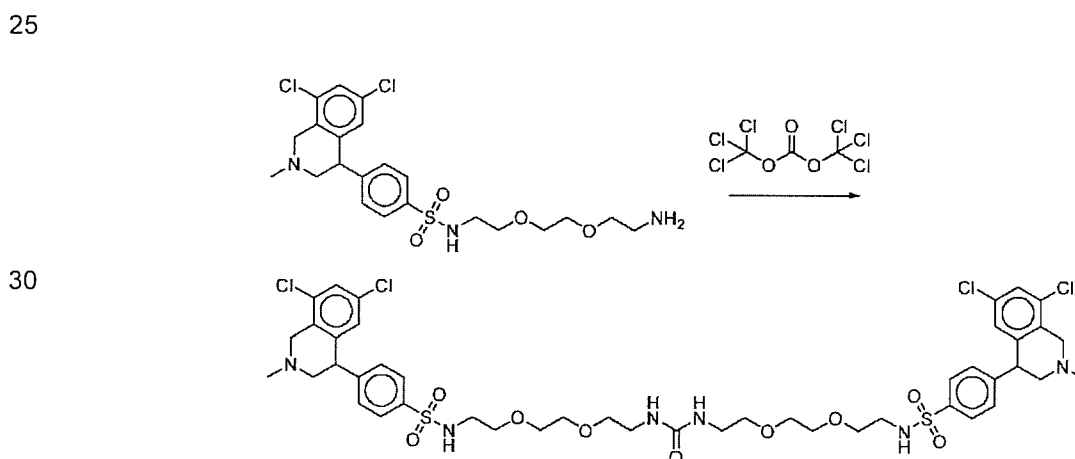
N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)tereftalamide



Composto 231, N1,N4-bis(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-tereftalamide: Composto 231 è stato preparato
15 seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 215 usando acido tereftalico (11,4mg, 0,0684mmol) e 4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-N-(2-(2-(2-idrossietossi)etossi)etil)benzensolfonammide (Composto 175.1, 100mg, 0,136mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (9,8mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,86-7,85 (m, 9H), 7,83 (s, 2H), 7,50 (s, 1H), 7,41 (d, 4H),
20 6,80 (s, 1H), 3,68-3,42 (m, 26H), 3,34 (m, 2H), 3,09-3,01 (m, 12H). MS (*m/z*): 1135,07 [M+H]⁺.

Esempio 232

N,N'-(10-osso-3,6,14,17-tetraossa-9,11-diazanonadecan-1,19-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)



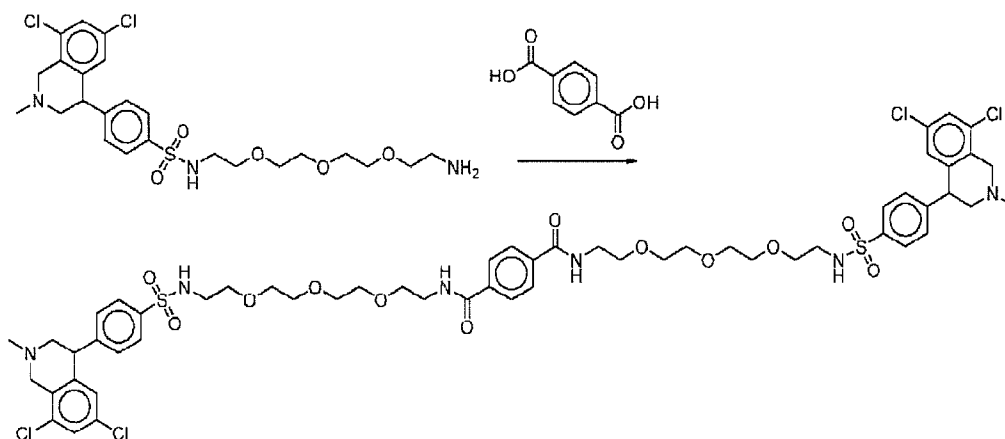
Composto 232, N,N'-(10-osso-3,6,14,17-tetraossa-9,11-diazanonadecan-1,19-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide): N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 175.1, 80mg, 0,110mmol) e DIEA (42,1mg, 0,330mmol) sono stati sciolti in DCM secco (0,5mL) sotto N₂ e raffreddati a 0°C. Una soluzione di trifosgene (4,9mg, 0,0165mmol) in DCM (0,2mL) è stata aggiunta goccia a goccia e la soluzione ottenuta è stata scaldata a temperatura ambiente in 30minuti. Il solvente è stato allontanato; il residuo ottenuto è stato ripreso in 4 mL di soluzione acetonitrile/acqua (1:1) e filtrato. Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (8,5mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,90 (d, 4H), 7,60 (s, 2H), 7,47 (d, 4H), 6,84 (s, 2H), 3,58-3,42 (m, 24H), 3,12-3,05 (m, 17H). MS (m/z): 1031,96 [M+H]⁺.

15

Rif. Esempio 233

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)tereftalamide

20



25

30

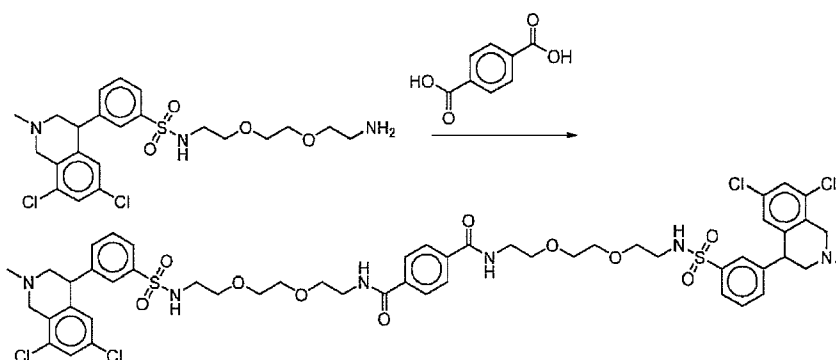
Composto 233, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)tereftalamide: Composto 233 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 215 usando acido

tereftalico (10,4mg, 0,0628mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 82, 97,2mg, 0,1255mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (38,9mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD₃OD): δ 7,83 (m, 10H), 7,85 (s, 2H), 7,42 (d, 4H), 6,83 (s, 1H), 3,66-3,55 (m, 28H), 3,46-3,39 (m, 11H), 3,12 (s, 7H), 3,04 (t, 4H). MS (m/z): 1223,14 [M+H]⁺.

Rif. Esempio 234

N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)tereftalammide

10



15

Composto 234, N1,N4-bis(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)tereftalammide: Composto 234 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 215 usando acido tereftalico (13,8 mg, 0,0833 mmol) e N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 168.2, 121,7mg, 0,167mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (60,0mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD₃OD): δ 7,88 (m, 6H), 7,72 (s, 2H), 7,61 (t, 2H), 7,51 (m, 4H), 6,80 (s, 2H), 4,88-4,75 (m, 4H), 4,75 (d, 2H), 4,74 (m, 2H), 3,85-3,42 (m, 25H), 3,12 (s, 6H), 2,99 (t, 4H). MS (m/z): 1135,11 [M+H]⁺.

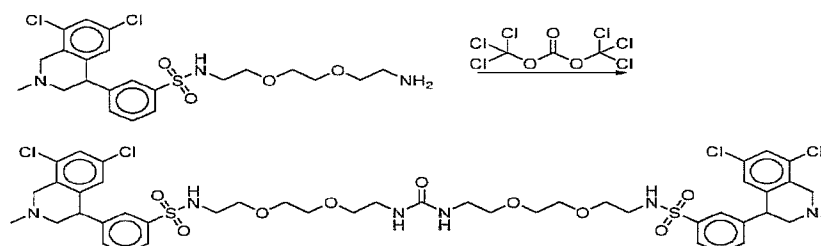
20

25

Esempio 235

N,N'-(10-osso-3,6,14,17-tetraossa-9,11-diazanonadecan-1,19-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

30

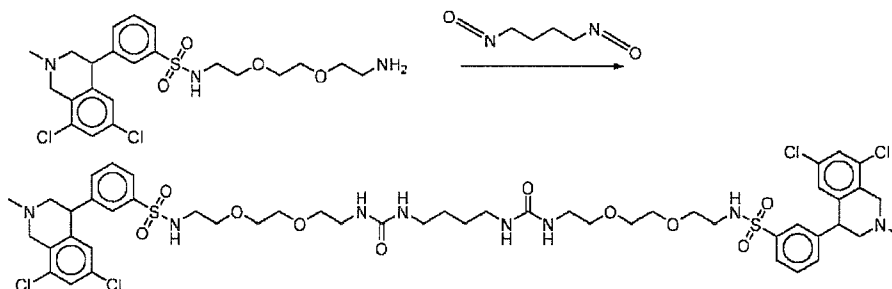


Composto 235, N,N'-(10-osso-3,6,14,17-tetraossa-9,11-diazanonadecan-1,19-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide): Composto 235 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 232 usando N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide (Composto 168.2, 56,6mg, 0,0775mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (25,0mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,88 (d, 2H), 7,75 (s, 2H), 7,65 (t, 2H), 7,53 (m, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,89-4,68 (m, 2H), 3,88 (m, 2H), 3,62-3,43 (m, 21H), 3,30-3,27 (m, 6H), 3,11 (s, 7H), 3,03 (t, 4H). MS (*m/z*): 1031,07 [M+H]⁺.

Esempio 236

N,N'-(10,17-diosso-3,6,21,24-tetraossa-9,11,16,18-tetraazaesacosan-1,26-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzen-solfonammide)

15



20

Composto 236, N,N'-(10,17-diosso-3,6,21,24-tetraossa-9,11,16,18-tetraaza-esacosan-1,26-diil)bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-

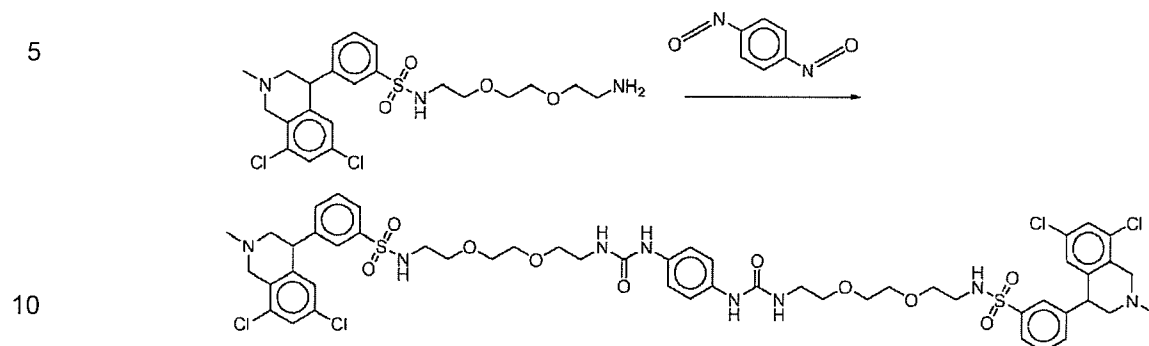
benzen-solfonammide): Composto 236 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 208 usando 1,4-diisocianatobutano (5,24mg, 0,0374mmol) e N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

il)benzen-solfonammide (Composto 168.2, 54,7mg, 0,0749mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (27,5mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,88-7,86 (d, 2H), 7,75 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,55-7,51 (m, 4H), 4,48 (m, 2H), 3,38-3,31 (m, 1H), 3,61-3,42 (m, 17H), 3,35-3,30 (m, 4H), 3,13 (s, 6H), 3,08-3,02 (m, 7H), 1,45 (m, 2H). MS (*m/z*): 1145,04 [M+H]⁺.

30

Esempio 237

N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(ossometilene)bis(azandiil)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)



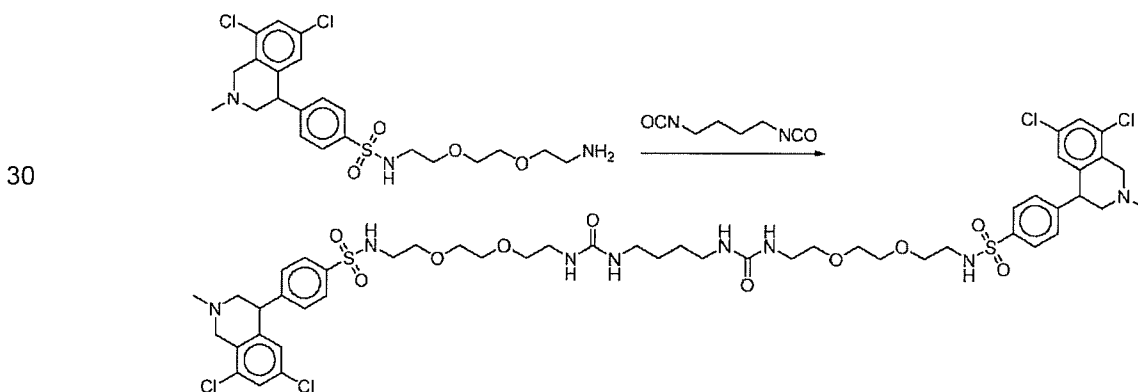
Composto 237, N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(ossometilene)bis(azandiil)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-

15 **il)benzensolfonammide):** Composto 237 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 208 usando 1,4-diisocianatobenzene (8,79mg, 0,0549mmol) e N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 168.2, 80,2mg, 0,110mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (37,6mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD3OD): δ 7,88 (d, 2H), 7,73 (s, 2H), 7,61 (t, 2H), 7,52 (d, 2H), 7,48 (d, 2H), 7,18 (s, 5H), 6,78 (s, 2H), 4,71-4,63 (m, 6H), 4,45-4,40 (m, 2H), 3,81-3,77 (m, 2H), 3,58-3,55 (m, 6H), 3,53-3,50 (m, 14H), 3,47-3,44 (m, 6H), 3,35-3,33 (m, 6H), 3,09 (s, 8H), 3,03 (t, 5H). MS (m/z): 1165,06 [M+H]⁺.

20

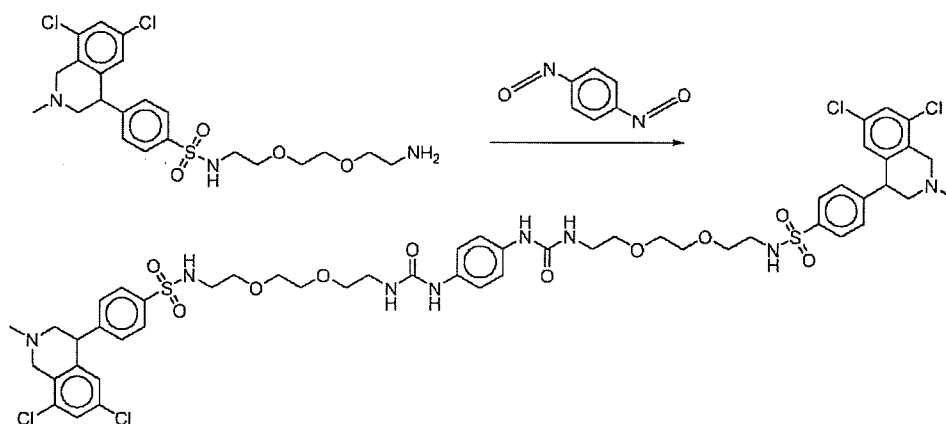
Esempio 238

25 **N,N'-(10,17-diosso-3,6,21,24-tetraossa-9,11,16,18-tetrazaesacosan-1,26-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)**



Composto 238, N,N'-(10,17-diosso-3,6,21,24-tetraossa-9,11,16,18-tetraaza-esacosan-1,26-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)-

benzensolfonammide): Composto 238 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 208 usando 1,4-diisocianatobutano (5,64mg, 0,402mmol) e N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 175.1, 58,8mg, 0,805mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (13,8 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD3OD): δ 7,86 (d, J=8Hz, 2H), 7,72 (s, 2H), 7,61 (t, 2H), 7,52 (s, 2H), 7,47 (d, J=7Hz, 2H), 7,18 (s, 5H), 7,78 (s, 2H), 4,77-4,68 (m, 5H), 4,48-4,40 (m, 2H), 3,35-3,28 (m, 2H), 3,56-3,51 (m, 16H), 3,45 (t, J=5Hz, 5H), 3,35-3,32 (m, 10H), 3,09 (s, 6H), 3,03 (t, J=5Hz, 3H). MS (*m/z*): 1145,01 [M+H]⁺.

Esempio 239**N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(ossometilene)bis(azandiil))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)****Composto 239, N,N'-(2,2'-(2,2'-(2,2'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(ossometilene)bis(azandiil))bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(ossi)bis(etan-2,1-diil))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide):**

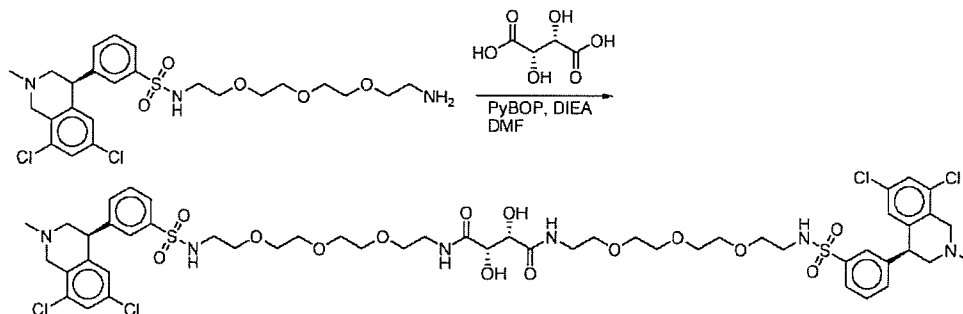
Composto 239 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 208 usando 1,4-diisocianatobenzene (12,5 mg, 0,078 mmol) e N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 175.1, 113,9 mg, 0,156 mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (48,9 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400 MHz, CD3OD): δ 7,87 (d, J=8Hz, 4H), 7,52 (s, 2H), 7,40 (d, J=8Hz, 4H), 7,18 (s, 4H), 7,69 (s,

2H), 4,70-4,62 (m, 3H), 4,48-4,40) (m, 2H), 3,82-3,76 (m, 2H), 3,58-3,43 (m, 21H), 3,35-3,30 (m, 4H), 3,11-3,06 (m, 11H). MS (m/z): 1165,12[M+H]⁺.

Esempio 240

(2S,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide

5



10

Composto 240, (2S,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-

15

diidrossisuccinamide: Composto 240 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 229 usando acido (2S,3S)-2,3-diidrossisuccinico (9,6mg, 0,057mmol) e (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonamide (intermedio 224.1, 88,6mg, 0,114mmol).

20

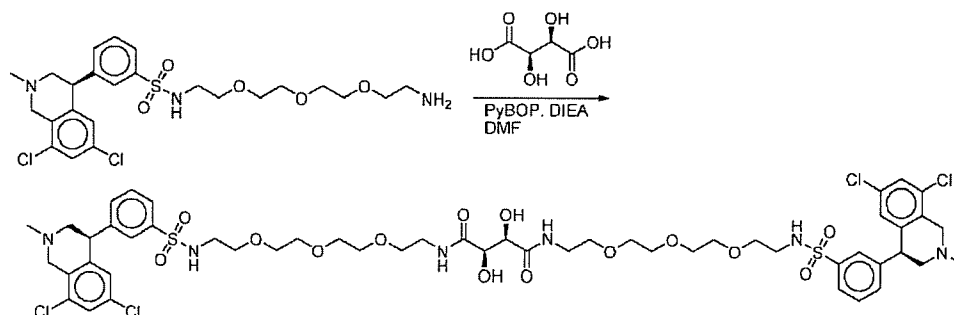
Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (24,5mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,94 (t, 1H), 7,87 (d, 2H), 7,77 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,53-7,50 (m, 4H), 6,82 (s, 2H), 4,479-4,45 (m, 2H), 4,44 (s, 2H), 3,88-3,84 (m, 2H), 3,62-3,53 (m, 22H), 3,50-3,48 (m, 5H), 3,45-3,40 (m, 9H), 3,13 (s, 6H), 3,04 (t, 4H). MS (m/z): 1208,02 [M+H]⁺.

25

Esempio 241

(2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide

30

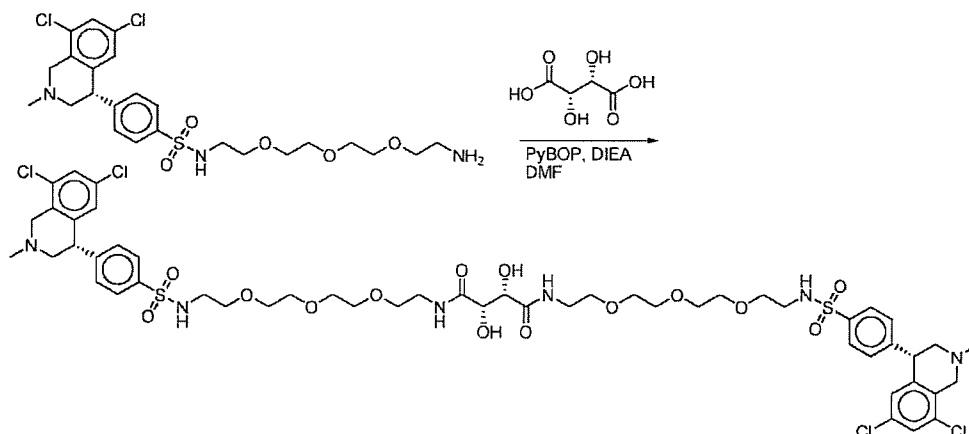


Composto 241, (2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(3-((R o S)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-

diidrossisuccinamide: Composto 241 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 229 usando acido (2R,3R)-2,3-diidrossisuccinico (8,7mg, 0,0519mmol) e (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 224.1, 80,5mg, 0,104mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (25,7) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,87 (d, 3H), 7,76 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,54-7,51 (m, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,78-4,73 (m, 4H), 4,49-4,42 (m, 4H), 3,89-3,85 (m, 2H), 3,62-3,53 (m, 22H), 3,51-48 (m, 5H), 3,46-3,38 (m, 9H), 3,14 (s, 6H), 3,04 (t, 4H). MS (*m/z*): 1208,21 [M+H]⁺.

Esempio 242**(2S,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinamide**

15



20

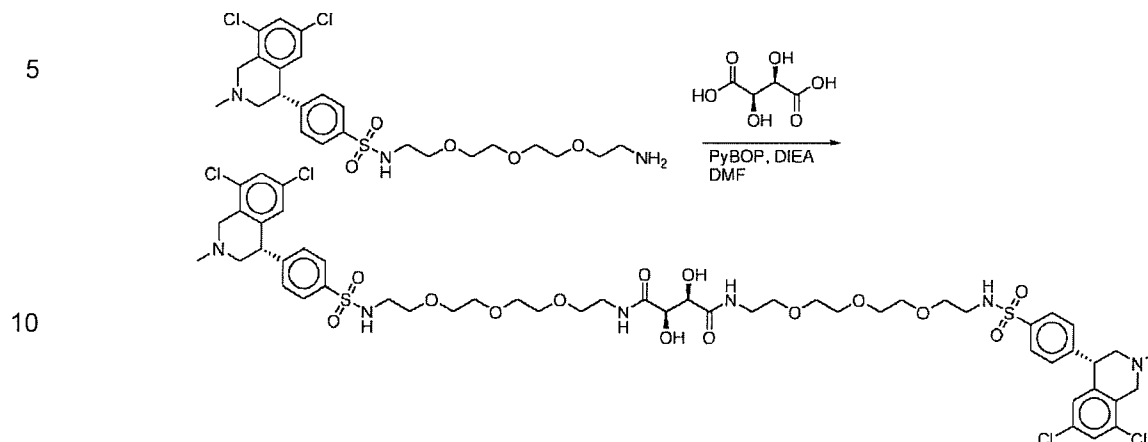
Composto 242, (2S,3S)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-

diidrossisuccinamide: Composto 242 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 229 usando acido (2S,3S)-2,3-diidrossisuccinico (6,3mg, 0,0374mmol) e (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 225.2, 58,0mg, 0,0749mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (21,6mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,85 (d, 4H), 7,54 (s, 2H), 7,45 (d, 3H), 6,84 (s, 1H), 4,772-4,69 (m, 3H), 4,43 (s, 2H), 3,86-3,81 (m, 1H), 3,59-3,53 (m, 16H), 3,49-3,39 (m, 11H), 3,12 (s, 5H), 3,08 (t, 4H). MS (*m/z*): 1208,14 [M+H]⁺.

30

Esempio 243

(2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-diidrossisuccinammide



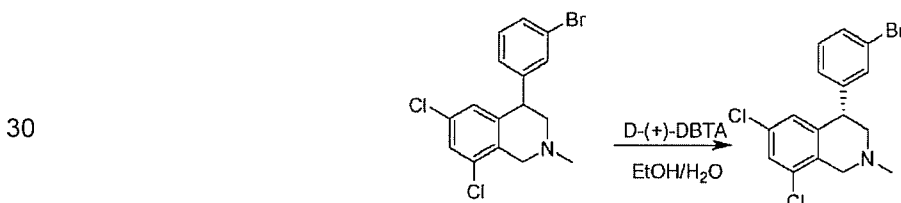
Composto 243, (2R,3R)-N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-2,3-

15 **diidrossisuccinammide:** Composto 243 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 229 usando acido (2R,3R)-2,3-diidrossisuccinico (8,4mg, 0,0,0499mmol) e (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 225.2, 77,3 mg, 0,0999 mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (23,4mg) come sale TFA.

20 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD₃OD): δ 7,89 (d, 4H), 7,53 (s, 2H), 7,45 (d, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,81-4,71 (m, 4H), 4,49-4,41 (m, 4H), 3,89-3,83 (m, 2H), 3,60-3,53 (m, 17H), 3,49-3,38 (m, 12H), 3,13 (s, 5H), 3,08 (t, 4H). MS (*m/z*): 1208,,09 [M+H]⁺.

Esempio 244

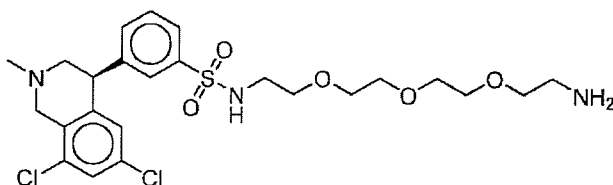
25 **(S o R)-N,N'-(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraazadotriacontan-1,32-diil)bis(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)**



Intermedio 244.1, (S o R)-4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina: In un pallone da 2000 mL, è stata posta una soluzione di 4-(3-bromofenil)-6,8-

dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (intermedio 1.4; 20 g, 54,20 mmol, 1,00 equiv) in etanolo (500 mL). Questo è stato seguito dall'aggiunta di acido D-(+)-dibenzoil tartarico (19 g, 53,07 mmol, 0,98 equiv), acqua (160 mL) e etanolo (1440 mL) a 45°C. La soluzione
 5 ottenuta è stata agitata per 30 min a 45°C in un bagno d'olio. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente per 24 ore, i solidi sono stati raccolti per filtrazione. La massa filtrata è stata sciolta in potassio carbonato (satturo) ed è stata estratta con 2x500 mL di etil acetato. Gli strati organici riuniti sono stati lavati con 2x500 mL di salamoia, essiccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Questo ha dato (S o R)-4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolina come olio incolore.

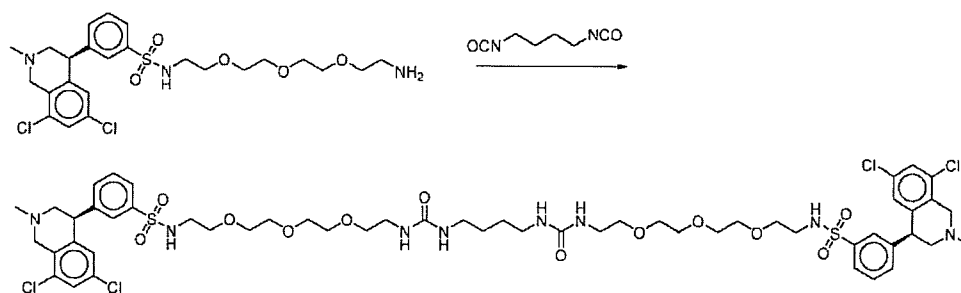
10



15

Intermedio 224.1 (sintesi alternativa), (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)-etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinol-4-il)benzen-solfonammide: (S o R)-4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolina (intermedio 244.1) è stato convertito a (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinol-4-il)benzen-solfonammide (intermedio 224.1) seguendo le procedure delineate per i substrati
 20 racemici in Rif. Esempio 1 e la riduzione descritta in Rif. Esempio 170.

25



30

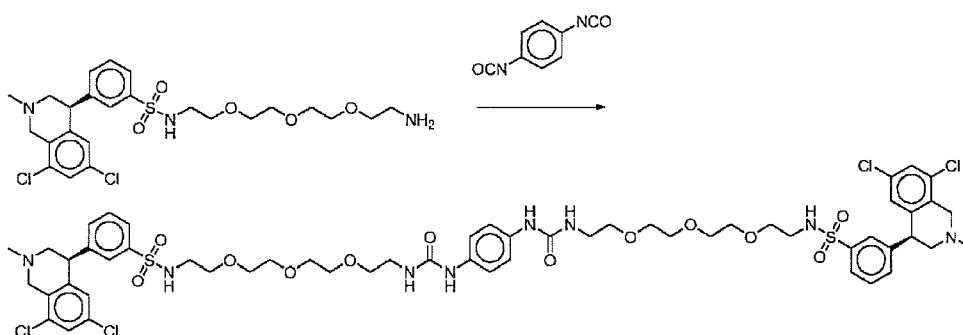
Composto 244, (S o R)-N,N'-(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraazadotriacontan-1,32-diil)bis(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinol-4-il)benzen-solfonammide): Composto 244 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 208 usando 1,4-diisocianatobutano (6,5mg, 0,0471mmol) e

(S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Intermedio 224.1, 72,9mg, 0,0941mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (34,9mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,89 (d, 2H), 7,75 (s, 2H), 7,63 (t, 2H), 7,55-7,51 (m, 4H), 6,83 (s, 2H), 4,48 (d, 2H), 3,90-3,85 (m, 2H), 3,59-3,55 (m, 17H), 3,51-3,43 (m, 14H), 3,31-3,23 (m, 6H), 3,14 (s, 7H), 3,04 (m, 9H), 1,43 (m, 4H). MS (*m/z*): 1232,99 [M+H]⁺.

Esempio 245

(S o R)-N,N'-(1,1'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13,1-diil))bis(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

10



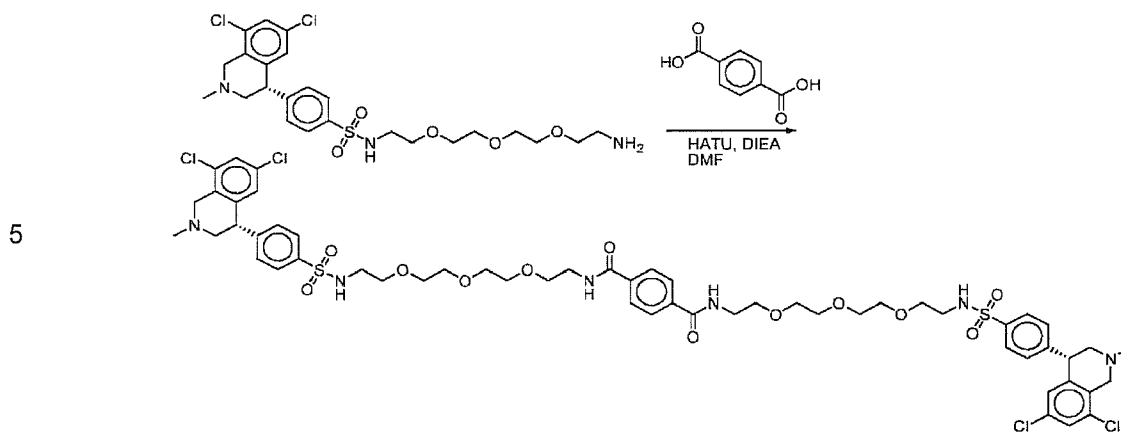
15

Composto 245, (S o R)-N,N'-(1,1'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(1-osso-5,8,11-tri-ossa-2-azatridecan-13,1-diil))bis(3-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide): Composto 245 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 208 usando (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Intermedio 224.1, 79,1mg, 0,102mmol) e 1,4-diisocianatobenzene (8,2mg, 0,0511mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (43,2mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): δ 7,87 (d, 2H), 7,72 (s, 2H), 7,61 (t, 2H), 7,51-7,46 (m, 4H), 7,17 (s, 4H), 6,78 (s, 2H), 4,44-4,39 (m, 2H), 3,82-3,77 (m, 2H), 3,61 (s, 11H), 3,57-3,53 (m, 13H), 3,49-3,48 (m, 6H), 3,44 (t, 5H), 3,35-3,29 (m, 6H), 3,09 (s, 7H), 3,03 (t, 4H). MS (*m/z*): 1253,01 [M+H]⁺.

25

Rif. Esempio 246

N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-tereftalamide



10 **Composto 246, N1,N4-bis(2-(2-(2-(2-(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)-tereftal-ammido)etossi)etossi)etil)-tereftal-ammido:**

Composto 246 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Rif. Esempio 215 usando (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Intermedio 224,1, 65,1mg, 0,0841mmol) e acido tereftalico (6,98mg, 0,042mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il

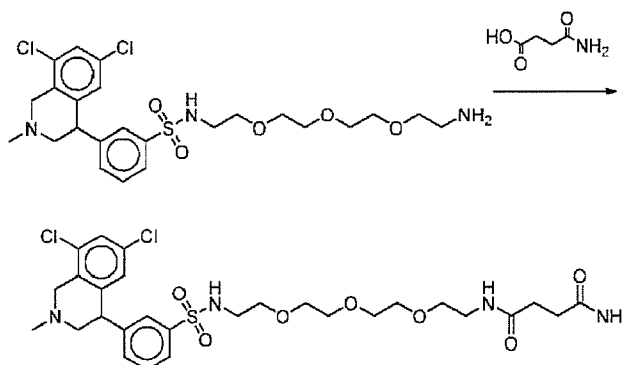
15 composto del titolo (19,3mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,89-7,85 (m, 6H), 7,52 (s, 2H), 7,43 (d, 4H), 6,81 (s, 2H), 4,73-4,66 (m, 3H), 4,47-4,42 (m, 1H), 3,84-3,79 (m, 2H), 3,64-3,59 (m, 14H), 3,57-3,54 (m, 11H), 3,46-3,39 (m, 8H), 3,12 (s, 6H), 3,03 (t, 4H). MS (m/z): 1233,04 [M+H]⁺.

20

Rif. Esempio 247

N1-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide

25



30

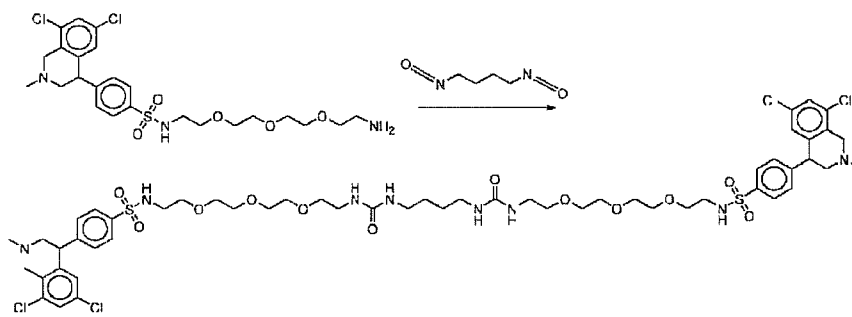
Composto 247, N1-(2-(2-(2-(2-(3-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)fenilsolfonammido)etossi)etossi)etil)succinammide: Composto 247 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Rif. Esempio 215 usando acido 4-ammino-4-ossobutanoico (7,6 mg, 0,0646 mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-3-

(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzonsolfonammide (Composto 28, 50 mg, 0,0646 mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (27,8 mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 7,88 (d, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,64 (t, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,51 (d, 1H), 6,84 (s, 1H), 4,78-4,71 (m, 2H), 4,55-4,48 (m, 1H), 3,81-3,75 (m, 1H), 3,63-3,55 (m, 10H), 3,51-4,45 (m, 5H), 3,44-3,41 (m, 3H), 3,38-3,31 (m, 3H), 3,13 (s, 3H), 3,07-3,02 (t, 2H), 2,48-2,43 (m, 4H). MS (m/z): 645,32 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Esempio 248

N,N' -(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraazadotriacontan-1,32-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzonsolfonammide)

10



15

Composto 248, N,N' -(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraazadotriacontan-1,32-diil)bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzonsolfonammide):

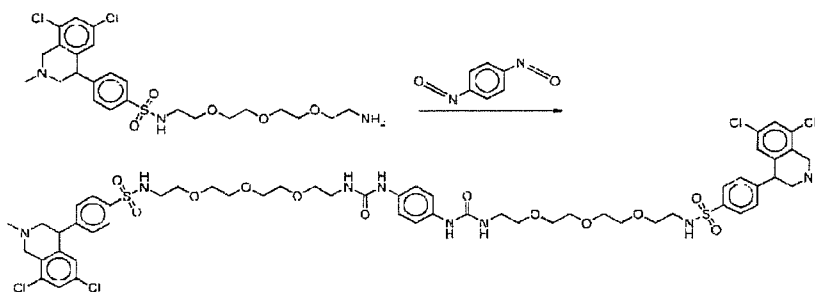
Composto 248 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 208 usando 1,4-diisocianatobutano (7,64 mg, 0,545 mmol) e N -(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzonsolfonammide (Composto 82, 84,4 mg, 0,109mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (43,6mg) come sale TFA. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 7,89 (d, 4H), 7,54 (s, 2H), 7,45 (d, 4H), 6,84 (s, 2H), 4,79-4,71 (m, 4H), 3,89-3,85 (dd, 2H), 3,59-3,56 (m, 17H), 3,49-3,43 (m, 14H), 3,28-3,23 (m, 5H), 3,14 (s, 7H), 3,09-3,04 (m, 9H), 1,42 (s, 4H). MS (m/z): 1233,03 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

25

Esempio 249

N,N' -(1,1'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(1-osso-5,8,11-trioassa-2-azatridecan-13,1-diil))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzonsolfonammide)

30



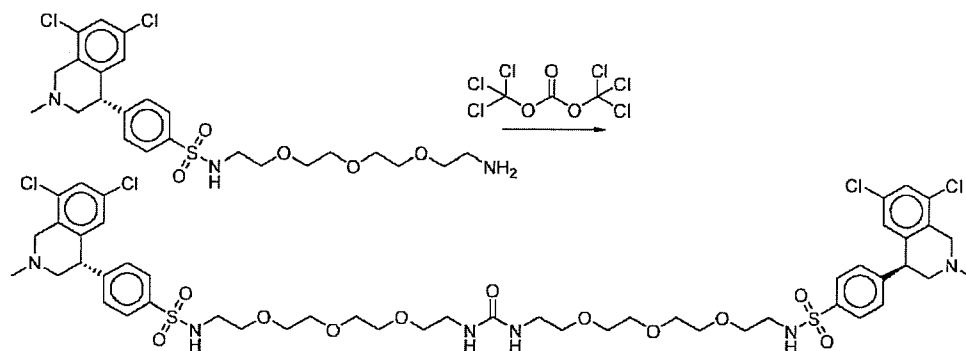
Composto 249, N,N'-(1,1'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13,1-diil))bis(4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide): Composto 249 è stato preparato seguendo la procedura delineata in Esempio 208 usando 1,4-diisocianatobenzene (7,95mg, 0,0495mmol) e N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-4-il)benzensolfonammide (Composto 82, 76,7mg, 0,099mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (39,6 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,87 (d, 4H), 7,51 (s, 2H), 7,40 (d, 4H), 7,16 (s, 4H), 6,79 (s, 2H), 4,88-4,83 (m, 4H), 4,65-4,50 (m, 2H), 3,81-3,77 (m, 2H), 3,61-3,59 (m, 9H), 3,58-3,54 (m, 11H), 3,53-3,48 (m, 5H), 3,47-3,42 (m, 5H), 3,35-3,30 (m, 4H), 3,11 (s, 6H), 3,07 (t, 4H). MS (*m/z*): 1253,04 [M+H]⁺.

15

Esempio 250

(S o R)-N,N'-(13-osso-3,6,9,17,20,23-esaossa-12,14-diazapentacosan-1,25-diil)bis(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)

20



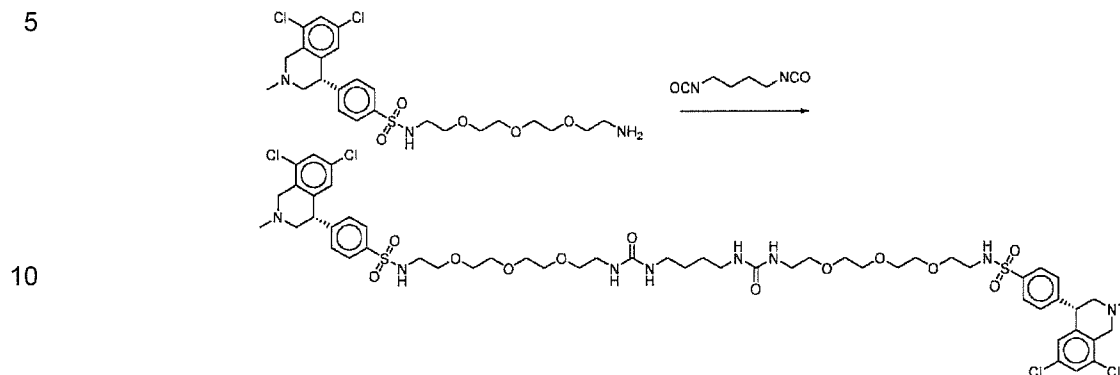
25

Composto 250, (S o R)-N,N'-(13-osso-3,6,9,17,20,23-esaossa-12,14-diazapentacosan-1,25-diil)bis(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide): Composto 250 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 232 usando (S o R)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (Intermedio 225.2, 75 mg, 0,0968mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (26,0 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,88 (d, 4H), 7,54 (s, 2H), 7,45 (d, 4H), 6,84 (s, 2H), 4,79-4,72 (m, 5H), 4,48-4,42 (m, 2H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,58-3,54 (m, 17H), 3,49-3,43 (m, 15H), 3,24-3,22 (m, 6H), 3,12 (s, 6H), 3,08 (t, 4H). MS (*m/z*): 1118,96 [M+H]⁺.

30

Esempio 251

(S o R)-N,N'-(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraazadotriacontan-1,32-diil)bis(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)



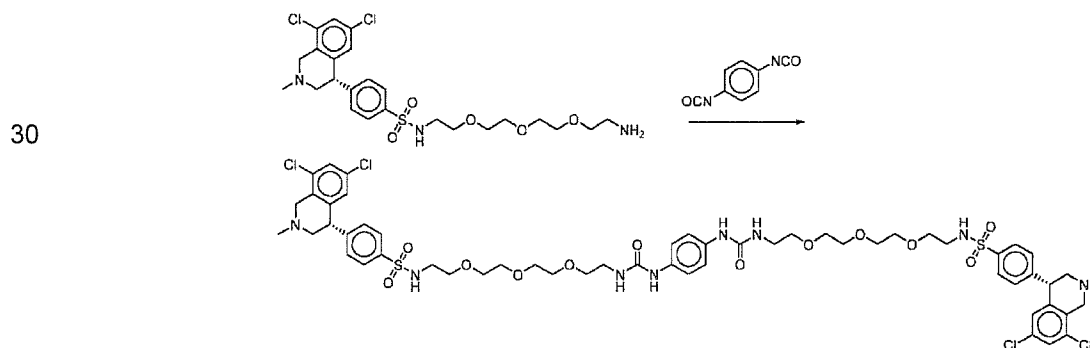
Composto 251, (S o R)-N,N'-(13,20-diosso-3,6,9,24,27,30-esaossa-12,14,19,21-tetraazadotriacontan-1,32-diil)bis(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide): Composto 251 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 208 usando (S o R)-N-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 225.2, 88,1mg, 0,114mmol) e 1,4-diisocianatobutano (7,9mg, 0,0569mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (56,1mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,85 (d, 4H), 7,54 (s, 2H), 7,45 (d, 4H), 6,84 (s, 2H), 4,77-4,74 (m, 4H), 4,50-4,46 (m, 2H), 3,89-3,84 (m, 2H), 3,61-3,56 (m, 17H), 3,50-3,43 (m, 14H), 3,26-3,23 (m, 6H), 3,14 (s, 7H), 3,09-3,04 (m, 10H), 1,48 (s, 4H). MS (m/z): 1233,01 [M+H]⁺.

15

20

Esempio 252

(S o R)-N,N'-(1,1'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13,1-diil))bis(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide)



5 **Composto 252, (S o R)-N,N'-(1,1'-(1,4-fenilenebis(azandiil))bis(1-osso-5,8,11-triossa-2-azatridecan-13,1-diil))bis(4-((S o R)-6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetra-idroisochinolin-4-il)benzensolfonammide):** Composto 252 è stato preparato seguendo le procedure delineate in Esempio 208 usando (S)-N-(2-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)etil)-4-(6,8-dicloro-2-metil-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-4-il)benzensolfonammide (intermedio 225.2, 45,2mg, 0,0584mmol) e 1,4-diisocianatobenzene (4,7 mg, 0,0292 mmol). Purificazione per HPLC preparativa ha dato il composto del titolo (20,7 mg) come sale TFA. ¹H-NMR (400MHz, CD3OD): δ 7,87 (d, 4H), 7,51 (s, 2H), 7,39 (d, 4H), 7,16 (s, 4H), 6,79 (s, 2H), 4,72-4,61 (m, 4H), 4,46-3,99 (m, 1H), 3,81-3,73 (m, 1H), 3,62-3,42 (m, 33H), 3,35-3,33 (m, 5H), 3,09-3,06 (m, 13H). MS (*m/z*): 1252,95 [M+H]⁺.

Dati di Area della Superficie Polare Topologica

15 Valori di Area della Superficie Polare Topologica (tPSA) per composti rappresentativi nel trovato sono mostrati sotto in Tabella 7. I valori di tPSA sono stati calcolati usando il metodo di Ertl et al., Journal of Medicinal Chemistry, 43:3714-3717 (2000).

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (Å ²)
Rif. Esempio 01	125
Rif. Esempio 02	125
Rif. Esempio 03	125
Rif. Esempio 04	125
Rif. Esempio 05	125
Rif. Esempio 06	125
Rif. Esempio 07	121
Rif. Esempio 08	154
Rif. Esempio 09	132

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (Å^2)
Rif. Esempio 10	125
Rif. Esempio 11	125
Rif. Esempio 12	125
Rif. Esempio 13	125
Rif. Esempio 14	125
Rif. Esempio 15	124
Rif. Esempio 16	177
Rif. Esempio 17	134
Rif. Esempio 18	116
Rif. Esempio 19	116
Rif. Esempio 20	116
Rif. Esempio 21	238
Rif. Esempio 22	116
Rif. Esempio 23	116
Esempio 24	177
Rif. Esempio 25	238
Rif. Esempio 26	116
Rif. Esempio 27	134
Rif. Esempio 28	112
Rif. Esempio 29	229
Rif. Esempio 30	137
Rif. Esempio 31	137

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (\AA^2)
Rif. Esempio 32	137
Rif. Esempio 33	137
Rif. Esempio 34	119
Rif. Esempio 35	119
Rif. Esempio 36	119
Rif. Esempio 37	119
Rif. Esempio 38	112
Rif. Esempio 39	112
Rif. Esempio 40	119
Rif. Esempio 41	291
Rif. Esempio 42	291
Rif. Esempio 43	309
Rif. Esempio 44	318
Rif. Esempio 45	199
Rif. Esempio 46	387
Rif. Esempio 47	404
Rif. Esempio 48	224
Rif. Esempio 49	417
Rif. Esempio 50	297
Rif. Esempio 51	213
Rif. Esempio 52	213
Rif. Esempio 53	213

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (Å^2)
Rif. Esempio 54	213
Rif. Esempio 55	213
Rif. Esempio 56	213
Rif. Esempio 57	241
Rif. Esempio 58	184
Rif. Esempio 59	220
Rif. Esempio 60	147
Rif. Esempio 61	134
Rif. Esempio 62	134
Rif. Esempio 63	215
Rif. Esempio 64	134
Rif. Esempio 65	123
Rif. Esempio 66	147
Rif. Esempio 67	161
Rif. Esempio 68	117
Rif. Esempio 69	117
Rif. Esempio 70	134
Rif. Esempio 71	208
Rif. Esempio 72	154
Rif. Esempio 73	134
Rif. Esempio 74	174
Rif. Esempio 75	178

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (Å^2)
Rif. Esempio 76	125
Rif. Esempio 77	238
Rif. Esempio 78	121
Rif. Esempio 79	123
Rif. Esempio 80	136
Rif. Esempio 81	242
Rif. Esempio 82	112
Rif. Esempio 83	191
Rif. Esempio 84	190
Rif. Esempio 85	123
Rif. Esempio 86	228
Esempio 87	270
Esempio 88	270
Rif. Esempio 89	159
Rif. Esempio 90	189
Rif. Esempio 91	147
Rif. Esempio 92	147
Rif. Esempio 93	74
Rif. Esempio 94	157
Rif. Esempio 95	115
Rif. Esempio 96	115
Rif. Esempio 97	312

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (Å^2)
Rif. Esempio 98	312
Rif. Esempio 99	235
Esempio 100	212
Rif. Esempio 101	202
Rif. Esempio 102	487
Esempio 103	212
Rif. Esempio 104	500
Esempio 168	251
Rif. Esempio 169	214
Rif. Esempio 170	270
Rif. Esempio 171	86
Esempio 172	270
Rif. Esempio 173	185
Rif. Esempio 174	243
Esempio 175	211
Esempio 176	233
Esempio 177	211
Esempio 178	220
Rif. Esempio 179	219
Esempio 180	229
Esempio 181	229
Rif. Esempio 182	229

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (Å^2)
Rif. Esempio 183	211
Rif. Esempio 184	202
Rif. Esempio 185	214
Rif. Esempio 186	237
Esempio 187	238
Rif. Esempio 188	211
Rif. Esempio 189	231
Esempio 190	211
Esempio 191	211
Rif. Esempio 192	273
Rif. Esempio 193	231
Rif. Esempio 194	221
Esempio 195	220
Rif. Esempio 196	211
Esempio 197	229
Esempio 198	238
Esempio 199	229
Esempio 200	211
Esempio 201	220
Esempio 202	235
Esempio 203	235
Rif. Esempio 204	290

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (\AA^2)
Esempio 205	251
Rif. Esempio 206	177
Esempio 207	251
Esempio 208	253
Esempio 209	253
Rif. Esempio 210	500
Rif. Esempio 211	227
Rif. Esempio 212	445
Rif. Esempio 213	347
Rif. Esempio 214	176
Rif. Esempio 215	344
Rif. Esempio 216	229
Rif. Esempio 217	441
Esempio 218	251
Rif. Esempio 219	280
Rif. Esempio 220	280
Rif. Esempio 221	192
Esempio 222	270
Esempio 223	270
Esempio 224	270
Esempio 225	270
Esempio 226	270

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (Å^2)
Esempio 227	270
Rif. Esempio 228	229
Esempio 229	270
Rif. Esempio 230	229
Rif. Esempio 231	211
Esempio 232	194
Rif. Esempio 233	229
Rif. Esempio 234	211
Esempio 235	194
Esempio 236	235
Esempio 237	235
Esempio 238	235
Esempio 239	235
Esempio 240	270
Esempio 241	270
Esempio 242	270
Esempio 243	270
Esempio 244	253
Esempio 245	253
Rif. Esempio 246	229
Rif. Esempio 247	158
Esempio 248	253

Tabella 7	
Valori di tPSA dei Composti	
Esempio #	Area di superficie polare topologica (\AA^2)
Esempio 249	253
Esempio 250	212
Esempio 251	253
Esempio 252	253

Dati Farmacologici

1. Test Farmacologico Rif. Esempio 1

Saggio a base cellulare dell'attività NHE-3. L'antiporto $\text{Na}^+\text{-H}^+$ dipendente di ratto mediato da NHE-3 è stato misurato usando una modifica del metodo di colorazione pH sensibile originariamente descritto da Tsien (*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1984) 81(23): 7436-7440). Cellule renali di opossum (OK) sono state ottenute dall'ATCC e propagate come da loro istruzioni. Il gene NHE-3 di ratto è stato introdotto nelle cellule OK tramite elettroporazione, le cellule sono state insemi-
 5 nate in piastre da 96 pozzetti e cresciute per una notte. Il mezzo è stato aspirato dai pozzetti, le cellule sono state lavate due volte con tampone NaCl-HEPES (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10 mM glucosio, 5mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 7,4), poi incubate per 30 min a temperatura ambiente con tampone NH_4Cl -HEPES (20 mM NH_4Cl , 80 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 7,4) contenente 5 μM di BCECF-AM (Invitrogen). Le cellule sono state lavate due volte con
 10 HEPES privo di Ammonio, privo di Na^+ (100 mM colina, 50 mM HEPES, 10 mM glucosio, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 7,4) e incubate nello stesso tampone per 10 minuti a temperatura ambiente per diminuire il pH intracellulare. Il recupero mediato da NHE-3 del pH neutro intracellulare è stato iniziato per aggiunta di tampone Na-HEPES contenente 5 uM etil isopropil amiloride (EIPA, un antagonista selettivo dell'attività NHE-1
 15 che non inibisce NHE-3) e 0-30 uM di composto da saggiare e monitorando i cambiamenti sensibili al pH in fluorescenza BCECF (λ_{ex} 505nm, λ_{em} 538nm) normalizzato alla fluorescenza BCECF pH insensibile (λ_{ex} 439nm, λ_{em} 538nm). Le velocità iniziali sono state
 20 diagrammate come media di 3-6 replicati e i valori di pIC_{50} sono stati stimati usando

GraphPad Prism. I dati di inibizione di molti dei composti degli esempi illustrati sopra sono mostrati in Tabella 8, sotto.

Tabella 8	
Dati di inibizione dei composti verso NHE-3 di ratto	
Esempio #	NHE-3 di ratto Media pIC ₅₀ ¹
Rif. Esempio 171	< 5,0
Rif. Esempio 174	< 5,0
Esempio 175	< 5,0
Esempio 223	< 5,0
Rif. Esempio 231	< 5,0
Esempio 232	< 5,0
Rif. Esempio 233	< 5,0
Esempio 235	< 5,0
Rif. Esempio 30	da 5 a 6
Rif. Esempio 31	da 5 a 6
Rif. Esempio 52	da 5 a 6
Rif. Esempio 54	da 5 a 6
Rif. Esempio 63	da 5 a 6
Rif. Esempio 64	da 5 a 6
Esempio 176	da 5 a 6
Rif. Esempio 196	da 5 a 6
Esempio 209	da 5 a 6
Rif. Esempio 219	da 5 a 6
Rif. Esempio 234	da 5 a 6
Rif. Esempio 28	da 6 a 7

Tabella 8	
Dati di inibizione dei composti verso NHE-3 di ratto	
Esempio #	NHE-3 di ratto Media pIC ₅₀ ¹
Rif. Esempio 29	da 6 a 7
Rif. Esempio 45	da 6 a 7
Rif. Esempio 46	da 6 a 7
Rif. Esempio 60	da 6 a 7
Rif. Esempio 65	da 6 a 7
Rif. Esempio 66	da 6 a 7
Rif. Esempio 67	da 6 a 7
Rif. Esempio 68	da 6 a 7
Rif. Esempio 69	da 6 a 7
Rif. Esempio 97	da 6 a 7
Esempio 100	da 6 a 7
Rif. Esempio 102	da 6 a 7
Rif. Esempio 104	da 6 a 7
Rif. Esempio 169	da 6 a 7
Rif. Esempio 170	da 6 a 7
Esempio 178	da 6 a 7
Esempio 207	da 6 a 7
Rif. Esempio 210	da 6 a 7
Rif. Esempio 211	da 6 a 7
Rif. Esempio 213	da 6 a 7
Rif. Esempio 217	da 6 a 7
Esempio 218	da 6 a 7

Tabella 8	
Dati di inibizione dei composti verso NHE-3 di ratto	
Esempio #	NHE-3 di ratto Media pIC ₅₀ ¹
Esempio 225	da 6 a 7
Rif. Esempio 228	da 6 a 7
Rif. Esempio 47	>7
Rif. Esempio 81	>7
Esempio 87	>7
Esempio 88	>7
Rif. Esempio 98	>7
Esempio 103	>7
Esempio 172	>7
Esempio 177	>7
Esempio 191	>7
Esempio 195	>7
Esempio 200	>7
Esempio 201	>7
Esempio 202	>7
Esempio 203	>7
Rif. Esempio 204	>7
Esempio 205	>7
Rif. Esempio 206	>7
Esempio 208	>7
Rif. Esempio 212	>7
Rif. Esempio 215	>7

Tabella 8	
Dati di inibizione dei composti verso NHE-3 di ratto	
Esempio #	NHE-3 di ratto Media pIC ₅₀ ¹
Rif. Esempio 216	>7
Esempio 222	>7
Esempio 224	>7
Esempio 229	>7
Rif. Esempio 230	>7
Esempio 236	>7
Esempio 237	>7
Esempio 244	>7
Esempio 250	>7
Esempio 251	>7
¹ pIC ₅₀ è il log negativo del valore di IC ₅₀ (un valore di IC ₅₀ di 1 micromolare corrisponde ad un valore di pIC ₅₀ di 6,0)	

2. Test Farmacologico Esempio 2

Saggio di Permeabilità di Membrane Artificiali Parallele (PAMPA). Questo modello consiste di un materiale per filtro idrofobico rivestito con una miscela di lecitina/fosfolipidi che crea una membrana lipidica artificiale. Piastre BD Gentest PAMPA a 96 pozzetti (cat #353015) sono scaldate per 1 ora a temperatura ambiente. 1 mL di 20 uM di composti di controllo (miscela combinata di 10 mM atenololo, ranitidina, labetalolo e propranololo) in tampone di trasporto (10 mM HEPES in HBSS pH 7,4) sono preparati con 1 mL di 20 uM di composti del test in tampone di trasporto. Le piastre PAMPA sono separate e 0,3 mL di composto sono aggiunti in duplicato al lato apicale (piastra donatrice/inferiore= "AP") e 2 mL di tampone sono posti nella camera basolaterale (piastra ricevente/superiore="BL"). La piastra BL è posta sulla piastra AP ed incubata per 3 ore in incubatore a 37°C. A quel punto, sono prelevati campioni da entrambe le piastre ed analizzati per la concentrazione di

composti usando LC/MS. Un valore di "P_e" (permeabilità effettiva) è calcolato usando la seguente formula.

$$P_e = (-\ln[1 - C_A(t)/C_{eq}]) / [A * (1/V_D + 1/V_A) * t]$$

dove

5 C_A = concentrazione nel pozzetto accettore, C_D = concentrazione nel pozzetto donatore

V_D = volume pozzetto donatore (mL), V_A = volume pozzetto accettore (mL)

A = area filtro = 0,3 cm², t = tempo di trasporto (secondi)

C_{eq} = concentrazione all'equilibrio = [C_D(t)*V_D+C_A(t)*V_A]/(V_D+V_A)

10 P_e è riportato in unità di cm/sec x 10⁻⁶.

Risultati dal test PAMPA sono mostrati in Tabella 9.

Tabella 9	
Valori Papp come determinati usando il saggio PAMPA	
Esempio #	Media Papp, A → B, cm/sec x 10 ⁻⁶
Rif. Esempio 01	0,53
Rif. Esempio 03	0,8
Rif. Esempio 07	0,5
Rif. Esempio 08	0,2
Rif. Esempio 13	0,3
Rif. Esempio 14	0,4
Rif. Esempio 15	0,05
Rif. Esempio 16	< 0,02
Rif. Esempio 23	< 0,04
Esempio 24	0,03
Rif. Esempio 26	< 0,02
Rif. Esempio 27	< 0,02
Rif. Esempio 30	0,56
Rif. Esempio 31	0,61

Tabella 9	
Valori Papp come determinati usando il saggio PAMPA	
Esempio #	Media Papp, A → B, cm/sec x 10 ⁻⁶
Rif. Esempio 34	0,2
Rif. Esempio 35	0,17
Rif. Esempio 36	0,2
Rif. Esempio 37	0,1
Rif. Esempio 38	0,1
Rif. Esempio 44	0,1
Rif. Esempio 47	< 0,01
Rif. Esempio 48	0,9
Rif. Esempio 51	0,2
Rif. Esempio 52	1,61
Rif. Esempio 53	1,6
Rif. Esempio 54	1,3
Rif. Esempio 56	0,5
Rif. Esempio 57	1,65
Rif. Esempio 58	0,2
Rif. Esempio 59	0,1
Rif. Esempio 60	0,99
Rif. Esempio 61	0,1
Rif. Esempio 63	0,43
Rif. Esempio 68	0,35
Rif. Esempio 69	0,3
Rif. Esempio 70	0,4
Rif. Esempio 71	0,45

Tabella 9	
Valori Papp come determinati usando il saggio PAMPA	
Esempio #	Media Papp, A → B, cm/sec x 10 ⁻⁶
Rif. Esempio 72	0,2
Rif. Esempio 73	0,27
Rif. Esempio 74	0,45
Rif. Esempio 75	0,4
Rif. Esempio 76	0,2

Valori crescenti di tPSA sono tipicamente associati a permeabilità inferiore. Figura 1 illustrata la Relazione tra tPSA e Permeabilità (Papp, come misurata nel saggio PAMPA) di composti degli Esempi. Composti con valori superiori di tPSA tendono verso permeabilità inferiore.

5

3. Test Farmacologico Rif. Esempio 3

Modello Farmacodinamico: Effetto dei composti del test sul contenuto di fluido di compartimenti intestinali. Ratti femmina normali Sprague Dawley, di 7 settimane, sono stati acclimatati per almeno 2 giorni. Gli animali sono stati nutriti ad libitum durante l'esperimento. Gruppi di 5 ratti sono stati alimentati oralmente con sonda gastrica con 1,5 mL di acqua contenente un composto di controllo negativo o composti del test, corretti ad una concentrazione che risulti in una dose di 10 mg/kg. Sei ore dopo la dose, i ratti sono stati eutanizzati con isofluorano. Il cieco e il colon sono stati legati e poi rimossi. Dopo un breve risciacquo in salina e asciugatura, i segmenti sono stati pesati. I segmenti sono stati poi aperti e i contenuti raccolti e pesati. I contenuti riuniti sono stati poi seccati e pesati di nuovo. La % di contenuto di acqua è stata riportata come $100 \times ((Ww - Wd) / Ww)$ dove Ww è il peso dei contenuti umidi e Wd è il peso dei contenuti dopo essiccamento. Le differenze tra gruppi sono state valutate tramite ANOVA ad una via con post test Bonferroni. Esempi sono mostrati in Figure 2A e 2B (in cui ratti sono stati dosati oralmente con 10 mg/kg di composto (Esempio o Controllo), e poi dopo 6 ore, i contenuti di cieco e colon sono stati rimossi, pesati e seccati, e la % di acqua nei contenuti è stata determinata: *, P < 0,05 e ***, P < 0,01 confrontati al controllo in analisi ANOVA).

10

15

20

4. Test Farmacologico Rif. Esempio 4

5 *Determinazione di C_{max} e AUC del composto.* Ratti Sprague-Dawley sono stati alimentati oralmente con sonda gastrica con articolo del test (2,5 mg/kg) e il siero è stato raccolto a 0,5, 1,2 e 4 h. I campioni di siero sono stati trattati con acetonitrile, le proteine precipitate allontanate per centrifugazione e i surnatanti analizzati per LC/MS/MS e confrontati contro una curva standard per determinare la concentrazione del composto. Tabella 10 illustra i dati dal profilo farmacocinetico di composti selezionati degli esempi. Tutti i composti sono stati dosati oralmente al dosaggio mostrato e i parametri farmacocinetici determinati come descritto nel testo.

Tabella 10			
Profilo Farmacocinetico di Composti Selezionati degli Esempi			
Esempio	Dose Orale Effettiva (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	AUC (ng x hr/mL)
Rif. Esempio 01	2,1	21	53
Rif. Esempio 16	1,6	71	159
Rif. Esempio 31	1,3	11	56
Rif. Esempio 35	2,2	2,4	5
Rif. Esempio 50	2,3	93	242
Rif. Esempio 52	4,6	14	9
Rif. Esempio 55	2,2	9	23
Rif. Esempio 60	2,4	2	0
Rif. Esempio 63	2,4	0	0
Rif. Esempio 211	0,7	< 2,3	< 3,0
Rif. Esempio 212	1,5	< 2,7	< 4,4
Rif. Esempio 213	9,5	< 5,0	< 5,0
Rif. Esempio 214	2,6	< 5,0	< 5,0
Rif. Esempio 215	7,7	< 2,0	< 2,0
Rif. Esempio 216	1,9	< 4,0	< 8,3
Rif. Esempio 217	9,1	< 10,0	< 10,0

Tabella 10			
Profilo Farmacocinetico di Composti Selezionati degli Esempi			
Esempio	Dose Orale Effettiva (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	AUC (ng x hr/mL)
Rif. Esempio 204	10,9	< 2,0	< 2,0
Esempio 218	9	< 1,0	< 1,0
Rif. Esempio 169	11	< 3,5	< 4,0
Esempio 205	10,7	< 2,0	< 2,0
Esempio 225	27	< 3,5	< 5,3
Esempio 226	31	< 3,0	< 5,0
Esempio 172	26	< 2,0	< 2,0
Rif. Esempio 228	23	< 5,0	< 5,0
Rif. Esempio 230	17	< 5,0	< 510
Rif. Esempio 173	28	23	19
Rif. Esempio 174	27	< 5,4	< 510
Esempio 208	12	< 5,0	< 5,0
Rif. Esempio 231	23	< 2,5	< 3,0
Esempio 232	17	< 2,0	< 2,0
Rif. Esempio 233	19	< 2,6	< 6,8
Rif. Esempio 234	22	< 2,0	< 2,0
Esempio 235	11	< 5,0	< 5,0
Esempio 175	28	8	6
Esempio 177	14	< 3,2	< 4,0
Esempio 178	18	< 2,0	< 2,0
Rif. Esempio 179	27	< 16,0	< 35,0
Esempio 180	25	< 10,0	< 19,0

Tabella 10			
Profilo Farmacocinetico di Composti Selezionati degli Esempi			
Esempio	Dose Orale Effettiva (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	AUC (ng x hr/mL)
Esempio 181	28	< 2,0	< 2,0
Rif. Esempio 185	17	< 2,0	< 2,0
Rif. Esempio 186	15	< 3,4	< 5,0
Esempio 244	16	< 7,0	< 15,0
Esempio 245	21	< 2,0	< 2,0

5. Test Farmacologico Rif. Esempio 5

Valutazione dell'inibizione di NHE-3 dei Composti in Modelli di Malattia con Ritenzione Na/H₂O: Modello CRF/ESRD. Ratti maschi Sprague-Dawley con nefrectomia subtotale (5/6), di 7 settimane e del peso di 175-200 g al momento della chirurgia, sono stati procurati da Charles River Laboratories. Gli animali sono stati sottoposti ad acclimatazione per 7 giorni e casualmente raggruppati (usando tabella di numeri casuali) prima di procedere agli esperimenti. Durante l'acclimatazione, tutti gli animali sono stati alimentati con dieta base HD8728CM. I ratti sono stati alloggiati in gabbie di raccolta (2/gabbia) durante il periodo di acclimatazione e il tempo tra le raccolte dei campioni. I ratti sono trasferiti a gabbie metaboliche nei giorni delle raccolte di campioni. Cibo ed acqua sono forniti ad libitum.

Insufficienza renale cronica è indotta nei ratti tramite nefrectomia (Nx) subtotale (5/6) seguita da iniezione intravenosa (IV) di adriamicina (ADR) a 2 settimane dalla nefrectomia, ad una dose di 3,5mg/kg peso corporeo. Gli animali sono poi distribuiti casualmente in gruppi controllo e trattamento con 10 ratti per gruppo. I ratti nel gruppo non trattato sono alimentati con dieta base e i ratti nei gruppi di trattamento sono alimentati con lo stesso cibo integrato con NHE-3 inibitore/polimero ritenente fluido a varie dosi. Tutti i gruppi sono mantenuti per 28 giorni.

Campioni di siero sono raccolti al giorno (-1) (1 giorno prima dell'iniezione di ADR), ai giorni 14 e 28 dopo trattamento ADR. Campioni delle urine e feci delle ventiquattro ore sono raccolti al giorno (-1), ai giorni 14 e 28 dopo trattamento ADR e conservati a -20°C per successiva analisi. Peso corporeo, consumo di acqua e cibo sono misurati agli stessi punti temporali delle raccolte di urine. La chimica di siero e urine (Na, K, Ca, Cl) sono determinati usando un ACE Clinical Chemistry System (ALFA WASSER MANN Diagnostic

Technologies, LLC). Le escrezioni fecali di elettroliti (Na, K, Ca, Cl) sono determinate per IC. Viene determinato anche il bilancio dei fluidi attraverso la quantità di assunzione di fluidi (nell'acqua da bere) sottratta la quantità di acqua fecale e il volume delle urine combinati. I tessuti (cuore, rene e intestino tenue) sono raccolti al termine degli esperimenti per successiva analisi istopatologica. All'accumulo di fluidi nel terzo spazio corporeo (fluidi pleurici ed asciti) è stato assegnato un punteggio semi-quantitativamente come segue: punteggio 0, nessun accumulo di fluidi; punteggio 1, quantità in tracce di fluidi; punteggio 2, ovvia quantità di fluidi; punteggio 3, entrambe le cavità piene di fluidi; punteggio 4, fluidi traboccati una volta aperte le cavità. Ciascun punteggio dell'accumulo di fluidi corporei è confermato e concordato da 2 investigatori.

Animali trattati con inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi mostrano diminuito aldosterone sierico, diminuito volume urinario delle 24 ore e diminuita escrezione urinaria di K e aumentata escrezione urinaria di Na in confronto al gruppo di non trattamento. Gli animali trattati hanno anche aumentata escrezione fecale di Na e fluidi in confronto al gruppo di controllo. Confrontati ai ratti non trattati che mostrano bilancio dei fluidi positivo di 4 g al giorno, animali trattati con inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi dimostrano una perdita di fluidi di 5 g al giorno.

Il trattamento di inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi in ratti CRF è associato con meno edema nei tessuti di cuore, rene e intestino tenue, meno ipertrofia nel cuore, meno accumulo di fluidi nel terzo spazio e peso corporeo più basso al termine dell'esperimento in confronto al gruppo non trattato.

6. Test Farmacologico Rif. Esempio 6

Valutazione dell'inibizione di NHE-3 dei Composti in Modelli di Malattia con Ritenzione Na/H₂O: Modello di Insufficienza Cardiaca Congestizia. CHF sono introdotti in ratti maschi Sprague Dawley, di 7 -8 settimane alimentati con dieta regolare ad libitum e con 10% etanolo in acqua da bere ad libitum, e alimentati con sonda gastrica con una dose giornaliera di 6,3 mg di cobalto acetato per 7 giorni. Poi i ratti CHF sono alimentati con sonda gastrica con una dose giornaliera di 4 mg di furosemide per 5 giorni, inducendo resistenza agli effetti diuretici di furosemide. I ratti sono poi suddivisi a caso in 2 gruppi, controllo e trattamento, e il gruppo di trattamento somministrato con inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi per 7 giorni. Il giorno 0 e il giorno 7 dopo il trattamento sono misurati livelli sierici di aldosterone, volume urinario, escrezioni urinarie di Na e K. Viene determinato anche il bilancio dei fluidi tramite la quantità di fluidi assunti (nell'acqua da bere) sottratti della quantità di fluidi fecali e del volume urinario combinati.

Gli animali trattati con inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi hanno diminuiti livelli sierici di aldosterone, diminuito volume urinario delle 24 ore ed escrezione urinaria di K, e aumentata escrezione urinaria di Na in confronto al gruppo di controllo. Gli animali trattati con inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi hanno, per esempio, aumentata escrezione fecale di Na e fluidi. In confronto ai ratti non trattati, che mostrano un bilancio di fluidi positivo di, per esempio, 4 g al giorno, gli animali trattati dimostrano una perdita di fluidi di 5 g al giorno.

7. Test Farmacologico Rif. Esempio 7

Valutazione dell'inibizione di NHE-3 dei Composti in Modelli di Malattia con Ritenzione Na/H₂O: Modello di Ipertensione. Ratti maschi Dahl sensibili al sale sono ottenuti da Harlan Teklad. Dopo acclimatazione, gli animali sono casualmente raggruppati e alimentati con dieta contenente 8% NaCl ± inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi per 7 giorni. Il giorno 0 e il giorno 7 dopo il trattamento sono misurati BP sistolica, livelli sierici di aldosterone, volume urinario, escrezione urinaria di Na e K. Viene anche determinato il bilancio dei fluidi tramite la quantità di fluidi assunti (nell'acqua da bere) sottratti della quantità di fluidi fecali e del volume urinario combinati.

Gli animali trattati con inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi mostrerebbero diminuita BP sistolica, diminuiti livelli sierici di aldosterone, diminuito volume urinario delle 24 ore ed escrezione urinaria di K, e aumentata escrezione urinaria di Na in confronto al gruppo di non trattamento. Gli animali trattati con inibitore NHE-3/polimero ritenente fluidi mostrerebbero anche aumentata escrezione fecale di fluidi. In confronto ai ratti non trattati, che mostrerebbero un bilancio di fluidi positivo di 4 g al giorno, gli animali trattati dimostrano una perdita di fluidi di 2 g al giorno.

8. Test Farmacologico Rif. Esempio 8

Studio dell'inibizione del Trasporto di Na su Tessuti del Colon. Immediatamente dopo eutanasia e dissanguamenti dei ratti, l'intero colon distale è rimosso, pulito in salina isotonica ghiacciata e parzialmente privato di strato muscolare e serosa usando dissezione per via smussa. Fogli piatti di tessuto sono montati in camere Ussing modificate con un'area di tessuto esposta di 0,64 cm². Flussi transepiteliali di ²²Na⁺ (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) sono misurati attraverso i tessuti del colon bagnati su entrambi i lati da 10 ml di salina tamponata (pH 7,4) a 37°C emessa in circolo per gorgogliamento con 95% O₂ - 5% CO₂. La salina standard contiene i seguenti soluti (in mmol/l): 139,4 Na⁺, 5,4 K, 1,2 Mg²⁺, 123,2 Cl⁻, 21,0 HCO₃⁻, 1,2 Ca²⁺, 0,6 H₂PO₄⁻, 2,4 HPO₄²⁻ e 10 glucosio. La grandezza e direzione del flusso netto (*J*_{net Na}) è calcolata come la differenza tra i due flussi

unidirezionali (da mucosale a serosale, *Jms Na* e serosale a mucosale, *Jsm Na*) misurata ad intervalli di 15 min per un periodo di controllo di 45 min (Per I), in condizioni di corto circuito. In alcune serie, Per I è seguito da un secondo periodo di flusso di 45 min (Per II) per determinare gli effetti acuti di inibitori NHE.

5 9. Test Farmacologico Rif. Esempio 9

Modello Farmacodinamico: effetto di composti del test e FAP sulla consistenza e forma delle feci di ratto. A ratti normali vengono dati un composto NHE-3 inibente ed eventualmente un polimero fluido-assorbente o -ritenente miscelati nella loro dieta a dosi aumentate. Acqua distillata è disponibile ad libitum. I dati clinici controllati sono peso corporeo, assunzione di cibo, assunzione di acqua, produzione urinaria e fecale. Na, K e creatinina sono misurati con un Clinical Analyzer (VetAce; Alfa Wassermann Diagnostic Technologies, LLC, West Caldwell, NJ). La consistenza delle feci espulse entro 24 h dopo la somministrazione di ciascun farmaco o veicolo è riportata come segue: quando le feci non sono formate, cioè torbide o acquose, questo è giudicato essere diarrea e la diarrea percentuale è riportata come il rapporto del numero di animali che producono feci non formate verso il numero testato. Tutte le feci sono raccolte subito dopo ogni evacuazione e poste in un vassoio coperto preparato per ogni animale per impedire che le feci si secchino. Per indagare la durata dell'attività di ciascun farmaco, le feci raccolte per ogni periodo di 8 h sono seccate per più di 8 h a 70°C in un forno ventilato dopo aver misurato il peso umido. Il contenuto fecale di fluidi è calcolato dalla differenza tra il peso fecale umido e il peso secco. Na e K fecale è analizzato per Cromatografia ionica (Dionex) dopo digestione acida dei campioni di feci.

15 10. Test Farmacologico Rif. Esempio 10

Effetto di composti del test e FAP su ratti CKD. Vengono usati ratti maschi Sprague-Dawley (275-300 g; Harlan, Indianapolis, IN) ed hanno libero accesso ad acqua e Purina rat chow 5001 ad ogni momento. Viene effettuata una nefrectomia per 5/6 per produrre un modello CRF di resezione chirurgica e lo studio del trattamento è effettuato 6 settimane dopo questa procedura. In un gruppo di controllo, ai ratti CRF è dato accesso a Purina rat chow; nei gruppi trattati, ai ratti CRF è dato accesso a Purina rat chow miscelato con l'articolo, cioè un composto NHE-3 inibente e eventualmente un polimero fluido-assorbente o -ritenente. Il periodo di trattamento è 30 giorni. La pressione sanguigna sistolica è controllata in tutti gli animali con l'uso di uno sfingomanometro per coda (Harvard Apparatus, South Natick, MA). Tutti i ratti sono eutanatizzati per iniezione intraperitoneale di pentobarbital (150 mg/kg peso corporeo) e il sangue è prelevato tramite puntura cardiaca per la determinazione di

Na⁺(Roche Hitachi Modular P800 chemistry analyzer; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e creatinina (kit 555A; Sigma Chemical, St. Louis, MO) sieriche. Sodio e creatinina vendono anche determinate in un campione di urina raccolta nelle 24 h immediatamente prima dell'eutanasia.

5 11. Test Farmacologico Rif. Esempio 11

Effetto di composti del test sull'accumulo di fluidi intestinale in topi lattanti. Topi lattanti Institute of Cancer Research/Harlan Sprague-Dawley (ICR-HSD), di età da 2 a 4 giorni (2,1±1,0 g), sono dosati oralmente con 0,1 mL di soluzione del test (veicolo (1 mmol/L HEPES) o inibitore NHE sciolto nel veicolo). Dopo dosaggio, i topi sono tenuti a 10 temperatura ambiente per 3 ore, quindi uccisi, i pesi corporeo ed intestinale misurati e viene calcolato un rapporto del peso intestinale sul peso corporeo rimanente. Un rapporto di 0,0875 rappresenta un'attività di unità di topo, indicando significativo accumulo di fluidi nell'intestino.

12. Test Farmacologico Rif. Esempio 12

15 *Determinazione della Capacità Idro-assorbente.* Questo test è progettato per misurare la capacità di un polimero di assorbire soluzione salina allo 0,9% contro una pressione di 50g/cm² o 5 kPa. Il superassorbente è posto in un cilindro di plastica che ha un tessuto di vaglio come fondo. Un peso che dà la pressione desiderata è posto alla sommità. Il dispositivo cilindrico è poi posto su una fonte di liquido. Il superassorbente è lasciato a 20 bagno per un'ora e la capacità assorbente è determinata in g/g.

Questo principio del test è descritto in European Disposables And Nonwovens Association (EDANA) standard *EDANA ERT 442 - Gravimetric Determination of Absorption under Pressure or Absorbency Under Load (AUL)* o nel test AUL trovato in colonna 12 nel brevetto US n. 5.601.542. Può essere usato qualunque di questi due metodi oppure il metodo 25 semplificato descritto sotto.

Equipaggiamento:

- Un cilindro di plastica avente un tessuto di vaglio fatto di acciaio o nylon incollato al fondo. Il tessuto può avere aperture di maglia di 36 µm (designata "400 mesh") o in ogni caso più piccole delle particelle testate più piccole. Il cilindro può avere un 30 diametro interno di 25,4 mm ed un'altezza di 40 mm. Può anche essere usato un cilindro più grande, quale l'apparato nello standard *EDANA ERT 442 - Gravimetric Determination of Absorption under Pressure.*

- Un pistone di plastica o disco spaziatore con un diametro leggermente più piccolo del diametro interno del cilindro Per una tazza con un diametro interno di 25,4 mm il disco può essere largo 25,2 mm, alto 8 mm e pesare circa 4,4 g.
- 5 • Un peso che esercita una pressione di 50 g/cm^2 sul superassorbente (in combinazione con il pistone). Per un cilindro di diametro interno 25,4 mm ($= 5,067 \text{ cm}^2$) e un pistone di 4,4 g, il peso dovrebbe avere una massa di 249 g.
- Piastra filtro di vetro o ceramica (porosità = 0). La piastra è alta almeno 5 mm e ha un diametro più largo del cilindro.
- Carta filtro con un diametro più largo del cilindro. Dimensione poro $<25 \mu\text{m}$.
- 10 • Piatto o vassoio Petri
- Soluzione 0,9% NaCl

Procedura:

- Porre la piastra filtro di vetro in un piatto Petri e mettere una carta filtro sulla sommità.
- 15 • Riempire il piatto Petri con soluzione 0,9% NaCl – fino alla cima della piastra filtro.
- Pesare un campione di superassorbente che corrisponde ad una copertura di $0,032 \text{ g/cm}^2$ sul tessuto di vaglio del cilindro ($=0,16 \text{ g}$ per un cilindro con un diametro interno 25,4 mm). Registrare il peso esatto del campione (A). Distribuire con attenzione il campione sul tessuto di vaglio.
- 20 • Mettere il pistone di plastica in cima al campione distribuito e pesare l'insieme cilindro (B). Quindi montare il peso sopra il pistone.
- Mettere l'insieme sulla carta filtro e lasciare a bagno il superassorbente per 60 minuti.
- Rimuovere il peso e pesare l'insieme con il superassorbente gonfio (C).
- 25 • Calcolare l'AUL in g/g secondo questa formula: $C - B$.

13. Test Farmacologico Rif. Esempio 13

Modello farmacodinamico: effetto di composti del test sul contenuto d'acqua fecale. Ratti femmina normali Sprague Dawley (Charles-River laboratories international, Hollister, CA), di 7- 8 settimane con peso corporeo 175 - 200g sono stati acclimatati per almeno 3 giorni prima di procedere con gli esperimenti. Gli animali sono stati forniti di cibo (Harlan Teklad 2018c) ed acqua *ad libitum* durante l'esperimento. Gli animali sono stati raggruppati casualmente in gruppi da 6 ratti.

30 Gli esperimenti sono stati iniziati dosando oralmente i composti del test a 3 mg/kg in volume da 10 ml/kg . Ratti dal gruppo di controllo sono stati alimentati con sonda gastrica con lo

stesso volume di veicolo (acqua). Dopo dosaggio, i ratti sono stati posti in gabbie metaboliche per 16 ore (per tutta la notte). Consumo di cibo ed acqua sono stati controllati. Dopo sedici ore, feci e urine sono state raccolte. La percentuale di acqua fecale è stata misurata pesando campioni fecali prima e dopo essiccamento.

- 5 Dati rappresentativi del contenuto % di acqua fecale sono mostrati in Tabella 11 (i dati sono espressi come medie, con 6 animali per punto-dati). Le differenze tra gruppi di controllo e trattati sono state valutate tramite ANOVA ad una via con Dunnett post test. I risultati sono significativi se $p < 0,05$.

Tabella 11			
(Rif.) Esempio	%Acqua fecale	%Acqua fecale (% di controllo)	Significativo?
224	65%	125%	Si
234	58%	117%	Si
239	58%	114%	Si
178	59%	118%	Si
237	60%	120%	Si
238	60%	121%	Si
177	60%	121%	Si
244	61%	118%	Si
236	64%	128%	Si
250	60%	120%	Si
200	62%	124%	Si
201	63%	127%	Si
202	63%	134%	Si
203	61%	130%	Si

10 14. Test Farmacologico Rif. Esempio 14

Modello farmacodinamico: effetto di composti del test sui livelli urinari di sodio. Si prevede che la riduzione di assorbimento di sodio dall'intestino si rifletterà in ridotti livelli di sodio nell'urina. Per testare ciò, sono stati ripetuti i protocolli in Rif. Esempio 13, ma è stata

raccolta l'urina in aggiunta alle feci. I livelli di sodio nell'urina sono stati analizzati per cromatografia ionica (IC) e la quantità di sodio escreto nell'urina è stata corretta per variazioni nell'assunzione di sodio misurando il consumo di cibo. In aggiunta, i composti del test sono stati somministrati a diversi livelli di dose per dimostrare una relazione dose-
5 risposta. Come mostrato in Figure 3A e 3B per Esempi 201, 244 e 260, dove poichè i ratti hanno escreto nell'urina circa metà del sodio che consumano, nei ratti trattati con dosi crescenti di NHE-3 inibitore, la quantità di sodio escreto nell'urina diminuisce significativamente e dipendentemente dalla dose.

15. Test Farmacologico Rif. Esempio 15

10 *Modello farmacodinamico: effetto dose dipendente del composto del test sul contenuto di acqua fecale.* Ratti sono stati controllati per il contenuto di acqua fecale come in Rif. Esempio 13 e il composto del test è stato somministrato a diversi livelli di dose per dimostrare una relazione dose-risposta. Come mostrato in Figura 4, in ratti trattati con dosi crescenti dell'inibitore NHE-3 testato (cioè Esempio 87), il contenuto di acqua fecale è
15 aumentato significativamente e dipendentemente dalla dose.

16. Test Farmacologico Rif. Esempio 16

Modello farmacodinamico: Aggiunta di un polimero assorbente fluido al cibo. Ratti sono stati controllati per il contenuto di acqua fecale come in Rif. Esempio 13, con l'aggiunta di un secondo gruppo che è stato alimentato con cibo addizionato di 1% Psillio alla loro dieta.
20 In aggiunta all'acqua fecale e al sodio urinario, la forma fecale è stata controllata su una scala 1-5, dove 1 è una normale pallina, 3 indica palline molli e non formate e 5 indica feci acquose. Come mostrato in Figure 5A, 5B e 5C, integrando la dieta con Psillio si è ottenuta una lieve riduzione della forma delle feci ma senza influenzare la capacità del composto del test (cioè Esempio 224) di aumentare il contenuto di acqua fecale o diminuire il sodio
25 urinario.

17. Test Farmacologico Rif. Esempio 17

Modello farmacodinamico: effetto di composti del test sull'ipersensibilità viscerale acuta indotta da stress in ratti wistar femmine. Ratti Wistar femmine del peso di 220 - 250 g sono stati preparati per elettromiografia. Gli animali sono stati anestetizzati e tre paia di elettrodi a
30 filo nickel-cromo sono stati impiantati bilateralmente nei muscoli striati a 3 cm lateralmente dalla linea mediana. Le estremità libere degli elettrodi sono state esteriorizzate sul retro del collo e protette da un tubo di vetro attaccato alla pelle. Le registrazioni elettromiografiche (EMG) sono iniziate 5 giorni dopo la chirurgia. L'attività elettrica dei muscoli striati

addominali è stata registrata con un elettromiografo (Mini VIII; Alvar, Paris, France) usando una costante a tempo breve (0,03 sec.) per rimuovere segnali a bassa frequenza (<3 Hz).

Stress da restrizione parziale (PRS), uno stress relativamente blando, è stato effettuato come segue. Brevemente, gli animali sono stati lievemente anestetizzati con etil etere e le loro zampe anteriori libere di afferrare e il tronco toracico sono stati avvolti in una imbracatura di costrizione di nastro di carta per limitare, ma non impedire i loro movimenti corporei e posti nelle loro gabbie per 2 ore. Animali finto-stress di controllo sono stati anestetizzati ma non avvolti. PRS è stato effettuato tra le 10:00 e le 12:00 del mattino.

Distensione colonrettale (CRD) è stata effettuata come segue: ratti sono stati posti in un tunnel di plastica, dove non era consentito muoversi o scappare ogni giorno per 3 giorni consecutivi (3 h /giorno) prima di ogni CRD. Il pallone usato per la distensione era lungo 4 cm e fatto da un preservativo di latex inserito nel retto a 1 cm dell'ano e fissato alla coda. Il pallone, collegato ad un barostato era gonfiato progressivamente per passaggi di 15 mmHg, da 0, 15, 45 e 60 mmHg, ciascun passaggio di gonfiaggio essendo di 5 min di durata. CRD era effettuata a T + 2h15 come una misura di PRS indotta da iperalgesia viscerale \pm composto del test o veicolo. Per determinare l'effetto antinocicettivo dei composti del test sull'ipersensibilità viscerale indotta da stress, i composti del test sono stati somministrati 1 h prima di CRD in 6 gruppi di 8 ratti femmine. Per ciascun parametro studiato (il numero di contrazioni addominali per ciascun periodo di 5 min durante la distensione rettale) i dati sono espressi come media \pm SEM. Confronti tra i diversi trattamenti sono stati effettuati usando un'analisi di varianza (ANOVA) seguita da un post test Dunnett. Il criterio per la significatività statistica è $p < 0,05$.

Figura 6 mostra i risultati di questo test usando il composto illustrato in Esempio 224 dosato oralmente a 10 mg/kg e mostra che a 45 e 60 mm Hg, l'inibizione di NHE-3 in ratti sorprendentemente riduce l'ipersensibilità viscerale alla distensione ($p < 0,05$).

18. Test Farmacologico Rif. Esempio 18

Modello farmacodinamico: effetto di composti del test sui livelli di sodio fecale. Si prevede che la riduzione di assorbimento di sodio dall'intestino si rifletterà in aumentati livelli di sodio nelle feci. Per testare ciò, sono stati ripetuti i protocolli in Rif. Esempio 13. Dopo essiccamento delle feci per determinare il contenuto di acqua, 1M HCl è stato aggiunto alle feci secche macinate ad una concentrazione di 50 mg/mL ed estratto a temperatura ambiente su rotatore per 5 giorni. Il contenuto di sodio è stato analizzato per cromatografia ionica (IC). Come mostrato in Figure 7A e 7B per Esempio 224, in ratti trattati con un NHE-3 inibitore, la quantità di sodio è stata escreta nelle feci significativamente ($p < 0,05$ tramite t-test).

19. Test Farmacologico Rif. Esempio 19

Determinazione del composto rimanente nelle feci. Ratti Sprague-Dawley sono stati alimentati oralmente con sonda gastrica con l'articolo del test. Una dose bassa di composto (0,1 mg/kg) è stata scelta in modo che le feci rimanessero solide e pratiche da raccogliere.

5 Per entrambi gli Esempi 202 e 203, tre ratti sono stati dosati e, dopo il dosaggio dei composti, i ratti sono stati posti in gabbie metaboliche per 72 ore. Dopo 72 ore, campioni fecali sono stati recuperati e seccati per 48 ore. Campioni fecali secchi sono stati macinati ad una forma polverosa e, per ogni ratto, 10 replicati di campioni da 50 mg sono stati estratti con acetonitrile. I materiali insolubili sono stati allontanati per centrifugazione e i surnatanti

10 analizzati per LC/MS/MS e confrontati contro una curva standard per determinare la concentrazione di composto. La quantità di composto effettivamente dosata è stata determinata per analisi LC/MS/MS delle soluzioni di dosaggio. La quantità totale di composto presente nei campioni fecali delle 72 ore è stata confrontata alla quantità totale di composto dosato e riportata come percentuale della dose totale recuperata. I risultati,

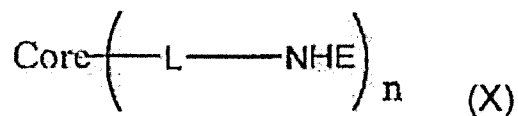
15 mostrati in Tabella 12, dimostrano recupero quasi quantitativo degli Esempi 202 e 203 in campioni fecali delle 72 ore.

Tabella 12

<u>Recupero di composti dosati da campioni fecali delle 72 ore</u>		
	% Recupero \pm SD	
	Esempio 202	Esempio 203
Ratto 1	93,8 \pm 11,8	100,3 \pm 6,7
Ratto 2	90,5 \pm 5,5	75,8 \pm 8,2
Ratto 3	92,4 \pm 10,6	104,4 \pm 7,1

RIVENDICAZIONI

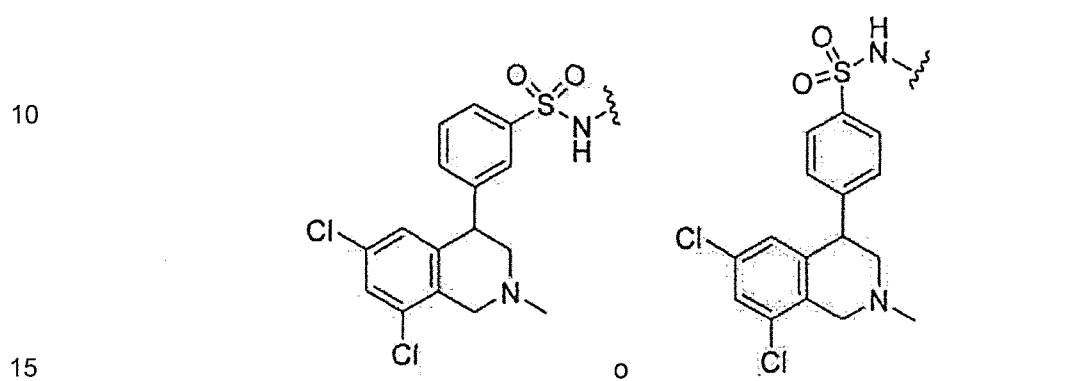
1. Un composto, o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui il composto ha la seguente struttura (X)



5 in cui:

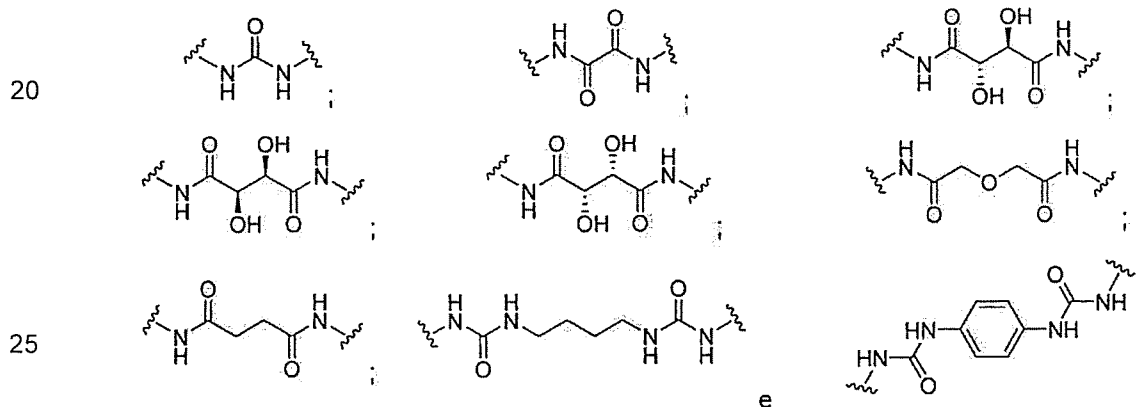
n è 2;

NHE ha una delle seguenti strutture:



L è un collettore polialchilene glicole; e

Core è scelto dal gruppo che consiste di:

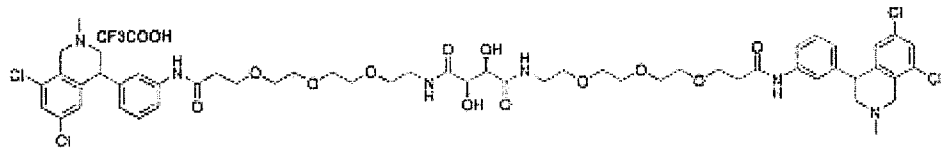


2. Il composto della rivendicazione 1, in cui L è un collettore polietilene glicole.

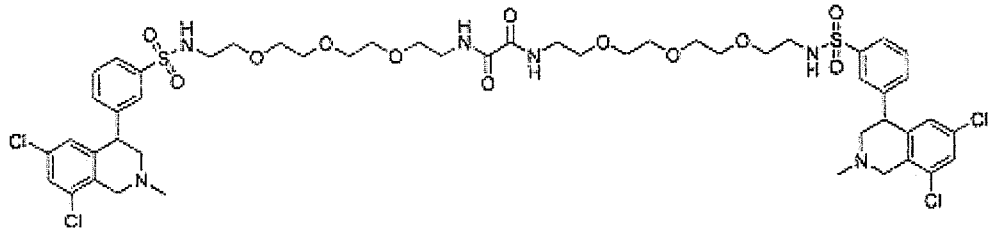
3. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2 in cui il composto è scelto da:

30

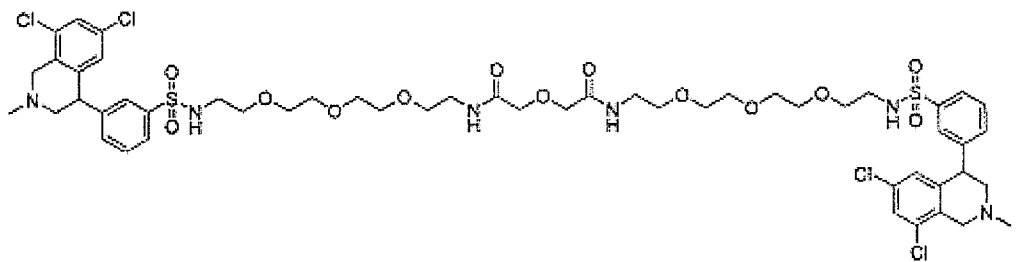
5



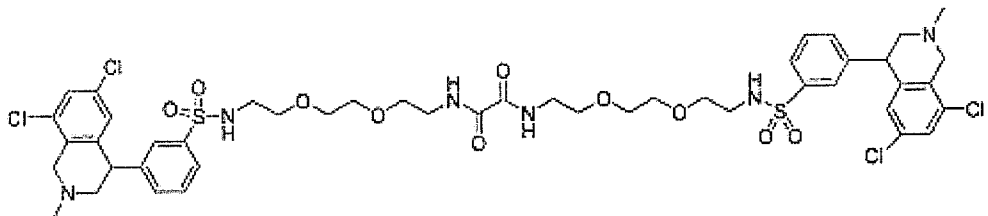
10



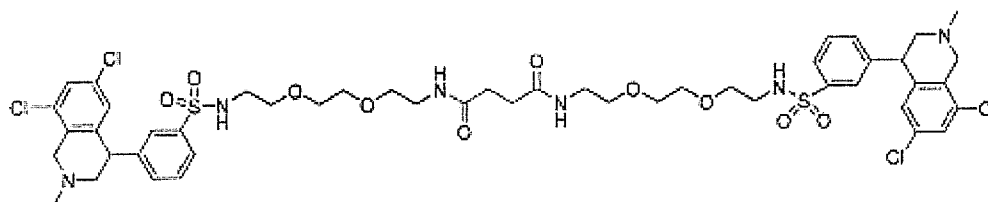
15



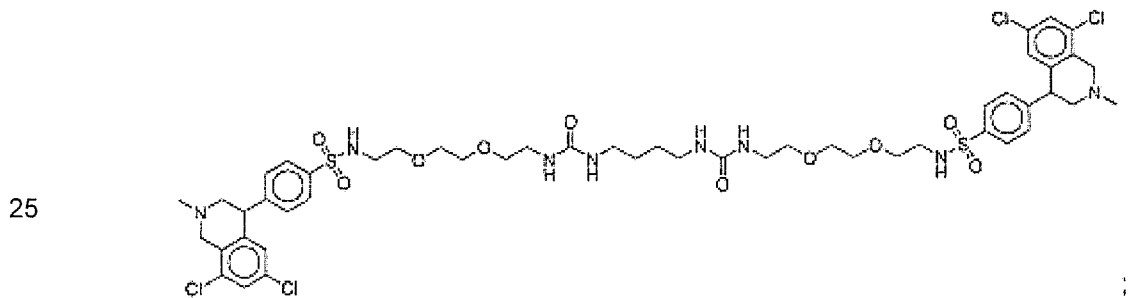
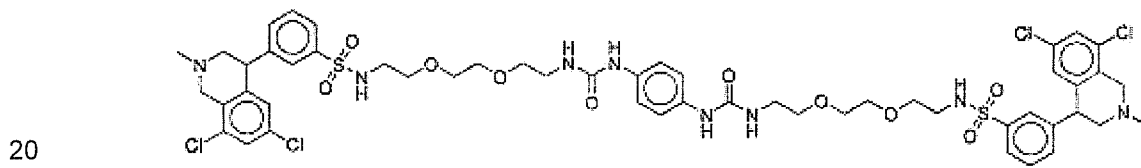
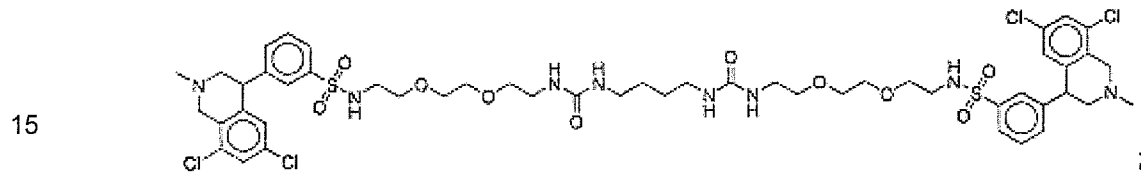
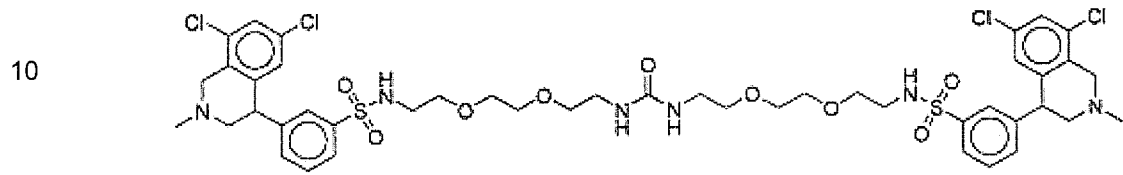
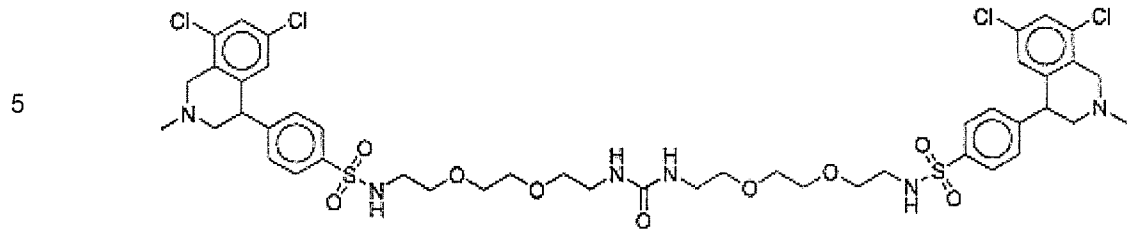
20



25

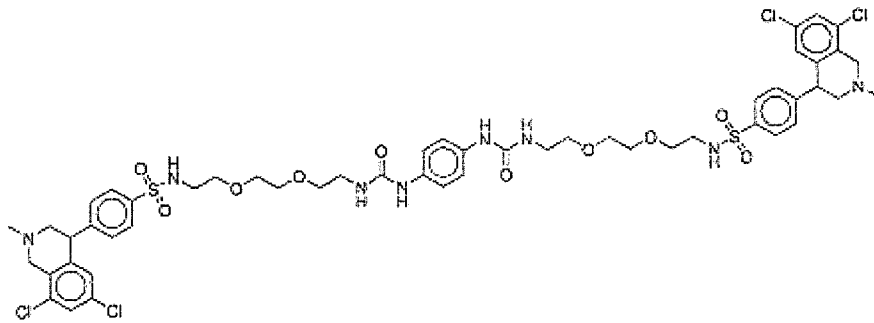


30

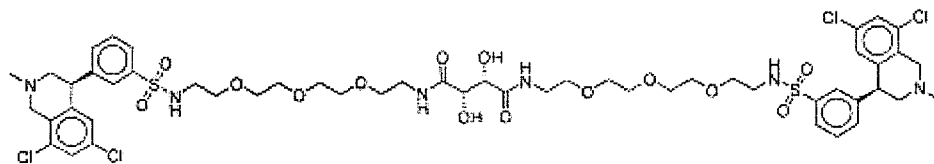


30

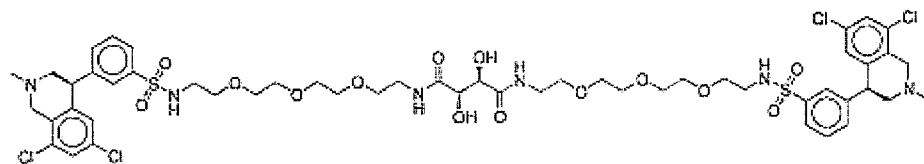
5



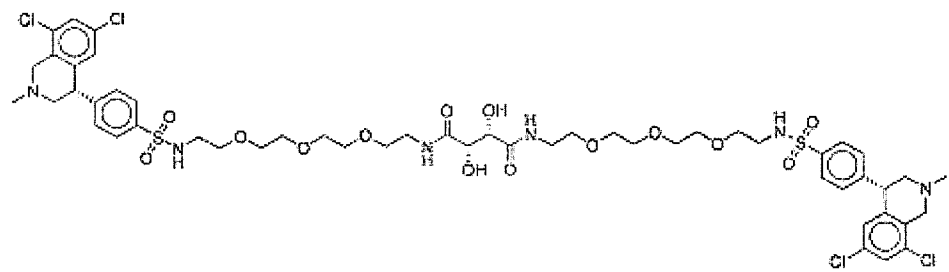
10



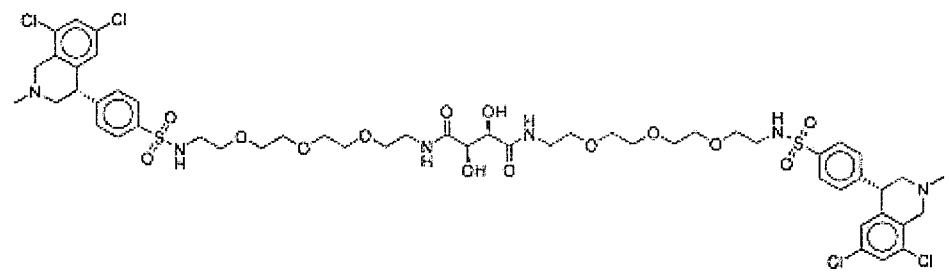
15



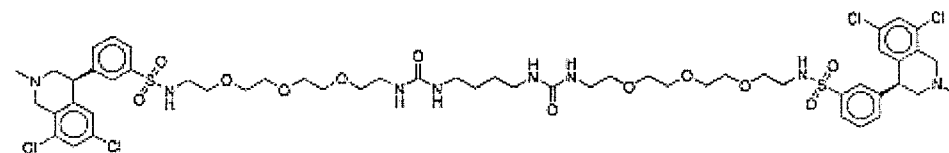
20



25



30

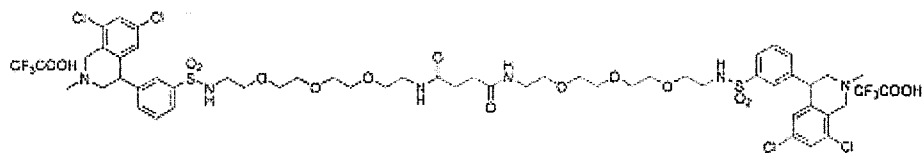




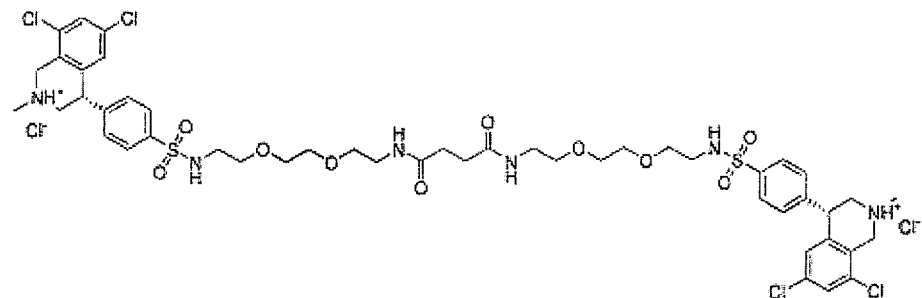
o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

4. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2 in cui il composto è scelto da:

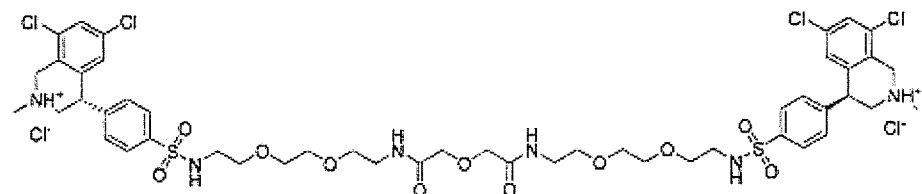
5



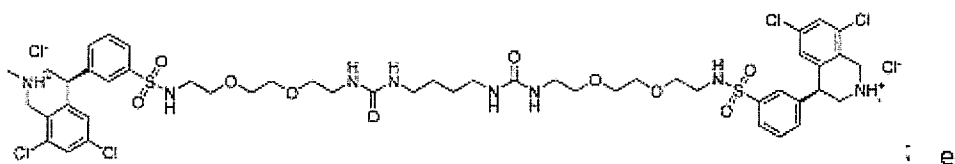
10



15



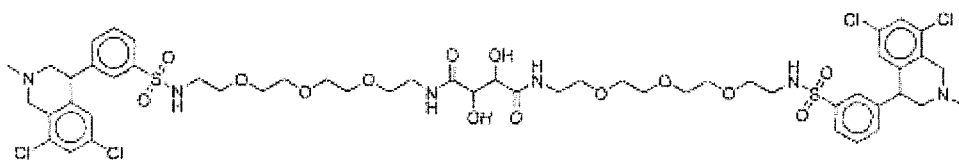
20



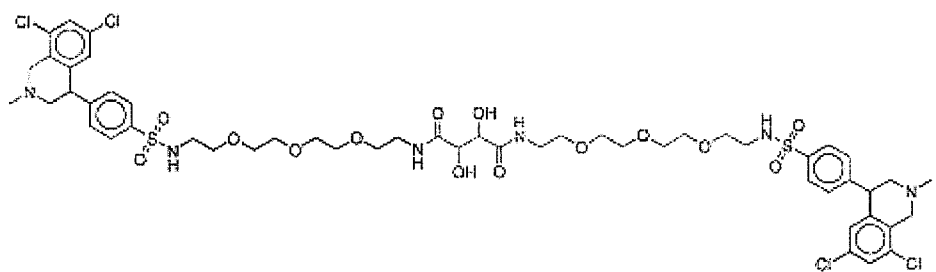
25

5. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2 in cui il composto è scelto da:

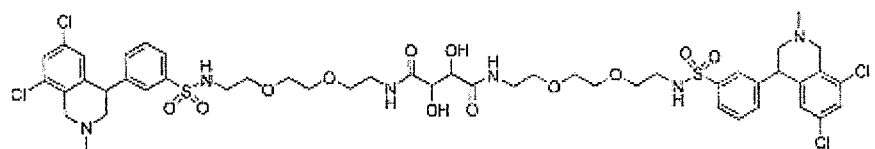
30



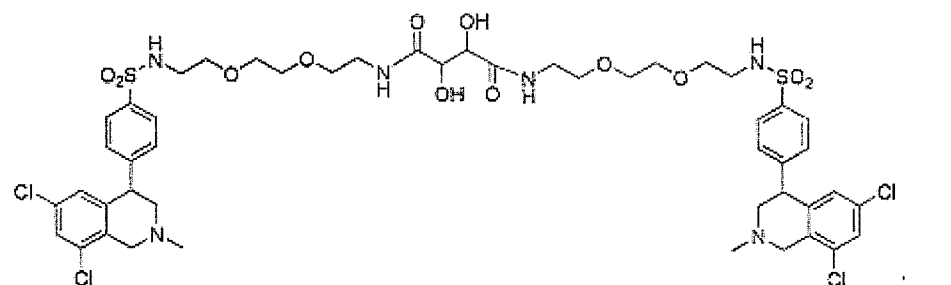
5



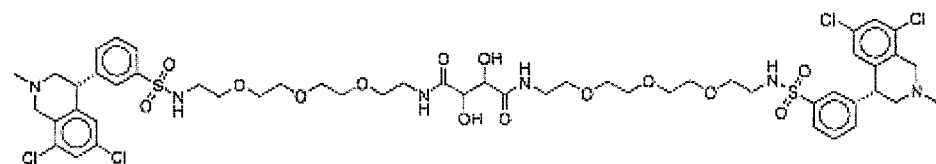
10



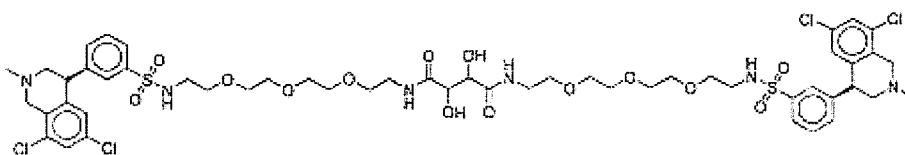
15



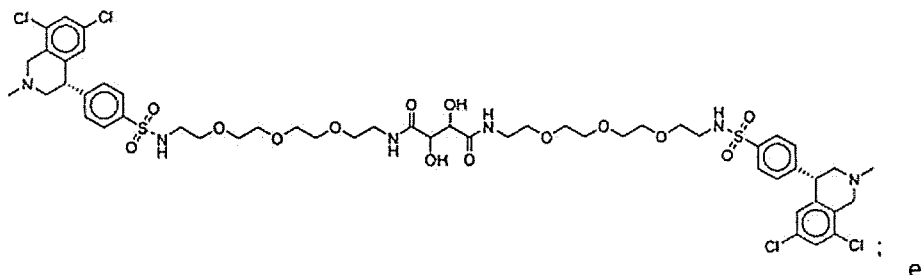
20



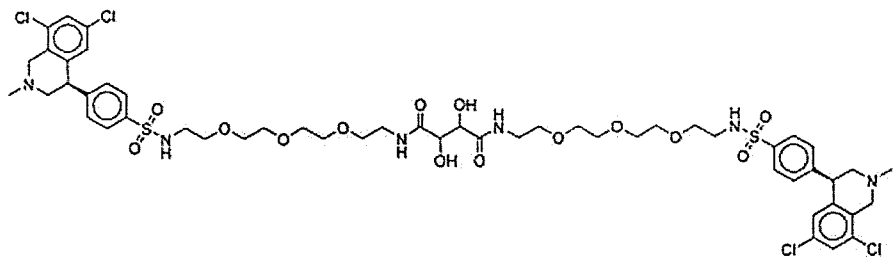
25



5

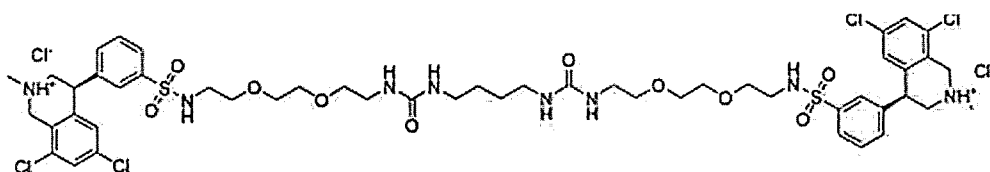


10



6. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2 in cui il composto è

15



7. Una composizione farmaceutica comprendente un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, o un stereoisomero o suo sale farmaceuticamente accettabile, e un veicolo, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

8. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6 per uso nel trattamento della sindrome da intestino irritabile.

9. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6 per uso nel trattamento della malattia renale allo stadio finale.

10. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6 per uso nel trattamento della malattia renale cronica.

11. Un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6 per uso nel trattamento della costipazione associata alla fibrosi cistica.

30

Dogana, 12/02/2018

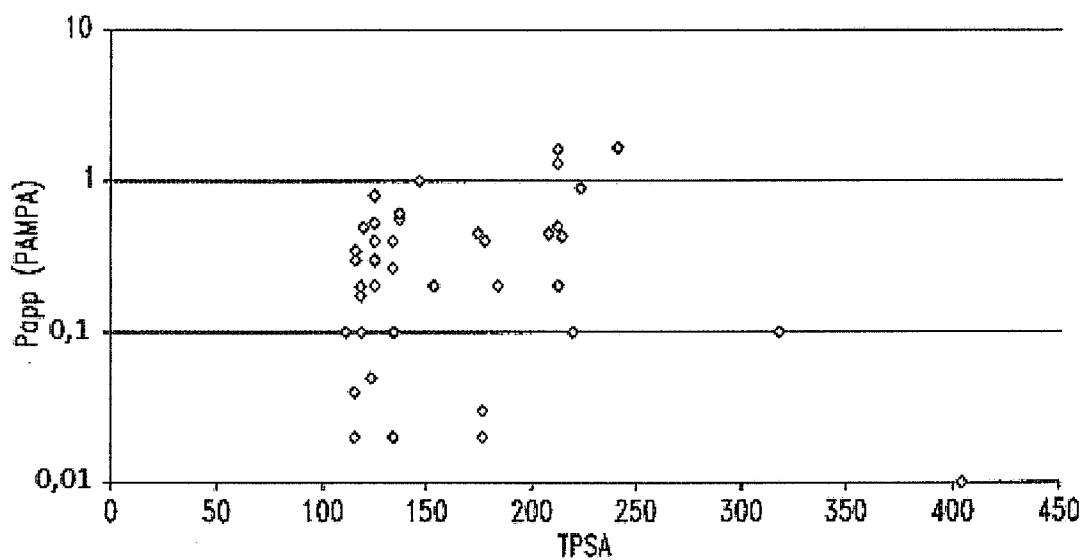
In fede

Il Mandatario

Ing. Marco Montebelli

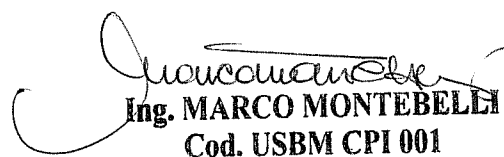
USBM CPI 001

Relazione tra tPSA e Permeabilità (Papp, come misurato nel saggio PAMPA) di composti degli esempi



Papp è riportato come A \rightarrow B, cm/sec $\times 10^{-6}$, e tPSA in (\AA^2)

FIG. 1


Ing. MARCO MONTEBELLI
Cod. USBM CPI 001

Contenuto di acqua di cieco e colon dopo somministrazione orale di Composti degli Esempi

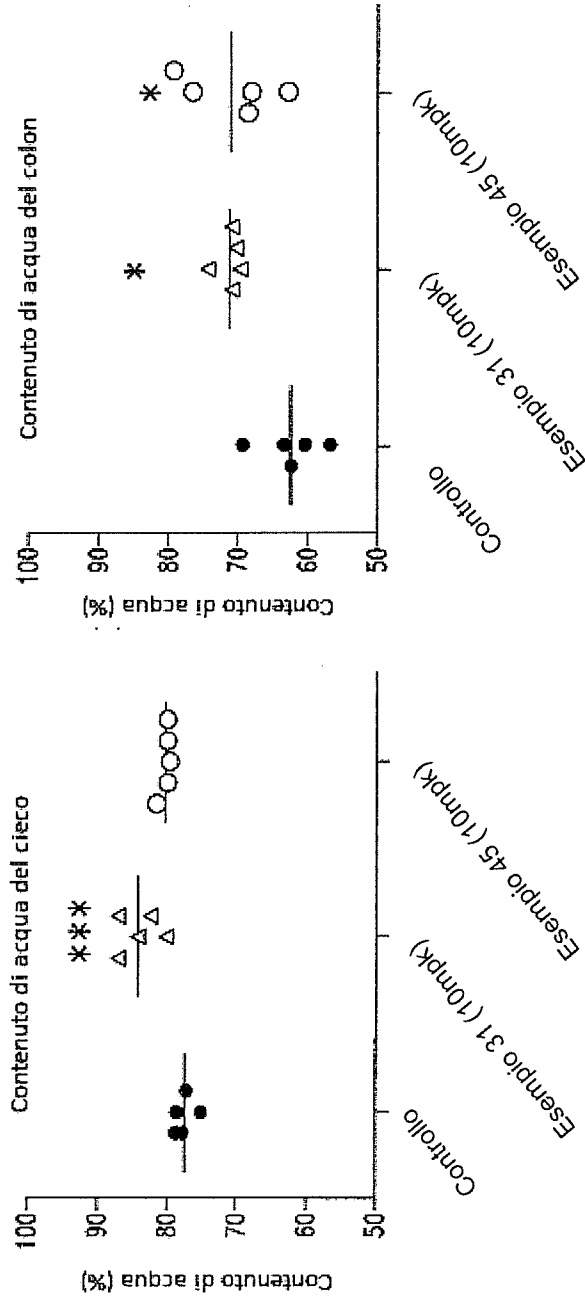


FIG. 2A

Ratti sono stati dosati con 10mg/kg di composto (Esempio o Controllo). Dopo 6 ore, i contenuti di cieco e colon sono stati rimossi, pesati e seccati e la % di acqua nei contenuti è stata determinata.

*, $P < 0,05$ e ***, $P < 0,01$ in confronto al controllo in analisi ANOVA

FIG. 2B

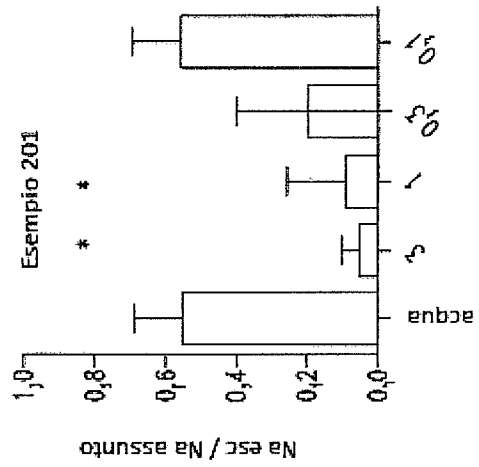


FIG. 3B

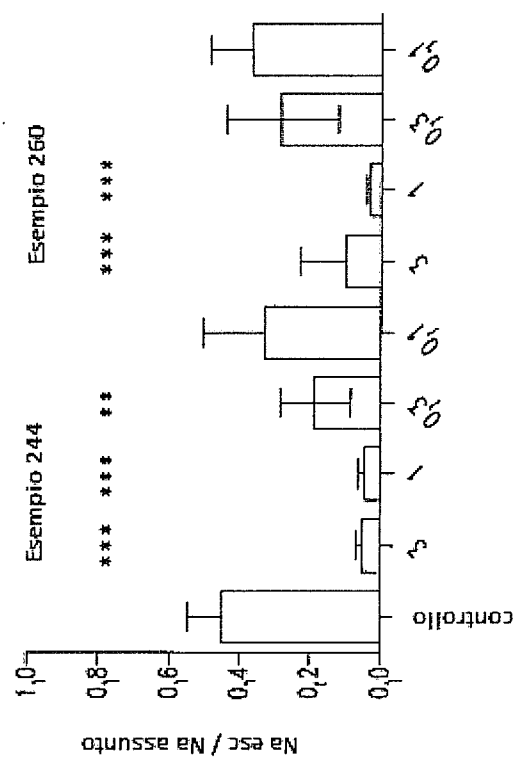


FIG. 3A

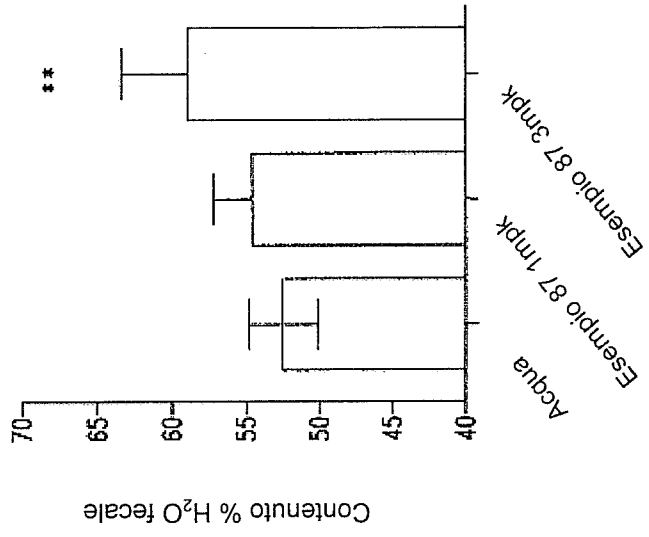


FIG. 4

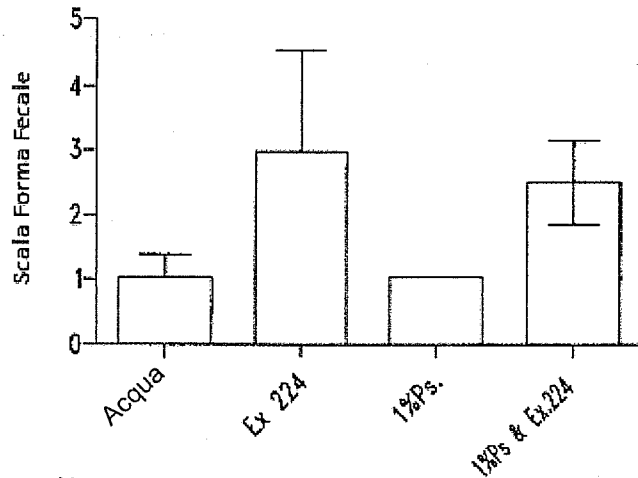


FIG. 5A

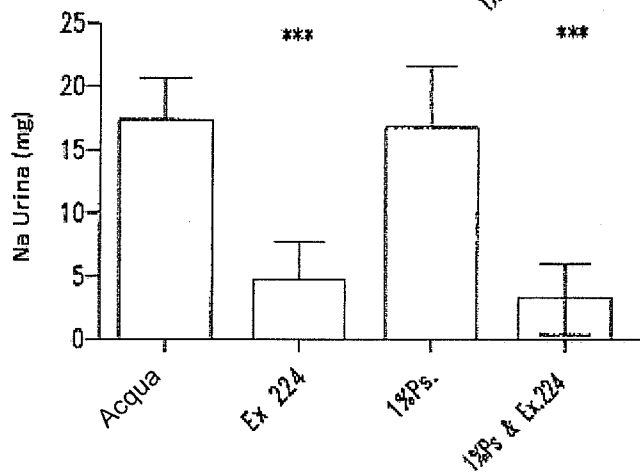


FIG. 5B

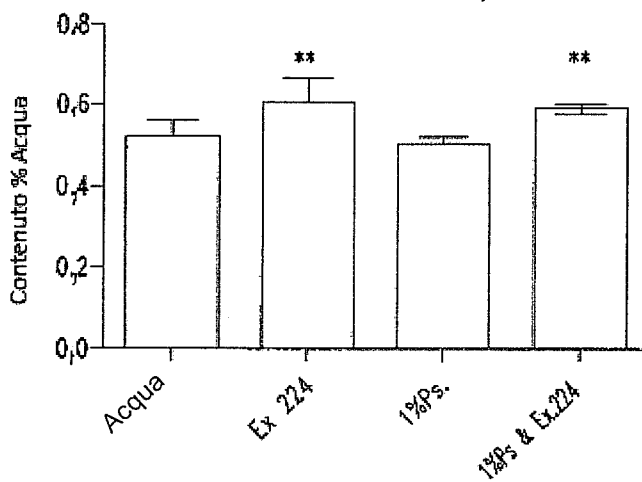


FIG. 5C

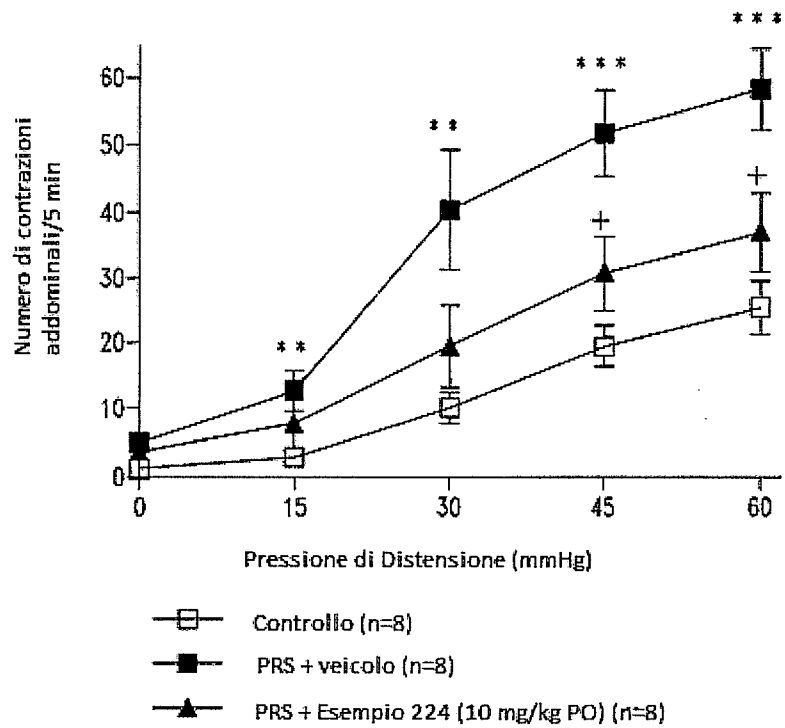


FIG. 6

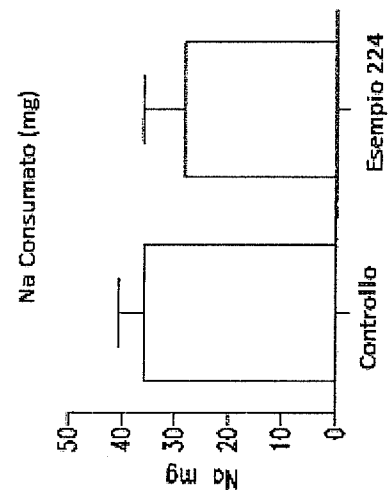


FIG. 7A

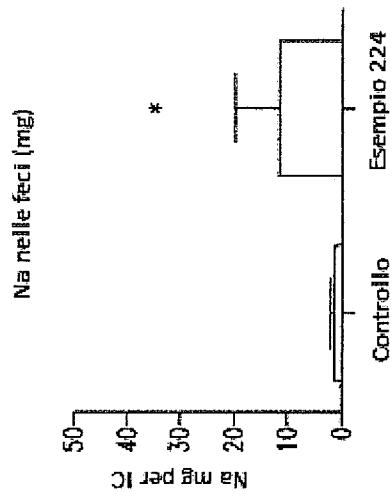


FIG. 7B