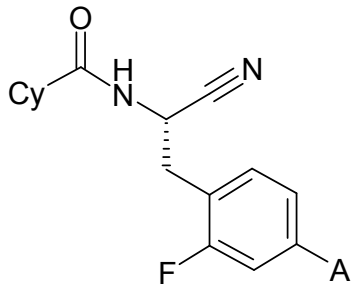
# INHIBIDORES ESPIROCÍCLICOS DE CATEPSINA C

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a un compuesto de la Fórmula I




I

en donde A y Cy tienen uno de los significados indicados en la memoria descriptiva y su uso como inhibidores de catepsina C, composiciones farmacéuticas que los contienen y métodos para utilizarlos como agentes para el tratamiento y/o prevención de enfermedades relacionadas con la actividad de dipeptidil peptidasa I, por ejemplo, enfermedades respiratorias.

## ANTECEDENTES

- WO2004110988 describe inhibidores de nitrilo peptidilo como inhibidores de dipeptidil-peptidasa I (DPPI) para el tratamiento de varias enfermedades.
- WO2009074829 y WO2010142985 también describen inhibidores de nitrilo peptidilo como inhibidores de dipeptidil-peptidasa I (DPPI) para el tratamiento de asma, COPD o rinitis alérgica.
- WO2013041497 describe N-[1-ciano-2-(fenil)etil]-2-azabiciclo[2.2.1]heptan-3-carboxamidas sustituidas como inhibidores de dipeptidil-peptidasa I (DPPI) para el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades respiratorias.

## BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

Dipeptidil-aminopeptidasa I (DPPI o catepsina C; EC3.4.141), es una cisteína proteasa lisosomal que puede eliminar dipéptidos de la terminal amino de sustratos de proteínas. La DPPI fue inicialmente descubierta por Gutman y Fruton en 1948 (J. Biol. Chem 174: 851-858, 1948). El cADN de la enzima humana se describió en 1995 (Paris et al.; FEBS Lett 369: 326-330, 1995). La proteína DPPI se procesa en una enzima madura proteolíticamente activa que consiste en una cadena pesada, una cadena liviana y un propéptido que permanece asociado a la enzima activa (Wolters et al.; J.

Biol. Chem. 273: 15514-15520, 1998). Mientras que las demás catepsinas cisteínas (por ejemplo, B, H, K, L y S) son monómeros, DPPI es un tetrámero 200-kD con 4 subunidades idénticas, cada una compuesta de 3 cadenas de polipéptidos diferentes. DPPI se expresa constitutivamente en muchos tejidos, con los más altos niveles en pulmón, riñón, hígado y bazo (Kominami et al.; Biol. Chem. Hoppe Seyler 373: 367-373, 1992). Consistente con su función en la activación de serina proteasas de células hematopoyéticas, DPPI también se expresa en niveles relativamente altos en neutrófilos, linfocitos citotóxicos, células *killer* naturales, macrófagos alveolares y mastocitos. La información reciente obtenida de ratones con deficiencia de DPPI sugiere que, además de ser una enzima importante en la degradación de proteínas lisosomales, DPPI también funciona como la enzima clave en la activación de serina proteasas de gránulos en linfocitos T citotóxicos y células *killer* naturales (granzimas A y B; Pham et al.; Proc. Nat. Acad. Sci 96: 8627-8632, 1999), mastocitos (quimasa y triptasa; Wolter et al.; J Biol. Chem. 276: 18551-18556, 2001), y neutrófilos (catepsina G, elastasa y proteinasa 3; Adkison et al.; J Clin. Invest. 109: 363,371, 2002). Una vez activadas, estas proteasas pueden degradar diversos componentes de la matriz extracelular, lo cual puede generar daño en el tejido e inflamación crónica.

Por lo tanto, los inhibidores de catepsina C pueden ser potencialmente útiles como terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias dominadas por neutrófilos-, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema pulmonar, asma, esclerosis múltiple y fibrosis quística (Guay et al.; Curr. Topics Med. Chem. 10: 708-716, 2010; Laine and Busch-Petersen; Expert Opin. Ther. Patents 20: 497-506, 2010). La artritis reumatoide es también otra enfermedad inflamatoria crónica en donde la DPPI parece tener una función. Los neutrófilos se reclutan en el área de la inflamación de las articulaciones y liberan catepsina G, elastasa y proteinasa 3, proteasas que se consideran responsables de la destrucción del cartílago asociada a la artritis reumatoide. De hecho, los ratones con deficiencia de DPPI estaban protegidos contra la artritis aguda inducida por la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales contra el colágeno tipo II (Adkison et al.; J Clin. Invest. 109: 363,371, 2002).

En vista de la función que cumple la DPPI en la activación de determinadas proteasas serina proinflamatorias, el problema de la presente invención es preparar compuestos que inhiben su actividad, que a su vez inhiben la actividad de la serina proteasa corriente abajo.

Se descubrió sorprendentemente que los compuestos espirocíclicos de la

presente invención poseen

- una actividad de catepsina C (DPPI) potente, que exhibe preferentemente una inhibición de DPPI $IC_{50}$ [µM] < 0,0050, con particular preferencia, < 0,0030,

Además, los compuestos de la presente invención exhiben las siguientes capacidades, que son favorables por su eficacia farmacológica:

- actividad celular alta, por ejemplo, inhibición del procesamiento de elastasa neutrófila en la línea celular U937, que exhibe, preferentemente, un IC50 [µM]<0,5, con particular preferencia, <0,003.
- selectividad alta contra otras catepsinas, por ejemplo, catepsina K, y
- en general, propiedades farmacocinéticas deseables, por ejemplo, estabilidad metabólica, que exhiben, preferentemente, una estabilidad *in vitro* en incubaciones de microsomas de hígado humano de t1/2 [min] >110, con particular preferencia, ≥120.

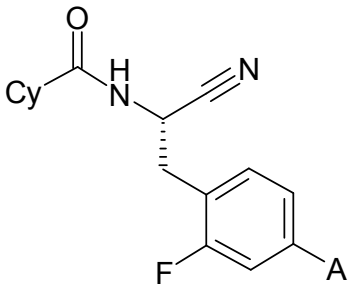
También se descubrió sorprendentemente que los compuestos de la presente invención muestran un nivel alto de inhibición de la actividad elastasa neutrófila en lisados de células de BALF (fluido del lavado broncoalveolar) en un acoplamiento diana en un modelo de ratón.

Asimismo, se descubrió sorprendentemente que los compuestos espirocíclicos de la presente invención forman un puente de sal adicional al Glu275 de la catepsina C, lo que genera un alto nivel de actividad enzimática y celular de esta clase de compuesto. Esta interacción adicional de la amina espiro-cíclica (por ejemplo, espiro-azetidina en el Ejemplo 11 y espiro-pirrolidina en el Ejemplo 16) se verificó mediante experimentos de cocristalización de la proteína catepsina C con los Ejemplos 11 y 16. En ambos casos, el átomo de nitrógeno básico forma un puente de sal con Glu275.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

Sorprendentemente, se descubrió que el problema antes mencionado se resuelve mediante los compuestos de la Fórmula I de la presente invención.

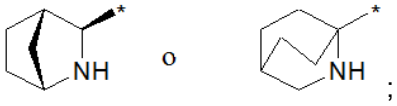
Por lo tanto, la presente invención se refiere a un compuesto de la Fórmula I o a una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico,



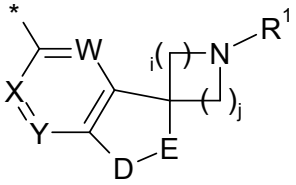
I

en donde

Cy es



A es



en donde

W se selecciona del grupo que consiste en CH y N;

X se selecciona del grupo que consiste en CH y N;

Y se selecciona del grupo que consiste en CH y N;

siempre que un máximo de uno de W, X e Y pueda ser N;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $N(R^2)$-C(O), $CH_2CH_2$, C(O)-O y $CH_2$-O;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $C_{1-3}$-alquilo;

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $C_{1-3}$-alquilo, $CH_3OCH_2CH_2$-, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, 4-tetrahidropiranilo y 3-tetrahidropiranilo;

i es 1, 2 o 3;

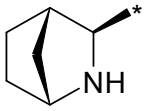
j es 1, 2 o 3;

siempre que la suma de i+j sea 2, 3 o 4.

**FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS**

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

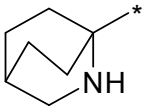
Cy es



.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

Cy es



Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$;

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^2$ es H.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^2$ es $CH_3$;

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

D-E es $CH_2$-O

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$ y oxetanilo;

$R^2$ es $CH_3$;

W se selecciona del grupo que consiste en CH y N;

X se selecciona del grupo que consiste en CH y N;

Y se selecciona del grupo que consiste en CH;

siempre que un máximo de uno de W, X e Y pueda ser N;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $N(R^2)$-C(O), $CH_2CH_2$, C(O)-O y $CH_2$-O;

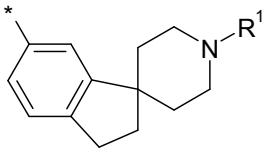
i es 1 o 2;

j es 1 o 2;

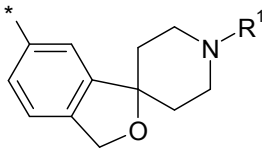
siempre que la suma de i+j sea 2, 3 o 4.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

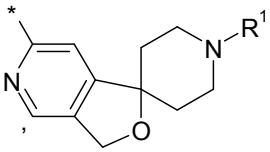
A se selecciona del grupo que consiste en las Fórmulas A1 a A14:



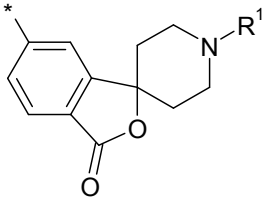
A1



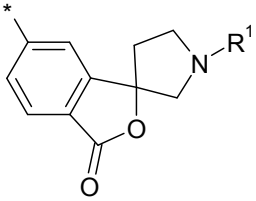
A2



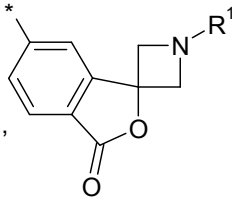
A3



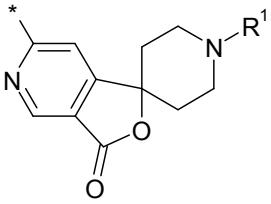
A4



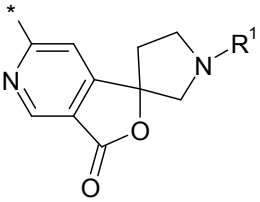
A5



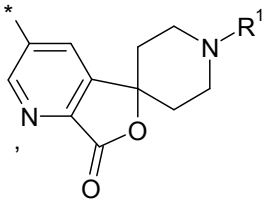
A6



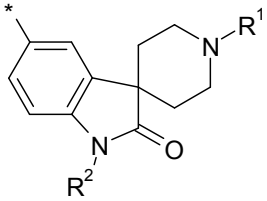
A7



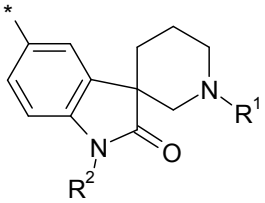
A8



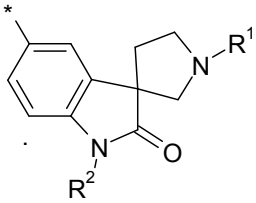
A9



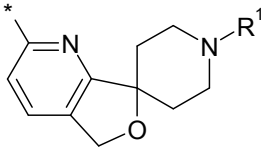
A10



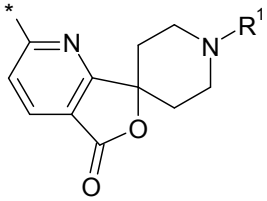
A11



A12



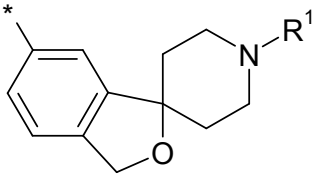
A13



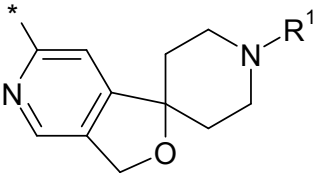
A14

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

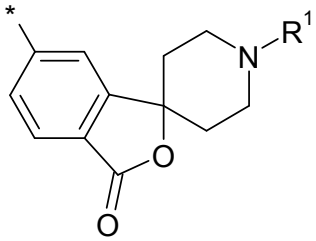
A se selecciona del grupo que consiste en A2, A3, A4, A5, A6, A7, A10, A13 y A14.



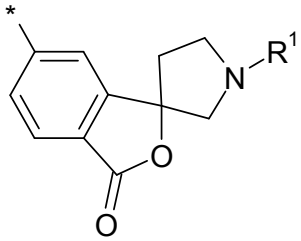
A2,



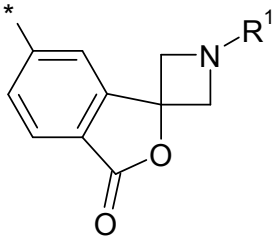
A3,



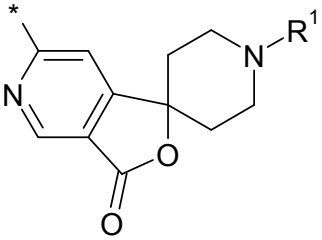
A4,



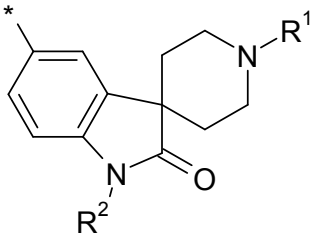
A5



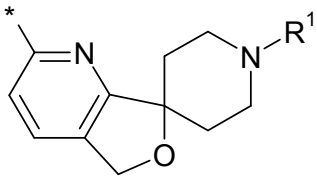
A6,



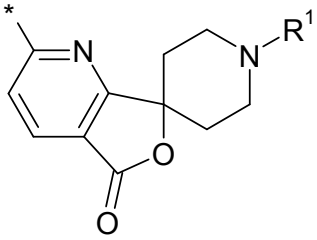
A7,



A10,



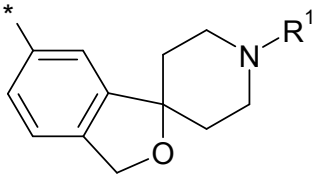
A13,



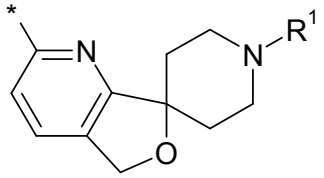
A14.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

A se selecciona del grupo que consiste en A2 y A13



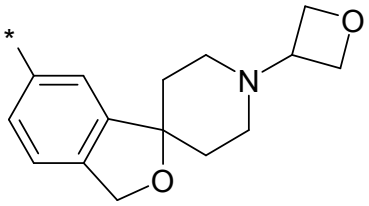
A2,



A13

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

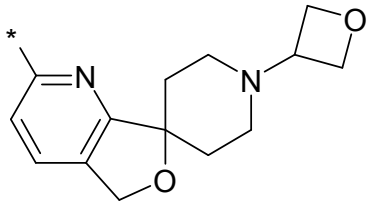
A es un grupo de las Fórmulas A2.1.



A2.1

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

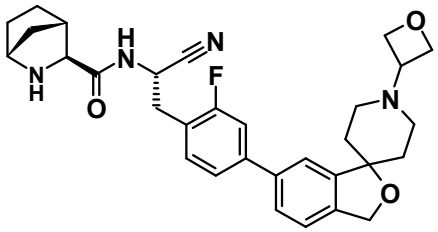
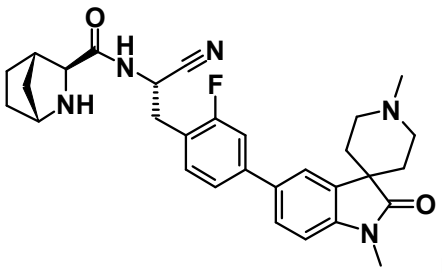
A es un grupo de la Fórmula A13.1

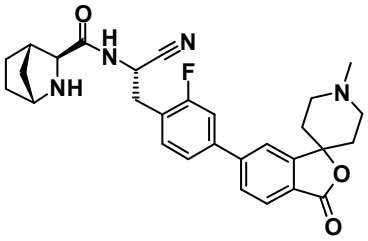
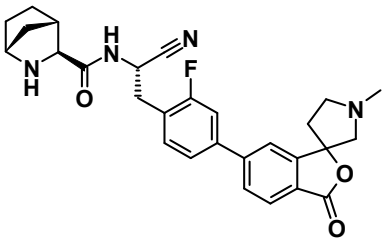
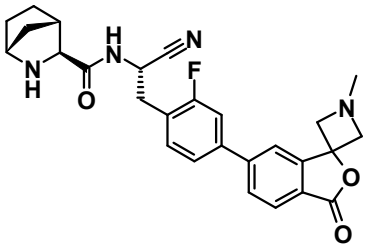
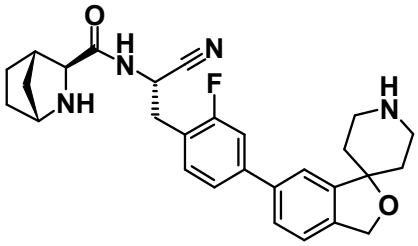
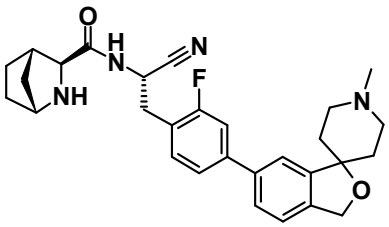
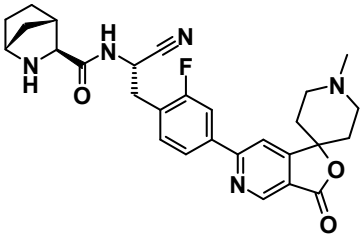
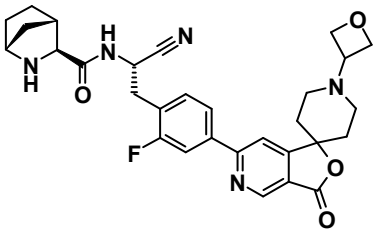
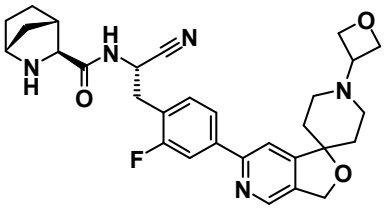


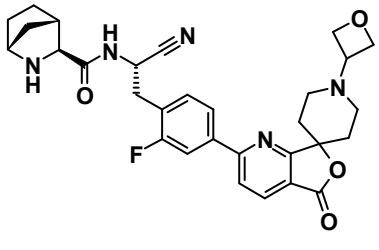
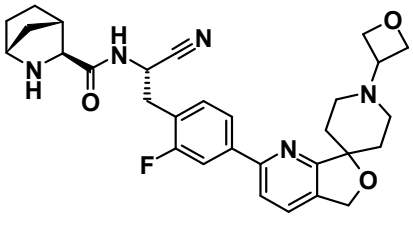
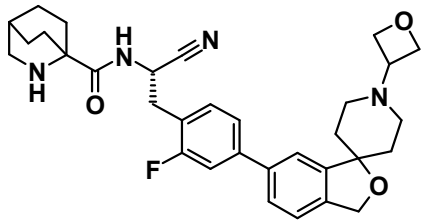
A13.1

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, seleccionados del grupo que consiste en

Ejemplos 1, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 22, 23, 24, 25 y 27.

| | |
|---|---|
|  Ej. 1 |  Ej. 5 |

| | |
|---|---|
|  Ej. 8 |  Ej. 10 |
|  Ej. 12 |  Ej. 13 |
|  Ej. 14 |  Ej. 19 |
|  Ej. 22 |  Ej. 23 |
| | |

| | |
|---|---|
|  Ej. 24 |  Ej. 25 |
|  Ej. 27 | |

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ es oxetanilo.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$ y oxetanilo;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$-.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O, C(O)-O y N($R^2$)-C(O).

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O y C(O)-O.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$ y oxetanilo;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$.

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O, C(O)-O y N($R_2$)-C(O).

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$, oxetanilo;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O y C(O)-O.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en oxetanilo;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O y C(O)-O.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

W es CH;

X es CH;

Y es CH.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

W es CH;

X es N;

Y es CH.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

W es N;

X es CH;

Y es CH.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

W es CH;

X es CH;

Y es N.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$-;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O, C(O)-O y $N(R_2)$-C(O);

W es CH;

X es CH;

Y es CH.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O y C(O)-O;

W es CH;

X es CH;

Y es CH.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$-;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O, C(O)-O y $N(R_2)$-C(O);

W es N;

X es CH;

Y es CH.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O y C(O)-O;

W es N;

X es CH;

Y es CH.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$-;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O, C(O)-O y $N(R_2)$-C(O);

W es CH;

X es N;

Y es CH.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O y C(O)-O;

W es CH;

X es N;

Y es CH.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

$R^2$ se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3$-;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O, C(O)-O y $N(R_2)$-C(O);

W es CH;

X es CH;

Y es N.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde

$R^1$ se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3$- y oxetanilo;

D-E se selecciona del grupo que consiste en $CH_2$-O y C(O)-O;

W es CH;

X es CH;

Y es N.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A se selecciona del grupo que consiste en A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13 y A14.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A se selecciona del grupo que consiste en A1, A2, A3, A4, A6, A7, A9, A10, A13 y A14.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A se selecciona de A4, A5, A6, A7 A8, A9 y A14.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A se selecciona del grupo que consiste en A10, A11 y A12.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A se selecciona del grupo que consiste en A2, A3, A9, A13 y A14.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A se selecciona del grupo que consiste en A2, A3 y A13.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A es A2.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde A es A13.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde i es 2 y j es 1.

Se prefieren los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde i es 1 y j es 1.

Se prefieren particularmente los compuestos anteriores de la Fórmula I, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde i es 2 y j es 2.

Se prefieren los compuestos de la Fórmula I, en donde los compuestos se seleccionan del grupo que consiste en los Ejemplos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26 y 27.

Todas y cada una de las definiciones de $R^1$, $R^2$, Cy, A, D, E, W, X, Y, i y j se pueden combinar entre sí.

Una forma de realización adicional de la presente invención es un compuesto de la Fórmula I, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, para usar como un medicamento.

Una forma de realización adicional de la presente invención es un compuesto de la Fórmula I, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, para usar como un medicamento para el tratamiento de asma y enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias gastrointestinales, glomerulonefritis, enfermedad eosinofílica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección por microorganismos patógenos, artritis reumatoide, enfermedades neutrofílicas, fibrosis quística (CF), fibrosis no quística, fibrosis pulmonar idiopática, bronquiectasias, vasculitis asociada a ANCA, cáncer de pulmón, enfisema, bronquitis crónica, lesiones pulmonares agudas (ALI), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), hipertensión pulmonar, hipertensión arterial pulmonar (PAH) y deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), obesidad e inflamaciones relacionadas, resistencia a la insulina, diabetes, esteatosis

hepática y del hígado graso.

Se prefiere un compuesto de la Fórmula I, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, para usar como un medicamento para el tratamiento de asma y enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias gastrointestinales, enfermedad eosinofílica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, infección por microorganismos patógenos, artritis reumatoide y aterosclerosis.

Se prefiere particularmente un compuesto de la Fórmula I, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, para usar como un medicamento para el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfisema.

Una forma de realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica, caracterizada por contener uno o más compuestos de la fórmula o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

Una forma adicional de realización de la presente invención es un método de tratamiento o prevención de enfermedades en el cual los inhibidores de la actividad de DPPI tienen un beneficio terapéutico, en donde el método comprende la administración de una cantidad preventiva o terapéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula 1 a un paciente que lo necesita.

Una forma de realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende, además de un compuesto de la Fórmula I, un compuesto farmacéuticamente activo seleccionado del grupo que consiste en betamiméticos, anticolinérgicos, corticoesteroides, inhibidores de PDE4, antagonistas de LTD4, inhibidores de EGFR, inhibidores de CRTH2, inhibidores de 5-LO, antagonistas del receptor de histamina, antagonistas de CCR9 e inhibidores de SYK, inhibidores de NE (elastasa neutrófila), inhibidores de MMP9 e inhibidores de MMP12, como así también combinaciones de dos o tres sustancias activas.

**TÉRMINOS Y DEFINICIONES USADOS**

Los términos que no se definen específicamente en la presente deben tener los significados que les otorgarían las personas del oficio de nivel medio, en función de la descripción y el contexto. Sin embargo, como se usa en la memoria descriptiva, y a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado y se les aplican las convenciones que se indican a continuación.

En los grupos, los radicales o las porciones definidos más adelante, la cantidad de átomos de carbono generalmente se especifica antes del grupo, por ejemplo, $C_{1-6}$-alquilo significa un radical o grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

En general, en grupos individuales, como HO, $H_2N$, S(O), $S(O)_2$, NC (ciano), HOOC, $F_3C$ o similares, la persona del oficio de nivel medio puede apreciar los puntos de unión del radical a la molécula de las valencias libres del grupo en sí mismo. Para los grupos combinados que comprenden dos o más subgrupos, el último subgrupo mencionado es el punto de unión al radical, por ejemplo, el sustituyente "aril-$C_{1-4}$alquil-" significa un grupo arilo que se une a un grupo $C_{1-4}$-alquil-, y este último se une al núcleo o al grupo al que se une el sustituyente.

De manera alternativa, “*” indica el punto de unión dentro de una entidad química.

En caso de que un compuesto de la presente invención se represente en forma de un nombre químico y como una fórmula, en caso de discrepancia prevalecerá la fórmula. Se puede usar un asterisco en las sub-fórmulas para indicar el enlace que se conecta con la molécula de núcleo definida.

Muchos de los términos mencionados a continuación se pueden usar de manera reiterada en la definición de una fórmula o un grupo y, en cada caso, tienen uno de los significados indicados con anterioridad, independientemente entre sí.

Como se usa en la presente, el término "sustituido" significa que uno o más hidrógenos del átomo designado se reemplazan por una selección del grupo indicado, siempre que no se exceda la valencia normal del átomo designado y que la sustitución de como resultado un compuesto estable.

Las expresiones "prevención", "profilaxis", "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" usadas en la presente son sinónimas y se refieren a que se reduce el riesgo de desarrollar una afección mencionada en la presente, en especial, en un paciente que tiene riesgo elevado de presentar esas afecciones o un caso clínico correspondiente, por ejemplo, riesgo elevado de desarrollar trastorno metabólico, tal como diabetes u obesidad, u otro trastorno mencionado en la presente. Por ende, la expresión "prevención de una enfermedad" como se usa en la presente se refiere al manejo y al cuidado de una persona con riesgo de desarrollar la enfermedad antes de la aparición clínica de la enfermedad. El fin de la prevención es combatir el desarrollo de la enfermedad, la afección o el trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o demorar la aparición de los síntomas o las complicaciones y prevenir o demorar el desarrollo de enfermedades, afecciones o trastornos relacionados. El éxito de ese tratamiento preventivo se refleja estadísticamente mediante la reducción de la incidencia de tal afección en una población de pacientes en riesgo de desarrollar esta afección, en comparación con

una población de pacientes equivalente sin tratamiento preventivo.

Los términos "tratamiento" o "terapia" se refieren al tratamiento terapéutico de pacientes que desarrollaron una o más de dichas afecciones en forma manifiesta, aguda o crónica, que incluyen el tratamiento sintomático, a fin de aliviar los síntomas de las señales específicas, o el tratamiento causal, a fin de revertir total o parcialmente la afección o retrasar la progresión de las señales cuanto más sea posible, en función de la afección y de su gravedad. Por ende, la expresión "tratamiento de una enfermedad" como se usa en la presente se refiere al manejo y al cuidado de un paciente que desarrolló la enfermedad, la afección o el trastorno. El fin del tratamiento es combatir la enfermedad, la afección o el trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, la afección o el trastorno, y para aliviar los síntomas o las complicaciones asociadas a la enfermedad, la afección o el trastorno.

A menos que se indique específicamente, en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, una fórmula o un nombre químicos determinados abarcan tautómeros y todos los estereoisómeros, isómeros ópticos e isómeros geométricos (por ejemplo, enantiómeros, diastereómeros, isómeros E/Z, etc.) y los racematos de estos, así como las mezclas, en diferentes proporciones, de cada uno de los enantiómeros, mezclas de diastereómeros o mezclas de cualquiera de las formas anteriores en las que existen esos isómeros y enantiómeros, así como las sales, las que incluyen sales de aquellos aceptables desde el punto de vista farmacéutico y solvatos de aquellos, tales como hidratos, que incluyen solvatos de los compuestos libres o solvatos de una sal del compuesto.

La frase "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se usa en la presente para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, según el criterio médico aceptable, adecuados para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin causar toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, y proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en la presente, la expresión "sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a derivados de los compuestos descritos, en donde el compuesto de origen se modifica obteniendo ácidos o sales básicas de aquel. Los ejemplos de sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen, entre otros, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos, tales como aminas; sales álcali u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos; y similares.

Por ejemplo, las sales incluyen sales de amoníaco, L-arginina, betaína, bentamina, benzatina, hidróxido de calcio, colina, deanol, dietanolamina (2, 2'-iminobis(etanol)), dietilamina, 2-(dietilamino)-etanol, 2-aminoetanol, etilendiamina, N-etil-glucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, lisina, hidróxido de magnesio, 4-(2-hidroxietil)-morfolina, piperazina, hidróxido de potasio, 1-(2-hidroxietil)-pirrolidina, hidróxido de sodio, trietanolamina (2, 2', 2"-nitrilotris(etanol)), trometamina, hidróxido de zinc, ácido acético, ácido 2.2-dicloro-acético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido L-aspártico, ácido bencensulfónico, ácido benzoico, ácido 2, 5-dihidroxibenzoico, ácido 4-acetamido-benzoico, ácido (+)-camfórico, ácido (+)-camfor-10-sulfónico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido decanoico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etan-1, 2-disulfónico, ácido etansulfónico, 2-hidroxi-etansulfónico,ácido etilendiamintetraacético, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido D-glucoheptónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, glicina, ácido glicólico, ácido hexanoico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido isobutírico, ácido DL-láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, lisina, ácido maleico, ácido (-)-L-málico, ácido malónico, ácido DL-mandélico, ácido metansulfónico, ácido galactárico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido octanoico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico (ácido embónico), ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido (-)-L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido 4-amino-salicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tánico, ácido (+)-L-tartárico, ácido tiociánico, ácido p-toluensulfónico y ácido undecilénico. Otras sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico se pueden formar con cationes de metales, como aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc y similares. (Véase también Pharmaceutical salts, Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci., (1977), 66, 1-19).

Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de la presente invención se pueden sintetizar del compuesto de origen que contiene una porción básica o ácida mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad suficiente de la base o del ácido adecuados en agua o en un diluyente orgánico, como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, acetonitrilo o una mezcla de estos.

Las sales de otros ácidos que no se mencionaron anteriormente que, por

ejemplo, son útiles para purificar o aislar los compuestos de la presente invención (por ejemplo, sales de trifluoroacetato) también comprenden una parte de la invención.

En general, el término “halógeno” se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "$C_{1-n}$-alquilo", en donde n es un entero seleccionado de 2, 3, 4, 5 o 6, ya sea solo o en combinación con otro radical, se refiere a un radical hidrocarburo acíclico, saturado, ramificado o lineal que tiene de 1 a n átomos de C. Por ejemplo, el término $C_{1-5}$-alquilo abarca los radicales $H_3C$-, $H_3C$-$CH_2$-, $H_3C$-$CH_2$-$CH_2$-, $H_3C$-$CH(CH_3)$-, $H_3C$-$CH_2$-$CH_2$-$CH_2$-, $H_3C$-$CH_2$-$CH(CH_3)$-, $H_3C$-$CH(CH_3)$-$CH_2$-, $H_3C$-$C(CH_3)_2$-, $H_3C$-$CH_2$-$CH_2$-$CH_2$-$CH_2$-, $H_3C$-$CH_2$-$CH_2$-$CH(CH_3)$-, $H_3C$-$CH_2$-$CH(CH_3)$-$CH_2$-, $H_3C$-$CH(CH_3)$-$CH_2$-$CH_2$-, $H_3C$-$CH_2$-$C(CH_3)_2$-, $H_3C$-$C(CH_3)_2$-$CH_2$-, $H_3C$-$CH(CH_3)$-$CH(CH_3)$- y $H_3C$-$CH_2$-$CH(CH_2CH_3)$-.

El término “oxetanilo” se refiere a un anillo cíclico saturado de 4 miembros que contiene un átomo de oxígeno en la posición 3 con respecto al punto de unión.

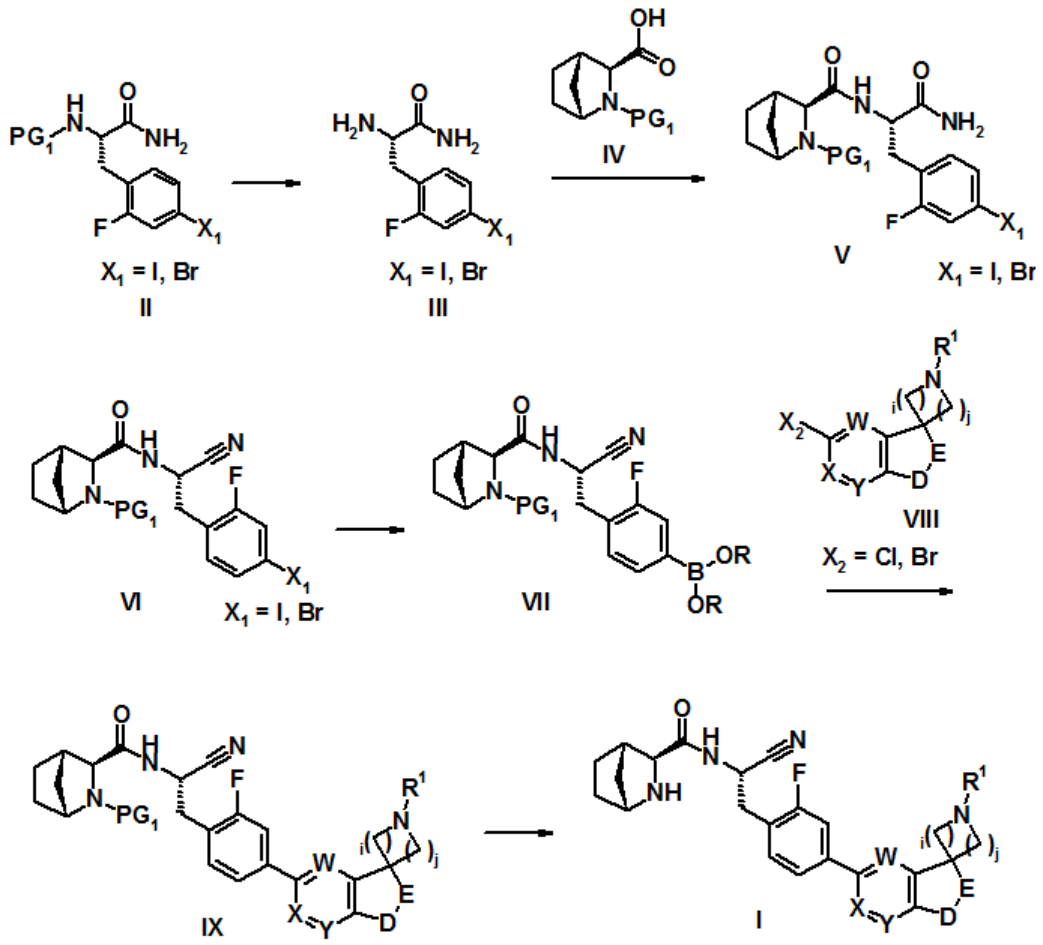
**PREPARACIÓN**

MÉTODOS DE SÍNTESIS GENERAL

La invención también proporciona procesos para elaborar un compuesto de la Fórmula **I**.

Las condiciones y los tiempos de reacción óptimos pueden variar según los reactivos particulares que se usan. A menos que se especifique lo contrario, las personas del oficio de nivel medio pueden seleccionar con facilidad solventes, temperaturas, presiones y otras condiciones de reacción. Los procedimientos específicos se proporcionan en la sección de Ejemplos de síntesis. Generalmente, el progreso de la reacción se puede controlar mediante cromatografía de capa delgada (TLC) o LC-MS, si se desea, y los intermediarios y productos se pueden purificar mediante cromatografía de gel de sílice, HPLC y/o mediante recristalización. Los siguientes ejemplos son ilustrativos y, como apreciarán las personas del oficio de nivel medio, se podrían modificar reactivos o condiciones particulares según sea necesario para cada compuesto sin experimentación indebida. Los materiales de inicio e intermediarios utilizados en los métodos siguientes se encuentran disponibles en el comercio o pueden ser preparados fácilmente por las personas del oficio de nivel medio a partir de materiales disponibles en el comercio.

Un compuesto de la Fórmula **I** se puede elaborar mediante el método descrito en el Esquema 1, 2, 3 o 4:




**Esquema 1**

Como se ilustra en el Esquema 1, la protección y desprotección de los grupos funcionales se describen en 'Protective Groups in Organic Synthesis', T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Por ejemplo, para la desprotección del grupo *ter*-butoxicarbonilo, un ácido, tal como ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido p-toluensulfónico o HCl, se puede usar en un solvente adecuado, tal como agua, DCM o dioxano, para proporcionar un compuesto de la Fórmula III.

La reacción de un ácido de la Fórmula IV, en donde $PG_1$ representa un grupo protector (por ejemplo, *ter*-butoxicarbonilo) usando procedimientos estándar de la literatura para la formación de una amida, por ejemplo, en presencia de una base tal como N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y un agente de activación tal como HATU o TBTU, con una amina de la Fórmula III en un solvente adecuado, proporciona un compuesto de la Fórmula V. También se pueden emplear en estas síntesis las reacciones estándar de acoplamiento de péptidos conocidas en el estado de la técnica

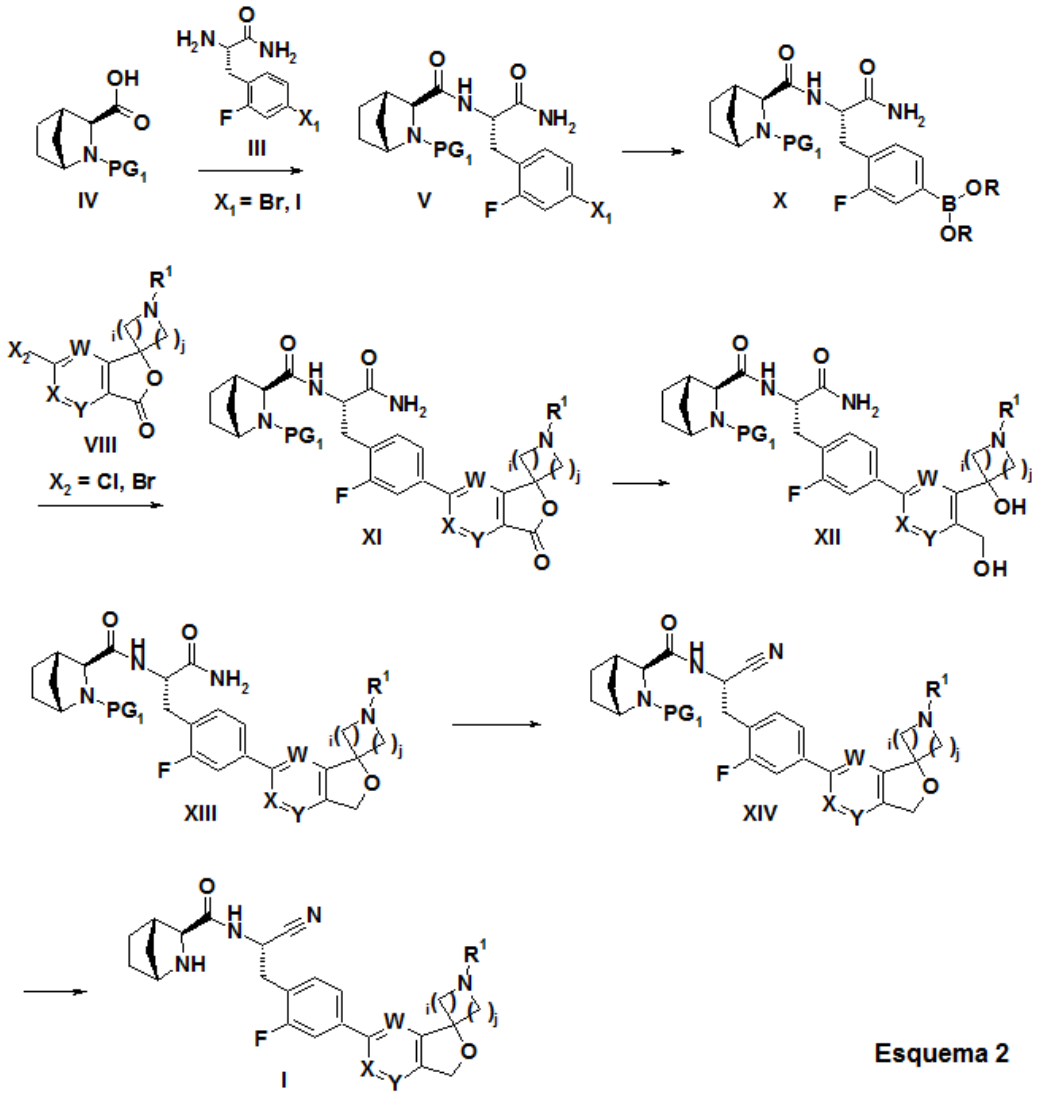
(véase, por ejemplo, M. Bodanszky, 1984, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag).

Se puede realizar la deshidratación de una amina, tal como en un compuesto de la Fórmula V para el nitrilo correspondiente de la Fórmula VI, mediante el uso de un agente de deshidratación, tal como hidróxido de (metoxicarbonilsulfamoil)trietilamonio, en un solvente adecuado, tal como diclorometano (DCM).

Los compuestos de la Fórmula VI ($X_1$= I, Br) se pueden convertir en los derivados de ácido borónico VII correspondientes, en donde R puede ser H o alquilo bajo independientemente, y los residuos R pueden formar un anillo. Por ejemplo, VI se puede hacer reaccionar con bis(neopentil glicolato)diboro en presencia de un catalizador adecuado, tal como [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), y una base adecuada, tal como acetato de potasio o sodio, potasio o carbonato de cesio o fosfato, en un solvente adecuado tal como dioxan, dimetilformamida (DMF) o diclorometano (DCM), para obtener derivados de ácido borónico VII.

Estos se pueden hacer reaccionar en una reacción catalizada por metal (transición) de un compuesto de Fórmula VIII ($X_2$= Cl, Br). El acoplamiento de estos halogenuros VIII proporciona un compuesto de la Fórmula IX. Por ejemplo, la reacción de estos halogenuros con un ácido borónico o el éster del ácido borónico VII correspondiente en un solvente adecuado, tal como dioxano, en presencia de un catalizador adecuado, tal como dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno-paladio, y una base adecuada, tal como sodio, potasio o carbonato de cesio, proporciona un compuesto de la Fórmula IX.

La protección y desprotección de los grupos funcionales se describen en 'Protective Groups in Organic Synthesis', T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Por ejemplo, para la desprotección del grupo *ter*-butoxicarbonilo, un ácido, tal como ácido p-toluensulfónico monohidrato, se puede usar en un solvente adecuado, tal como acetonitrilo, para proporcionar un compuesto de la Fórmula I.




**Esquema 2**

Como se ilustra en el Esquema 2, la reacción de un ácido de la Fórmula IV, en donde $PG_1$ representa un grupo protector (por ejemplo, *ter*-butoxicarbonilo) usando procedimientos estándar de la literatura para la formación de una amida, por ejemplo, en presencia de una base tal como N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y un agente de activación tal como HATU o TBTU, con una amina de la Fórmula III en un solvente adecuado, proporciona un compuesto de la Fórmula V. También se pueden emplear en estas síntesis las reacciones estándar de acoplamiento de péptidos conocidas en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, M. Bodanszky, 1984, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag).

Los compuestos de Fórmula V se pueden convertir en los análogos de derivados de ácido borónico X correspondientes para el procedimiento de reacción

descrito en el Esquema 1.

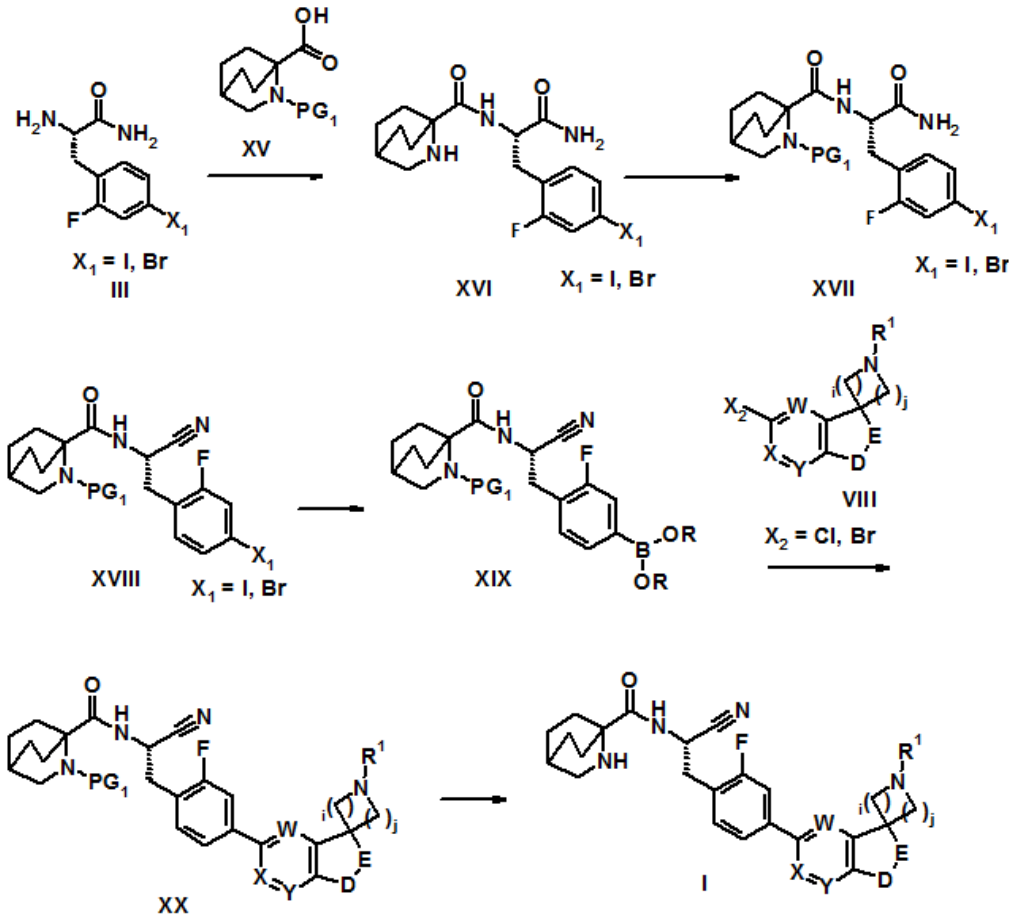
Estos se pueden hacer reaccionar en una reacción catalizada por metal (transición) de un compuesto de Fórmula VIII ($X_2$= Cl, Br) para obtener un análogo del compuesto de la Fórmula XI para el procedimiento de reacción descrito en el Esquema 1.

El compuesto de la Fórmula XI se puede convertir en el compuesto de la Fórmula XII usando un agente reductor, tal como borohidruro de sodio o litio, en un solvente adecuado, tal como tetrahidrofurano.

El compuesto de la Fórmula XII se puede convertir en el compuesto de la Fórmula XIII usando reactivos, tales como anhídrido p-toluensulfónico o cloruro de metansulfonilo, en presencia de una base, tal como trietilamina o N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), en un solvente adecuado, tal como tetrahidrofurano.

Se puede realizar la deshidratación de una amina, tal como en un compuesto de la Fórmula XIII para el nitrilo correspondiente de la Fórmula XIV, mediante el uso de un agente de deshidratación tal como hidróxido de (metoxicarbonilsulfamoil)trietilamonio, en un solvente adecuado, tal como diclorometano (DCM).

La protección y desprotección de los grupos funcionales se describen en 'Protective Groups in Organic Synthesis', T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Por ejemplo, para la desprotección del grupo *ter*-butoxicarbonilo, un ácido, tal como ácido p-toluensulfónico monohidrato, se puede usar en un solvente adecuado, tal como acetonitrilo, para proporcionar un compuesto de la Fórmula I.




**Esquema 3**

Como se ilustra en el Esquema 3, la reacción de un ácido de la Fórmula XV, en donde $PG_1$ representa un grupo protector (por ejemplo, *ter*-butoxicarbonilo) usando procedimientos estándar de la literatura para la formación de una amida, por ejemplo, en presencia de una base, tal como N-metilmorfolina, y un agente de activación, tal como anhídrido cíclico del ácido1-propanfosfónico (PPA), con una amina de la Fórmula III en un solvente adecuado proporciona un compuesto de la Fórmula XVI. Las reacciones estándares de acoplamiento de péptidos conocidas en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, M. Bodanszky, 1984, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag) se pueden utilizar en estas síntesis.

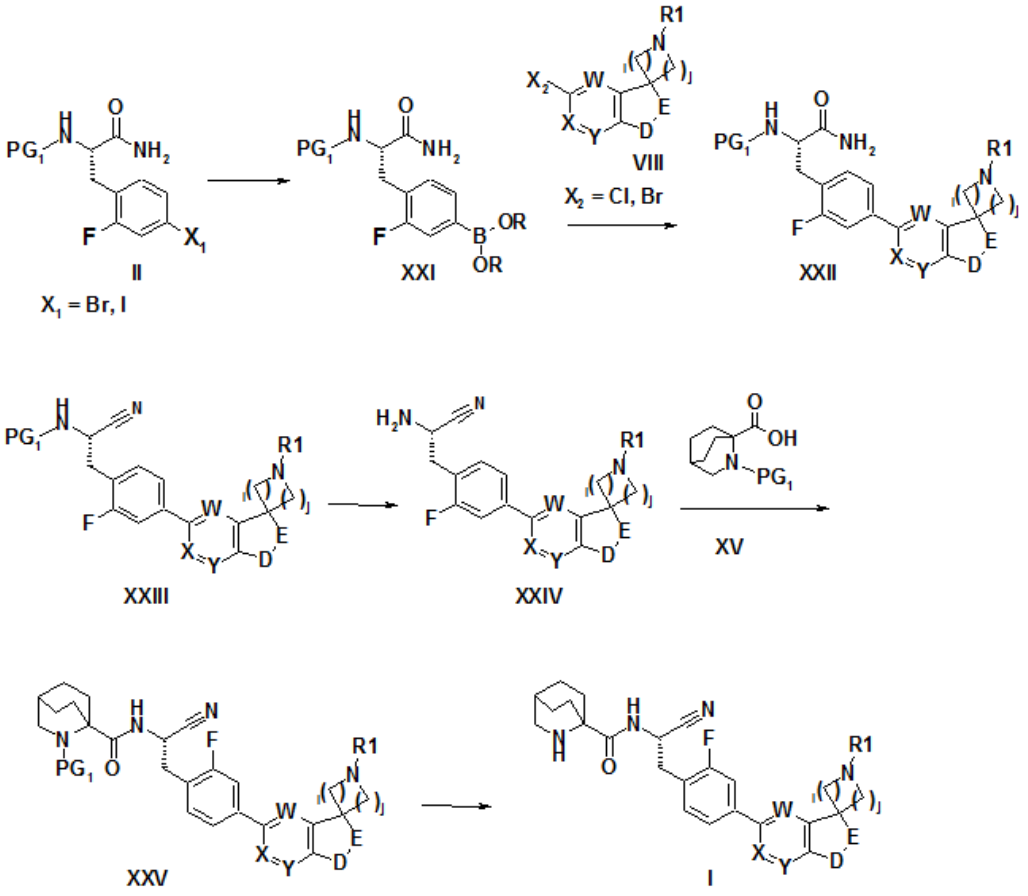
La protección y desprotección de los grupos funcionales se describen en 'Protective Groups in Organic Synthesis', T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Por ejemplo, para la protección de una amina de la Fórmula XVI, se puede usar dicarbonato de di-*ter*-butilo en un solvente adecuado, tal como diclorometano, para proporcionar un compuesto de la Fórmula XVII.

Se puede realizar la deshidratación de una amina, tal como en un compuesto de la Fórmula XVII para el nitrilo correspondiente de la Fórmula XVIII, mediante el uso de un agente de deshidratación, tal como hidróxido de (metoxicarbonilsulfamoil)trietilamonio, en un solvente adecuado, tal como diclorometano (DCM).

Los compuestos de la Fórmula XVIII ($X_1$= I, Br) se pueden convertir en los derivados de ácido borónico XIX correspondientes, en donde R puede ser H o alquilo bajo independientemente, y los residuos R pueden formar un anillo. Por ejemplo, XVIII se puede hacer reaccionar con bis(pinacolato)diboro en presencia de un catalizador adecuado, tal como [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), y una base adecuada, tal como acetato de potasio o sodio, potasio o carbonato de cesio o fosfato, en un solvente adecuado tal como dioxan, dimetilformamida (DMF) o diclorometano (DCM), para obtener derivados de ácido borónico XIX.

Estos se pueden hacer reaccionar en una reacción catalizada por metal (transición) de un compuesto de Fórmula VIII ($X_2$= Cl, Br). El acoplamiento de estos halogenuros VIII proporciona un compuesto de la Fórmula XX. Por ejemplo, la reacción de estos halogenuros con un ácido borónico o el éster del ácido borónico XIX correspondiente en un solvente adecuado, tal como dioxano, en presencia de un catalizador adecuado, tal como dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno-paladio, y una base adecuada, tal como sodio, potasio o carbonato de cesio, proporciona un compuesto de la Fórmula XX.

La protección y desprotección de los grupos funcionales se describen en 'Protective Groups in Organic Synthesis', T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Por ejemplo, para la desprotección del grupo *ter*-butoxicarbonilo, un ácido, tal como ácido p-toluensulfónico monohidrato, se puede usar en un solvente adecuado, tal como acetonitrilo, para proporcionar un compuesto de la Fórmula I.




**Esquema 4**

Como se ilustra en el Esquema 4, el compuesto de la Fórmula II se puede convertir en los derivados de ácido borónico XXI correspondientes, en donde R puede ser H o alquilo bajo independientemente, y los residuos R pueden formar un anillo. Por ejemplo, II se puede hacer reaccionar con bis(neopentil glicolato)diboro en presencia de un catalizador adecuado, tal como [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), y una base adecuada, tal como acetato de potasio o sodio, potasio o carbonato de cesio o fosfato, en un solvente adecuado tal como dioxan, dimetilformamida (DMF) o diclorometano (DCM), para obtener derivados de ácido borónico XXI.

Estos se pueden hacer reaccionar en una reacción catalizada por metal (transición) de un análogo de un compuesto de la Fórmula VIII para el procedimiento de reacción descrito en el Esquema 1 para obtener un compuesto de la Fórmula XXII.

Se puede realizar la deshidratación de una amina, tal como un compuesto de la Fórmula XXII para el nitrilo correspondiente de la Fórmula XXIII, mediante el uso de un agente de deshidratación, tal como hidróxido de (metoxicarbonilsulfamoil)trietilamonio,

en un solvente adecuado, tal como diclorometano (DCM).

La protección y desprotección de los grupos funcionales se describen en 'Protective Groups in Organic Synthesis', T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Por ejemplo, para la desprotección de *ter*-butoxicarbonilo, un ácido, tal como ácido p-toluensulfónico monohidrato, se puede usar en un solvente adecuado, tal como acetonitrilo, para proporcionar un compuesto de la Fórmula I.

La reacción de un ácido de la Fórmula XV, en donde PG1 representa un grupo protector (por ejemplo, ter-butoxicarbonilo) usando procedimientos estándar de la literatura para la formación de una amida, por ejemplo, en presencia de una base, tal como N-metilmorfolina, y un agente de activación, tal como anhídrido cíclico del ácido1-propanfosfónico (PPA), con una amina de la Fórmula XXIV en un solvente adecuado proporciona un compuesto de la Fórmula XXV. Las reacciones estándares de acoplamiento de péptidos conocidas en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, M. Bodanszky, 1984, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag) se pueden utilizar en estas síntesis.

La protección y desprotección de los grupos funcionales se describen en 'Protective Groups in Organic Synthesis', T. W. Greene y P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Por ejemplo, para la desprotección de *ter*-butoxicarbonilo, un ácido, tal como ácido p-toluensulfónico monohidrato, se puede usar en un solvente adecuado, tal como acetonitrilo, para proporcionar un compuesto de la Fórmula I.

Otras modificaciones de los compuestos de la Fórmula I con métodos conocidos en el estado de la técnica e ilustrados en los Ejemplos más adelante se pueden usar para preparar compuestos adicionales de la invención.

**EJEMPLOS DE SÍNTESIS**

Los siguientes son compuestos representativos de la invención que se pueden obtener mediante esquemas de síntesis generales, los ejemplos y los métodos conocidos en el estado de la técnica. Los materiales de inicio e intermediarios se encontraban disponibles en el comercio y se adquirieron en los catálogos de ABCR, ACROS, ABLOCK PHARMATECH, ACTIVATE, ALDRICH, APOLLO SCIENTIFIC, ARK PHARM INC, ATLANTIC SCIENTIFIC TECHNOLOGY, BETAPHARM, BEFARM, CHEMBRIDGE CORPORATION, CNH-TECH, ENAMINE LTD, GOLDENBRIDGE PHARMA INC, GVK BIO, MERCACHEM, MOLBRIDGE, WUXI APPTEC, ZERENEX o se sintetizaron de acuerdo con la literatura o como se describe más adelante en "Síntesis de materiales de inicio/ eductos"

El tiempo de retención de cromatografía de líquidos-espectroscopia de masa (LCMS) y los datos de *m/z* observados para los compuestos mencionados más adelante se obtienen mediante uno de los métodos siguientes:

Método **V001_007** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Waters Alliance con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 4,6 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 3,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente/solvente [min] | % de Sol [H2O, 0,1% de TFA] | % de Sol [Metanol] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,0 | 95 | 5 | 4 | 60 |
| 1,6 | 0 | 100 | 4 | 60 |
| 1,85 | 0 | 100 | 4 | 60 |
| 1,9 | 95 | 5 | 4 | 60 |

Método **V003_003** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Waters Alliance con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 4,6 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 3,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente/solvente [min] | % de Sol [$H_2O$, 0,1% $NH_3$] | % de Sol [Metanol] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,0 | 95 | 5 | 4 | 60 |
| 0,2 | 95 | 5 | 4 | 60 |
| 1,5 | 0 | 100 | 4 | 60 |
| 1,75 | 0 | 100 | 4 | 60 |

Método **V011_S01** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Waters Alliance con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 4,6 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 3,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente de solvente [min] | % de Sol [$H_2O$, 0,1% $NH_3$] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,0 | 97 | 3 | 5 | 60 |
| 0,2 | 97 | 3 | 5 | 60 |
| 1,6 | 0 | 100 | 5 | 60 |
| 1,7 | 0 | 100 | 5 | 60 |

Método **V012_S01** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Waters Alliance con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 4,6 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 3,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente de solvente [min] | % de Sol [$H_2O$,0,1 % de TFA] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,0 | 97 | 3 | 5 | 60 |
| 0,2 | 97 | 3 | 5 | 60 |
| 1,6 | 0 | 100 | 5 | 60 |
| 1,7 | 0 | 100 | 5 | 60 |

Método **X001_004** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Waters Acquity con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 2,1 x 20 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 2,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente/solvente [min] | % de Sol [$H_2O$,0,10% de TFA] | % de Sol [Metanol] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,0 | 95 | 5 | 1,4 | 60 |
| 0,05 | 95 | 5 | 1,4 | 60 |
| 1,00 | 0 | 100 | 1,4 | 60 |
| 1,1 | 0 | 100 | 1,4 | 60 |

Método **X011_S03** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Waters Acquity con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters Xbridge BEH C18 | | |
| Dimensión de columna | | 2,1 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 1,7 µm | | |
| Tiempo de gradiente de solvente [min] | % de Sol [$H_2O$, 0,1 % de NH3] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,00 | 95 | 5 | 1,3 | 60 |
| 0,02 | 95 | 5 | 1,3 | 60 |
| 1,00 | 0 | 100 | 1,3 | 60 |
| 1,10 | 0 | 100 | 1,3 | 60 |

Método **X012_S02** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Waters Acquity con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge BEH C18 | | |
| Dimensión de columna | | 2,1 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 1,7 µm | | |
| Tiempo de gradiente de solvente [min] | % de Sol [$H_2O$, 0,1 % de TFA] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,0 | 99 | 1 | 1,3 | 60 |
| 0,02 | 99 | 1 | 1,3 | 60 |
| 1,00 | 0 | 100 | 1,3 | 60 |
| 1,10 | 0 | 100 | 1,3 | 60 |

Método **Z011_S03** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Agilent 1200 con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 3 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 2,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente/solvente [min] | % de Sol [$H_2O$,0,1% de NH3] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,00 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 0,20 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 1,20 | 0 | 100 | 2,2 | 60 |
| 1,25 | 0 | 100 | 3 | 60 |
| 1,40 | 0 | 100 | 3 | 60 |

Método **Z012_S04** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Agilent 1200 con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 3 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 2,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente/Solvente [min] | % de Sol [$H_2O$,0,1% de NH3] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,00 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 0,20 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 1,20 | 0 | 100 | 2,2 | 60 |
| 1,25 | 0 | 100 | 3 | 60 |
| 1,40 | 0 | 100 | 3 | 60 |

Método **Z018_S04** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Agilent 1200 con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters Sunfire C18 | | |
| Dimensión de columna | | 3 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 2,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente de solvente [min] | % de Sol [$H_2O$,0,1 % de TFA] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,00 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 0,20 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 1,20 | 0 | 100 | 2,2 | 60 |
| 1,25 | 0 | 100 | 3 | 60 |
| 1,40 | 0 | 100 | 3 | 60 |

Método **Z020_S01** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Agilent 1200 con DAD y MSD | | |
| Columna | | Waters Sunfire C18 | | |
| Dimensión de columna | | 3 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 2,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente de solvente [min] | % de Sol [$H_2O$,0,1% de FA] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,00 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 0,20 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 1,20 | 0 | 100 | 2,2 | 60 |
| 1,25 | 0 | 100 | 3 | 60 |
| 1,40 | 0 | 100 | 3 | 60 |

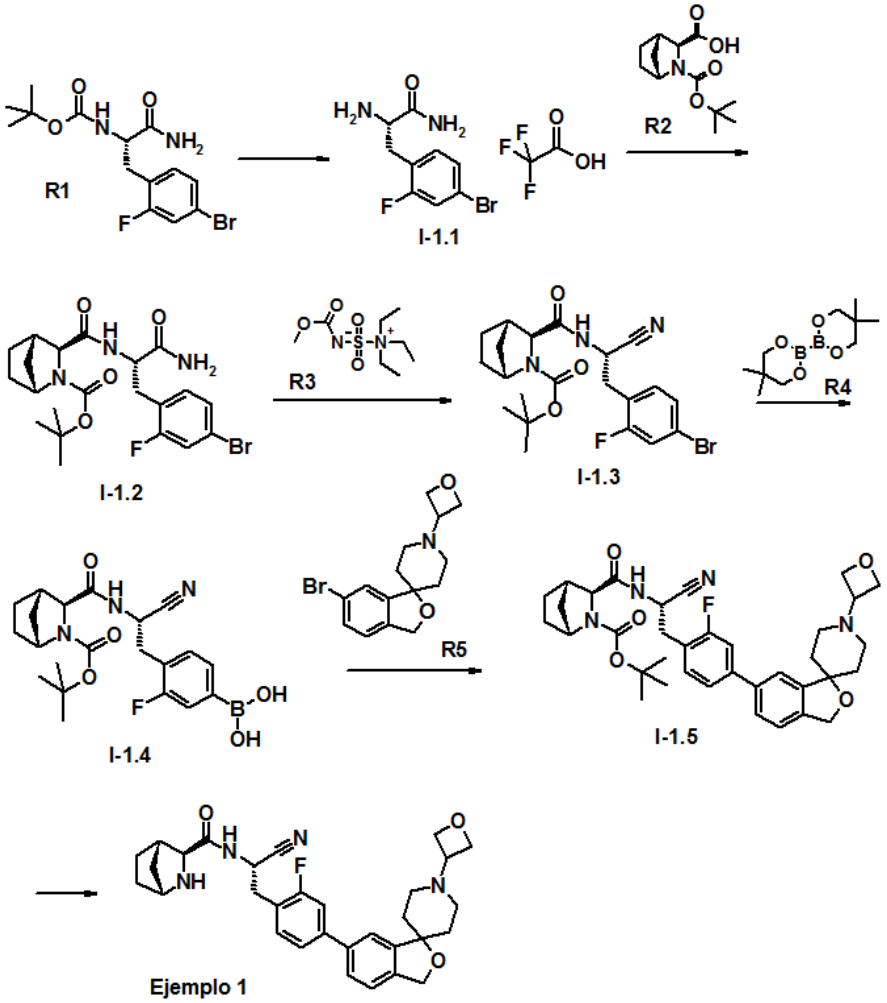
Método **Z021_S01** de LC-MS

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Descripción del dispositivo | | Agilent 1200 con DAD y MSD | | |
| Columna | | XBridge C18 | | |
| Dimensión de columna | | 3 x 30 mm | | |
| Tamaño de partícula | | 2,5 µm | | |
| Tiempo de gradiente de solvente [min] | % de Sol [$H_2O$,0,1% de FA] | % de Sol [Acetonitrilo] | Flujo [ml/min] | Temp [°C] |
| 0,00 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 0,20 | 97 | 3 | 2,2 | 60 |
| 1,20 | 0 | 100 | 2,2 | 60 |
| 1,25 | 0 | 100 | 3 | 60 |
| 1,40 | 0 | 100 | 3 | 60 |

Métodos de síntesis:

**Método A**

**Síntesis de (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-ciano-2-[2-fluoro-4-[1'-(oxetan-3-il)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidin]-5-il]fenil]etil]-3-azabiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxamida (Ejemplo 1)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-1.1**

A R1 (20,00 g, 55,37 mmol) en diclorometano (50 ml) se agregó ácido trifluoroacético (17,09 ml, 221,48 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró, el residuo se disolvió en diclorometano (15 ml) y diisopropiléter (140 ml). El precipitado se filtró, se lavó con diisopropiléter y se secó para obtener I-1.1 como una sal de TFA.

Rendimiento 99 %, *m/z* 261 [M+H]+, rt 0,50 min, Método Z018_S04 de LC-MS.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-1.2**

A R2 (13,86 g, 55,72 mmol) en DMF (65 ml) se agregó DIPEA (9,02 ml, 50,67 mmol) y se enfrió hasta 5 °C. Se agregó TBTU (17,89 g, 55,72 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos. Luego, se agregaron I-1.1 (sal de TFA) (19,0 g, 50,65 mmol), DMF (65 ml) y DIPEA (13,52 ml, 75,98 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato

de etilo y se extrajo con agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, 1 mol/l de ácido clorhídrico acuoso, agua, solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (5 %) y nuevamente con agua. La capa orgánica se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía flash (eluyente: diclorometano/ metanol 95:5).
Rendimiento 82%, *m/z* 484 [M+H]+, rt 0,91 min, Método Z018_S04 de LC-MS.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-1.3**

A I-1.2 (20,0 g, 41,29 mmol) en diclorometano (200 ml) se agregó R3 (19,68 g, 82,58 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío, el residuo se disolvió en acetato de etilo y se extrajo con agua, 1 mol/l de ácido acético acuoso y agua. La capa orgánica se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se recristalizó a partir de acetonitrilo y se filtró.
Rendimiento 71 %, *m/z* 466 [M+H]+, rt 0,98 min, Método Z018_S04 de LC-MS.

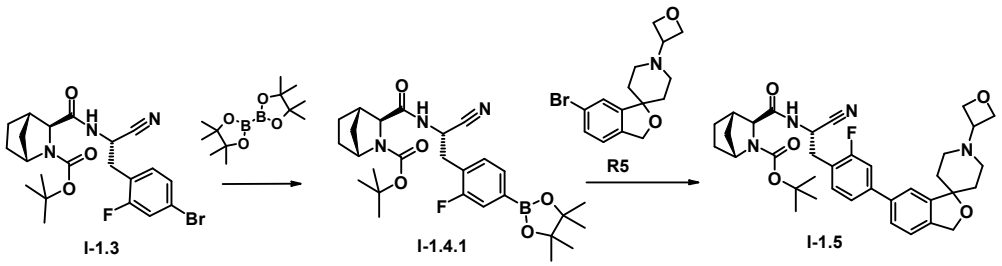
**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-1.4**

A I-1.3 (1,5 g, 3,22 mmol) en dioxano (20 ml) R4 (799,22 mg, 3,54 mmol), se agregaron acetato de potasio (0,947 g, 9,65 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), complejo con diclorometano (1:1) (52,54 mg, 0,064 mmol). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno y se calentó hasta 70 ºC durante 1,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y agua. La capa orgánica se separó y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa.
Rendimiento 94 %, *m/z* 332 [M+H-Boc]+, rt 0,96 min, Método Z020_S01 de LC-MS.

**Etapa 5: Síntesis del Intermediario I-1.5**

A I-1.4 (400,0 mg, 0,93 mmol) en acetonitrilo (18 ml) se agregó R5 (301,0 mg, 0,93 mmol) y la mezcla se purgó con argón. Se agregaron 2 mol/l de una solución acuosa de carbonato de sodio (928 µl, 1,86 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno-paladio (60,5 mg, 0,09 mmol), la mezcla de reacción se purgó nuevamente con argón y se agitó a 80 °C en el reactor de microondas durante 45 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM : MeOH = 98:2 a 92:8) para obtener I-1.5.
Rendimiento 79 % *m/z* 631 [M+H]+, rt 1,09 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis alternativa del Intermediario I-1.5**




**Síntesis del Intermediario I-1.4.1**

A I-1.3 (20 g, 42,89 mmol) en dioxano (255 ml), se agregaron bis(pinacolato)diboro (13,07 g, 51,46 mmol), acetato de potasio (12,63 g, 128,66 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), complejo con diclorometano (1:1) (1,75 g, 2,14 mmol). La mezcla se purgó con nitrógeno durante 5 minutos, se calentó hasta 70 ºC y se agitó durante la noche a esa temperatura. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y agua. La capa orgánica se separó y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo: EtOAc = 92:8 a 34:66).

Rendimiento 64 % *m/z* 332 [M+H – Boc – $((CH_3)_2CH)_2$]+, rt 0,73 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

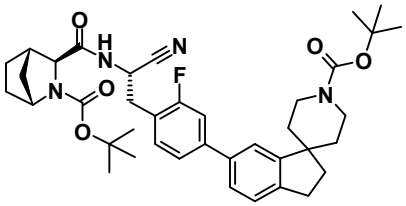
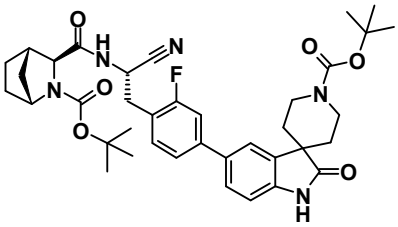
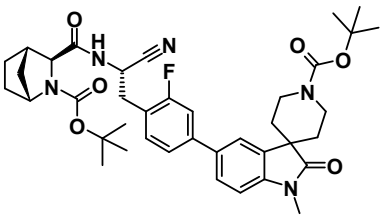
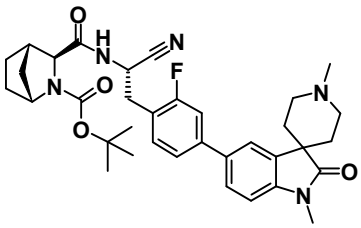
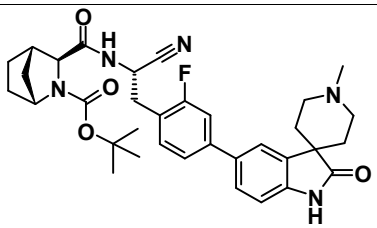
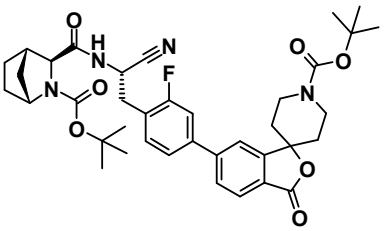
**Síntesis del Intermediario I-1.5**

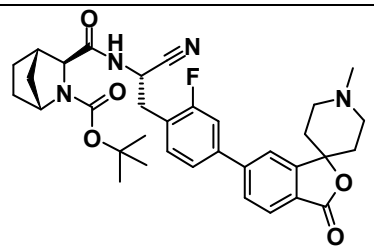
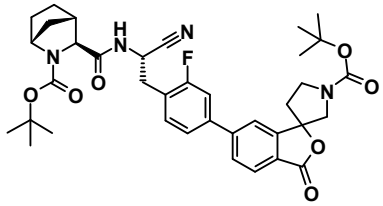
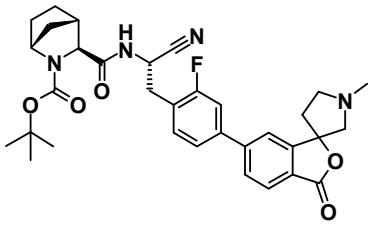
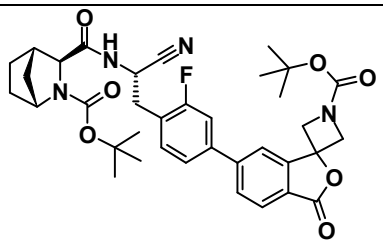
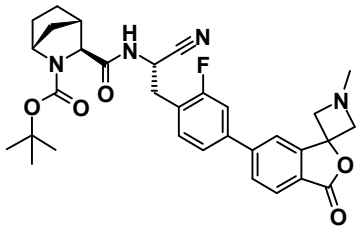
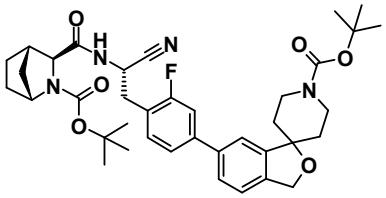
A I-1.4.1 (3,96 g, 7,71 mmol) en acetonitrilo (60 ml) se agregó R5 (2,50 g, 7,71 mmol) y la mezcla se purgó con argón. Se agregaron 2 mol/l de una solución acuosa de carbonato de sodio (7,71 ml, 15,42 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis(di-ter-butilfosfino)ferroceno-paladio (502,6 mg, 0,77 mmol), la mezcla de reacción se purgó nuevamente con argón y se agitó a 80 °C durante 90 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM : MeOH = 99:1 a 94:6) para obtener I-1.5.

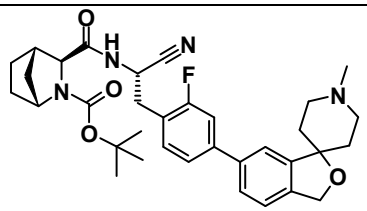
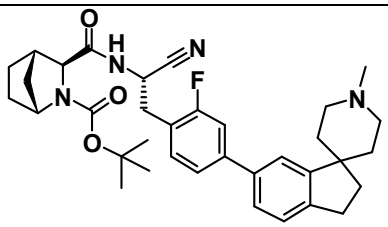
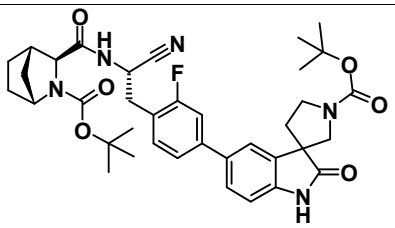
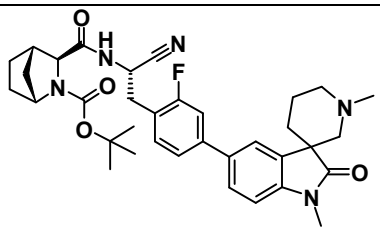
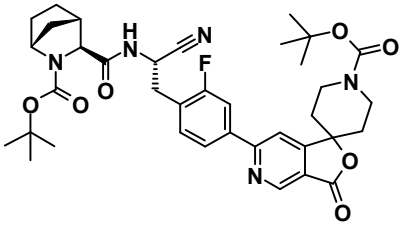
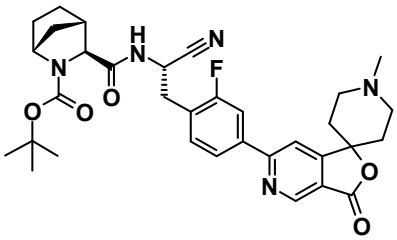
Rendimiento 75% *m/z* 631 [M+H]+, rt 1,09 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

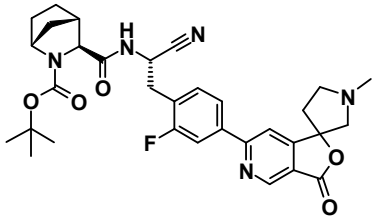
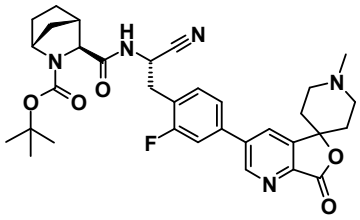
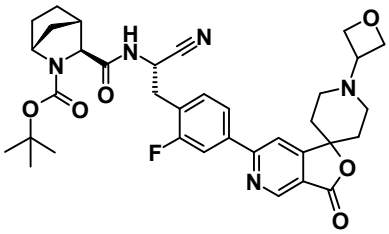
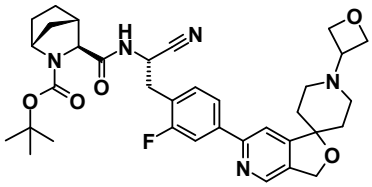
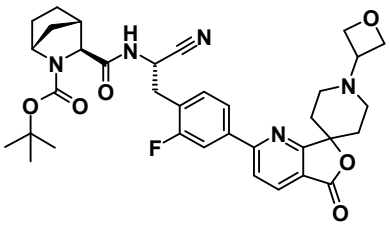
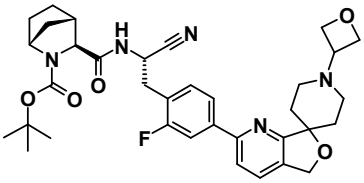
Los siguientes intermediarios indicados en la Tabla 1 se sintetizan de manera similar al Intermediario I-1.4 y los eductos apropiados:

**Tabla 1**

| Intermediario | Educto | Estructura del intermediario | m/z [M+H]+ | rt (min) | Método LC-MS |
|---|---|---|---|---|---|
| I-1.5.1 | R6 |  | 517 [M-Boc-t.but +H]+ | 1,29 | Z012_S04 |
| I-1.5.2 | R8 |  | 532 [M-Boc-t.but +H]+ | 1,14 | Z012_S04 |
| I-1.5.3 | R9 |  | 546 [M-Boc-t.but +H]+ | 1,19 | Z012_S04 |
| I-1.5.4 | R10 |  | 616 | 0,95 | Z012_S04 |
| I-1.5.5 | R10.1 |  | 602 | 0,91 | Z012_S04 |
| I-1.5.6 | I-7,2 |  | 589 [M-Boc +H]+ | 1,19 | Z012_S04 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| I-1.5.7 | R10.2 |  | 603 | 0,94 | Z012_S04 |
| I-1.5.8 | I-7.2.1 |  | 575 [M-Boc +H]+ | 1,15 | Z011_S03 |
| I-1.5.9 | R10.3 |  | 589 | 0,95 | Z012_S04 |
| I-1.5.10 | I-7.2.2 |  | 561 [M-Boc +H]+ | 1,17 | Z012_S04 |
| I-1.5.11 | R10.4 |  | 575 | 1,04 | Z011_S03 |
| I-1.5.12 | I-7,4 |  | 575 [M-Boc +H]+ | 1,24 | Z011_S03 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| I-1.5.13 | R10.5 |  | 589 | 1,12 | Z011_S03 |
| I-1.5.14 | R7 |  | 587 | 1,19 | Z011_S03 |
| I-1.5.15 | R12 |  | 574 [M-Boc +H]+ | 1,10 | Z011_S03 |
| I-1.5.16 | R10.6 |  | 615 | 0,80 | Z020_S01 |
| I-1.5.17 | R14 |  | 590 [M-Boc +H]+ | 1,16 | Z011_S03 |
| I-1.5.18 | R10.7 |  | 604 | 1,04 | Z011_S03 |

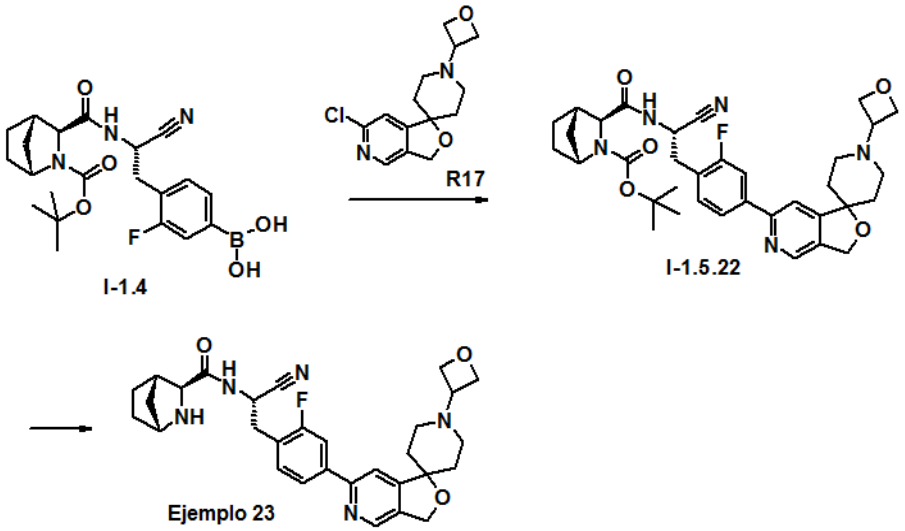
| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| I-1.5.19 | I-11.1.1 |  | 590 | 1,02 | Z011_S03 |
| I-1.5.20 | R15 |  | 604 | 1,03 | Z011_S03 |
| I-1.5.21 | R16 |  | 546 [M-Boc +H]+ | 1,00 | Z011_S03 |
| I-1.5.22 | R17 |  | 632 | 1,03 | Z011_S03 |
| I-1.5.23 | R18 |  | 646 | 0,90 | Z011_S03 |
| I-1.5.24 | R19 |  | 632 | 1,04 | Z011_S03 |

**Etapa 6: Síntesis del Ejemplo 1**

A I-1.5 (3,64 g, 5,78 mmol) en acetonitrilo (60 ml) se agregó ácido p-toluensulfónico monohidrato (5,49 g, 28,88 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de

hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC de fase inversa.
Rendimiento 84% *m/z* 531 [M+H]+, rt 1,00 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis de (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-ciano-2-[2-fluoro-4-[1'-(oxetan-3-il)spiro[3H-furo[3,4-c]piridin-1,4'-piperidin]-6-il]fenil]etil]-3-azabiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxamida (Ejemplo 23)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-1.5.22**

A I-1.4 (92,2 mg, 0,17 mmol) en acetonitrilo (3 ml) se agregó R17 (48,0 mg, 0,17 mmol) y la mezcla se purgó con argón. Se agregaron 2 mol/l de una solución acuosa de carbonato de cesio (171 µl, 0,34 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno-paladio (11,1 mg, 0,02 mmol), la mezcla de reacción se purgó nuevamente con argón y se agitó a 80 °C en el reactor de microondas durante 45 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC de fase inversa para obtener I-1.5.22.
Rendimiento 52 % *m/z* 632 [M+H]+, rt 1,04 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

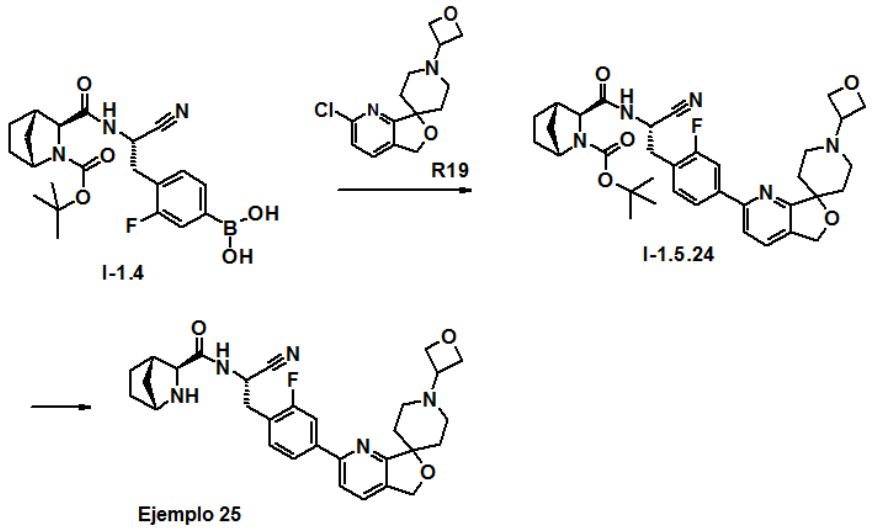
**Etapa 2: Síntesis del Ejemplo 23**

A I-1.5.22 (56,0 mg, 0,09 mmol) en acetonitrilo (2 ml) se agregó ácido p-toluensulfónico monohidrato (84,3 mg, 0,44 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se basificó con TEA,

se filtró a través de un filtro de membrana y se purificó mediante HPLC de fase inversa.

Rendimiento 83% *m/z* 532 [M+H]+, rt 0,96 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis de (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-ciano-2-[2-fluoro-4-[1'-(oxetan-3-il)spiro[5H-furo[3,4-b]piridin-7,4'-piperidin]-2-il]fenil]etil]-3-azabiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxamida (Ejemplo 25)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-1.5.24**

A I-1.4 (2,304 g, 5,34 mmol) en acetonitrilo (50 ml) se agregó R19 (1,50 g, 5,34 mmol) y la mezcla se purgó con argón. Se agregaron 2 mol/l de una solución acuosa de carbonato de sodio (5,343 ml, 10,69 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno-paladio (348,2 mg, 0,53 mmol), la mezcla de reacción se purgó nuevamente con argón y se agitó a 70°C en el reactor de microondas durante 45 minutos. Se agregó una cantidad adicional de I-1.4 (150 mg, 0,35 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 70°C durante 25 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM : MeOH = 99:1 a 9:1) para obtener I-1.5.24.

Rendimiento 55% *m/z* 632 [M+H]+, rt 1,05 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

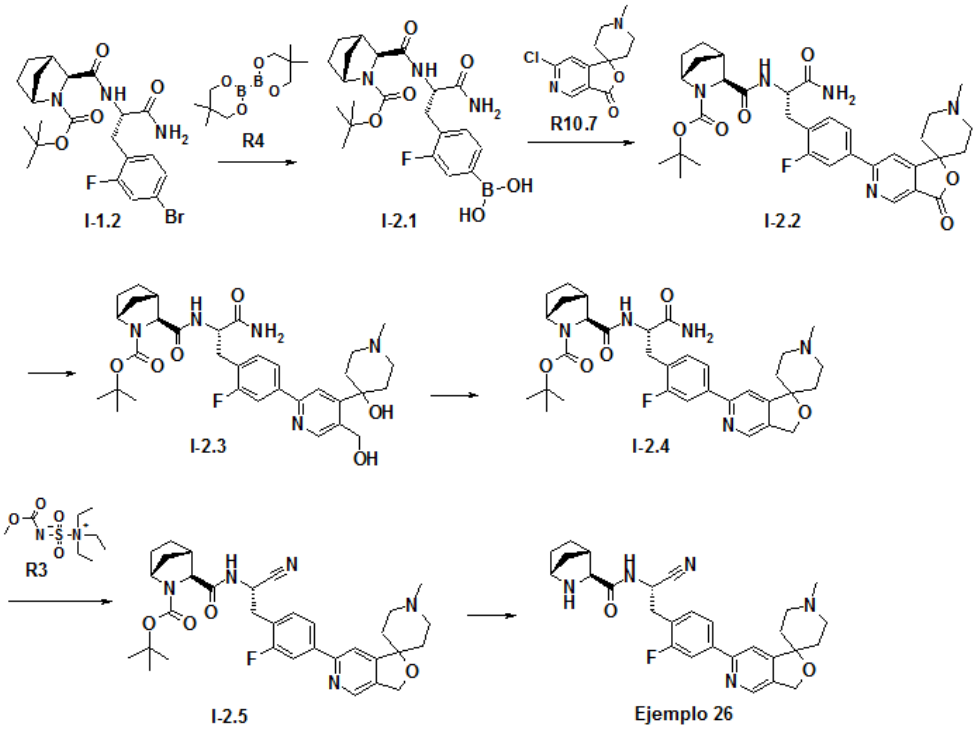
**Etapa 2: Síntesis del Ejemplo 25**

A I-1.5.24 (1,85 g, 2,93 mmol) en acetonitrilo (50 ml) se agregó ácido p-toluensulfónico monohidrato (2,78 g, 14,64 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a

temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC de fase inversa.
Rendimiento 88% *m/z* 532 [M+H]+, rt 0,97 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Método B**

**Síntesis de (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-ciano-2-[2-fluoro-4-(1'-metilspiro[3H-furo[3,4-c]piridin-1,4'-piperidin]-6-il)fenil]etil]-3-azabiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxamida (Ejemplo 26)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-2.1**

A I-1.2 (1,0 g, 2,07 mmol) en dioxano (10 ml) R4 (512,99 mg, 2,27 mmol), se agregó acetato de potasio (607,92 mg, 9,65 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), complejo con diclorometano (1:1) (33,72 mg, 0,041 mmol). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno y se calentó hasta 70 ºC durante la noche. Nuevamente, se agregaron R4 (100 mg, 0,44 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), complejo con diclorometano (1:1) (10 mg, 0,01 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo

con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa.
Rendimiento 50 %, *m/z* 450 [M+H]+.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-2.2**

A I-2.1 (204,46 mg, 0,46 mmol) en acetonitrilo (4 ml) se agregó R10.7 (115 mg, 0,46 mmol) y la mezcla se purgó con argón. Se agregaron 2mol/L de una solución de carbonato de cesio (455,09 µl, 0,91 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno-paladio (29,66 mg, 0,046 mmol), la mezcla de reacción se purgó nuevamente con argón y se agitó a 80 °C en el reactor de microondas durante 45 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa.
Rendimiento 75 %.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-2.3**

A I-2.2 (212 mg, 0,34 mmol) en THF (5 ml) se agregó borohidruro de litio (2 mol/l, 0,26 ml, 0,51 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con metanol, se diluyó con agua y acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución de hidrogenocarbonato de sodio y salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío.
Rendimiento 91%.

**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-2.4**

A I-2.3 (194 mg, 0,31 mmol) en THF (5 ml) se agregaron TEA (0,22 ml, 1,55 mmol) y anhídrido p-toluensulfónico (121,43 mg, 0,37 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción alcanzó temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se inactivó con agua y se concentró al vacío. El residuo se diluyó con solución de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa.
Rendimiento 34%, *m/z* 608 [M+H]+.

**Etapa 5: Síntesis del Intermediario I-2.5**

A I-2.4 (65 mg, 0,11 mmol) en diclorometano (2,5 ml) se agregó R3 (63,72 mg, 0,27 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se extrajo con agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío.
Rendimiento >95 %.

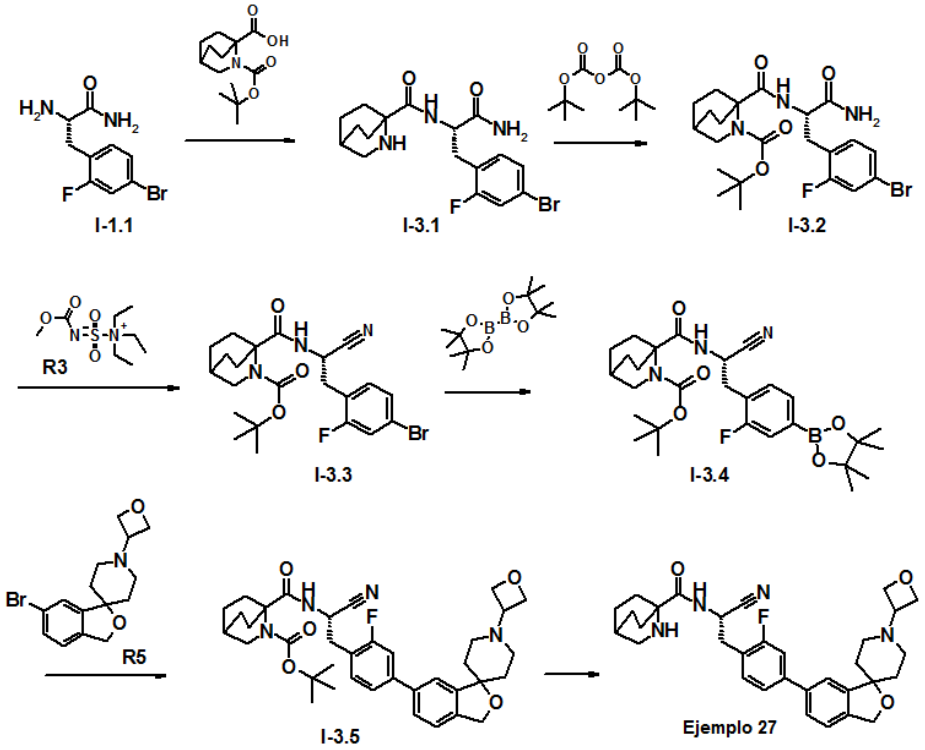
**Etapa 6: Síntesis del Ejemplo 26**

A I-2.5 (68 mg, 0,10 mmol) en acetonitrilo (2 ml) se agregó ácido p-toluensulfónico monohidrato (98,70 mg, 0,52 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se basificó con TEA y se purificó mediante HPLC de fase inversa.

Rendimiento 28% *m/z* 490 [M+H]+, rt 0,96 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Método C**

**Síntesis de N-[(1S)-1-ciano-2-[2-fluoro-4-[1'-(oxetan-3-il)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidin]-5-il]fenil]etil]-3-azabiciclo[2.2.2]octan-4-carboxamida (Ejemplo 27)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-3.1**

A una solución enfriada hasta 0 °C de I-1.1 (5,80 g, 22,2 mmol), ácido 3-*ter*-butoxicarbonil-3-azabiciclo[2.2.2]octan-4-carboxílico, preparado de acuerdo con Radchenko *et al. J. Org. Chem.* 2009, 5541-5544 (5,67 g, 22,2 mmol) y N-metil-morfolina (12,2 ml, 111,0 mmol) en diclorometano seco (67 ml), se agregó PPA (13,08 ml (50 % en acetato de etilo), 22.2 mmol). La mezcla de reacción alcanzó temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con diclorometano varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al

vacío para proporcionar I-3.1, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Rendimiento 73 %, *m/z* 398/400 [M+H]+, rt 0,87 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-3.2**

A una solución enfriada hasta 0 °C de I-3.1 (8,625 g, 21,66 mmol) en 300 ml de diclorometano seco se agregó por goteo una solución de dicarbonato de di-*ter*-butilo (6,26 g, 28,70 mmol) en 20 ml de diclorometano seco. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 0 °C, alcanzó temperatura ambiente, y se agitó durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar I-3.2, que usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Rendimiento 98 %, *m/z* 398/400 [M+H – Boc]+, rt 1,04 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-3.3**

A una suspensión de I-3.2 (5,52 g, 11,07 mmol) en diclorometano seco (70 ml) se agregó R3 (3,96 g, 16,60 mmol) en cuatro porciones y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Una cantidad adicional de R3 (791,0 mg, 3,32 mmol) se agregó y la mezcla de reacción se agitó durante 6 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con 10 % de solución acuosa de ácido tartárico, solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente: EtOAc = 94:6 a 69:31) para proporcionar I-3.3.

Rendimiento 77 %, *m/z* 380/382 $[M+H – Boc]^+$, rt 1,10 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-3.4**

A I-3.3 (3,61 g, 7,52 mmol) en dioxano (45 ml), se agregaron bis(pinacolato)diboron (3,24 g, 12,78 mmol), acetato de potasio (2,21 g, 22,55 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), complejo con diclorometano (1:1) (61,4 mg, 0,08 mmol). La mezcla se purgó con nitrógeno durante 5 minutos y se calentó a 70 ºC durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo: EtOAc = 100:0 a 91:9) para proporcionar I-3.4.

Rendimiento 68% *m/z* 346 $[M+H – Boc – ((CH_3)_2CH)_2]+$, rt 0,77 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 5: Síntesis del Intermediario I-3.5**

A I-3.4 (1,14 g, 2,16 mmol) en acetonitrilo (30 ml) se agregó R5 (0,70 g, 2,16 mmol) y la mezcla se purgó con argón. Se agregaron 2 mol/l de una solución acuosa de carbonato de sodio (2,16 ml, 4,32 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis(di-ter-butilfosfino)ferroceno-paladio (141,0 mg, 0,22 mmol), la mezcla de reacción se purgó nuevamente con argón durante 5 minutos y se agitó a 80 °C durante 70 minutos en el reactor de microondas. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM : MeOH = 99:1 a 9:1) para obtener I-3.5.

Rendimiento 81% *m/z* 645 [M+H]+, rt 1,11 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

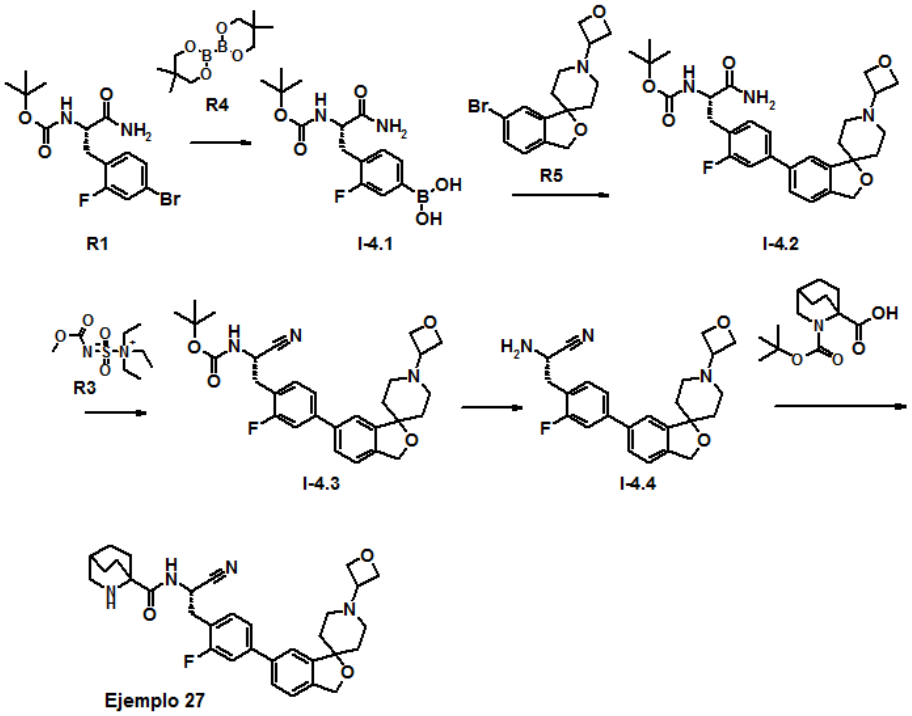
**Etapa 6: Síntesis del Ejemplo 27**

A I-3.5 (923,0 mg, 1,43 mmol) en acetonitrilo (40 ml), se agregó ácido p-toluensulfónico monohidrato (681,0 mg, 3,58 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó con TEA y se concentró al vacío. Se agregó agua y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC de fase inversa.

Rendimiento 61 %, *m/z* 545 [M+H]+, rt 1,02 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Método D**

**Síntesis alternativa de N-[(1S)-1-ciano-2-[2-fluoro-4-[1'-(oxetan-3-il)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidin]-5-il]fenil]etil]-3-azabiciclo[2.2.2]octan-4-carboxamida (Ejemplo 27)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-4.1**

A R1 (340 mg, 0,94 mmol) en dioxano (7 ml), se agregaron R4 (288 mg, 1,28 mmol), acetato de potasio (277 mg, 2,82 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II), complejo con diclorometano (1:1) (15,3 mg, 0,02 mmol). La mezcla se purgó con nitrógeno y se calentó hasta 70 ºC durante 2h. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar I-4.1.

Rendimiento 90 %, *m/z* 325 [M-H]-, rt 0,94 min, Método Z020_S01 de LC-MS.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-4.2**

A I-4.1 (228 mg, 0,70 mmol) en acetonitrilo (10 ml) se agregó R5 (239 mg, 0,70 mmol) y la mezcla se purgó con argón. Se agregaron 2mol/L de una solución acuosa de carbonato de potasio (700 µl, 1,4 mmol) y dicloruro de 1,1'-bis(di-*ter*-butilfosfino)ferroceno-paladio (46 mg, 0,07 mmol), la mezcla de reacción se purgó nuevamente con argón durante 5 minutos y se agitó a 80 °C durante 45 minutos en el reactor de microondas. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se

purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar I-4.2.

Rendimiento 80 %, *m/z* 526 $[M+H]^+$, rt 0,83 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-4.3**

A I-4.2 (294 mg, 0,56 mmol) en diclorometano (10 ml) se agregó R3 (333 mg, 1,4 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos a temperatura ambiente. DCM se retiró al vacío, el residuo obtenido se dividió en acetato de etilo y 10 % solución acuosa de ácido tartárico, las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar I-4.3.

Rendimiento 95%, *m/z* 508 $[M+H]^+$, rt 1,06 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-4.4**

A I-4.3 (320 mg, 0,63 mmol) en acetonitrilo (8 ml) se agregó ácido p-toluensulfónico monohidrato (600 mg, 3,15 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo tres veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío.

Rendimiento 80%, *m/z* 408 [M+H]+, rt 0,90 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

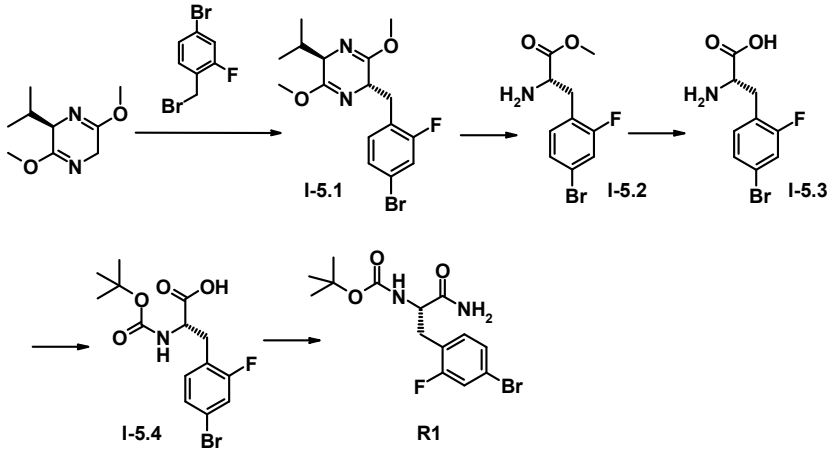
**Etapa 5: Síntesis del Ejemplo 27**

A I-4.4 (30 mg, 0,07 mmol) en DMF (1 ml) se agregó ácido 3-ter-butoxicarbonil-3-azabiciclo[2.2.2]octan-4-carboxílico, preparado de acuerdo con Radchenko *et al. J. Org. Chem.* 2009, 5541-5544 (19 mg, 0,07 mmol), N-metil-morfolina (16 µl, 0,15 mmol) y PPA (43 µl, 50 % rn DMF) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2,5 horas a temperatura ambiente, se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar el Ejemplo 27 (durante la preparación y/o la purificación, ocurrió la desprotección del grupo Boc).

Rendimiento 32%, *m/z* 545 [M+H]+, rt 1,02 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis de materiales de inicio/ eductos**

**Síntesis de ter-butil N-[(1S)-2-amino-1-[(4-bromo-2-fluoro-fenil)metil]-2-oxo-etil]carbamato (R1)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-5.1**

(2R)-(-)-2,5-Dihidro-3,6-dimetoxi-2-isopropilpirazina (212 g, 1151 mmol) en tetrahidrofurano seco (600 ml) se enfrió hasta -78 °C. Luego, se agregó por goteo n-butillitio (2,5 M en hexanos, 552 ml, 1381 mmol), manteniendo la temperatura por debajo de -78 °C. Luego de 30 min, se agregó por goteo bromuro de 4-bromo-2-fluorobencil (324g, 1209 mmol) en tetrahidrofurano seco (120 ml). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 h. La mezcla se inactivó con solución de $NH_4Cl$ saturada y se extrajo tres veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se evaporó al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (heptano/ acetato de etilo = 80/20). Rendimiento 60%.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-5.2**

A I-5.1 (104 g, 265 mmol) en acetonitrilo (600 ml) se agregó HCl acuoso 0,2 M (2788 ml, 558 mmol). La mezcla se agitó a RT durante 12 h. La mezcla se extrajo con dietiléter y el pH de la capa acuosa se ajustó a ~8 con solución saturada de $NaHCO_3$. Luego, se extrajo tres veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró. Rendimiento 80%.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-5.3**

I-5.2 (62,4 g, 211 mmol) se agitó en HCl acuoso 3 M (3 mol/l, 1000 ml) a 60 °C durante 16 h. La mezcla se enfrió y el pH se ajustó a ~7 con NaOH 6M acuoso. Luego la mezcla de reacción se filtró, se lavó tres veces con agua y se secó en un horno de vacío a 40 °C durante 12 h. Rendimiento 74 %.

**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-5.4**

A I-5.3 (151g, 546 mmol) en 1,4-dioxano (2.2 L) se agregó carbonato de sodio acuoso 2 M (301 ml, 602 mmol) y dicarbonato de di-terbutilo (138 g, 632 mmol). La mezcla se

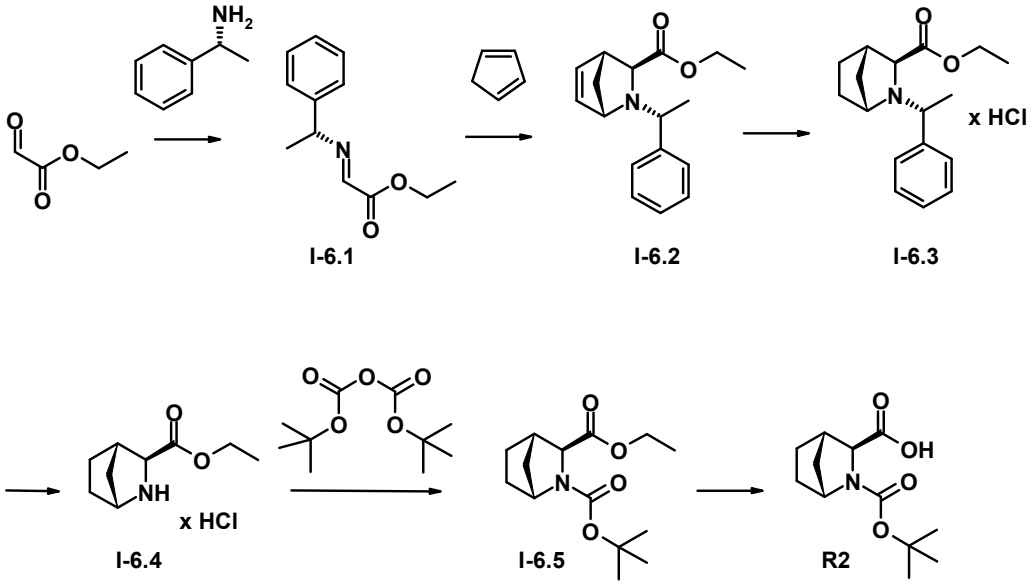
agitó durante 4h. Luego, se agregó agua y el pH se ajustó a ~4-5 con ácido cítrico. La mezcla se extrajo tres veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró. El residuo se agitó en heptano durante 15 min y el producto se filtró. Rendimiento 87%.

**Etapa 5: Síntesis de R1**

A I-5.4 (181 g, 476 mmol) en DMF seco (1200 ml), se agregaron N-metilmorfolina (72 g, 713 mmol) y TBTU (153 g, 476 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min. Luego, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se agregó solución acuosa de cloruro de amonio al 35 % (47 ml, 856 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Se agregó agua y el producto formado se filtró y se lavó tres veces con agua. El producto se secó en un horno al vacío a 40 °C durante 72 h. Rendimiento 64 %.

**Síntesis de (1S,2S,4R)-3-[(ter-butoxi)carbonil]-3-azabiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilato (R2)**

El compuesto se encuentra disponible en el comercio o se puede sintetizar en analogía a Tararov et al, Tetrahedron Asymmetry 13 (2002), 25-28.




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-6.1**

Una solución de oxoacetato de etilo (44,9 g, 0,44 mol), recientemente destilada de una solución disponible en el comercio en tolueno (a 50 mbar, 55 °C) en dietiléter (300 ml) se enfrió a -10 °C, luego se agregó por goteo (R)-(+)-1-feniletanamina (53 g, 440 mmol), manteniendo la temperatura por debajo de 0 °C. Una vez terminada la adición, se agregó $MgSO_4$*$H_2O$ (91 g, 660 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura

ambiente durante la noche. La mezcla se filtró, el licor madre se concentró al vacío y el residuo se destiló a presión reducida para obtener I-6.1 (47g, *m/z* 206 [M+H]+, rt 1,29 min, Método V003_003 de LC-MS). El producto se usó sin purificación adicional.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-6.2**

Una solución de I-6.1 (47 g, 229 mmol) y 1,3-ciclopentadieno (30 g, 458 mmol) (recientemente destilado de diciclopentadieno) en DMF (150 ml) y 120 µl de agua se enfrió hasta 0 °C antes de agregar TFA (18 ml, 234 mmol) por goteo. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, luego se agregó a una solución de 40 g de $NaHCO_3$ en 1200 ml de agua y se extrajo con dietiléter. La capa orgánica se separó, se lavó subsecuentemente con $NaHCO_3$ acuoso y agua, se secó en $MgSO_4$ y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo = 9:1) para obtener I-6.2 (Rendimiento 52 % *m/z* 272 [M+H]+, rt 0,42 min, Método X001_004 de LC-MS).

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-6.3**

A una solución de I-6.2 (24,8 g, 91 mmol) en etanol (250 ml), se agregó níquel Raney (2,5 g) y se hizo reaccionar a 50 psi en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. El catalizador se filtró, la solución se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo 9:1). Luego de la evaporación del solvente orgánico, el producto obtenido se volvió disolvió nuevamente en dietiléter y se trituró con solución de HCl en dioxano, se concentró al vacío, se volvió a disolver en 200 ml de etanol y se concentró al vacío para obtener I-6.3 (Rendimiento 78 %, *m/z* 274 [M+H]+, rt 0,42 min, Método X001_004 de LC-MS).

**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-6.4**

A una solución de I-6.3 (22 g, 71 mmol) en etanol (250 ml), se agregó 10 % de Pd/C (2,5 g) y se hizo reaccionar a 15 bar en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. El catalizador se filtró, la solución se concentró al vacío. El residuo se lavó con diisopropiléter para obtener I-6.4 (Rendimiento 98 %, *m/z* 170 [M+H]+, rt 0,48 min, Método V001_007 de LC-MS).

**Etapa 5: Síntesis del Intermediario I-6.5**

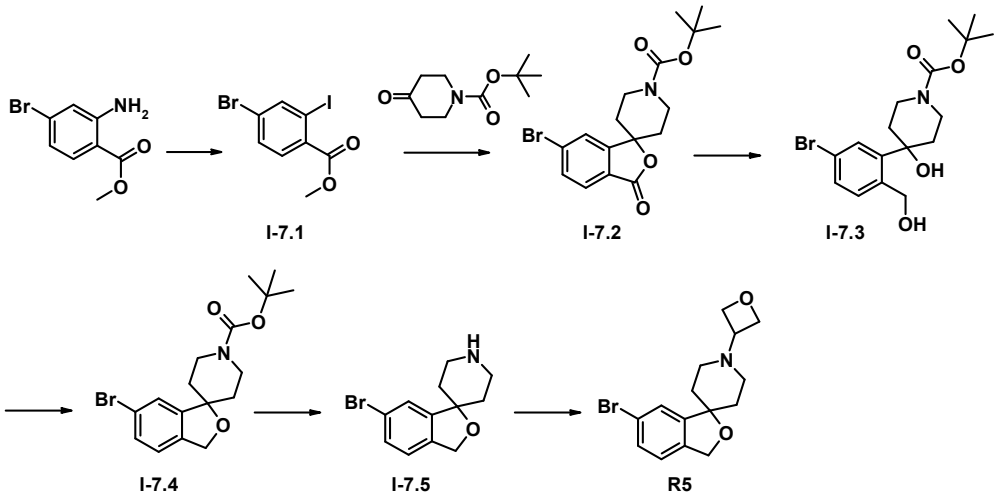
A I-6.4 (14,3 g, 69,3 mmol) en una solución de trietilamina (24,6 ml, 175,3 mmol), se agregó THF (150 ml) y agua (2 ml), dicarbonato de di-ter-butilo (15,9 g, 73 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 40 horas a temperatura ambiente, luego se concentró al vacío. Se agregó acetato de etilo al residuo, posteriormente se extrajo con agua, ácido acético acuoso 1N y agua, antes de que se secara la capa orgánica

en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío para obtener I-6.5 (Rendimiento 95 %, *m/z* 270 [M+H]+, rt 1,33 min, Método V003_003 de LC-MS).

**Etapa 6: Síntesis de R2**

Una mezcla de I-6.5 (16,9 g; 63 mmol) en acetona (152 ml), agua (50 ml) e hidróxido de litio (3 g, 126 mmol) se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se agregó agua (100 ml), el volumen se redujo al vacío antes de enfriarse a 0 °C, luego se agregó HCl acuoso 1N para acidificar hasta un pH de 2-3, seguido inmediatamente de extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, se secó ($MgSO^4$) y se concentró. Al residuo, se agregaron diclorometano (100 ml) y ciclohexano (100 ml), el volumen se redujo al vacío a la mitad y la mezcla se llevó a 15 °C. El precipitado se filtró, se lavó con ciclohexano para obtener R2 (Rendimiento 66 %, *m/z* 242 [M+H]+).

**Síntesis de 5-bromo-1'-(oxetan-3-il)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidina] (R5)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-7.1**

Metil 2-amino-4-bromobenzoato (10 g, 43,47 mmol) se suspendió en ácido sulfúrico 20 % (200 ml) y la solución obtenida se enfrió hasta 0 °C. Nitrito de sodio (3,60 g, 52,16 mmol), disuelto en agua (40 ml), se agregó por goteo entre 0 °C - 5 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos adicionales a esa temperatura. Después, una solución enfriada (ca. 0 °C) de yoduro de potasio (14,43 g, 86,93 mmol) en agua (40 ml) se agregó por goteo y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 5 °C. La mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, 10 % de solución acuosa de tiosulfato de sodio, salmuera, se secó en $Na_2SO_4$ y se concentró al vacío. Rendimiento 94%.

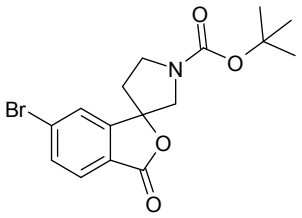
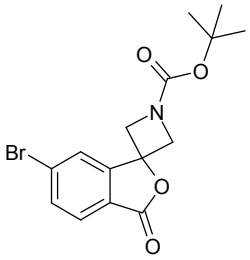
**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-7.2**

I-7.1 (9,42 g, 27,63 mmol) y ter-butil 4-oxopiperidin-1-carboxilato (6,24 g, 30,40 mmol) en THF seco (200 ml) se enfriaron hasta -70 °C. Se agregó por goteo complejo de cloruro de isopropilmagnesio-cloruro de litio (1,3 mol/l en THF, 23,38 ml, 30,40 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos adicionales a esta temperatura, alcanzó temperatura ambiente y se agitó durante 45 minutos. La mezcla de reacción se inactivó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$ y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash (éter de petróleo : EtOAc = 95:5 a 40:60) para proporcionar I-7.2.

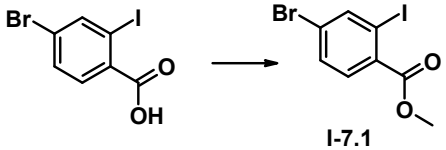
Rendimiento 74 %, *m/z* 326,328 [M+H – ter-Bu]+, rt 1,09 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

Los siguientes intermediarios indicados en la Tabla 2 se sintetizan de manera similar a los intermediarios adecuados:

**Tabla 2**

| Intermediario | Estructura | m/z $[M+H]^+$ | rt (min) | Método LC-MS |
|---|---|---|---|---|
| I-7.2.1 |  | 312; 314 [M–ter-But+H]+ | 1,06 | Z011_S03 |
| I-7.2.2 |  | 298; 300 [M–ter-But+H]+ | 1,07 | Z012_S04 |

**Síntesis alternativa del Intermediario I-7.1**




A ácido 4-bromo-2-yodobenzóico (9,0 g, 27,53 mmol) en metanol (50 ml) se agregó ácido sulfúrico concentrado (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 90 minutos a 80°C. La mezcla de reacción se vertió en agua helada, se agregó

hidrogenocarbonato de sodio hasta alcanzar un valor de pH de 7 y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. Rendimiento 95%.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-7.3**

A I-7.2 (8,11 g, 21,22 mmol) en THF (100 ml) se agregó borohidruro de litio (2 mol/l en THF, 21,22 ml, 42,44 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El análisis de HPLC-MS indicó una conversión del 20 %. Se agregó por goteo borohidruro de litio (2 mol/l en THF, 27,0 ml, 54,0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 6 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó cuidadosamente con agua mientras se enfriaba a ca. 0 °C con agua helada. Una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio se agregó a la mezcla de reacción, el precipitado obtenido se filtró, y el licor madre se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío.

Rendimiento >95 %, *m/z* 312/314 [M+H – ter-Butil – $H_2O$]+, rt 1,01 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-7.4**

I-7.3 (605 mg, 1,57 mmol) se disolvió en THF seco (20 ml) y se enfrió hasta 0 °C, se agregaron TEA (1,09 ml, 7,83 mmol) y anhídrido p-toluensulfónico (613,44 mg, 1,88 mmol). La mezcla de reacción alcanzó temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con agua y solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa.

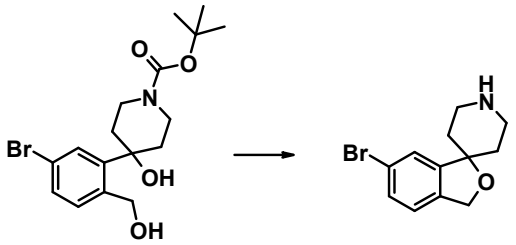
Rendimiento 72 %, *m/z* 368; 370 [M+H]+

**Etapa 5: Síntesis del Intermediario I-7.5**

I-7.4 (240 mg, 1,57 mmol) se disolvió en DCM seco (2 ml) y se agregó TFA (500 µl, 6,53 mmol). La mezcla de reacción se *[omisión en el texto fuente]* 70 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío, el residuo se volvió a disolver en metanol, se filtró a través de un cartucho de fase sólida (resina StratoSpheres™ PL-HCO3 MP) y el metanol se retiró al vacío.

Rendimiento 97 %, *m/z* 268; 270 [M+H]+, rt 0,93 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis alternativa del Intermediario I-7.5**



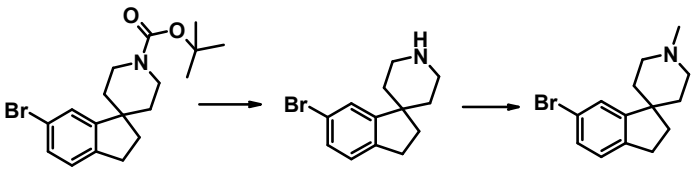

I-7.3 I-7.5

I-7.3 (8,39 g, 21,71 mmol) se disolvió en THF seco (25 ml), se agregó HCl acuoso 5N (25 ml) y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 30 h. La mezcla de reacción se agitó hasta temperatura ambiente, se basificó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío.
Rendimiento 76%, *m/z* 268; 270 [M+H]+, rt 0,93 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 6: Síntesis de R5**

I-7.5 (5,0 g, 18,49 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano seco (20 ml), se agregaron 3-oxetanona (1,78 ml, 27,73 mmol) y ácido acético (1,06 ml, 18,49 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 25 minutos a temperatura ambiente. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (6,82 g, 30,57 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con MeOH, se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$ y se concentró al vacío para proporcionar R5.
Rendimiento 89 %, *m/z* 324, 326 [M+H]+, rt 0,93 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis de 6-bromo-1'-metil-spiro[indan-1,4'-piperidina] (R7)**




R6 I-8.1 R7

**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-8.1**

A R6, adquirido de WUXI APPTEC (200 mg, 0,55 mmol) en diclorometano (3 ml) se agregó ácido trifluoroacético (0,25 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío, el residuo se volvió a disolver en metanol, se filtró a través de un cartucho de fase sólida

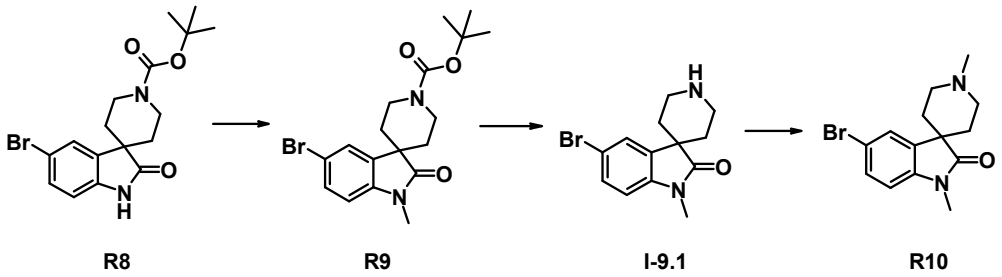
(resina StratoSpheres™ PL-HCO3 MP) y el metanol se retiró al vacío. Rendimiento >95 %.

**Etapa 2: Síntesis de R7**

A I-8.1 (152 mg, 0,57 mmol) en metanol (4 ml) se agregaron formaldehído (37 % en agua, 0,21 ml, 2,86 mmol) y ácido acético (0,05 ml, 0,86 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (302,6 mg, 1,43 mmol) y la mezcla de reacción se agitó 80 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró, se trituró con agua y solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y salmuera. El precipitado se filtró y el filtrado se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío para obtener R7.

Rendimiento 89%.

**Síntesis de 5-bromo-1,1'-dimetil-spiro[indolin-3,4'-piperidin]-2-ona (R10)**




**Etapa 1: Síntesis de R9**

A R8, adquirido de ACTIVATE (200 mg, 0,53 mmol) en DMF (4 ml) se agregó hidruro de sodio (60 % de dispersión en aceite mineral, 31,5 mg, 0,79 mmol), en enfriamiento hasta 0 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se agregó yoduro de metilo (36 µl, 0,58 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar R9. Rendimiento 98%.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-9.1**

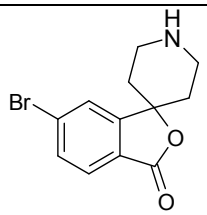
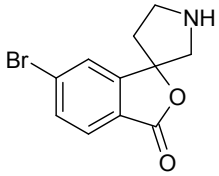
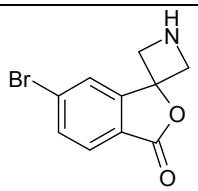
A R9 (191 mg, 0,48 mmol) en diclorometano (5 ml) se agregó ácido trifluoroacético (0,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío, el residuo se volvió a disolver en

metanol, se filtró a través de un cartucho de fase sólida (resina StratoSpheres™ PL-HCO3 MP) y el metanol se retiró al vacío.

Rendimiento > 95 %

Los siguientes intermediarios indicados en la Tabla 3 se sintetizan de manera similar a los intermediarios adecuados:

**Tabla 3**

| Intermediario | Estructura | m/z $[M+H]^+$ | rt (min) | Método LC-MS |
|---|---|---|---|---|
| I-9.1.1 |  | 282; 284 | 0,69 | Z012_S04 |
| I-9.1.2 |  | 268; 270 | 0,57 | Z021_S01 |
| I-9.1.3 |  | 254; 256 | 0,62 | Z012_S04 |

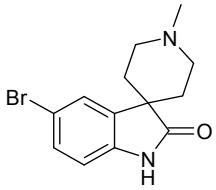
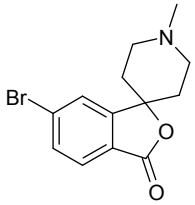
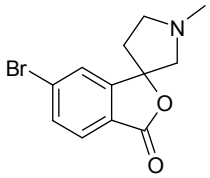
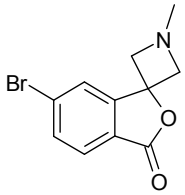
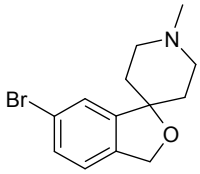
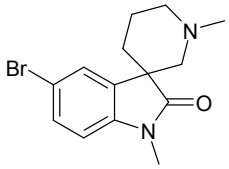
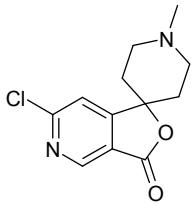
**Etapa 3: Síntesis de R10**

A I-9.1 (152 mg, 0,52 mmol) en metanol (5 ml) se agregaron formaldehído (37 % en agua, 0,19 ml, 2,58 mmol) y ácido acético (0,044 ml, 0,77 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (273,0 mg, 1,29 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró, se diluyó con agua y solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío.

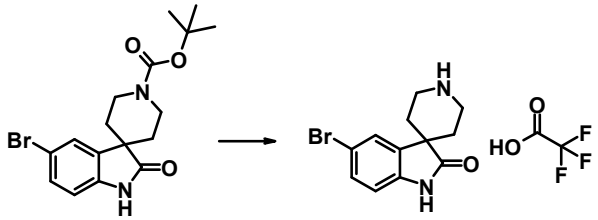
Rendimiento >95 %, 309; 311 [M+H]+, rt 0,75 min, Método Z012_S04 de LC-MS.

Los siguientes intermediarios indicados en la Tabla 4 se sintetizan de manera similar a los intermediarios adecuados:

**Tabla 4**

| Intermediario | Estructura | m/z $[M+H]^+$ | rt (min) | Método LC-MS |
|---|---|---|---|---|
| R10.1 |  | 295; 297 | 0,69 | Z012_S04 |
| R10.2 |  | 296; 298 | 0,70 | Z012_S04 |
| R10.3 |  | 282; 284 | 0,68 | Z012_S04 |
| R10.4 |  | 268; 270 | 0,62 | Z012_S04 |
| R10.5 |  | 282; 284 | 0,77 | Z012_S04 |
| R10.6 |  | 309; 311 | 0,59 | Z020_S01 |
| R10.7 |  | 253 | 0,24 | Z021_S01 |

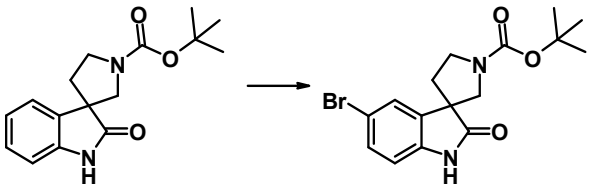
**Síntesis de sal de TFA de 5-bromospiro[indolin-3,4'-piperidin]-2-ona (R11)**



R8 R11

A R8, adquirido de ACTIVATE (150 mg, 0,39 mmol) en diclorometano (3 ml) se agregó ácido trifluoroacético (0,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró. Rendimiento 100 %.

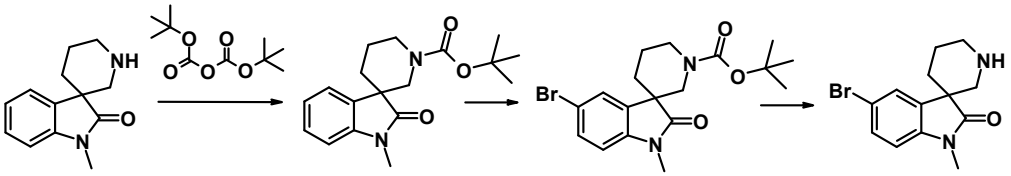
**Síntesis de ter-butil 5-bromo-2-oxo-spiro[indolin-3,3'-pirrolidin]-1'-carboxilato (R12)**



R12

A ter-butilo 2-oxospiro[indolin-3,3'-pirrolidin]-1'-carboxilato, adquirido de Zerenex (50,0 mg, 0,17 mmol) en acetonitrilo (1,5 ml) se agregó N-bromosuccinimida (30,5 mg, 0,17 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua y solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó y se concentró al vacío. Rendimiento 80%, *m/z* 367; 369 [M+H]+

**Síntesis de 5-bromo-1-metil-spiro[indolin-3,3'-piperidin]-2-ona (R13)**



I-10.1 I-10.2 R13

**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-10.1**

A 1-metilspiro[indol-3,3'-piperidin]-2(1H)-ona, adquirido de ChemBridge Corporation

(1,0 g, 4,62 mmol) en diclorometano (20 ml) se agregaron TEA (0,64 ml, 4,62 mmol) y dicarbonato de di-ter-butilo (958,6 mg, 4,39 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se diluyó con agua y solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con diclorometano. Las fases se separaron, y la capa acuosa se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron en $MgSO_4$ y se concentraron al vacío.

Rendimiento >95 %, *m/z* 261 [M+H – ter-Butil]+, rt 1,06 min, Método Z020_S01 de LC-MS.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-10.2**

A I-10.1 (1,54 g, 4,87 mmol) en acetonitrilo (35 ml) se agregó N-bromosuccinimida (856,7 mg, 5 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua y solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y salmuera, se secó en $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró al vacío.

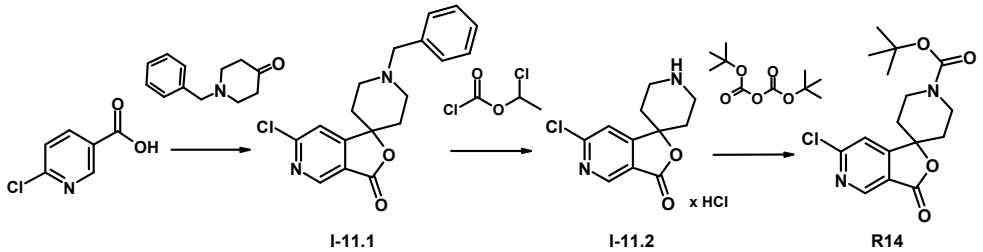
Rendimiento 93 %, *m/z* 340 [M+H – ter-Butil]+, rt 1,13 min, Método Z020_S01 de LC-MS.

**Etapa 3: Síntesis de R13**

A I-10.2 (200 mg, 0,51 mmol) en diclorometano (10 ml) se agregó ácido trifluoroacético (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se liofilizó. El residuo se disolvió en diclorometano y se extrajo con 1 mol/l de hidróxido de sodio acuoso y salmuera. La capa orgánica se secó y se concentró al vacío.

Rendimiento 88 %, *m/z* 295; 297 [M+H]+, rt 0,59 min, Método Z020_S01 de LC-MS.

**Síntesis de ter-butil 6-cloro-3-oxo-spiro[furo[3,4-c]piridin-1,4'-piperidin]-1'-carboxilato (R14)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-11.1**

La síntesis del Intermediario I-11.1 se describe en EP2072519 A1, p. 36.

A -78 °C, una solución de hexano (94 ml, 150,81 mmol) de n-butil litio 1,6 M se agregó

por goteo a una solución de THF (110 ml) de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (16,14 g, 113,10 mmol) y la solución obtenida se agitó durante 1 hora. Luego, una solución de THF (50 ml) de ácido 6-cloronicotínico (6,0 g, 37,70 mmol) se agregó por goteo durante 1 hora y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. Una solución de THF (50 ml) de 1-bencil-4-piperidona (21,6 g, 113,10 mmol) se agregó por goteo a -78 °C. Luego de agitar durante 2 horas, se agregó agua (70 ml), y la mezcla de reacción calentó hasta temperatura ambiente.

La capa acuosa se separó, y la capa orgánica se extrajo con solución acuosa de hidróxido de sodio 1 N (2x75 ml). La capa acuosa obtenida se extrajo con dietiléter (100 ml), y la capa acuosa se acidificó (pH~1) agregando ácido clorhídrico concentrado.

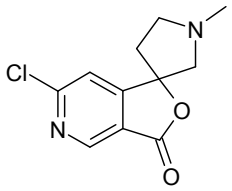
Luego de agitar durante 1 hora, el precipitado se filtró, se lavó con agua, y se disolvió en acetato de etilo.

La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, se secó en $Na_2SO_4$ y se concentró al vacío. El residuo se lavó con dietiléter.

Rendimiento 66 %, *m/z* 329 [M+H]+, rt 0,72 min, Método Z012_S04 de LC-MS.

El siguiente intermediario como indica en la Tabla 5 se sintetiza de manera similar al intermediario adecuado:

**Tabla 5**

| Intermediario | Estructura | m/z $[M+H]^+$ | rt (min) | Método LC-MS |
|---|---|---|---|---|
| I-11.1.1 |  | 239 | 0,75 | Z011_S03 |

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-11,2**

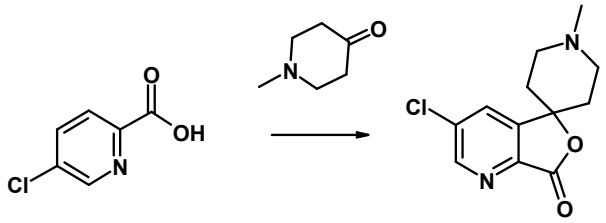
I-11.1 (2,0 g, 6,08 mmol) en dicloroetano (15 ml) se enfrió hasta 0 °C. Una solución de cloroformiato de 1-cloroetilo (1,98 ml, 18,25 mmol) en dicloroetano (5 ml) se agregó lentamente y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos adicionales a 0 °C. Después, la mezcla de reacción se calentó a reflujo y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se disolvió en metanol y se calentó a reflujo durante 30 minutos, durante ese tiempo se formó el precipitado. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y el precipitado se filtró para proporcionar I-11.2 (clorhidrato).

Rendimiento 61%.

**Etapa 3: Síntesis de R14**

A I-11.2 (500 mg, 1,82 mmol) en diclorometano (10 ml) se agregaron TEA (0,51 ml, 3,64 mmol) y dicarbonato de di-ter-butilo (396,6 mg, 1,82 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente, se diluyó con agua y solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se secó y se concentró al vacío. Rendimiento 91%.

**Síntesis de 3-cloro-1'-metil-spiro[furo[3,4-b]piridin-5,4'-piperidin]-7-ona (R15)**



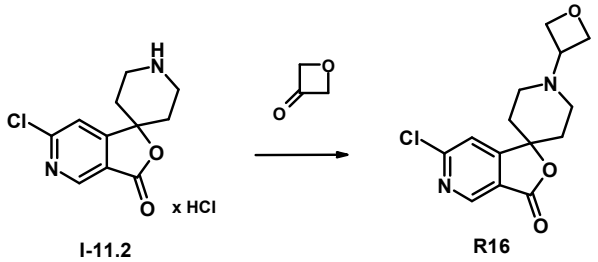

**R15**

A una solución de hexano (2,38 ml, 3,81 mmol) de n-butil litio 1,6 M a -78 °C se agregó por goteo a una solución de THF (5 ml) de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (0,76 g, 4,43 mmol) y la solución obtenida se agitó durante 1 hora esa temperatura. Luego, una solución de THF (1 ml) de ácido 5-cloro-2-piridincarboxílico (0,2 g, 1,27 mmol) se agregó por goteo durante 5 minutos y la mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos. Una solución de THF (1 ml) de 1-metil-4-piperidona (0,44 ml, 3,81 mmol) se agregó por goteo a -78 °C. Después de 1 hora, se agregó agua (10 ml), y la mezcla de reacción calentó hasta temperatura ambiente.

Acetato de etilo (15 ml) y solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (15 ml) se agregaron a la mezcla de reacción y la capa acuosa se separó. La capa orgánica se extrajo con solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2x10 ml). La fase combinada acuosa se acidificó (pH~1) agregando ácido clorhídrico concentrado.

Después de agitar durante 1 hora, la mezcla de reacción se acidificó agregando solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ y se extrajo con acetato de etilo (4x25 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$ y se concentró al vacío para proporcionar R15. Rendimiento 21 %, *m/z* 253, 255 [M+H]+, rt 0,41 min, Método Z012_S04 de LC-MS.

**Síntesis de 6-cloro-1'-(oxetan-3-il)spiro[furo[3,4-c]piridin-1,4'-piperidin]-3-ona (R16)**

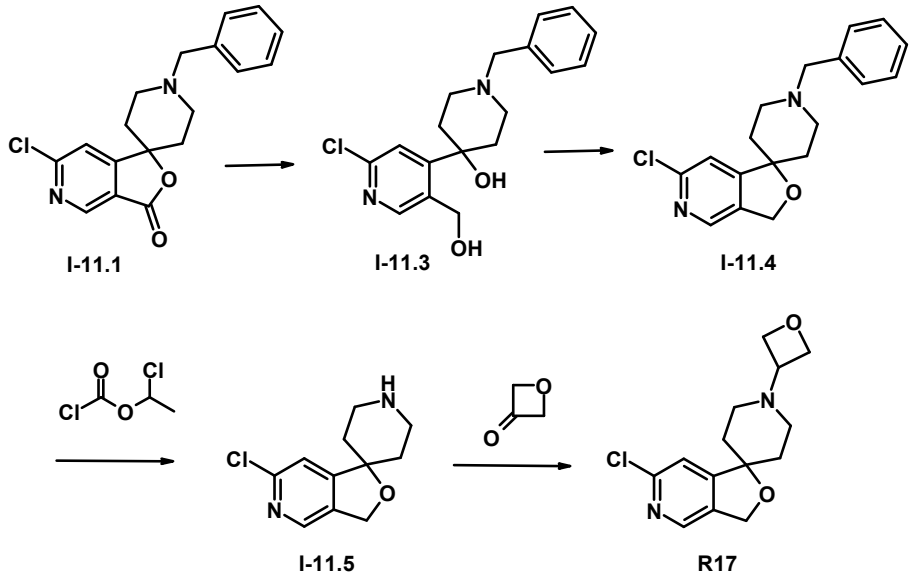



a) Generación de la base libre:

I-11.2 (200 mg, 0,73 mmol) se disolvió parcialmente en metanol seco, se agregó carbonato de tetraalquilamonio unido al polímero (Aldrich, 540293), y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente Se filtró el carbonato de tetraalquilamonio unido al polímero y se retiró el metanol al vacío para proporcionar la base libre de I-11.2.

b) La base libre de I-11.2 se disolvió en la mezcla de diclorometano seco (3 ml) / tetrahidrofurano seco (1 ml), se agregaron 3-oxetanona (0,23 ml, 3,64 mmol) y ácido acético (0,06 ml, 1,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 75 minutos a temperatura ambiente, luego se agregó triacetoxiborohidruro de sodio y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$ y se concentró al vacío. Rendimiento 80%, *m/z* 295 [M+H]+, rt 0,75 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis de 6-cloro-1'-(oxetan-3-il)spiro[3H-furo[3,4-c]piridin-1,4'-piperidina] (R17)**



**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-11.3**

A I-11.1 (1,00 g, 3,04 mmol) en metanol (15 ml) se agregó borohidruro de sodio (345 mg, 9,12 mmol) en pequeñas porciones y la mezcla de reacción se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. Se agregó borohidruro de sodio adicional (750 mg, 19,82 mmol) en 3 porciones (cada una de 250 mg) durante 5 h a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se inactivó con agua y se diluyó con acetato de etilo. La capa orgánica se separó, y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, salmuera, se secó en $Na_2SO_4$ y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar I-11.3. Rendimiento 40%, *m/z* 333 [M+H]+, rt 0,91 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-11.4**

A I-11.3 (378 mg, 1,14 mmol) en THF seco (5 ml) se agregaron TEA (0,95 ml, 6,81 mmol) y cloruro de metansulfonilo (0,26 ml, 3,5 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción alcanzó temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $Na_2SO_4$ y se concentró al vacío para proporcionar el producto crudo, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Rendimiento 95%, *m/z* 315 [M+H]+, rt 1,06 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-11.5**

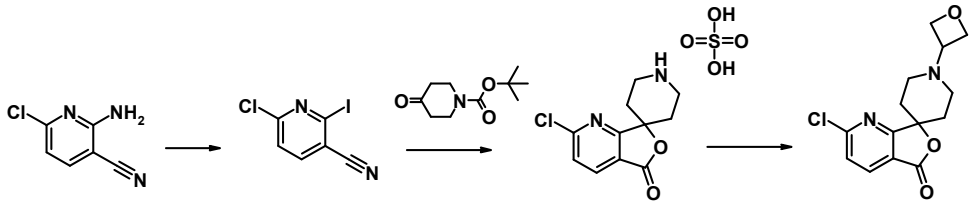
A una solución de I-11.4 (246 mg, 0,78 mmol) en dicloroetano (4 ml) se agregó cloroformiato de 1-cloroetilo (0,42 ml, 3,91 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo y se agitó durante 3 horas. Se retiró dicloroetano al vacío, el residuo obtenido se volvió a disolver en metanol (3 ml) y la solución obtenida se sometió a reflujo durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar I-11.5. Rendimiento 72%, *m/z* 225 [M+H]+, rt 0,71 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 4: Síntesis de R17**

I-11.5 (114 mg, 0,51 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano seco (2 ml), se agregaron 3-oxetanona (0,05 ml, 0,76 mmol) y ácido acético (0,044 ml, 0,76 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (269 mg, 1,27 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de

etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$ y se concentró al vacío para proporcionar R17. Rendimiento 62%, *m/z* 281 [M+H]+, rt 0,76 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis de 2-cloro-1'-(oxetan-3-il)spiro[furo[3,4-b]piridin-7,4'-piperidin]-5-ona (R18)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-12.1**

2-Amino-6-clorinonicotinonitrilo, adquirido de ABLOCK PHARMATECH, (2,0 g, 13,02 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano seco (40 ml), se agregaron yoduro de cobre (I) (3,72 g, 19,54 mmol), diiodometano (8,39 ml, 104,2 mmol) y nitrilo de ter-butilo (6,20 ml, 52,1 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1,5 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y todos los volátiles se retiraron al vacío. El residuo obtenido se disolvió en acetato de etilo (100 ml) y se lavó con 10 % de solución acuosa de tiosulfato de sodio (25 ml), solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (25 ml), se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash para proporcionar I-12.1 (eluyente: éter de petróleo / acetato de etilo).

Rendimiento 74%, *m/z* 265 [M+H]+, rt 0,90 min, Método Z012_S04 de LC-MS.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-12.2**

I-12.1 (1,0 g, 3,78 mmol) y ter-butil 4-oxopiperidin-1-carboxilato (753 mg, 3,78 mmol) se disolvieron en THF seco (10 ml) y la mezcla de reacción se enfrió hasta -65 °C. Se agregó por goteo complejo de cloruro de isopropilmagnesio-cloruro de litio (1,3 mol/l en THF, 3,78 ml, 4,92 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min adicionales a esta temperatura. Luego, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 20 minutos y se agregó metanol (0,8 ml, 19,7 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se agregó por goteo 50 % de solución acuosa de ácido sulfúrico (2.0 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El precipitado blanco formado se filtró, se lavó con THF y se secó al vacío para proporcionar I-12.2 crudo (sal de sulfato) como un sólido blanco. El producto crudo se usó en la siguiente etapa sin purificación

adicional.

Rendimiento 94%, *m/z* 239 [M+H]+, rt 0,69 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 3: Síntesis de R18**

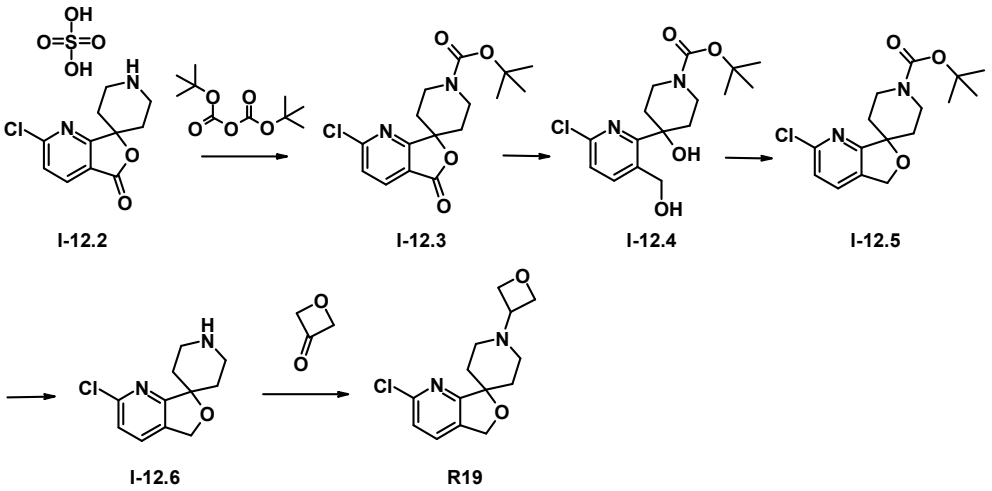
a) Generación de la base libre:

I-12.2 (150 mg, 0,45 mmol) se disolvió en una mezcla de metanol (2 ml) / agua (2 ml), se agregó carbonato de tetraalquilamonio unido al polímero (Aldrich, 540293) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se filtró el carbonato de tetraalquilamonio unido al polímero, metanol y agua se retiraron al vacío para proporcionar la base libre de I-12.2.

b) El residuo obtenido se volvió a disolver en una mezcla de THF (2 ml) / agua (0,1 ml), se agregaron 3-oxetanono (0,04 ml, 0,67 mmol) y ácido acético (0,038 ml, 0,67 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$ y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash para proporcionar R18 (eluyente: DCM / MeOH).

Rendimiento 18%, *m/z* 295 [M+H]+, rt 0,74 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Síntesis de 2-cloro-1'-(oxetan-3-il)spiro[5H-furo[3,4-b]piridin-7,4'-piperidina] (R19)**




**Etapa 1: Síntesis del Intermediario I-12.3**

A I-12.2 (3,25 g, 9,65 mmol) en diclorometano (50 ml) se agregó TEA (4,04 ml, 28,95 mmol), la mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se agregó dicarbonato de di-ter-butilo (2,11 g, 9,65 mmol). La mezcla de reacción se

agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente, se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se concentró al vacío y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna flash (éter de petróleo : EtOAc = 95:5 a 60:40) para proporcionar I-12.3.

Rendimiento 49 %, *m/z* 239 [M–Boc+H]+, rt 1,03 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 2: Síntesis del Intermediario I-12.4**

A I-12.3 (10,0 g, 29,52 mmol) en etanol (500 ml) se agregó borohidruro de sodio (2,23 g g, 59,03 mmol) y cloruro de calcio (6,55 g, 59,03 mmol) en dos porciones y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. HPLC-MS indicó 85 % de conversión en el producto deseado. Se agregó una cantidad adicional de borohidruro de sodio (350 mg, 9,25 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 6 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, se retiró etanol al vacío y el residuo obtenido se trituró con acetato de etilo. El precipitado formado se filtró y el líquido madre se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El residuo obtenido se trituró con acetonitrilo, el precipitado formado se filtró, el líquido madre se concentró al vacío y ese procedimiento se repitió dos veces más. Los precipitados se combinaron y se secaron al vacío para proporcionar I-12.4.

Rendimiento 54 %, *m/z* 243 [M+H–Boc]+, rt 0,97 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 3: Síntesis del Intermediario I-12.5**

A I-12.4 (6,77 g, 17,77 mmol) en THF seco (75 ml) se agregaron TEA (14,84 ml, 106,64 mmol) y cloruro de metansulfonilo (5,50 ml, 71,09 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con diclorometano varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$, se concentró al vacío y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna flash (éter de petróleo : EtOAc = 95:5 a 72:28) para proporcionar I-12.5.

Rendimiento 65%, *m/z* 225 [M+H–Boc]+, rt 1,07 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 4: Síntesis del Intermediario I-12.6**

A I-12.5 (4,13 g, 12,07 mmol) en diclorometano (15 ml) se agregó ácido trifluoroacético (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío, el residuo obtenido se volvió a disolver en metanol (50 ml), se agregó carbonato de tetraalquilamonio unido al polímero (Aldrich, 540293)

y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente El carbonato de tetraalquilamonio unido al polímero se filtró y el metanol se retiró al vacío para obtener I-12.6.

Rendimiento 99%, *m/z* 225 [M+H]+, rt 0,74 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

**Etapa 5: Síntesis de R19**

I-12.6 (3,62 g, 12,08 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano seco (40 ml), se agregaron 3-oxetanona (1,16 ml, 18,13 mmol) y ácido acético (691 µl, 12,08 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (6,74 g, 30,21 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 25 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con metanol, se diluyó con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo varias veces. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en $MgSO_4$ y se concentró al vacío. El residuo obtenido se trituró con una mezcla de acetonitrilo / metanol (9:1), el precipitado formado se filtró, el líquido madre se concentró al vacío y ese procedimiento se repitió dos veces más. Los precipitados se combinaron y se secaron al vacío para proporcionar 2,47 g de R19. El líquido madre se concentró al vacío, el residuo obtenido se volvió a disolver en acetonitrilo y se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar una cantidad adicional de (0,32 g) de R19.

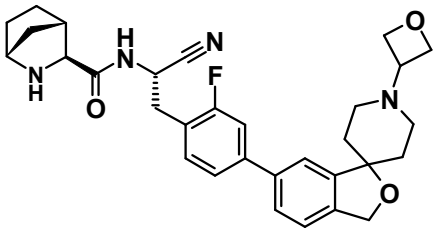
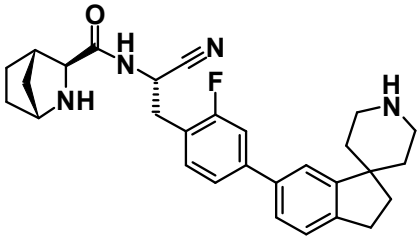
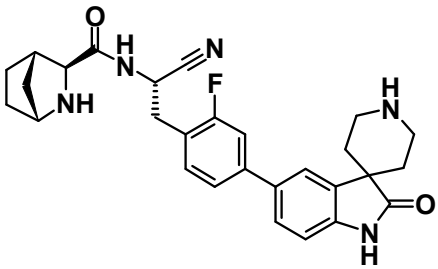
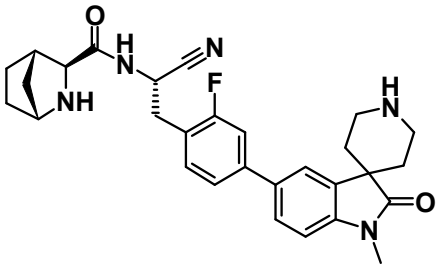
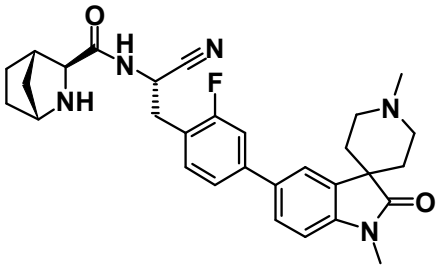
Rendimiento 78%, *m/z* 281 [M+H]+, rt 0,78 min, Método Z011_S03 de LC-MS.

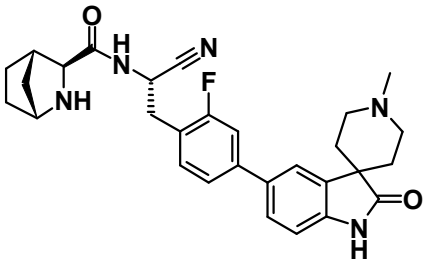
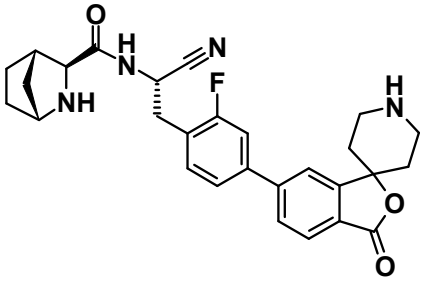
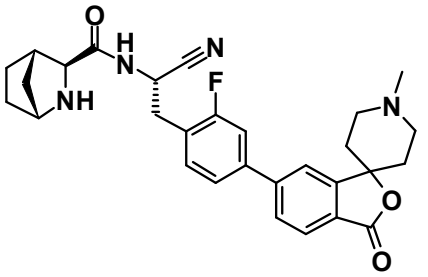
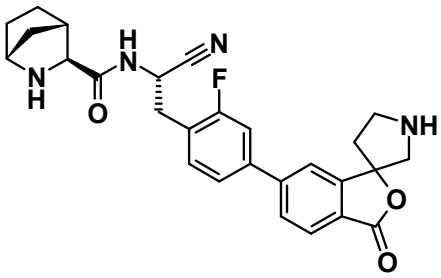
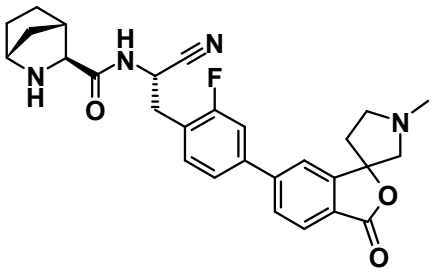
EJEMPLOS

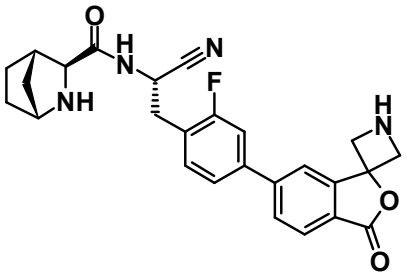
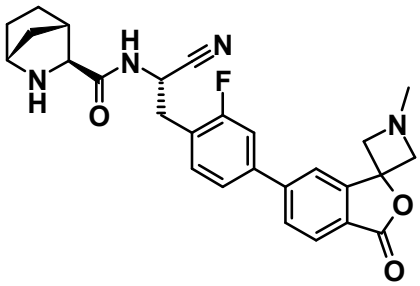
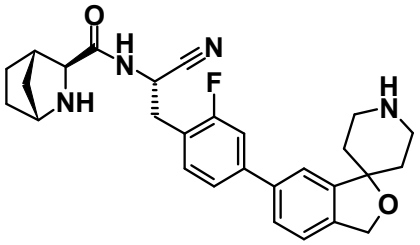
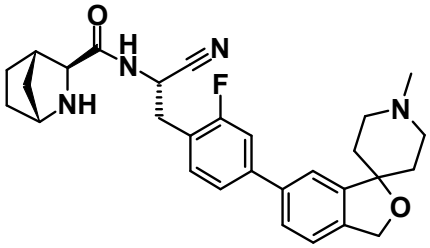
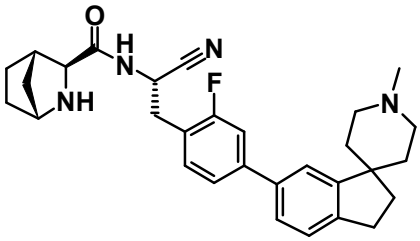
(rt = tiempo de retención). Métodos de desprotección : TSA (ácido toluensulfónico cf. Ejemplo 1). Se asigna la estereoquímica en el átomo de carbono adyacente al grupo nitrilo: enlace estereo significa isómero S.

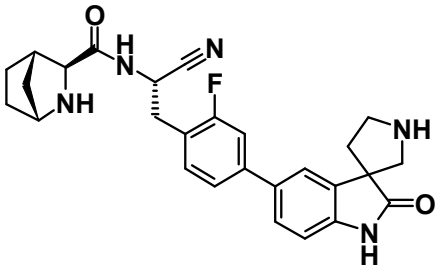
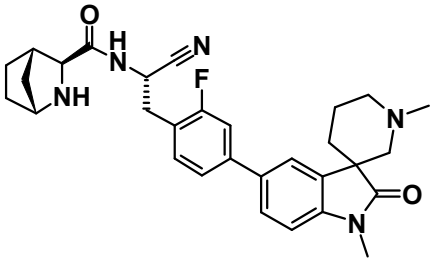
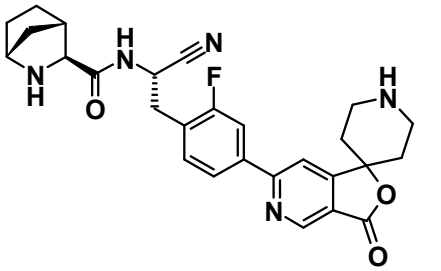
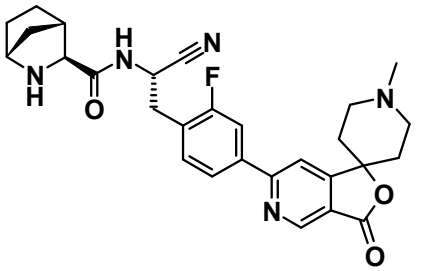
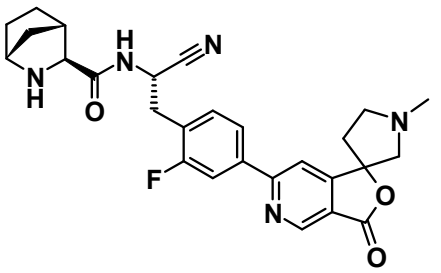
**Tabla 6**

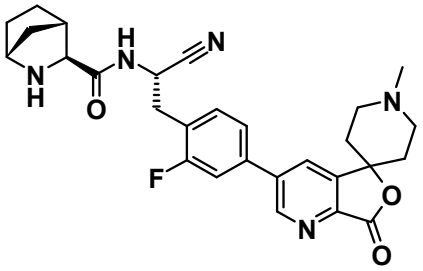
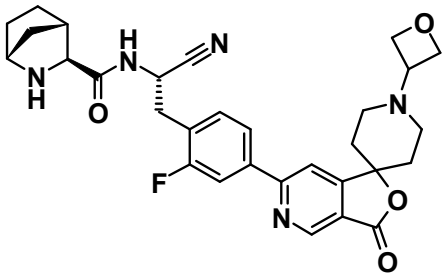
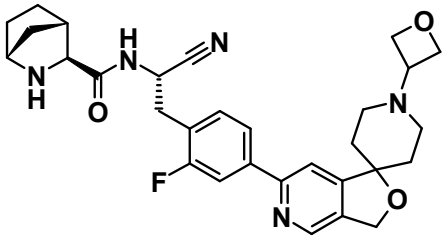
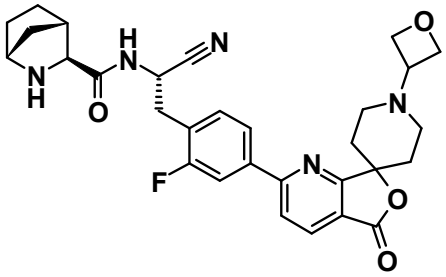
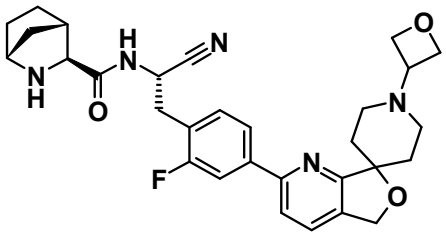
| # | Estructura | Educto | Método de sintetización/ desprotección | Rendimiento [%] |
|---|---|---|---|---|

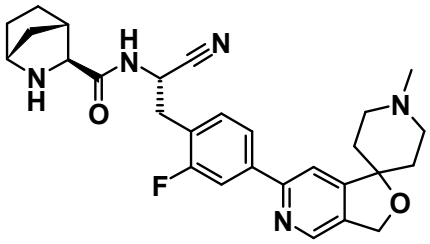
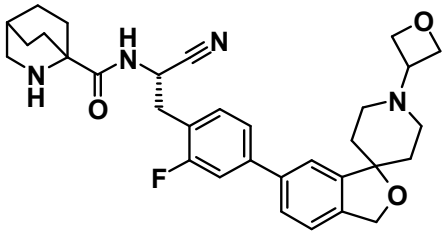
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 |  | I-1.5 | A/TSA | 84 |
| 2 |  | I-1.5.1 | A/TSA | >95 |
| 3 |  | I-1.5.2 | A/TSA | 35 |
| 4 |  | I-1.5.3 | A/TSA | 48 |
| 5 |  | I-1.5.4 | A/TSA | 48 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 6 |  | I-1.5.5 | A/TSA | 7 |
| 7 |  | I-1.5.6 | A/TSA | 43 |
| 8 |  | I-1.5.7 | A/TSA | 41 |
| 9 |  | I-1.5.8 | A/TSA | 90 |
| 10 |  | I-1.5.9 | A/TSA | 16 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 11 |  | I-1.5.10 | A/TSA | 20 |
| 12 |  | I-1.5.11 | A/TSA | 54 |
| 13 |  | I-1.5.12 | A/TSA | 9 |
| 14 |  | I-1.5.13 | A/TSA | 43 |
| 15 |  | I-1.5.14 | A/TSA | 49 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 16 |  | I-1.5.15 | A/TSA | 58 |
| 17 |  | I-1.5.16 | A/TSA | 46 |
| 18 |  | I-1.5.17 | A/TSA | 35 |
| 19 |  | I-1.5.18 | A/TSA | 73 |
| 20 |  | I-1.5.19 | A/TSA | 47 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 21 |  | I-1.5.20 | A/TSA | 36 |
| 22 |  | I-1.5.21 | A/TSA | 35 |
| 23 |  | I-1.5.22 | A/TSA | 83 |
| 24 |  | I-1.5.23 | A/TSA | >95 |
| 25 |  | I-1.5.24 | A/TSA | 88 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 26 |  | I-2.5 | B/TSA | 28 |
| 27 |  | I-3.5 | C/TSA | 61 |

DATOS ANALÍTICOS DE LOS EJEMPLOS

**Tabla 7**

| **Ejemplo** | **m/z [M+H]+** | **Rt [min]** | **Método LC-MS** |
|---|---|---|---|
| 1 | 531 | 1,00 | Z011_S03 |
| 2 | 473 | 1,19 | Z011_S03 |
| 3 | 488 | 0,89 | Z012_S04 |
| 4 | 502 | 0,73 | Z012_S04 |
| 5 | 516 | 0,74 | Z012_S04 |
| 6 | 502 | 0,70 | Z012_S04 |
| 7 | 489 | 0,72 | Z012_S04 |
| 8 | 503 | 0,72 | Z012_S04 |
| 9 | 475 | 0,91 | Z011_S03 |
| 10 | 489 | 0,96 | Z011_S03 |
| 11 | 461 | 0,91 | Z011_S03 |
| 12 | 475 | 0,97 | Z011_S03 |

| **Ejemplo** | **m/z [M+H]+** | **Rt [min]** | **Método LC-MS** |
|---|---|---|---|
| 13 | 475 | 0,76 | Z012_S04 |
| 14 | 489 | 1,05 | Z011_S03 |
| 15 | 487 | 1,17 | Z011_S03 |
| 16 | 474 | 0,89 | Z011_S03 |
| 17 | 516 | 0,60 | Z020_S01 |
| 18 | 490 | 0,90 | Z011_S03 |
| 19 | 504 | 0,95 | Z011_S03 |
| 20 | 490 | 0,92 | Z011_S03 |
| 21 | 504 | 0,92 | Z011_S03 |
| 22 | 546 | 0,94 | Z011_S03 |
| 23 | 532 | 0,96 | Z011_S03 |
| 24 | 546 | 0,93 | Z011_S03 |

| Ejemplo | m/z [M+H]+ | Rt [min] | Método LC-MS |
|---|---|---|---|
| 25 | 532 | 0,97 | Z011_S03 |
| 26 | 490 | 0,96 | Z011_S03 |

| Ejemplo | m/z [M+H]+ | Rt [min] | Método LC-MS |
|---|---|---|---|
| 27 | 545 | 1,02 | Z011_S03 |

**Tabla 8**

Lista de abreviaturas

| | |
|---|---|
| ACN | acetonitrilo |
| ac. | acuoso |
| BOC, boc | ter-butiloxicarbonilo |
| d | día |
| DBU | 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno |
| DCM | diclorometano |
| DEA | dietilamina |
| DIPEA | N,N-diisopropiletilamina |
| DIPE | diisopropiléter |
| DMAP | 4-dimetilaminopiridina |
| DMF | N,N-dimetilformamida |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| EA, EtOAc | acetato de etilo |
| FA | ácido fórmico |
| h | hora |
| HATU | hexafluoro-fosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio |
| LiOH | hidróxido de litio |
| MeOH | metanol |
| MeTHF | tetrahidrofurano de metilo |
| min | minuto |
| NaH | hidruro de sodio |
| PE | éter de petróleo |
| PPA | anhídrido cíclico del ácido1-propanfosfónico |
| RT, r.t. | temperatura ambiente, por ejemplo, 15 - 25 °C |
| Rt | tiempo de retención |
| TBME | ter-butilmetiléter |
| TBTU | tetrafluoroborato de o-(1H-benzo-1,2,3-triazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio |

| | |
|---|---|
| TEA | trietilamina |
| TFA | ácido trifluoroacético |
| THF | tetrahidrofurano |
| TSA | ácido p-toluensulfónico monohidrato |

**DATOS FARMACOLÓGICOS**

Otras funciones y ventajas de la presente invención serán evidentes en los siguientes ejemplos más detallados que muestran, a modo de ejemplo, los principios de esta invención.

**INHIBICIÓN DE DPPI HUMANA (CATEPSINA C)**

Materiales: Las placas de microtitulación (Optiplate-384 F) se adquirieron de PerkinElmer (N.° de producto
10 6007270). El sustrato Gly-Arg-AMC se obtuvo de Biotrend (N.° de producto 808756 péptido a medida).

Albúmina de suero bovino (BSA; N.° de producto A3059) y ditiotreitol (DTT; N.° de producto D0632) se obtuvieron de Sigma. El amortiguador TagZyme se obtuvo de Riedel-de-Haen (N.° de producto 04269), NaCl se obtuvo de Merck (N.° de producto 1.06404.1000) y ácido morfolinoetansulfónico (MES) se obtuvo de Serva (N.° de producto 29834). El inhibidor Gly-Phe-DMK de DPP1 se adquirió de MP Biomedicals (N.° de producto 03DK00625). La DPPI recombinante humana se adquirió de Prozymex. Todos los demás materiales se encontraban disponibles en el comercio al más alto nivel.

Se usaron los siguientes amortiguadores: Amortiguador MES: 25 mM de MES, 50 mM de NaCl, 5 mM de DTT, ajustado a pH 6,0, que contenía 0,1 % de BSA; amortiguador TAGZyme: 20 mM de NaH2PO4, 150 mM de NaCl ajustado a pH 20 6,0 con HCl

**Condiciones del ensayo:** La DPPI recombinante humana se diluyó en amortiguador TAGZyme a 1 U/ml (38,1 µg/ml, respectivamente) y luego se activó mediante la mezcla en una relación 1:2 con una solución acuosa de cisteamina (2 mM) e incubación durante 5 min a temperatura ambiente.

5 ul de compuesto de prueba (concentración final 0,1 nM a 100 µM) en agua bidestilada 5 (que contenía 4 % de DMSO, concentración final de 1 % de DMSO) se mezclaron con 10 µl de DPPI en amortiguador MES (concentración final 0,0125 ng/µl) y se incubaron durante 10 min. Luego, se agregaron 5 µl de sustrato en amortiguador MES (concentración final 50 µM). Luego, las placas de mitrotitulación se incubaron a

temperatura ambiente durante 30 min. Luego, la reacción se detuvo mediante la adición de 10 µl de Gly-Phe-DMK en 10 de amortiguador MES (concentración final 1 µM). La fluorescencia en las cavidades se determinó usando un lector de fluorescencia SpectraMax M5 de Molecular Devices (Ex 360 nm, Em 460 nm) o un lector de fluorescencia Envision (Ex 355 nm, Em 460 nm).

Cada placa de mitrotitulación del ensayo contenía cavidades con controles de vehículo (1 % de DMSO en bidest + 0,075 % de 15 BSA) como referencia para la actividad de enzima no inhibida (100 % de Ctl; valores altos) y cavidades con el inhibidor (Gly-Phe-DMK, en bidest + 1 % de DMSO + 0,075 % de BSA, concentración final 1µM) como controles para fluorescencia de fondo (0 % de Ctl; valores bajos).

El análisis de los datos se realizó calculando el porcentaje de fluorescencia en presencia del compuesto de prueba en comparación con la fluorescencia del control de vehículo luego

20 de sustraer la fluorescencia de fondo usando la fórmula siguiente:

(RFU(muestra)-RFU(fondo))*100/(RFU(control)-RFU(fondo))

Los datos de estos cálculos se usaron para generar los valores IC50 para la inhibición de DPPI, respectivamente.

**Tabla 9**

| Ejemplo | Inhibición de DPPI $IC_{50}$ [µM] |
|---|---|
| 1 | 0,0011 |
| 2 | 0,0006 |
| 3 | 0,0003 |
| 4 | 0,0004 |
| 5 | 0,0006 |
| 6 | 0,0002 |
| 7 | 0,0005 |
| 8 | 0,0007 |
| 9 | 0,0005 |
| 10 | 0,0006 |
| 11 | 0,0007 |
| 12 | 0,0005 |
| 13 | 0,0006 |
| 14 | 0,0010 |

| Ejemplo | Inhibición de DPPI $IC_{50}$ [µM] |
|---|---|
| 15 | 0,0005 |
| 16 | 0,0005 |
| 17 | 0,0016 |
| 18 | 0,0016 |
| 19 | 0,0010 |
| 20 | 0,0016 |
| 21 | 0,0014 |
| 22 | 0,0048 |
| 23 | 0,0050 |
| 24 | 0,0027 |
| 25 | 0,0018 |
| 26 | 0,0020 |
| 27 | 0,0029 |

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ELASTASA NEUTRÓFILA EN PREPARACIÓN DE LISADO CITOSÓLICO DE U937 DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON EL COMPUESTO DE PRUEBA**

Materiales:

Optiplate 384F se adquirieron de PerkinElmer (N.° de producto #6007270). Las placas de cultivo celular Nunclon de 24 cavidades (N.° 142475) y placas de 96 cavidades (N.° 267245) se obtuvieron de Nunc. Dimetilsulfóxido (DMSO) se obtuvo de Sigma (N.° de producto D8418). Nonidet-P40 (NP40) se obtuvo de USBiological (N.° de producto N3500)

El sustrato, específico para elastasa neutrófila, se obtuvo de Bachem (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC; N.° de producto I-1270).

La elastasa neutrófila humana se obtuvo de Calbiochem (N.° de producto 324681)

Amortiguadores:

Amortiguador Tris (100 mM de Tris; NaCl 1M; pH 7,5)

Amortiguador Tris + HSA 0,1 %; albúmina de suero humano se obtuvo de Calbiochem (Cat#. 126658)

Amortiguador de serina-proteasa (20 mM de Tris; 100 mM de NaCl; pH 7,5) + 0,1 % de HSA

Amortiguador de lisis de serina proteasa: 20 mM de Tris-HCl; 100 mM de NaCl pH

7,5; + 0,2 % de Nonidet-P40;

PBS: solución salina amortiguada con fosfato, sin Ca y Mg, de Gibco

Cultivo celular:

U937 de ECACC (Cat. N.° 85011440) cultivado en suspensión a 37 °C y 5 % de CO2.

Densidad celular: 0,2-1 células Mio /ml.

Medio: RPMI1640 GlutaMAX (N.° 61870) con 10 % de FCS de Gibco

Siembra de células y tratamiento:

Los compuestos en 100 % de DMSO se diluyeron en el medio (-FCS) con 10 % de DMSO y se diluyeron adicionalmente de acuerdo con el experimento planeado.

20 µl de la solución del compuesto se transfirió a las cavidades respectivas de la placa de 24 cavidades y se diluyó con 2 ml de suspensión celular/cavidad que contenía $1x10^5$ células/ml (concentración final de DMSO = 0,1 %). Factor de dilución del compuesto = 100

Los compuestos (hasta 7 concentraciones) se evaluaron por triplicado con 3 cavidades para el control de DMSO 0,1 %, se incubaron durante 48 horas sin cambio de medio a 37 °C, 5 % de CO2 y 95 % de humedad relativa.

Cosecha de células y lisado de células:

Se transfirió la suspensión celular en bloque de ensayo de 96 cavidades de 2 ml. Las células se separaron del medio mediante centrifugación (500 X g; 10 min; temperatura ambiente); se descartó el sobrenadante. Las células se suspendieron nuevamente en 1 ml de PBS; se centrifugaron (500 X g; 10 min; temperatura ambiente); se lavaron dos veces con PBS. Se agregó 80 µl de amortiguador sobrenadante (helado) al pelet celular; se suspendió nuevamente el pelet y se almacenó en hielo durante 10 minutos. Los residuos se retiraron mediante centrifugación a 1000 X g durante 10 min a 4 °C. Se transfirieron 80-100 µl de sobrenadante de lisado en una placa de 96 cavidades y se almacenó inmediatamente a -80 °C.

Ensayo de actividad de elastasa neutrófila:

Los lisados congelados se descongelaron a 37 °C durante 10 minutos y se almacenaron en hielo. El contenido de proteína se determinó con un ensayo de proteínas de Bradford. Los lisados se diluyeron hasta 0,2-0,5 mg/ml de proteína en amortiguador de serina proteasa + HSA.

Estándar: NE (100 µg/ml de solución de reserva en amortiguador Tris; almacenado a -80 °C) se diluyó en amortiguador Tris + HSA hasta 750 ng/ml, y se diluyó en serie adicionalmente 1:2 durante la curva estándar.

Se transfirieron muestras de amortiguador, vacías, estándares y de lisado a una placa

de 384 cavidades

Plan de mezcla con pipeta

Blanco: 5 µl de amortiguador Tris + 10 µl de amortiguador de serina proteasa + 5 µl de sustrato

Estándar: 5 µl de amortiguador Tris + 10 µl de NE (diferente concentración) + 5 µl de sustrato

Lisado: 5 µl de amortiguador Tris + 10 µl de lisado + 5 µl de sustrato

El aumento en la fluorescencia (Ex360 nm/Em 460 nm) se determinó después de 30 minutos con un lector de fluorescencia Spectramax M5 de Molecular Device. El resultado se interpoló a ng/mg de proteína de lisado usando funciones de fórmulas de excel. El porcentaje de inhibición en las muestras de lisado tratado con compuesto se calcula en función de la muestra de control tratada con DMSO (100-(muestra de compuesto*100)/muestra de control)

Un compuesto de prueba presentará valores entre 0 % y 100 % de inhibición de elastasa neutrófila. IC50 se calculó usando Graphpad Prism; ajuste no lineal (log(inhibidor) *vs.* respuesta -- pendiente variable). El valor de IC50 se interpoló como la concentración del compuesto de prueba que genera una reducción de la actividad de elastasa neutrófila de 50 % (con respecto al control tratado con DMSO).

**Tabla 10**

| **Ejemplo** | **Reducción de actividad de elastasa neutrófila en células U937 IC50 [µM]** |
|---|---|
| 1 | 0,0010 |
| 2 | 0,0068 |
| 3 | 0,5030 |
| 4 | 0,0910 |
| 5 | 0,0023 |
| 6 | 0,0222 |
| 7 | 0,0349 |
| 8 | 0,0008 |
| 9 | 0,0215 |

| Ejemplo | Reducción de actividad de elastasa neutrófila en células U937 IC50 [µM] |
|---|---|
| 10 | 0,0014 |
| 11 | 0,0107 |
| 12 | 0,0012 |
| 13 | 0,0167 |
| 14 | 0,0011 |
| 15 | 0,0002 |
| 16 | 0,0738 |
| 17 | 0,0006 |
| 18 | 0,2202 |
| 19 | 0,0050 |
| 20 | 0,0232 |
| 21 | 0,0637 |
| 22 | 0,0157 |
| 23 | 0,0075 |
| 24 | 0,0060 |
| 25 | 0,0016 |
| 26 | 0,0046 |
| 27 | 0,0007 |

**INHIBICIÓN DE CATEPSINA K HUMANA**

Materiales:

Las placas de microtitulación (Optiplate-384 F) se adquirieron de PerkinElmer (N.° de producto 6007270). El sustrato Z-Gly-Pro-Arg-AMC se obtuvo de Biomol (N.° de producto- P-142). L-cisteína (N.° de producto 168149) se obtuvo de Sigma. El acetato de sodio se obtuvo de Merck (N.° de producto- 6268.0250), EDTA se obtuvo de Fluka

(N.° de producto- 03680). El inhibidor E-64 se adquirió de Sigma (N.° de producto- E3132). La proenzima catepsina K recombinante humana se adquirió de Biomol (N.° de producto SE-367). Todos los demás materiales se encontraban disponibles en el comercio al más alto nivel.

Se usaron los siguientes amortiguadores: Amortiguador de activación: 32,5 mM de acetato de sodio, ajustado a pH 3,5 con HCl; amortiguador de ensayo: 150 mM de acetato de sodio, 4 mM de EDTA, 20 mM de L-cisteína, ajustado a pH 5,5 con HCl,

Condiciones del ensayo:

Para activar la proenzima, se mezclaron 5 µl de procatepsina K con 1ul de amortiguador de activación, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min.

5 µL de compuesto de prueba (concentración final 0,1 nM a 100 µM) en agua bidestilada (que contenía 4 % de DMSO, concentración final de DMSO 1 %) se mezclaron con 10 µl de catepsina K en amortiguador de ensayo (concentración final 2 ng/µl) y se incubaron durante 10 min. Luego, se agregaron 5 µl de sustrato en amortiguador de ensayo (concentración final 12,5 µM). Luego, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. Luego, la reacción se detuvo mediante la adición de 10 µl de E64 en amortiguador de ensayo (concentración final 1 µM). La fluorescencia en las cavidades se determinó usando un lector de fluorescencia SpectraMax M5 de Molecular Devices (Ex 360 nm, Em 460 nm).

Cada placa de mitrotitulación del ensayo contenía cavidades con controles de vehículo (1 % de DMSO en bidest) como referencia para la actividad de enzima no inhibida (100 % de Ctl; valores altos) y cavidades con el inhibidor (E64 en bidest + 1 % de DMSO, concentración final 1µM) como controles para fluorescencia de fondo (0 % de Ctl; valores bajos).- El análisis de los datos se realizó calculando el porcentaje de fluorescencia en presencia del compuesto de prueba en comparación con la fluorescencia del control de vehículo luego sustraer la fluorescencia de fondo:

(RFU(muestra)-RFU(fondo))*100/(RFU(control)-RFU(fondo))

Los datos de estos cálculos se usaron para generar los valores $IC_{50}$ para la inhibición de catepsina K, respectivamente.

**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD METABÓLICA CON MICROSÓMAS DE HÍGADO HUMANO**

La degradación metabólica del compuesto de prueba se evalúa a 37 °C con microsomas de hígado agrupados de humano. El volumen de incubación final de 100 µl por punto temporal contiene amortiguador TRIS, pH 7,6 (0,1 M), cloruro de

magnesio (5 mM), proteína microsómica (1 mg/ml) y el compuesto de prueba a una concentración final de 1 µM. Después de un breve período de preincubación a 37 °C, las reacciones se inician mediante la adición de beta-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH, 1 mm) y se finalizan mediante la transferencia de una alícuota en acetonitrilo después de diferentes puntos temporales. Adicionalmente, la degradación independiente de NADPH se monitorea en incubaciones sin NADPH, terminadas en el último punto temporal. El compuesto de prueba remanente [%] luego de la incubación independiente de NADPH se refleja mediante el parámetro c(control) (estabilidad metabólica). Las incubaciones inactivadas se convierten en pelets mediante centrifugación (10'000 g, 5 min). Se analiza una alícuota del sobrenadante mediante LC-MS/MS para determinar la cantidad del compuesto de origen.

La semivida (t1/2 IN VITRO) se determina mediante la pendiente de la representación semilogarítmica del perfil concentración-tiempo. La depuración intrínseca (CL_INTRINSIC) se calcula considerando la cantidad de proteína en la incubación:

CL_INTRINSIC [µl/min/mg de proteína] = (ln 2 / (semivida [min] x contenido proteico [mg/ml])) x 1'000.

Los valores de semivida (t1/2 INVITRO) de los compuestos seleccionados en el ensayo de estabilidad metabólica descrito anteriormente se detallan en la tabla siguiente.

**Tabla 11**

| **Ejemplo** | **Estabilidad *in vitro* en incubaciones de microsomas de hígado humano t1/2 [min]** |
|---|---|
| 1 | >130 |
| 2 | >130 |
| 3 | >130 |
| 4 | >130 |
| 5 | >130 |
| 6 | 110 |
| 7 | >130 |
| 8 | 74 |

| Ejemplo | Estabilidad *in vitro* en incubaciones de microsomas de hígado humano t1/2 [min] |
|---|---|
| 9 | >130 |
| 10 | >130 |
| 11 | >130 |
| 12 | 46 |
| 13 | >130 |
| 14 | >130 |
| 15 | >130 |
| 16 | >130 |
| 17 | 60 |
| 18 | >130 |
| 19 | >130 |
| 20 | >130 |
| 21 | >130 |
| 22 | >130 |
| 23 | >130 |
| 24 | >130 |
| 25 | >130 |
| 26 | 55 |
| 27 | 120 |

**UN ACOPLAMIENTO DIANA EN UN MODELO DE RATÓN**

Tratamiento del compuesto:

Para monitorear el efecto de los compuestos de prueba sobre la actividad de elastasa neutrófila en neutrófilos periféricos, ratones Crl:NMRI hembra se trataron de la siguiente manera:

Grupo 1 (6 animales): 0,5 mg/kg de compuesto de prueba en 0,5 % de Natrosol (pH 2-

3)

Grupo 2 (6 animales): 0,5 % Natrosol (pH 2-3)

Grupo 3 (2 animales): 0,5 % Natrosol (pH 2-3)

Los compuestos de prueba o solución de Natrosol se aplicaron de lunes a viernes a las 7:00 am y 4:00 pm cada día de la primera semana del estudio, y lunes y martes (7:00 am and 4:00 pm) la segunda semana. Los compuestos de prueba o Natrosol se aplicaron por vía oral.

Exposición de LPS y preparación de lavado broncoalveolar:

El miércoles de la segunda semana, los animales se trataron con el compuesto de prueba o solución de Natrosol como se describió anteriormente (7:00 am) y luego se expusieron por inhalación a LPS (lipopolisacárido):

Grupo 1 y 2: 20 minutos de inhalación de LPS (E.coli serotipo 055:B5; 1 mg/ml en PBS) usando un nebulizador continuo MiniHeart Hi-Flo (Westmed)

Grupo 3: No hubo exposición a LPS

4 horas después de la exposición a LPS, se preparó un lavado broncoalveolar usando 2x1 ml de solución salina de Hank por animal, a partir de todos los animales, y la cantidad de células en el fluido de lavado se determinó usando un Sysmex XT-1800i. Las células en el fluido de lavado se separaron mediante centrifugación y se lisaron en amortiguador de lisis (100 mM de TRIS pH 7,5, NaCl 1 M, 0,2 % de NP40).

Medición de elastasa neutrófila (NE):

La actividad de NE (elastasa neutrófila) en el lisado celular de BALF (fluido de lavado broncoalveolar) se midió y usando el sustrato de NE fluorescente MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (Bachem): 10 µl de lisado celular se mezclaron con 5 µl de amortiguador de ensayo (20 mM de Tris pH 7,5, 100 mM de NaCl, 0,1% de albúmina de suero humano) y 5 µl de sustrato (1 mM en amortiguador de ensayo) en una placa de 384 cavidades (Optiplate 384f, PerkinElmer). La mezcla de reacción se incubó durante 60 min a temperatura ambiente y la fluorescencia se midió (360 nm de excitación, 460 nm de emisión). Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron a la cantidad de neutrófilos de BALF para cada animal. Para calcular la inhibición de la actividad de NE por los compuestos de prueba, el valor de fluorescencia medio del grupo 3 se sustrajo de los valores de fluorescencia de los grupos 1 y 2, y el % de inhibición de la actividad de NE en el grupo 1 se comparó con el valor de fluorescencia medio del grupo 2 calculado.

La actividad de elastasa neutrófila en el lisado de BALF después del pretratamiento con inhibidores de catepsina C (7d administración bid (dos veces por día)) se detallan

en la tabla siguiente:

**Tabla 12**

| Ejemplo | Inhibición de la actividad de elastasa neutrófila en lisado de BALF después del pretratamiento con inhibidores de catepsina C (dosificación: 0,5 mg/kg bid durante 7 días) |
|---|---|
| 1 | 96 |
| 25 | 94 |

**ESTRUCTURAS CRISTALINAS DE COMPLEJOS DE LIGANDO DE CATEPSINA C**

**MÉTODOS**

Proteína:

Se produjo catepsina C (Cat C) recombinante humana de acuerdo con los protocolos biológicos moleculares estándares (**Literatura: 1 - 3**).

Cristalización e impregnación:

Antes de la cristalización el amortiguador de proteínas se intercambió con 20 mM de Bis-Tris pH 7,0, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 2 mM de DTT con una columna NAP10 (GE Healthcare). La muestra de proteína se concentró a 9-10 mg/ml. Los cristales se cultivaron a 20 °C en gotas colgantes usando 1,0 µl de proteína y 1,0 µl de solución de cavidad (0,1 M de Bis-Tris-Propano pH 6,0-6,5, 18-20 % (p/v) de PEG 3350, 200 mM de NaF, 1 mM de DDT). Los cristales aparecieron durante la noche y crecieron hasta alcanzar su tamaño completo dentro de 2-3 días. Las coestructuras de ligando se obtuvieron mediante impregnación de los cristales apo en la solución de cavidad enriquecida con 1 mM del respectivo ligando (mediante dilución de 100 mM de solución de reserva en DMSO) durante la noche. Luego, los cristales se congelaron en nitrógeno líquido antes de la recolección de datos usando 20 % de glicerol y solución de cavidad como crioprotector.

Recolección de datos, resolución y refinamiento de estructura:

Todos los datos de difracción se recolectaron a 100 K en un generador ánodo rotatorio (Rigaku) usando radiación CuKα y se procesaron con XDS (**Literatura: 4**). Las coestructuras de ligando se resolvieron mediante diferencia del método Fourier y se refinaron con el programa autoBuster (Global Phasing Ltd.) reiterado con reconstrucción manual mediante el programa coot (**Literatura: 5**). El procesamiento de

datos y estadísticas de refinamiento finales se enumeran en la **Tabla 13**. Se usó el programa PyMOL (DeLano Scientific LLC) para la preparación de figuras.

## RESULTADOS

Estructura de complejos de ligando de catepsina C:

La estructura de la catepsina C (Cat C) humana se describe en la literatura (**Literatura 2**) como un tetrámero que contiene cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad comprende tres cadenas: cadenas livianas y pesadas forman el dominio catalítico, mientras que el denominado dominio de exclusión bloquea la hendidura de sitio activo más allá del bolsillo S2 y es responsable por la actividad de exopeptidasa de Cat C. Las estructuras de Cat C en complejos con los Ejemplos 11 y 16 (**Tabla 14, Figura 1**) se determinaron para elucidar el modo de fijación de esta clase de compuestos. Los Ejemplos 11 y 16 se fijaron a través de una interacción covalente del grupo nitrilo con Cys234. El Ejemplo 11 era un enantiómero único con el átomo de carbono adyacente al grupo nitrilo en la configuración (S), mientras que el Ejemplo 16 (átomo de carbono espirocíclico que tiene esteroquímica *RS*) era una mezcla de diastereómeros. El aminoácido bicíclico alcanzó el bolsillo S1 de la enzima en donde se unió a través de puentes de hidrógeno a los átomos de la estructura de Gly277 y Asn380, así como también a la cadena lateral de Asp1. El sistema bis-arilo se orientó hacia el bolsillo S2, en donde participó en interacciones van der Waals con los residuos Asp1 y Pro3 del dominio de exclusión. De manera sorprendente, se observó una interacción adicional de la amina espirocíclica: espiro-azetidina en el Ejemplo 11 y espiro-pirrolidina en el Ejemplo 16. En ambos casos, el átomo de nitrógeno básico formó un puente de sal con Glu275 que fue consistente con la alta actividad de la enzima de esta clase de compuesto.

**Referencias:**

(1) Søren W. Dahl, Torben Halkier, Conni Lauritzen, Iztok Dolenc, John Pedersen, Vito Turk y Boris Turk. (2001) Human Recombinant Pro-dipeptidyl Peptidase I (Cathepsin C) Can Be Activated by Cathepsins L and S but Not by Autocatalytic Processing. *Biochemistry* **40**, 1671-1678.

(2) Dusan Turk, Vojko Janjic, Igor Stern, Marjetka Podobnik, Doriano Lamba, Sùren Weis Dahl, Connie Lauritzen, John Pedersen, Vito Turk and Boris Turk (2001) Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine

proteases. *The EMBO Journal* **20**, 6570-6582.

(3) Furber, M. et al. (2014) Cathepsin C Inhibitors: Property Optimization and Identification of a Clinical Candidate. *J. Med. Chem.*, **57**,2357–2367.

(4) Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132.

(5) Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132.

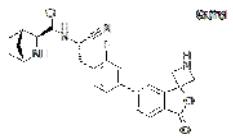
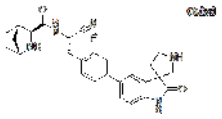
**Tabla 13. Recolección de datos y estadísticas de refinamiento**

| **Recolección de datos** [1] | | |
|---|---|---|
| Conjunto de datos | Ejemplo 11 | Ejemplo 16 |
| Detector | Saturn944 | Mar345 |
| Grupo espacial | I222 | I222 |
| Dimensiones de celda unitaria | | |
| a, b, c (Å) | 86,0, 89,3, 114,6 | 86,5, 88,7, 114,5 |
| Resolución (Å) | 1,7 | 1,5 |
| Compleción (%) | 81,0 (9,1) | 93,3 (43,5) |
| $R_{sym}$ (%) | 4,2 (31,6) | 3,5 (28,0) |
| $< I/\sigma(I) >$ | 32,1 (2,9) | 32,5 (4,7) |
| **Refinamiento** [2] | | |
| R-factor / R-libre (%) | 17,8/19,2 | 21,3/21,7 |
| Longitud de enlace para Rmsd (Å) | 0,008 | 0,008 |
| Ángulos de enlace para Rmsd (°) | 0. 90 | 0,93 |

[1] Los valores entre paréntesis pertenecen a la resolución superficial más alta; $R_{sym} = \Sigma_{hkl}\Sigma_i \left| I_i - \langle I \rangle \right| / \Sigma_{hkl}\Sigma_i I_i$

[2] R-factor = $\Sigma hkl \left| \left| Fobs \right| - k \left| Fcalc \right| \right| / \Sigma hkl \left| Fobs \right|$; R-libre se calculó usando 5 % de los datos excluidos del refinamiento; Rmsd, desviación de raíz media cuadrática.

**Tabla 14. Compuestos analizados por cristalografía de rayos X**

| Compuesto | Ejemplo 11 | Ejemplo 16 |
|---|---|---|
| Estructura |  |  |
| estereoisómero | Diastereómero único | Mezcla de diastereómeros |
| CatC $IC_{50}$ (nM) | 0,7 | 0,5 |

## COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las preparaciones adecuadas para la administración de los compuestos de la Fórmula I serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio e incluirán, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, pastillas, tabletas, soluciones, jarabes, elíxires, sachets, productos inyectables, productos inhalables y polvos, etc., preferentemente, comprimidos.

Los comprimidos adecuados se pueden obtener, por ejemplo, mezclando uno o más compuestos de acuerdo con la Fórmula I con excipientes conocidos, por ejemplo, diluyentes inertes, portadores, desintegrantes, adyuvantes, tensioactivos, aglutinantes y/o lubricantes. Los comprimidos también pueden comprender varias capas.

## COMBINACIONES

Los compuestos de la Fórmula general **I** se pueden usar solos o en combinación con otras sustancias activas de la Fórmula **I** de acuerdo con la invención. Los compuestos de la Fórmula general **I** también se pueden combinar, opcionalmente, con otras sustancias farmacológicamente activas. Estas incluyen, agonistas del receptor adrenérgico ß2 (acción prolongada y corta), anticolinérgicos (acción prolongada y corta), esteroides antiinflamatorios (corticoesteroides orales y tópicos), cromoglicato, metilxantina, miméticos de glucocorticoides disociados, inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4, inhibidores de PDE7, antagonistas de LTD4, inhibidores de EGFR, agonistas de dopamina, antagonistas de PAF, derivados de Lipoxina A4, moduladores de FPRL1, antagonistas (BLT1, BLT2) del receptor de LTB4, antagonistas del receptor de histamina H1, antagonistas del receptor de histamina H4, antagonistas del receptor de histamina dual H1/H3, inhibidores de PI3-quinasa, inhibidores de tirosina quinasas no receptoras, por ejemplo, LYN, LCK, SYK, ZAP-70, FYN, BTK o ITK, inhibidores de quinasas MAP, por ejemplo, p38, ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3 o SAP, inhibidores de vía de señalización de NF-κB, por ejemplo, inhibidores de quinasa IKK2, inhibidores de iNOS, inhibidores de MRP4, inhibidores de la biosíntesis de leucotrieno, por ejemplo, inhibidores de 5-lipoxigenasa (5-LO), inhibidores de cPLA2, inhibidores de Leucotrieno A4 hidrolasa o inhibidores de FLAP, agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), antagonistas de CRTH2, moduladores del receptor de DP1, antagonistas del receptor de tromboxano, antagonistas de CCR3, antagonistas de $CCR^4$, antagonistas de CCR1, antagonistas de CCR5, antagonistas de CCR6, antagonistas de CCR7, antagonistas de CCR8, antagonistas de CCR9, antagonistas de CCR30, antagonistas de $CXCR^3$, antagonistas

de $CXCR^4$, antagonistas de $CXCR^2$, antagonistas de $CXCR^1$, antagonistas de CXCR5, antagonistas de CXCR6, antagonistas de $CX3CR^3$, antagonistas de neuroquinina (NK1, NK2), moduladores del receptor de esfingosina 1-fosfato, inhibidores de esfingosina-1-fosfato liasa, moduladores del receptor de adenosina, por ejemplo, agonistas de A2a, moduladores de receptores purinérgicos, por ejemplo, inhibidores de P2X7, activadores de histona deacetilasas (HDAC), antagonistas de bradicinina (BK1, BK2), inhibidores de TACE, moduladores de PPAR-gama, inhibidores de Rho-quinasa, inhibidores de enzima que convierte la interleucina 1-beta (ICE), moduladores de receptores tipo Toll (TLR), inhibidores de la HMG-CoA reductasa, antagonistas de VLA-4, inhibidores de ICAM-1, agonistas de SHIP, antagonistas del receptor de GABAa, inhibidores de ENaC, inhibidores de prostasin, inhibidores de matriptasa, moduladores del receptor de melanocortina (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R), antagonistas de CGRP, antagonistas de endotelina, antagonistas de TNF□, anticuerpos anti-TNF, anticuerpos anti-GM-CSF, anticuerpos anti-CD46, anticuerpos anti-IL-1, anticuerpos anti-IL-2, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-5, anticuerpos anti-IL-13, anticuerpos anti-IL-4/IL-13, anticuerpos anti-TSLP, anticuerpos anti-OX40, agentes mucorregulatores, agentes inmunoterapéuticos, compuestos para tratar la inflamación de las vías respiratorias, compuestos para tratar la tos, inhibidores de VEGF, inhibidores de NE, inhibidores de MMP9, inhibidores de MMP12, también combinaciones de dos o tres sustancias activas.

Se prefieren betamiméticos, anticolinérgicos, corticoesteroides, inhibidores de PDE4, antagonistas de LTD4, inhibidores de EGFR, inhibidores de CRTH2, inhibidores de 5-LO,antagonistas del receptor de histamina e inhibidores de SYK, inhibidores de NE, inhibidores de MMP9, inhibidores de MMP12, pero también combinaciones de dos o tres sustancias activas, es decir:

- Betamiméticos con corticoesteroides, inhibidores de PDE4, inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4,
- Anticolinérgicos con betamiméticos, corticoesteroides, inhibidores de PDE4, inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4,
- Corticoesteroides con inhibidores de PDE4, inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4
- Inhibidores de PDE4 con inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4
- Inhibidores de CRTH2 con antagonistas de LTD4.

**INDICACIONES**

Los compuestos de la invención, y sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, tiene actividad como farmacéuticos, en particular como inhibidores de la actividad de dipeptidil peptidasa I y, por lo tanto, se pueden usar para el tratamiento de:

1. vías respiratorias: enfermedades obstructivas de las vías respiratorias que incluyen: asma, que incluye asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por fármaco (que incluye asma inducida por aspirina y NSAID) y asma inducida por polvo, que incluye intermitente y persistente y de todas las intensidades, y otras causas de hiperreactividad de las vías aéreas; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); bronquitis, que incluye bronquitis infecciosa y eosinofílica; enfisema; deficiencia de alfa1-antitripsina; bronquiectasia; fibrosis quística; sarcoidosis; pulmón de granjero y enfermedades relacionadas; neumonitis por hipersensibilidad; fibrosis pulmonar, que incluye alveolitis fibrosante criptogénica, neumonia intersticial idiopática, fibrosis que complica tratamiento antineoplásico e infección crónica, que incluye tuberculosis y aspergilosis y otras infecciones micóticas; complicaciones de trasplante pulmonar; trastornos trombóticos y vasculares de la vasculatura pulmonar, poliangiitis (granulomatosis de Wegener) e hipertensión pulmonar; actividad antitusiva que incluye el tratamiento de tos crónica asociada a trastornos inflamatorios y de secreción de las vías respiratorias, y tos iatrogénica; rinitis aguda y crónica que incluye rinitis medicamentosa, y rinitis vasomotora; rinitis alérgica estacional y perenne que incluye rinitis nerviosa (rinitis polínica); poliposis nasal; infección viral aguda que incluye resfrío común, e infección causada por virus respiratorio sincicial, influenza, coronavirus (que incluye SARS) y adenovirus;

2. piel: psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto y otras dermatitis eccematosa y reacciones de hipersensibilidad demorada; fito y fotodermatitis; dermatitis seborreica, dermatitis herpetiforme, liquen plano, liquen escleroso y atrófico, pioderma gangrenoso, sarcoidosis cutánea, lupus eritematoso discoide, pénfigo, penfigoide, epidermolisis ampollosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritema tóxico, eosinofilia cutánea, alopecia areata, calvicie de patrón masculino, síndrome de Sweet, síndrome de Weber-Christian, eritema multiforme; celulitis, infecciosa y no infecciosa; paniculitis; linfoma cutáneo, cáncer de piel no melanoma y otras lesiones displásicas; trastornos inducidos por fármacos que incluyen erupción fija por fármacos;

3. ojos: blefaritis; conjuntivitis, que incluye conjuntivitis alérgica perenne y vernal; iritis; uveítis anterior y posterior; coroiditis; trastornos autoinmunitarios, degenerativos o

inflamatorios que afectan la retina; oftalmía, que incluye oftalmía simpática; sarcoidosis; infecciones que incluye virales, micóticas y bacteriales;

4. genitourinaria: nefritis, que incluye intersticial y glomerulonefritis; síndrome nefrótico; cistitis, que incluye cistitis aguda y crónica (intersticial) y úlcera de Hunner; uretritis aguda y crónica, prostatitis, epididimitis, ooforitis y salpingitis; vulvovaginitis; enfermedad de Peyronie; disfunción eréctil (en hombres y mujeres);-

5. rechazo a aloinjerto: agudo y crónico después de, por ejemplo, trasplante de riñón, corazón, hígado, pulmón, médula espinal, piel, córnea o después de transfusión sanguínea; o enfermedad de injerto contra huésped crónica.

6. Otros trastornos autoinmunes y alérgicos que incluye artritis reumatoide, síndrome del intestino irritable, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, diabetes mellitus, púrpura trombocitopénica idiopática, fascitis eosinofíilica, síndrome de hiper-IgE, síndrome de antifosfolipídicos y síndrome de Sazary;

7. oncología: tratamiento de tipos de cáncer comunes, que incluye próstata, mamas, pulmón, ovarios, pancreático, intestino y colon, estómago, tumores de piel y cerebro y neoplasias malignas que afectan la médula espinal (que incluye leucemias) y sistemas linfoproliferativos, tales como linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; que incluye prevención y tratamiento de enfermedades metastásicas y recidiva tumoral, y síndromes paraneoplásicos; y,

8. enfermedades infeccionas: enfermedades virósicas, tales como verrugas genitales, verrugas comunes, verrugas plantares, hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes simple, molusco contagioso, viruela, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus del papiloma humano (HPV), citomegalovirus (CMV), virus varicela-zóster (VZV), rhinovirus, adenovirus, coronavirus, influenza, parainfluenza; enfermedades bacteriales, tales como tuberculosis y mycobacterium avium, lepra; otras enfermedades infecciosas, tales como enfermedades fúngicas, clamidia, Candida, aspergillus, meningitis criptocócica, Pneumocystis carnii, criptosporidiosis, histoplasmosis, toxoplasmosis, infección por trypanosoma y leishmaniasis.

9. dolor: Datos informados en la literatura reciente de ratones con deficiencia de catepsina C señalan una función moduladora de catepsina C en la sensación de dolor.- En consecuencia, inhibidores de catepsina C también pueden ser útiles en el ámbito clínico de diversidad de formas de dolor crónico, por ejemplo, dolor inflamatorio neuropático.

Para el tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas anteriormente, por lo

general, una dosis terapéuticamente eficaz estará en el rango de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por dosis de un compuesto de la invención; preferentemente, de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal por dosis.- Por ejemplo, para la administración a una persona de 70 kg, el rango de dosis sería de alrededor de 0,7 mg a alrededor de 7000 mg por dosis de un compuesto de la invención, preferentemente de alrededor de 7,0 mg a alrededor de 1400 mg por dosis. Es posible que se necesite cierto grado de optimización de la dosis de rutina para determinar un patrón y un nivel de dosificación óptimos. El ingrediente activo se puede administrar de 1 a 6 veces por día.

La cantidad farmacéuticamente eficaz o dosis terapéutica real dependerá, por supuesto, de factores conocidos por los expertos en el arte, tales como la edad y el peso del paciente, la vía de administración y la gravedad de la enfermedad. En cualquier caso, el ingrediente activo se administrará en dosis y de una manera que permita el suministro de una cantidad farmacéuticamente eficaz según la afección particular del paciente.