

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 012**

51 Int. Cl.:

C07D 405/14 (2006.01)

C07D 403/14 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2020** **PCT/CN2020/098222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2020** **WO20259620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2020** **E 20830755 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3988098**

54 Título: **Compuestos heterocicloalquilílicos usados como antagonistas de CCR2/CCR5**

30 Prioridad:

24.06.2019 CN 201910554176

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2025

73 Titular/es:

WUXI LIFE FOUNTAIN BIOTECH CO., LTD.
(100.00%)

**Room 504, Building C1, No. 201 Linghu Avenue,
Xinwu District
Wuxi City, CN**

72 Inventor/es:

**LUO, YUNFU;
BA, YUYONG;
CHEN, YANHE y
CHEN, SHUHUI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 995 012 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos heterocicloalquilílicos usados como antagonistas de CCR2/CCR5

Referencias cruzadas de las solicitudes relacionadas

5 La solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de invención china nº CN201910554176.4, presentada ante la Oficina Nacional de la Propiedad Intelectual de China el 24 de junio de 2019.

Campo técnico

10 La invención se refiere a una serie de compuestos con grupos heterocicloalquilo, o sus isómeros o sales farmacéuticamente aceptables, y a sus aplicaciones en la fabricación de fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con antagonistas de CCR2/CCR5, específicamente a un compuesto de fórmula (I) o a sus isómeros o sales farmacéuticamente aceptables.

Antecedentes

15 Las quimiocinas son una pequeña familia secretada de citocinas proinflamatorias que actúan como quimioinductores de los leucocitos. Facilitan el transporte de los leucocitos desde el lecho vascular hasta los tejidos circundantes, respondiendo a las señales inflamatorias. La quimiotaxis comienza con la unión de las quimiocinas a sus receptores (GPCR), que desencadenan un aumento del flujo de calcio, la inhibición de la producción de monofosfato de adenosina cíclico, el reordenamiento del citoesqueleto, la activación de integrinas y la activación de las vías de señalización de la motilidad celular, al tiempo que aumentan la expresión de proteínas de adhesión.

20 Los quimioinductores (es decir, las quimiocinas) son proteínas relativamente pequeñas (8-10 kD) que estimulan la migración celular. Según el número de residuos aminoácidos entre la primera y la segunda cisteína altamente conservadas, la familia de las quimiocinas se clasifica en cuatro subfamilias. La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) es un miembro de la subfamilia de quimiocinas CC (donde CC representa una subfamilia con primeras y segundas cisteínas adyacentes) que se une al receptor de quimiocinas 2 de la superficie celular (CCR2). MCP-1 es una potente quimiocina que media la migración de monocitos y linfocitos a sitios inflamados después de unirse a CCR2 (es decir, quimiotaxis). MCP-1 también es expresada mediante los cardiomiocitos, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos, los condrocitos, las células musculares lisas, las células glomerulares, las células alveolares, los linfocitos T y el cáncer de esófago. Al entrar en el tejido inflamatorio, los monocitos se diferencian en macrófagos que expresan CCR5, proporcionando una fuente secundaria de una variedad de reguladores proinflamatorios, incluidos el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-1 (IL-1), la IL-8 (una subfamilia de quimiocinas CXC, donde CXC representa un residuo aminoácido entre la primera y la segunda cisteína), IL-12, 30 metabolitos del ácido araquidónico (p. ej., PGE2 y LTB4), radicales libres derivados del oxígeno, metaloproteinasas de matriz y componentes del complemento.

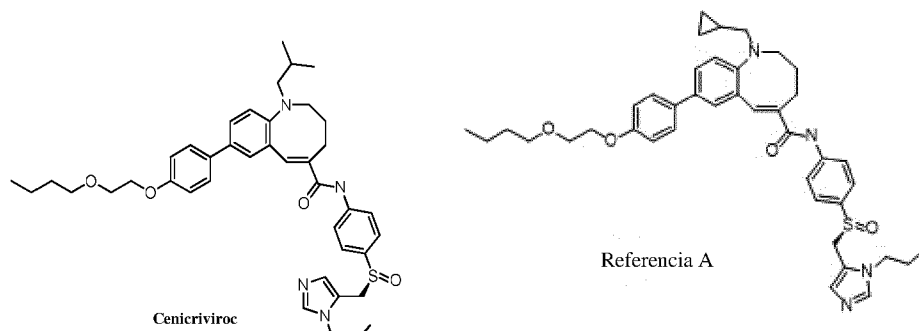
35 CCR2 (también conocido como CKR-2, MCP-1RA o MCIRB) se expresa predominantemente en monocitos y macrófagos y es esencial para los procesos inflamatorios dependientes de macrófagos. CCR2 es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) que se une a varios miembros de la familia MCP (por ejemplo, CCL2, CCL7, CCL8, etcétera) con alta afinidad y desencadena una señal de quimiotaxis, lo que conduce a la migración dirigida al receptor. Los modelos animales de enfermedades inflamatorias crónicas han probado que los antagonistas inhiben la respuesta inflamatoria al inhibir la unión de MCP-1 y CCR2.

40 CCR5 es un receptor acoplado a proteína G que se une a una variedad de ligandos de quimiocinas CC, incluidos CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11 y CCL13. En comparación con CCR2, la función de CCR5 in vivo es menos clara. Comparado con CCR2, CCR5 se expresa predominantemente en células Th1 activadas y macrófagos tisulares diferenciados de los monocitos sanguíneos, que concomitantemente regulan a la baja la expresión de CCR2. Se ha mostrado que CCR5 contribuye a la supervivencia de los macrófagos durante la inflamación y la infección, y también juega un papel en la retención de los macrófagos en los tejidos inflamatorios. Además, CCR5 media el reclutamiento y la activación de las células Th1 en la inflamación. CCR5 también se expresa en osteoclastos y es 45 esencial para la formación de osteoclastos, lo que indica la contribución de CCR5 en el proceso patológico de la artritis reumatoide. La activación de las células lisas vasculares en la que está implicada CCL4/CCR5 también puede facilitar la aterosclerosis y la patología de la AIH (hiperplasia intimal acelerada).

50 La distribución celular complementaria y las diferentes funciones celulares de CCR2 y CCR5 proporcionan que la doble diana de estos dos receptores pueda tener una mayor eficacia que la diana de un solo receptor. En la biología de monocitos/macrófagos, CCR2 desempeña un papel importante en la mediación de la migración de los monocitos de la médula ósea a la sangre y desde la sangre a los tejidos, donde CCR5 regula principalmente la activación, el reconocimiento y la posible retención de los macrófagos en los tejidos inflamatorios. Además, el bloqueo de CCR5, además de sus efectos sobre monocitos/macrófagos, puede mejorar el potencial tratamiento de los antagonistas duales al inhibir las respuestas de las células T. Sobre la base de las ventajas de la doble diana de CCR2 y CCR5, 55 también se han estudiado en profundidad los antagonistas de CCR2/CCR5, y hay cuatro fármacos que han entrado en la etapa clínica, por ejemplo, Cenriciviroc de Tobira, BMS-813160 de Bristol-Myers Squibb y PF-04634817 de Pfizer. Por lo tanto, los antagonistas de CCR2/CCR5 tienen un buen potencial en el desarrollo de fármacos. En el presente

documento, los inventores reivindican el derecho a la protección por patente de compuestos heterocicloalquilados como antagonistas de CCR2/CCR5.

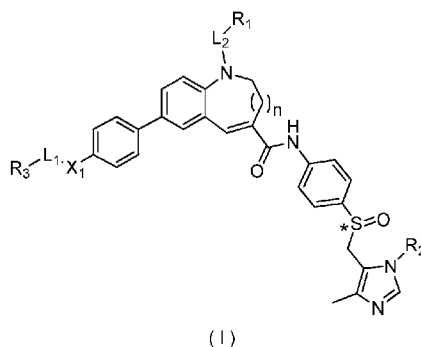
El documento WO2003014105A1 reporta un compuesto, Cenicriviroc (CVC), y la Referencia A y las estructuras se muestran a continuación.



5

Sumario

La invención proporciona un compuesto según la ecuación (I), o un isómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



10 en donde,

n se selecciona del grupo que consiste en 1, 2 y 3;

R₁ es un heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_a;

R₂ es un alquilo C₁₋₆, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_b;

R₃ es un alcoxi C₁₋₆, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_c;

15 X₁ es selecciona del grupo que consiste en O, S y -NH-;

L₁ es -(CRR)_m-;

L₂ es -CRR-;

m se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3 y 4;

cada R_a, R_b y R_c se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, NH₂, CN y CH₃;

20 cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, NH₂, CN y CH;

el heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros comprende 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos o grupos heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en -NH-, -O-S- y N; en donde su isómero es un isómero geométrico o estereoisómero; y

25 el átomo de azufre con "*" es un átomo de azufre quiral que está presente como un solo enantiómero (R) o (S) o enriquecido en uno de los enantiómeros.

En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ es un grupo alquilo C₁₋₃ que puede estar sustituido por 1, 2 ó 3

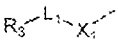
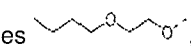
R_b, y las otras variables están definidas en la presente invención.

En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ es CH₂CH₃ y las otras variables están definidas en la presente invención.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, R₃ es un grupo alcoxi C₄₋₆ que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_c, y otras variables están definidas en la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, R₃ está definido por  y otras variables se definen en la presente invención.

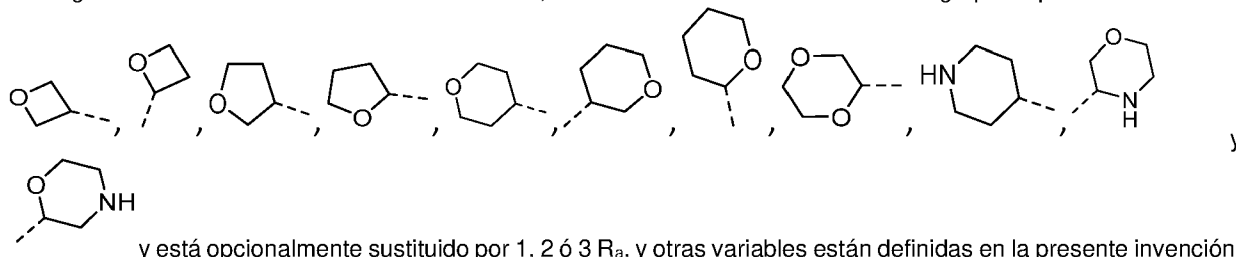
En algunas realizaciones de la invención, L₁ es -CH₂CH₂-, y otras variables están definidas en la presente invención.

10 En algunas realizaciones de la invención, la unidad estructural  es , y otras variables están definidas en la presente invención.

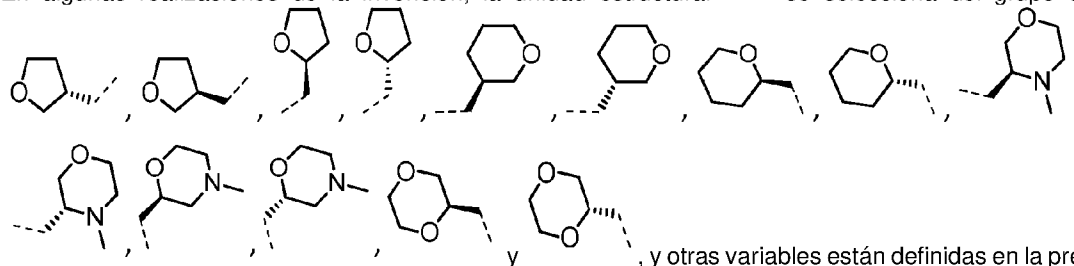
En algunas realizaciones de la invención, L₂ es -CH₂-, y otras variables están definidas en la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, R₁ se selecciona de un grupo que consiste en oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydropirranilo, hexapiridilo, morfolinilo y dioxanilo, que están opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_a y otras variables están definidas en la presente invención.

15 En algunas realizaciones de la invención, R₁ se selecciona de un grupo que consiste en

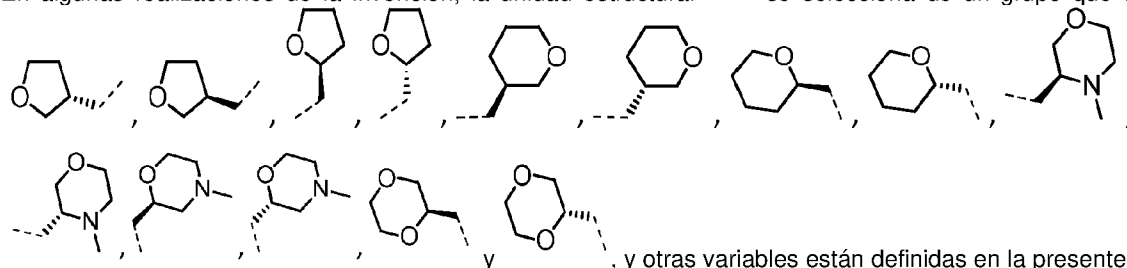


En algunas realizaciones de la invención, la unidad estructural  se selecciona del grupo que consiste en

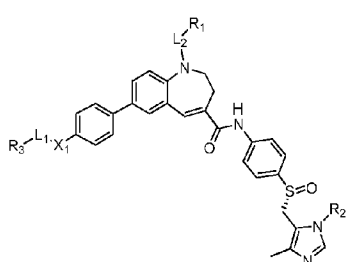


20 y otras variables están definidas en la presente invención.

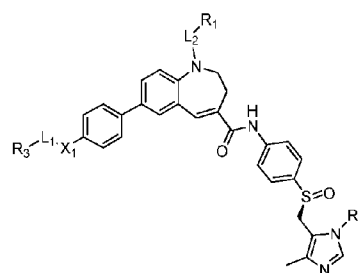
En algunas realizaciones de la invención, la unidad estructural  se selecciona de un grupo que consiste en



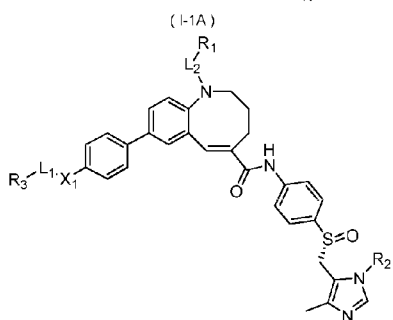
25 En algunas realizaciones de la presente invención, el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en



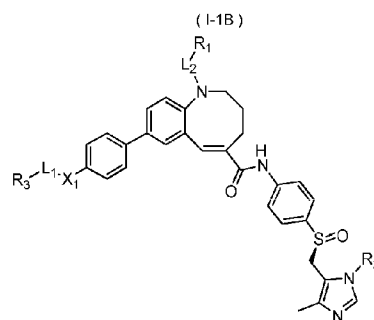
(I-1A)



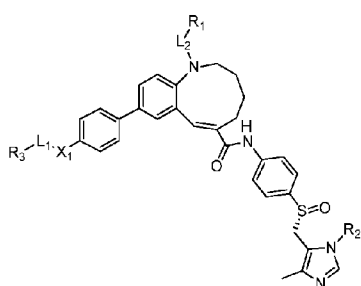
(I-1B)



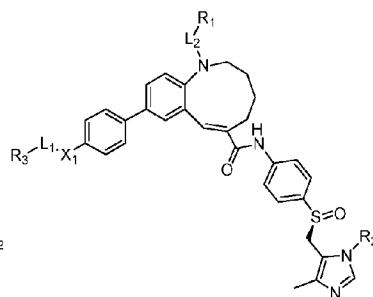
(I-2A)



(I-2B)



(I-3A)

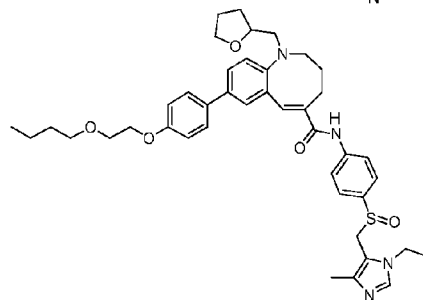
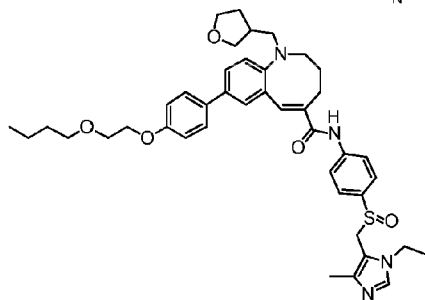
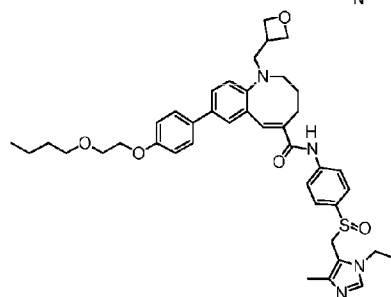
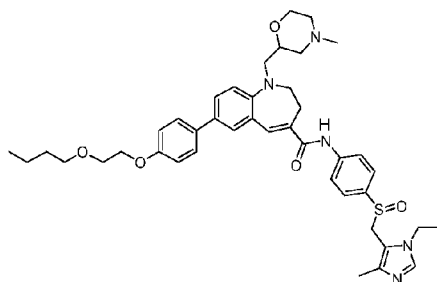
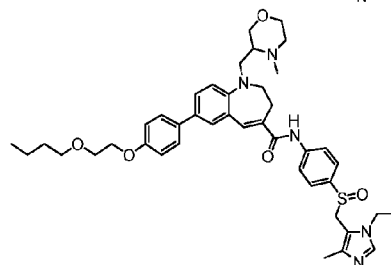
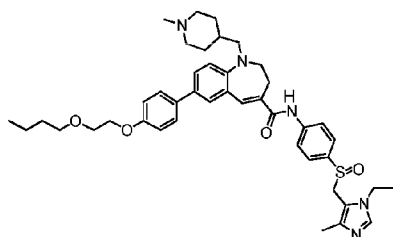
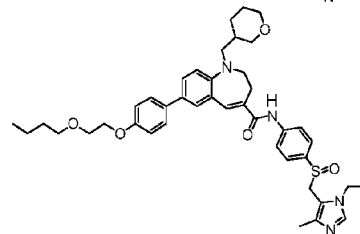
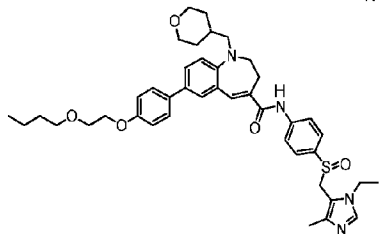
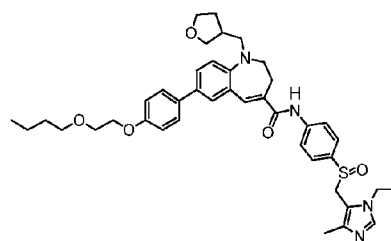
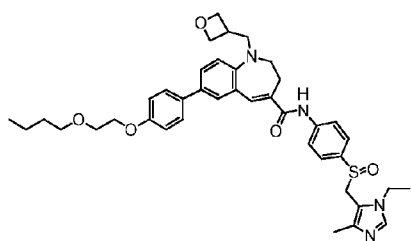


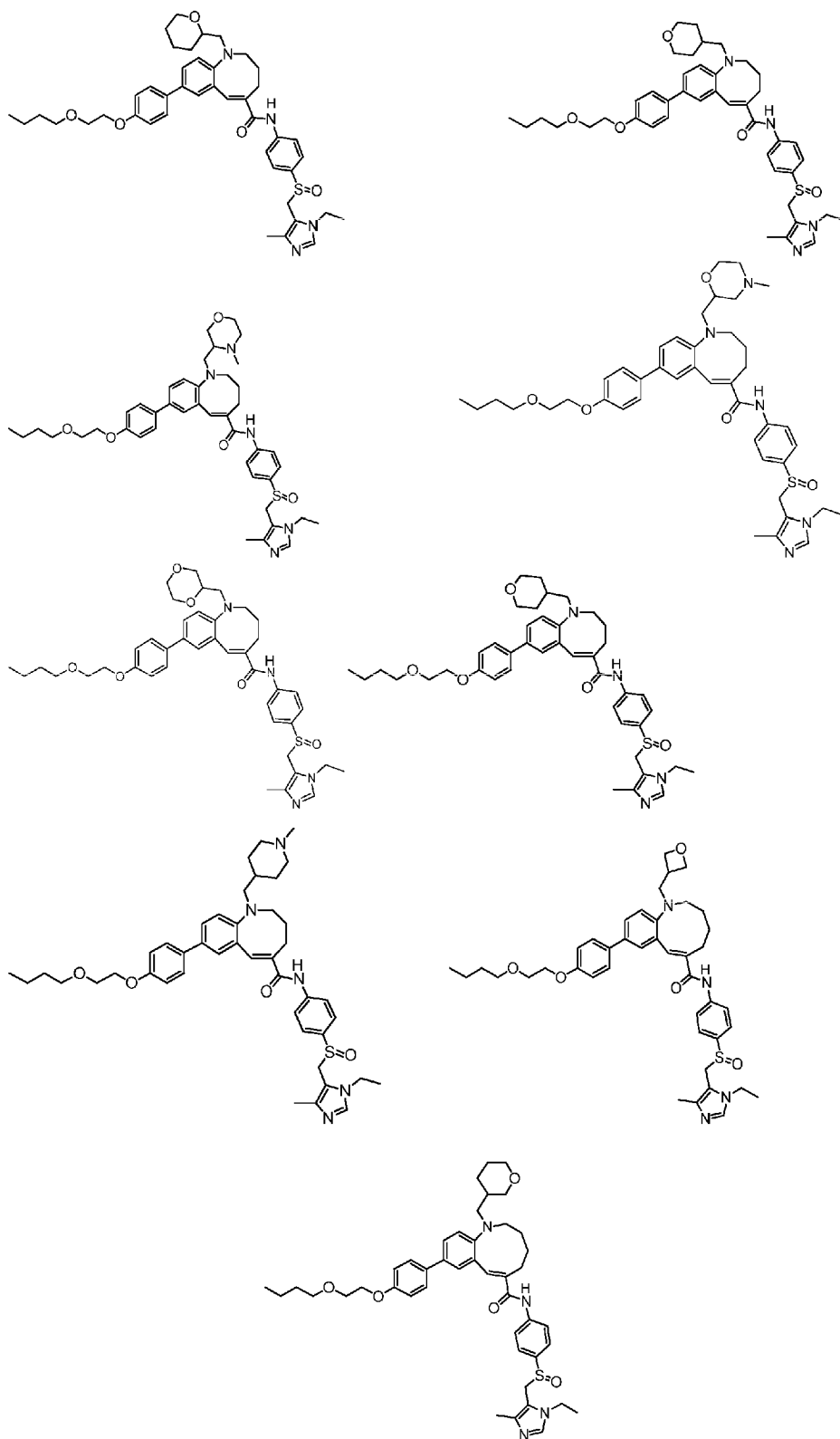
(I-3B)

en donde, R₁, R₂, R₃, X₁, L₁, L₂ están definidos en la presente invención.

Algunas de las realizaciones de la invención son cualquier combinación de las variables anteriores.

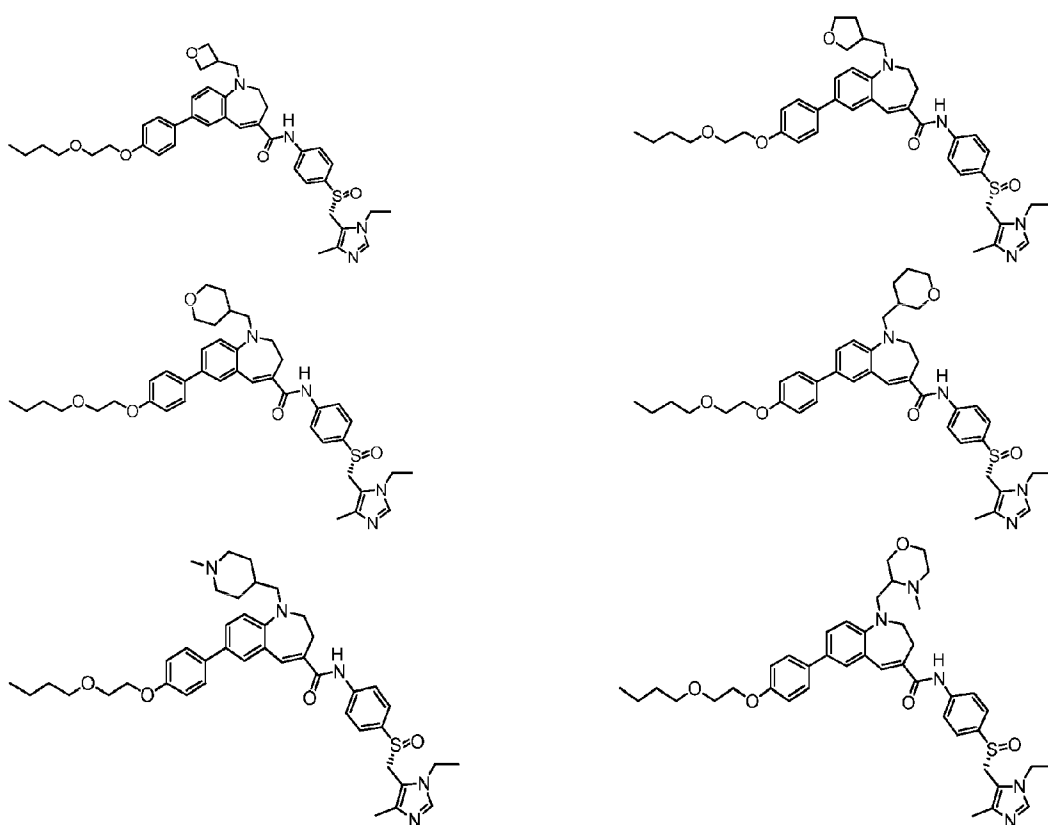
La invención también proporciona un compuesto de la siguiente fórmula, o un isómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo

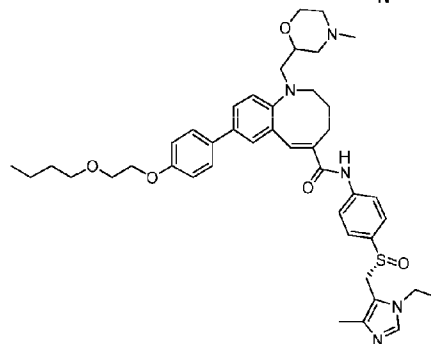
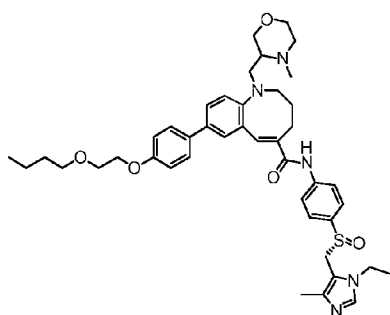
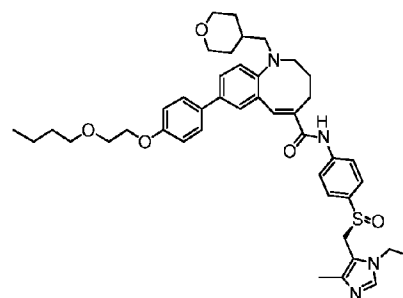
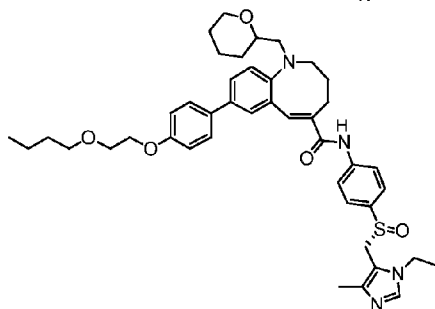
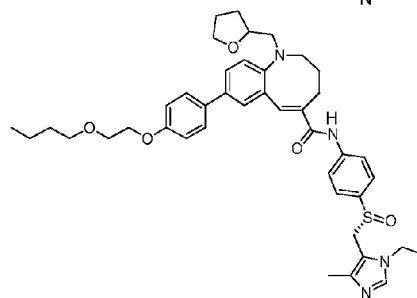
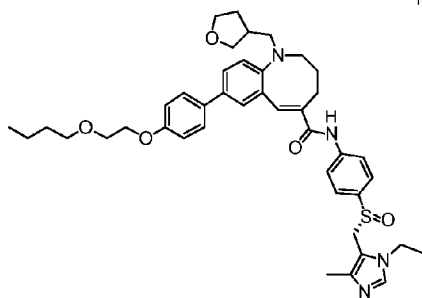
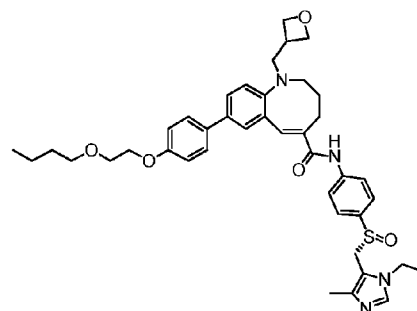
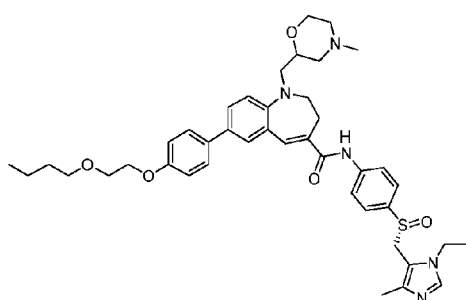


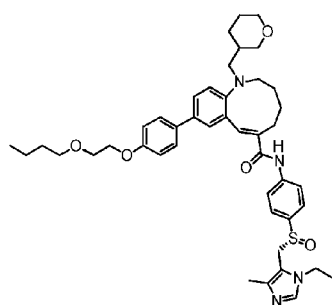
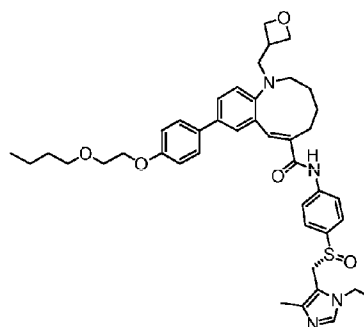
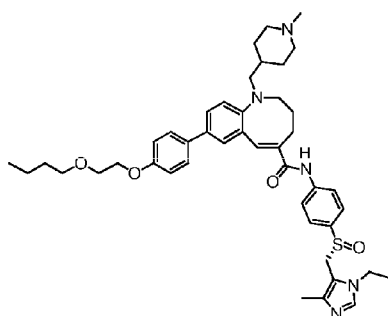
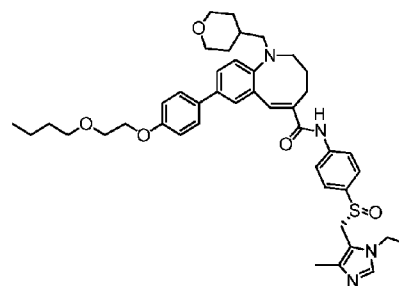
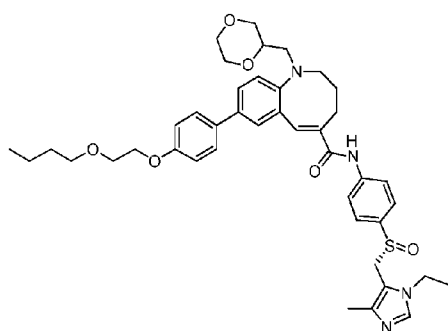


0

En algunas realizaciones de la invención, el compuesto, o sus isómeros o sales farmacéuticamente aceptables, se selecciona de un grupo que consiste en

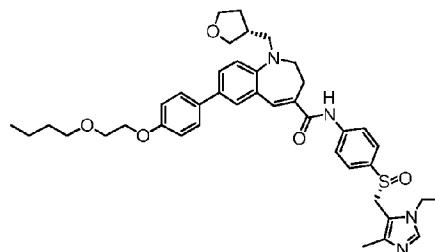
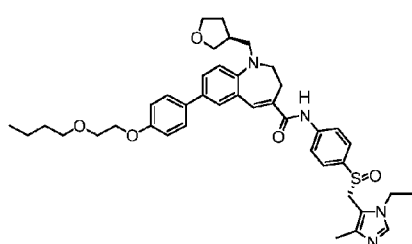


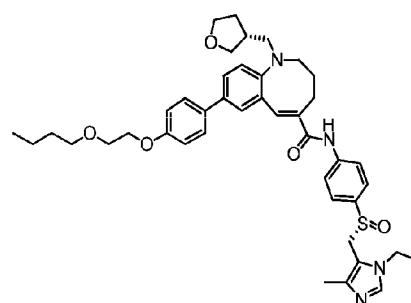
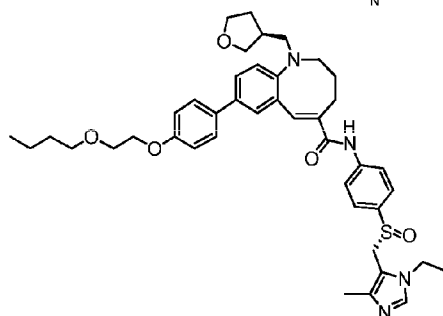
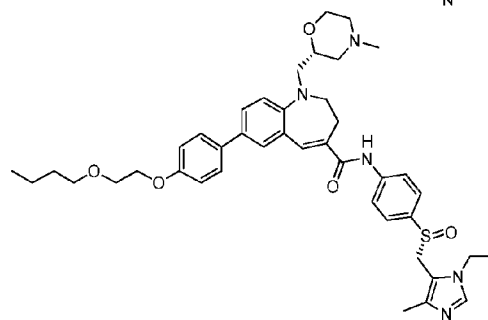
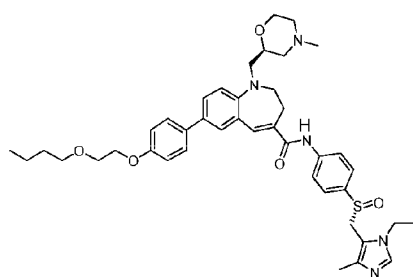
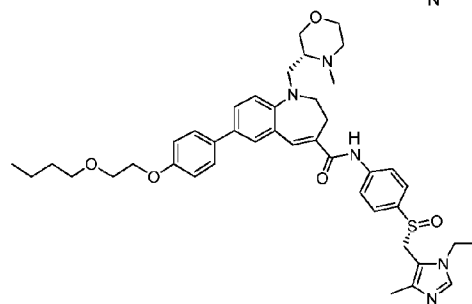
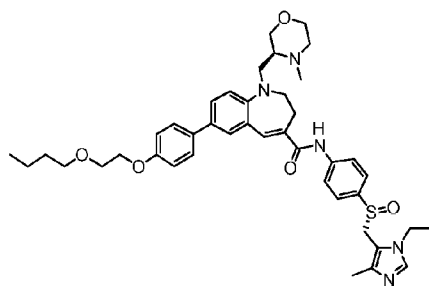
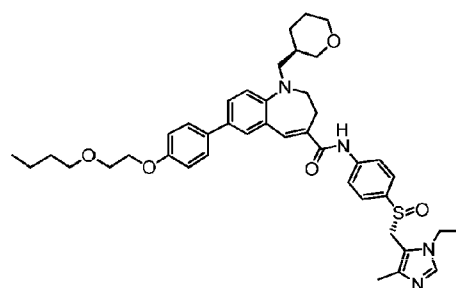
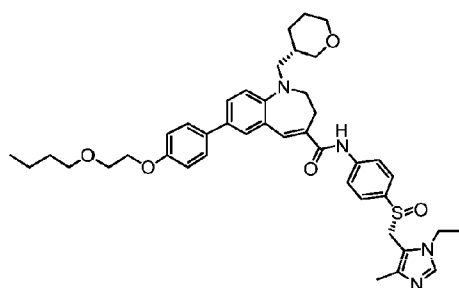


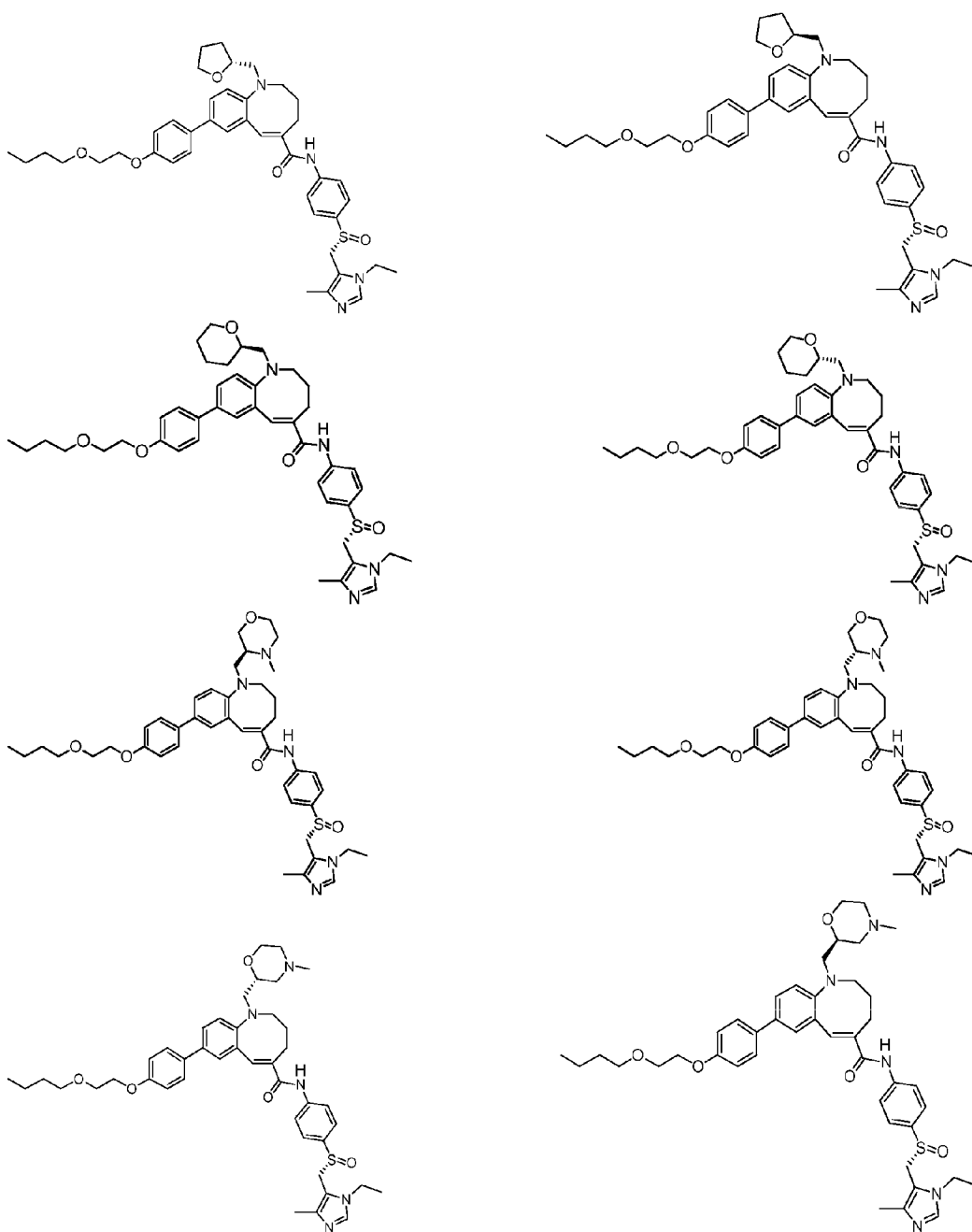


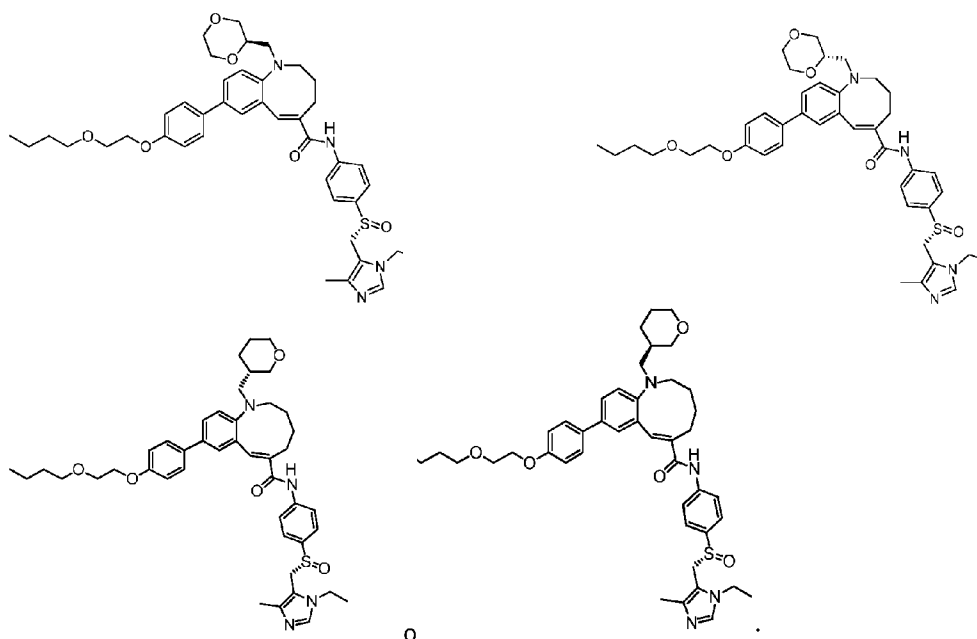
0

En algunas realizaciones de la invención, el compuesto, o sus isómeros, o sales farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en









La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable como ingrediente activo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 La invención también proporciona un compuesto o un isómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con antagonistas de CCR2/CCR5.

La invención también proporciona un compuesto o un isómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o composiciones farmacéuticas según la invención para uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica.

10 Efecto técnico

Los compuestos de la invención tienen efectos significativos sobre el antagonismo de los receptores CCR2 y CCR5. En comparación con el compuesto de referencia cuando se combina con un anticuerpo, los compuestos de la invención reducen significativamente el riesgo causado por la interacción fármaco-fármaco y mejoran significativamente el efecto antitumoral cuando se combinan con un anticuerpo.

15 Definición y descripción

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos, expresiones y frases utilizados en este documento tendrán los siguientes significados. Los términos, expresiones o frases específicos que no están específicamente definidos deben entenderse en su significado claro y no deben considerarse inciertos o poco claros. Los nombres comerciales mencionados en este documento están destinados a referirse al producto comercial correspondiente o a su ingrediente activo.

A los efectos del presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formulaciones que, a juicio de un médico de confianza, tienen un perfil de seguridad adecuado cuando entran en contacto con tejidos humanos y animales, no causan toxicidad excesiva, irritación, reacciones alérgicas u otros problemas o complicaciones, y cumplen una relación beneficio/riesgo razonable.

25 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal producida del compuesto de la invención que se prepara a partir del compuesto con sustituyentes específicos descubiertos por la invención y un ácido o base con una toxicidad relativamente baja. Cuando el compuesto de la presente invención contiene un grupo funcional relativamente ácido, se puede obtener una sal de adición de álcali poniendo en contacto el compuesto en forma neutra con una cantidad suficiente de álcali en una solución pura o un disolvente inerte apropiado. Las sales de adición de álcalis farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, aminas orgánicas o magnesio, y similares. Cuando el compuesto de la presente invención contiene un grupo funcional relativamente básico, se puede preparar una sal de adición de ácido poniendo en contacto el compuesto en forma neutra con una cantidad suficiente de un ácido en una solución pura o un disolvente inerte apropiado. Ejemplos de sales de adición de ácidos que son farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido carbónico, bicarbonato, ácido fosfórico, hidrógeno-fosfato, dihidrógeno-fosfato, ácido sulfúrico, bisulfato, ácido yodhídrico, ácido fosforoso, etc.; y sales de ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido

propiónico, ácido isobutírico, ácido maleico, ácido malónico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido subérico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido mandélico, ácido ftálico, ácido fenilsulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico y similares; y también incluye sales de aminoácidos (por ejemplo, arginina, etc.), y sales de ácidos orgánicos tales como el ácido glucurónico y similares. Algunos compuestos específicos de la invención contienen grupos funcionales tanto alcalinos como ácidos, por lo que pueden convertirse en cualquier sal de adición de álcali o de adición de ácido.

La sal farmacéuticamente aceptable de la invención puede prepararse por métodos químicos tradicionales, utilizando un compuesto original que contenga un grupo ácido o alcalino. En general, el método de preparación de dichas sales comprende hacer reaccionar, en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos, estos compuestos que están en forma de ácidos o álcalis libres con una cantidad estequiométrica de álcalis o ácidos apropiados.

Los compuestos de la presente invención pueden existir como isómeros geométricos o estereoisómeros específicos. Se prevé que la invención incluya todas las formas de esta clase de compuestos, incluyendo isómeros cis y trans, enantiómeros (-) y (+), enantiómeros (R) y (S), diastereómeros, isómeros (D), isómeros (L), así como mezclas racémicas y otras mezclas, tales como mezclas enriquecidas en enantiómeros o diastereómeros, y todas estas mezclas están dentro del alcance de la invención. Otros átomos de carbono asimétricos pueden estar presentes en sustituyentes tales como los grupos alquilo. El alcance de la invención incluye todos estos isómeros y sus mezclas.

A menos que se especifique lo contrario, el término "enantiómeros" o la expresión "isómeros ópticos" se refiere a estereoisómeros que son imágenes especulares entre sí.

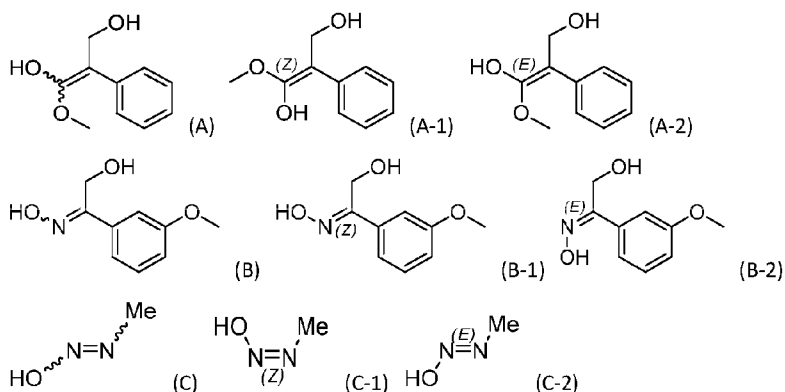
A menos que se especifique lo contrario, los "isómeros cis-trans" o "isómeros geométricos" son causados por la incapacidad de rotar libremente de los dobles enlaces o enlaces simples de los átomos de carbono que forman un anillo.

A menos que se especifique lo contrario, el término "diastereómero" se refiere a un estereoisómero en el que una molécula tiene dos o más centros quirales y la relación entre las moléculas no es una relación especular.

A menos que se especifique lo contrario, "(+)" se refiere a dextrorrotación, "(-)" se refiere a levorrotación y "(±)" se refiere a compuesto racémico.

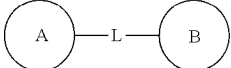
A menos que se especifique lo contrario, la configuración absoluta de un centro estereogénico está representada por un enlace sólido en cuña () y un enlace discontinuo en cuña () , y la configuración relativa de un centro estereogénico está representada por un enlace sólido recto () y un enlace discontinuo recto () , se utiliza una línea en onda () para representar un enlace discontinuo sólido () o un enlace discontinuo en cuña () o se utiliza la línea en onda () para representar un enlace sólido recto () y un enlace discontinuo recto () .

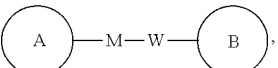
A menos que se especifique lo contrario, cuando una estructura de doble enlace, tal como un doble enlace carbono-carbono, un doble enlace carbono-nitrógeno y un doble enlace nitrógeno-nitrógeno, está presente en un compuesto y cada átomo del doble enlace está conectado a dos sustituyentes diferentes (incluso cuando el doble enlace contiene un átomo de nitrógeno, el par solitario unido al átomo de nitrógeno se considera como un sustituyente conectado), si el átomo en el doble enlace del compuesto está conectado a su sustituyente a través de una línea ondulada () , esto se refiere al isómero (Z), al isómero (E) o a una mezcla de ambos isómeros del compuesto. Por ejemplo, la siguiente fórmula (A) quiere decir que el compuesto existe como un solo isómero de fórmula (A-1) o fórmula (A-2), o como una mezcla de dos isómeros de fórmula (A-1) y fórmula (A-2); la siguiente fórmula (B) quiere decir que el compuesto existe en forma de un solo isómero de fórmula (B-1) o fórmula (B-2), o como una mezcla de dos isómeros de fórmula (B-1) y fórmula (B-2). La siguiente fórmula (C) quiere decir que el compuesto existe como un solo isómero de fórmula (C-1) o fórmula (C-2), o como una mezcla de los dos isómeros de fórmula (C-1) y fórmula (C-2).

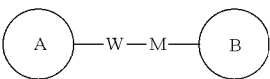


- A menos que se especifique lo contrario, el término "tautómero" o la expresión "forma tautómera" se refiere al hecho de que los isómeros de diferentes grupos funcionales están en equilibrio dinámico a temperatura ambiente y pueden transformarse rápidamente uno en otro. Si los tautómeros posiblemente existen (por ejemplo, en solución), se puede alcanzar el equilibrio químico de los tautómeros. Por ejemplo, la tautomería de protones (también conocida como tautomería prototrópica) incluye la interconversión a través de la migración de protones, tal como la tautomerización ceto-enol y la tautomerización de imina-enamina. La tautomería de valencia incluye alguna recombinación de los electrones del enlace para lograr la interconversión. Un ejemplo específico de tautomerización cetona-enol es el tautomerismo entre dos tautómeros de pentano-2,4-diona y 4-hidroxipent-3-en-2-ona.
- A menos que se especifique lo contrario, las expresiones "enriquecido en un isómero", "enriquecido en isómeros", "enriquecido en un enantiómero" o "enriquecido en enantiómeros" se refieren a que el contenido de uno de los isómeros o enantiómeros es inferior al 100% y el contenido de dicho isómero o enantiómero es mayor o igual que 60%, o 70%, u 80%, o 90%, o 95%, o 96%, o 97%, o 98%, o 99%, o 99,5%, o 99,6%, o 99,7%, o 99,8% o 99,9%.
- A menos que se especifique lo contrario, la expresión "exceso de isómero" o "exceso enantiomérico" se refiere a la diferencia entre los porcentajes relativos de dos isómeros o dos enantiómeros. Por ejemplo, si un isómero o enantiómero es 90% y el del otro es 10%, el exceso (valor ee) de isómero o enantiómero es del 80%.
- Los isómeros activos (R) y (S), así como los isómeros (D) y (L), pueden prepararse mediante síntesis asimétrica, reactivos quirales u otras técnicas convencionales. Si se desea, los enantiómeros de un compuesto de la invención pueden prepararse mediante síntesis asimétrica o derivatización de reactivos auxiliares quirales, en los que se aíslan las mezclas de diastereómeros resultantes y se eliminan los grupos auxiliares para obtener los enantiómeros puros deseados. O, cuando una molécula contiene un grupo funcional alcalino (tal como un grupo amino) o un grupo funcional ácido (tal como un grupo carboxilo), se forma una sal diastereómera con un ácido o álcali ópticamente activo apropiado, seguido por resolución del diastereómero por un método conocido en la técnica de cristalización fraccionada o cromatografía y posterior recuperación para obtener el enantiómero puro. Además, la separación de un enantiómero y de un diastereómero usualmente se logra mediante cromatografía, donde la cromatografía emplea una fase estacionaria quiral, opcionalmente en combinación con un método de derivatización química (por ejemplo, generación de un carbamato a partir de una amina).
- El compuesto de la presente divulgación puede contener una proporción no natural de un isótopo atómico en uno o más de los átomos que constituyen el compuesto. Por ejemplo, el compuesto puede ser radiomarcado con isótopos radiactivos tales como el tritio (^3H), el yodo-125 (^{125}I) o el C-14 (^{14}C). Otro ejemplo es la formación de fármacos deuterados al reemplazar el hidrógeno con hidrógeno pesado, el enlace formado por el deuterio y el carbono es más fuerte que el del hidrógeno ordinario y el carbono. En comparación con los fármacos no deuterados, los fármacos deuterados tienen las ventajas de reducir los efectos tóxicos y secundarios, mejorar la estabilidad del fármaco, mejorar la eficacia, prolongar la vida media biológica de los fármacos, etc. Todas las variantes isotópicas de los compuestos de la presente divulgación, ya sean radiactivos o no, están dentro del alcance de la presente divulgación.
- El término "opcional" u "opcionalmente" significa que pueden ocurrir los eventos o condiciones posteriores pero que no son necesarios, y el término incluye tanto el caso en el que los eventos o condiciones ocurren como el caso en el que los eventos o condiciones no ocurren.
- El término "sustituido" significa que uno o más átomos de hidrógeno en un átomo específico están sustituidos con el sustituyente, que incluye las variantes de deuterio e hidrógeno, siempre que el estado de valencia del átomo en particular sea normal y el compuesto sustituto sea estable. Cuando el sustituyente es oxígeno (es decir, =O), significa que se sustituyen dos átomos de hidrógeno. Las posiciones en un anillo aromático no pueden estar sustituidas por una cetona. La expresión "opcionalmente sustituido" significa que un átomo puede estar sustituido por un sustituyente o no, a menos que se indique lo contrario, el tipo y el número de sustituyentes pueden ser arbitrarios, siempre que sean químicamente alcanzables.
- Cuando cualquier variable (tal como R), aparece más de una vez en la constitución o estructura del compuesto, la definición de la variable en cada ocurrencia es independiente. Así, por ejemplo, si un grupo está sustituido por 0-2 R, el grupo puede estar opcionalmente sustituido por hasta dos R, en donde la definición de R en cada ocurrencia es independiente. Además, la combinación del sustituyente y/o sus variantes solo está permitida si la combinación da lugar a un compuesto estable.
- Cuando el número de grupos enlazantes es 0, tal como $\text{---}(\text{CRR})_0\text{---}$, significa que el grupo enlazante es un enlace simple. Cuando se selecciona una de las variables de un enlace simple, significa que los dos grupos conectados por el enlace simple están directamente conectados. Por ejemplo, cuando la L en A-L-Z representa un enlace simple, la estructura A-L-Z es en realidad A-Z.
- Cuando un sustituyente está vacante, significa que este sustituyente no existe. Por ejemplo, cuando X en A-X está vacante, la estructura A-X es en realidad A. Cuando el sustituyente enumerado no indica mediante qué átomo está unido al grupo que se va a sustituir, dicho sustituyente puede estar enlazado por cualquiera de sus átomos. Por ejemplo, cuando un grupo piridilo actúa como sustituyente, se puede unir al grupo que será sustituido por cualquier átomo de carbono en el anillo de piridina.

Cuando un grupo enlazante enumerado no indica su dirección de enlace, su dirección de enlace es arbitraria. Por

ejemplo, cuando el grupo enlazante L es -M-W- en , -M-W- se puede enlazar a los anillos A y

B en la misma dirección que el orden de lectura de izquierda a derecha para constituir ; o también se puede enlazar con los anillos A y B en la dirección opuesta al orden de lectura de izquierda a derecha para

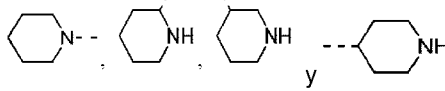
constituir . Una combinación de los grupos enlazantes, sustituyentes y/o sus variantes solo está permitida cuando dicha combinación puede dar lugar a un compuesto estable.

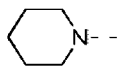
A menos que se especifique lo contrario, cuando un grupo tiene una o más sitios conectables, uno cualquiera o más de los sitios del grupo puede estar conectado a otros grupos mediante enlaces químicos. Cuando no existe un modo de conexión especificado para un enlace químico, y hay átomos de H en el sitio conectable, el número de átomos de H en el sitio conectable se reduce correspondientemente de acuerdo con el número de enlaces químicos conectados, y se forma así un grupo con el número de valencia correspondiente. El enlace químico que conecta el sitio con otro

grupo puede estar representado por una línea recta sólida (—), una línea recta discontinua (---) o una línea ondulada (~~~~). Por ejemplo, una línea recta sólida en -OCH₃ indica una conexión con otro grupo vía el átomo de oxígeno del grupo; la línea recta discontinua en  indica que está conectado a otro grupo por ambos extremos del

átomo de nitrógeno en el grupo; la línea ondulada en  se refiere a que está conectado a otro grupo a través

de los átomos de carbono en las posiciones 1 y 2 en el grupo fenilo;  significa que cualquier sitio conectable en el grupo piperidinilo puede estar conectado a otro grupo por 1 enlace, y son posibles al menos 4 modos de conexión,

que son ; incluso si -N- esté conectado a un átomo de H,  incluye

el modo de conexión , excepto que cuando 1 enlace está conectado a un sitio el número de átomos de H en ese sitio se reduce correspondientemente en 1 y de este modo se forma un grupo piperidinilo monovalente.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "heteroalquilo de 4 a 6 miembros", ya sea solo o en combinación con otros términos, significa un grupo cíclico saturado que consiste en 4 a 6 átomos en el anillo, los cuales 1, 2, 3 ó 4 átomos del anillo son heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N, y el resto son átomos de carbono, en donde el átomo de nitrógeno está opcionalmente cuaternizado. La expresión "heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros" se refiere a los sistemas de anillo único. Además, en lo que respecta al "grupo heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros", un heteroátomo puede ocupar una posición de conexión entre el grupo heterocicloalquilo y el resto de la molécula. El heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros incluye heterocicloalquilo de 4 a 6, de 4 a 5, de 5 a 6, de 4, 5 y 6 miembros. Los ejemplos de heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros incluyen, pero no se limitan a, azetidino, oxetanilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, tetrahidrofurilo (que incluye tetrahidrofuran-2-ilo, etc.), tetrahidropiranilo, piperidinilo (que incluye 1-piperidinilo, 2-piperidinilo y 3-piperidinilo, etc.), piperazinilo (que incluye 1-piperazinilo y 2-piperazinilo, etc.), morfolinilo (que incluye 3-morfolinilo y 4-morfolinilo, etc-) y así sucesivamente.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "alquilo C₁₋₆" se utiliza para referirse a un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que consiste en 1 a 6 átomos de carbono. El grupo alquilo C₁₋₆ incluye los grupos alquilo C₁₋₅, C₁₋₄, C₁₋₃, C₁₋₂, C₂₋₆, C₂₋₄, C₆ y C₅, etc.; puede ser monovalente (como en el metilo), divalente (como el metileno) o polivalente (como el metileno). Ejemplos de grupos alquilo C₁₋₆ incluyen, pero no se limitan a, metilo (Me), etilo (Et), propilo (incluidos n-propilo e isopropilo), butilo (incluidos n-butilo, isobutilo, s-butilo y terc-butilo), amilo (incluidos n-amilo, isoamilo y neoamilo), hexilo, y similares.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "alquilo C₁₋₃" se utiliza para indicar un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que consiste en 1 a 3 átomos de carbono. El grupo alquilo C₁₋₃ incluye los grupos alquilo C₁₋₂ y C₂₋₃, y similares; puede ser monovalente (como metilo), divalente (como metileno) o polivalente (como metileno). Ejemplos de grupos alquilo C₁₋₃ incluyen, pero no se limitan a, metilo (Me), etilo (Et), propilo (incluidos n-propilo e isopropilo), y similares.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "alcoxi C₁₋₃" se refiere a los grupos alquilo que contienen de 1 a 3 átomos de carbono que están unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno. El grupo alcoxi C₁₋₃ incluye los grupos alcoxi C₁₋₂ y C₂₋₃, y similares. Puede ser monovalente (como metoxi), bivalente (como metileno) o polivalente (como metileno). Ejemplos de grupos alcoxi C₁₋₃ incluyen, pero no se limitan a, metoxi (MeO), etoxi (EtO), propoxi (incluidos n-propoxi e isopropoxi), y similares.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "alcoxi C₁₋₆" se refiere a los grupos alquilo que contienen de 1 a 6 átomos de carbono que están unidos al resto de la molécula por un átomo de oxígeno. El grupo alcoxi C₁₋₆ incluye los grupos alcoxi C₁₋₄, C₁₋₃, C₁₋₂, C₂₋₆, C₂₋₄, C₆, C₅, C₄ y C₃, y similares. Ejemplos de grupos alcoxi C₁₋₆ incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi (incluidos n-propoxi e isopropoxi), butoxi (incluidos n-butoxi, isobutoxi, s-butoxi y t-butoxi), pentoxi (incluidos n-pentoxi, isopentoxi y neopentoxi), hexiloxi, y similares.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "alcoxi C₄₋₆" se refiere a los grupos alquilo que contienen de 4 a 6 átomos de carbono, que están unidos al resto de la molécula por un átomo de oxígeno. El grupo alcoxi C₄₋₆ incluye los grupos alcoxi C₄₋₆, C₄₋₅, C₆, C₅, C₄, y similares. Ejemplos de grupos alcoxi C₅₋₆ incluyen, pero no se limitan a, butoxi (incluidos n-butoxi, isobutoxi, s-butoxi y t-butoxi), pentoxi (incluidos n-pentoxi, isopentoxi y neopentoxi), hexiloxi, y similares.

La expresión "grupo saliente" se refiere a un grupo funcional o a un átomo que puede ser reemplazado por otro grupo funcional o átomo mediante una reacción de sustitución (por ejemplo, una reacción de sustitución por afinidad). Por ejemplo, los grupos salientes representativos incluyen triflato, cloro, bromo y yodo; grupos sulfonato, tales como mesilato, tosilato, p-bromobenzenosulfonato, ésteres del ácido p-toluensulfónico, etc.; aciloxi, tal como acetoxi; trifluoroacetoxi y similares.

La expresión "grupo protector" incluye, pero no se limita a, "grupo protector de amino", "grupo protector de hidroxilo" o "grupo protector de mercapto". La expresión "grupo protector de amino" se refiere a un grupo protector que es adecuado para prevenir reacciones secundarias en la posición del nitrógeno del grupo amino. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, pero no se limitan a: formilo; acilo, tal como alcanilo (tal como acetilo, tricloroacetilo o trifluoroacetilo); alcóxicarbonilo, tal como el terc-butoxicarbonilo (Boc); arilmetoxicarbonilo, tal como el benciloxicarbonilo (Cbz) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); arilmetilo, tal como bencilo (Bn), tritilo (Tr), 1,1-bis-(4'-metoxifenil)metilo; sililo, tal como el trimetilsililo (TMS) y terc-butildimetilsililo (TBS), y similares. La expresión "grupo protector de hidroxilo" se refiere a un grupo protector que es adecuado para prevenir reacciones secundarias de un grupo hidroxilo. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, pero no se limitan a: grupos alquilo tales como metilo, etilo y terc-butilo; grupos acilo tales como alcanilo (tal como acetilo); grupos arilmetilo tales como bencilo (Bn), oxibencilo (PMB), 9-fluorenilmetilo (Fm) y difenilmetilo (DPM); grupos sililo tales como el trimetilsililo (TMS) y el terc-butildimetilsililo (TBS), y similares.

Los compuestos de la invención puede prepararse mediante una variedad de métodos de síntesis bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo las realizaciones específicas enumeradas a continuación, las realizaciones formadas en combinación con otros métodos de síntesis química y alternativas equivalentes familiares para los expertos en la técnica. Las realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, las realizaciones de la invención.

Los disolventes utilizados en la invención están disponibles comercialmente. En la invención se usan las siguientes abreviaturas: aq representa agua; HATU representa hexafluorofosfato O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurea, EDC representa hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, m-CPBA representa ácido 3-cloroperoxisulfónico, CDI representa carbonildiimidazol, DCM representa diclorometano, PE representa éter de petróleo, DIAD representa azodicarboxilato de diisopropilo, DMF representa N,N-dimetilformamida; DMSO representa dimetilsulfóxido; EtOAc representa acetato de etilo; EtOH representa etanol; MeOH representa metanol; Cbz representa benciloxicarbonilo, un grupo protector de aminas; BOC representa terc-butoxicarbonilo, un grupo protector de aminas; HOAc representa ácido acético; NaCNBH₃ representa cianoborohidruro sódico; Rt representa temperatura ambiente; THF representa tetrahidrofurano; Boc₂O representa carbonato de di-terc-butilo; TFA representa ácido trifluoroacético; DIPEA representa diisopropiletilamina; SOCl₂ representa cloruro de tionilo; CS₂ representa disulfuro de carbono; TsOH representa ácido p-toluenosulfónico; NFSI representa N-fluoro-N-(bencenosulfonil)bencenosulfonamida; n-Bu₄NF representa fluoruro de tetrabutilamonio; iPrOH representa 2-propanol; Pd(dppf)Cl₂ representa 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno paladio(II) dicloruro; DEA representa dietilamina; mp representa punto de fusión; LDA representa diisopropilamina de litio; r.t. representa temperatura ambiente, O/N representa durante la noche; Eq representa equivalente, o cantidad equivalente; rpm es una unidad de velocidad de rotación y representa el número de revoluciones por minuto.

Los compuestos se nombran según los principios convencionales de nomenclatura en la técnica o utilizando el software ChemDraw®. Los compuestos comercialmente disponibles utilizan los nombres de los catálogos de los proveedores.

Breve descripción de los dibujos

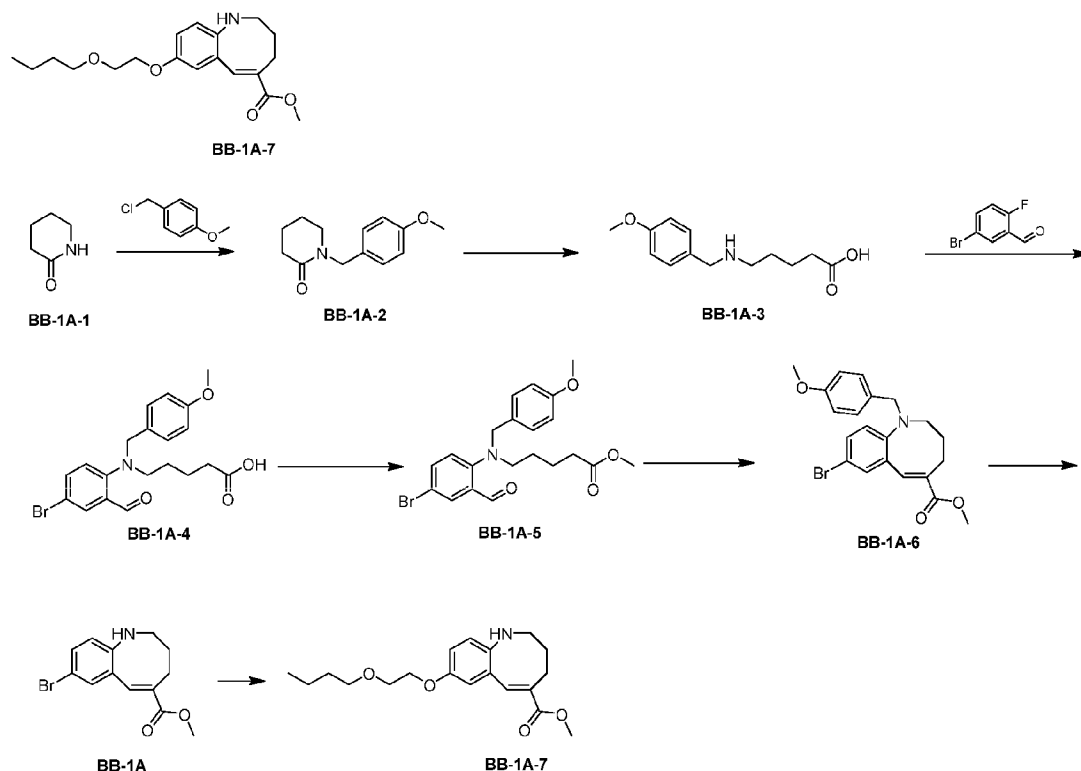
La Figura 1 muestra el efecto de WX001 sobre el volumen tumoral en un modelo tumoral de cáncer de colon MC38 de ratón.

Descripción detallada

La invención es como se establece en las reivindicaciones independientes y otros aspectos de la invención se describen con más detalle en las reivindicaciones dependientes. Las realizaciones que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones no describen parte de la invención.

La presente invención se describirá a continuación en detalle mediante ejemplos, que no pretenden ser restricciones inapropiadas a la invención. La invención se ha descrito en detalle en el presente documento, en el cual se divulgan realizaciones de la invención. Para aquellos expertos en la técnica, será obvio que se pueden realizar varios cambios y mejoras en las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento. Por lo tanto, se contempla que las reivindicaciones adicionales cubrirán cualquiera de tales modificaciones o realizaciones que caigan dentro del alcance de la invención.

Ejemplo de referencia 1: Fragmento BB-1A-7



Etapas 1: Síntesis del compuesto BB-1A-2

Se suspendieron en tolueno (5000 mL) bromuro de tetrabutilamonio (86,58 g, 302,63 mmoles) e hidróxido de potasio (339,6 g, 6,05 moles) para formar una mezcla, y después de mantener la mezcla a reflujo durante 16 h, se añadió piridina-2-ona (500,00 g, 5,04 moles) y metoxicloruro (1,03 kg, 6,56 moles). La mezcla se mantuvo a 100 °C durante 24 h, se enfrió a temperatura ambiente y se lavó tres veces con agua (2000 mL × 3). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. La solución concentrada se separó mediante una columna cromatográfica para obtener el compuesto BB-1A-2.

Etapas 2: Síntesis del compuesto BB-1A-4

Una solución del compuesto BB-1A-2 (40 g) e hidróxido de sodio (7,29 g) en agua (200 mL) se agitó a 80 °C durante 24 h. La mezcla se neutralizó con ácido clorhídrico concentrado (7,38 mL) a 0 °C para obtener una solución mixta de BB-1A-3. Se añadió carbonato de sodio (65,66 g) y dimetilsulfóxido (600 mL) a esta solución mixta a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 5-bromo-2-fluorobenzaldehído (46,11 g) gota a gota a la mezcla a 100 °C. A continuación, la mezcla de reacción se reflujo a 100 °C durante 48 horas y se ajustó a pH = 7 con una solución acuosa de cloruro de amonio (1 mol/L) refrigerada con hielo y se extrajo con acetato de etilo (1 L × 3). La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo/acetato de etilo = 200:1 a 1:1) para obtener el compuesto BB-1A-4.

Etapas 3: Síntesis del compuesto BB-1A-5

A una mezcla del compuesto BB-1A-4 (10 g) con carbonato de sodio (12,61 g) en acetonitrilo (100 mL) se añadió una

solución de yoduro de metilo (22 g) en acetonitrilo (50 mL). En una atmósfera de nitrógeno, la mezcla de reacción se agitó a 15-30 °C durante 24 horas, se inactivó con agua (300 mL) y se extrajo con acetato de etilo (400 mL × 2). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 50:1 a 20:1 a 10:1) para obtener el compuesto **BB-1A-5**.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10,31 (s, 1H), 7,89 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,54 (dd, J = 9,0, 2,51 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,97 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 6,80 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 4,21 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,07 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,25 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,46 - 1,58 (m, 4H).

Etapas 4: Síntesis del compuesto **BB-1A-6**

A una solución del compuesto **BB-1A-5** (11 g) en carbonato de dimetilo (42,8 g) se añadió metóxido sódico (6,84 g) para formar una mezcla. La mezcla se calentó a 60 °C y se agitó a 60 °C durante 35 h, se ajustó al pH (7-8) con cloruro de amonio en solución acuosa (1 mol/L) y se filtró. La torta del filtro se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto **BB-1A-6**.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,74 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,05 - 7,11 (m, 3H), 6,88 (d, J = 8,53 Hz, 2H), 6,53 (d, J = 9,03 Hz, 1H), 4,39 (s, 2H), 3,80 (d, J = 2,01 Hz, 6H), 3,48 (t, J = 5,02 Hz, 2H), 2,58 (t, J = 6,02 Hz, 2H), 1,47 (d, J = 5,52 Hz, 2H).

Etapas 5: Síntesis del compuesto **BB-1A**

A una solución del compuesto **BB-1A-6** (10 g) en tolueno (50 mL) se añadió ácido trifluoroacético (100 mL). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó durante 8 h a 60 °C, se neutralizó a pH = 7 con una solución saturada de bicarbonato de sodio bajo refrigeración con hielo y se extrajo con acetato de etilo (250 mL × 2). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 50:1 a 5:1) para obtener el compuesto **BB-1A**.

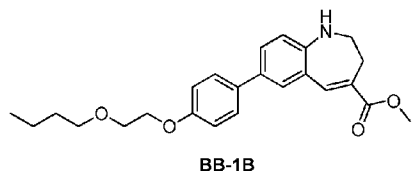
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,66 (s, 1H), 7,39-7,05 (m, 1H), 6,85 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,36 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,51 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,75 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,49 - 1,40 (m, 2H).

Etapas 6: Síntesis del compuesto **BB-1A-7**

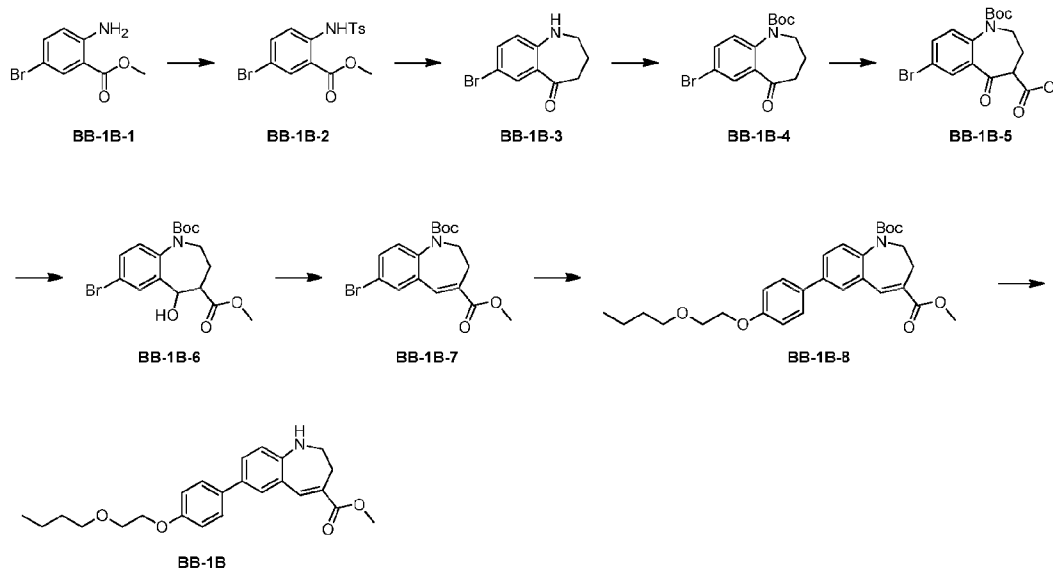
Se disolvieron a 25 °C en dimetilsulfóxido (62,5 mL) y agua (12,5 mL) **BB-1A** (7,5 g, 25,32 mmoles, 1 eq) y **BB-2** (8,92 g, 27,86 mmoles, 1,1 eq), y luego se añadieron Pd(dppf)Cl₂ (926,50 mg, 1,27 mmoles, 0,05 eq) y carbonato de potasio (10,50 g, 75,97 mmoles, 3 eq) para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se hizo reaccionar a 80 °C durante 18 h en una atmósfera de nitrógeno y luego se filtró. El filtrado se suplementó con 100 mL de agua y a continuación se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró y evaporó a presión reducida para obtener un producto crudo. El producto crudo se separó por cromatografía en columna (éter de petróleo/acetato de etilo = 20:1 a 8:1) para obtener el compuesto **BB-1A-7** (8 g).

MS-ESI (m/z): 410,0 (M+1)⁺.

Ejemplo de referencia 2: Fragmento BB-1B



Ruta sintética:



Etapas 1: Síntesis del compuesto **BB-1B-2**

Se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (55,94 g) a 25 °C a una solución del compuesto **BB-1B-1** (45 g) en piridina (450 mL), se agitó a 55 °C durante 5 h para formar una mezcla. Se añadió agua (200 mL) a la mezcla y se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (200 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 100:1 a 10:1) para obtener **BB-1B-2**.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10,51 (s, 1H), 8,04 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,63 - 7,59 (m, 1H), 7,57 - 7,52 (m, 1H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 2,38 (s, 3H).

Etapas 2: Síntesis del compuesto **BB-1B-3**

A una solución del compuesto **BB-1B-2** (59 g) en DMF (200 mL) se añadieron a 0 °C hidruro de sodio (6,14 g, 60% de pureza) y DMF (50 mL) y luego se agitó a 25 °C durante 2 h en una atmósfera de nitrógeno. Se añadieron yoduro de sodio (23,02 g) y 4-bromobutirato de etilo (32,95 g) a 0 °C y se agitó a 80 °C durante 16 h en atmósfera de nitrógeno, y a continuación se añadieron a 0 °C hidruro de sodio (6,14 g, 60% de pureza) y DMF (50 mL) a 0 °C y se agitó a 80 °C durante 15 h en atmósfera de nitrógeno. Se añadió agua (200 mL) a la mezcla y se extrajo con acetato de etilo (50 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (200 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un aceite amarillo. Se añadieron ácido sulfúrico concentrado (100 mL, 98% de pureza) y ácido acético (157,5 g) al aceite amarillo a 0 °C y se agitó a 90 °C durante 2,5 h. La mezcla se ajustó a pH = 8 con una solución acuosa de hidróxido de sodio de 12 mol/L y luego se extrajo con acetato de etilo (300 mL × 3) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (300 mL). La capa orgánica combinada se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 50:1 a 5:1) para obtener **BB-1B-3**.

Etapas 3: Síntesis del compuesto **BB-1B-4**

Los reaccionantes **BB-1B-3** (6 g) y anhídrido Boc (15,16 g) se disolvieron en tetrahidrofurano (100 mL) y se añadió N,N-lutidina (4,58 g) para formar una mezcla. La mezcla se agitó a 70 °C durante 4 horas, se inactivó con agua (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 50:1 a 20:1) para obtener **BB-1B-4**.

MS-ESI (m/z): 283,9 [M-55]⁺.

Etapas 4: Síntesis del compuesto **BB-1B-5**

Se añadió metóxido de sodio (2,13 g) a una solución del reaccionante **BB-1B-4** (2,68 g) en carbonato de dimetilo (50 mL) a 25 °C y se agitó a 100 °C en atmósfera de nitrógeno durante 2 h. La mezcla se inactivó con agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (100 mL), se

secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 50:1 a 5:1) para obtener el compuesto **BB-1B-5**.

MS-ESI (m/z): 342,1 [M-55]⁺.

5 Etapa 5: Síntesis del compuesto **BB-1B-6**

Se añadió borohidruro de sodio (484,49 mg) a una solución del reaccionante BB-1B-5 (1,7 g) en tetrahidrofurano (20 mL) a -40 °C y se añadió metanol (10 mL) a la misma. La mezcla se agitó a -15 °C durante 0,5 h, se inactivó con agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto **BB-1B-6**.

10 Etapa 6: Síntesis del compuesto **BB-1B-7**

Los reaccionantes **BB-1B-6** (1,93 g) y trietilamina (1,56 mL) se disolvieron en una solución de tetrahidrofurano (20 mL) y se añadió cloruro de metilsulfonilo (1,29 g) a la misma a 0 °C. La mezcla se agitó durante 15 h a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno y luego se añadió a la misma 1,8-diazaciclo [5,4,0]-undeceno (1,14 g) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se inactivó con agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 50:1 a 5:1) para obtener el compuesto **BB-1B-7**.

MS-ESI (m/z): 326,0 [M-55]⁺.

20 Etapa 7: Síntesis del compuesto **BB-1B-8**

Se añadieron los reaccionantes **BB-1B-7** (0,35 g), **BB-2** (351,86 mg) y carbonato de potasio (379,64 mg) a una solución de dimetilsulfóxido (10 mL) y el complejo [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]paladio dicloruro diclorometano (74,77 mg) y luego la mezcla se agitó a 80°C en atmósfera de nitrógeno durante 16 h. Se añadió agua (50 mL) a la mezcla y se extrajo con acetato de etilo (50 mL × 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa (PE:EA = 5:1) para obtener el compuesto BB-1B-8.

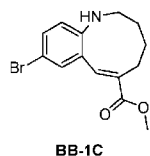
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,74 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,51 (br d, J = 8,8 Hz, 3H), 7,48 (br s, 1H), 7,01 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,20-4,16 (m, 2H), 3,85-3,80 (m, 5H), 3,56 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,92 (s, 2H), 2,05 (s, 1H), 1,66 - 1,58 (m, 2H), 1,56 (s, 9H), 1,45 - 1,35 (m, 4H), 0,94 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

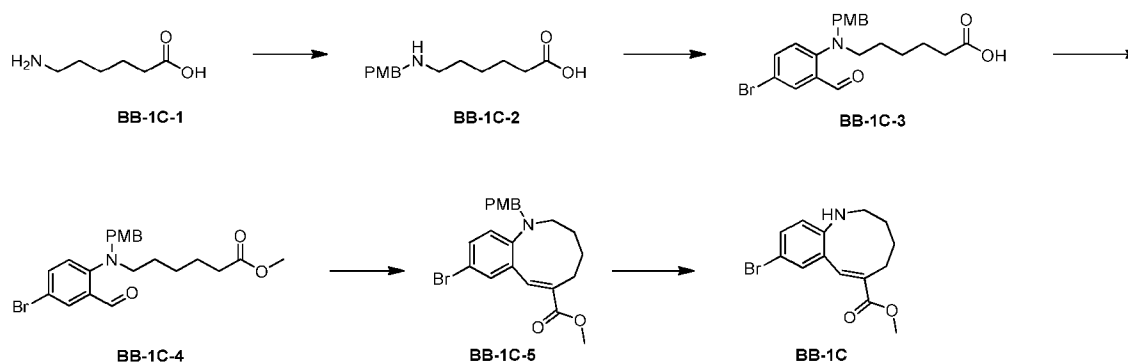
30 Etapa 8: Síntesis del compuesto **BB-1B**

A una solución del compuesto **BB-1B-8** (0,23 g) en acetato de etilo (10 mL) se añadió ácido clorhídrico 4 M en acetato de etilo (10 mL) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La solución de reacción se ajustó a pH 8 con una solución acuosa de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). La capa orgánica agrupada se lavó con salmuera saturada (100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto **BB-1B**.

MS-ESI (m/z): 396,3 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 3: Fragmento BB-1C





Etapas 1: Síntesis del compuesto **BB-1C-2**

Se añadieron metanol (600 mL), ácido 6-aminocaproico (50 g) y 4-metoxibenzaldehído (52 g) a una solución acuosa de NaOH 1 M (381,18 mL) y se añadió paladio sobre carbono (4,5 g, 10% de pureza). La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno (137895-206843 Pa, es decir, "20-30 psi"), y se filtró y evaporó a presión reducida (acetona, 300 mL). Se añadió acetona (50 mL) al residuo y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, se filtró y se lavó con acetona. La torta del filtro se secó a vacío para obtener el compuesto **BB-1C-2**.

MS-ESI m/z: 252,3 [M+H]⁺.

Etapas 2: Síntesis del compuesto **BB-1C-3**

Se disolvieron **BB-1C-2** (86 g, 342,19 mmoles, 1 equivalente) y 5-bromo-2-fluorobenzaldehído (55,57 g) en dimetilsulfóxido (350 mL) y se añadieron carbonato de sodio (90,67 g) y agua (175 mL). La solución de reacción se agitó a 100 °C durante 12 h y se vertió en agua (1.200 mL) y se ajustó a pH = 3-4 con ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con acetato de etilo (500 mL × 2 veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (500 mL) y se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 a 1/1) para obtener el compuesto **BB-1C-3**.

MS-ESI m/z: 434,2 [M+H]⁺.

Etapas 3: Síntesis del compuesto **BB-1C-4**

Se añadieron yoduro de metilo (15,49 mL) y carbonato de potasio (36,91 g) a la solución de **BB-1C-3** (58 g) en N,N-dimetilformamida (300 mL). La solución de reacción se agitó a 25 °C durante 4 h y se vertió en agua (1.000 mL) y se extrajo con acetato de etilo (500 mL × 2 veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (500 mL), se secó y se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 a 7/3) para obtener el compuesto **BB-1C-4**.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10,31 (s, 1H), 7,90 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,54 (dd, J = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 7,06 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,98 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,22 (s, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,06 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,25 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,58 - 1,51 (m, 4H), 1,27 - 1,25 (m, 2H).

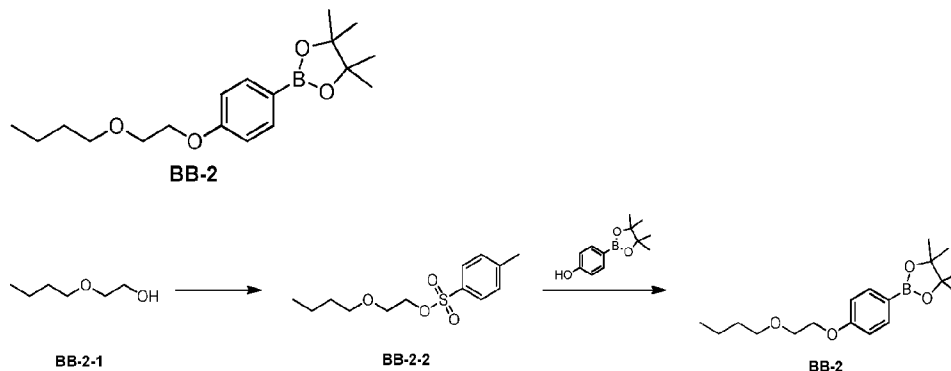
MS-ESI m/z: 448,2 [M+H]⁺.

Etapas 4: Síntesis del compuesto **BB-1C-5**

Se añadió metóxido de sodio (6,51 g) a una solución de **BB-1C-4** (10,8 g) en carbonato de dietilo (500 mL), y se agitó a 25 °C durante 12 h. Se añadió agua (500 mL) a la solución de reacción y se extrajo con acetato de etilo (300 mL × 2). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (500 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 10/1) para obtener el compuesto **BB-1C-5**.

MS-ESI m/z: 430,2, 432,2 [M+1, M+3]⁺.

Ejemplo de referencia 4: Fragmento BB-2

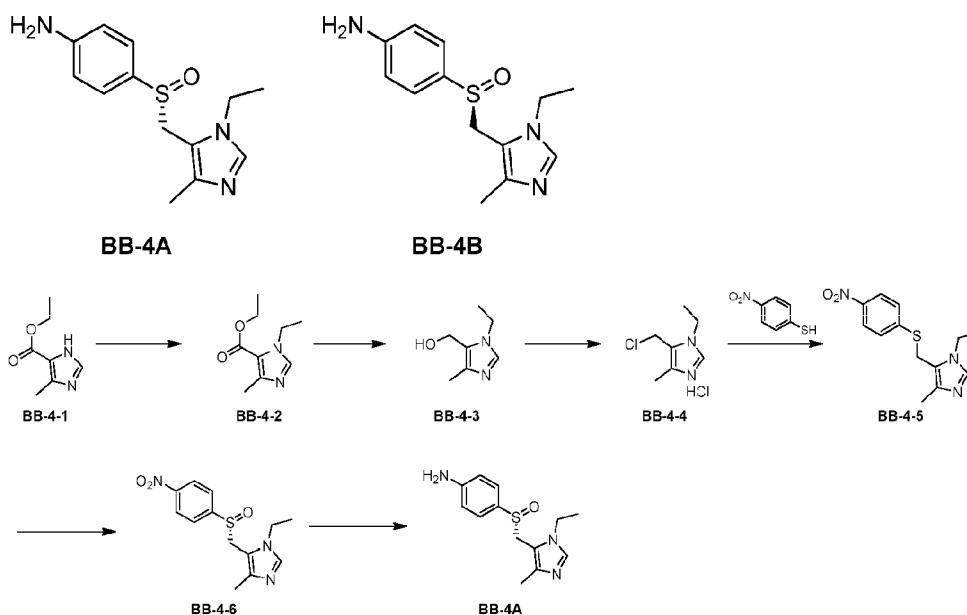
Etapa 1: Síntesis del compuesto **BB-2-2**

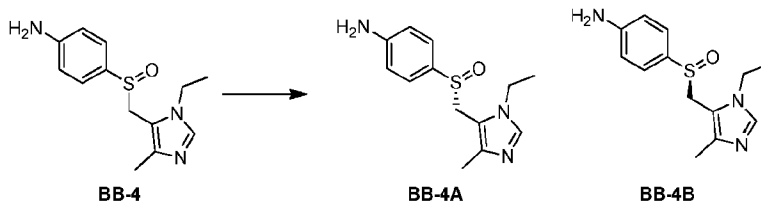
- 5 Los compuestos **BB-2-1** (100 g, 0,846 moles), cloruro de p-toluenosulfonilo (146,67 g, 769,31 mmoles) y trietilamina (233,54 g, 2,31 moles) se disolvieron en diclorometano (0,5 L) y se agitaron durante 12 h a temperatura ambiente, se enfriaron a temperatura ambiente y se filtraron a presión reducida para eliminar el disolvente, el residuo se disolvió en agua (400 mL) y se extrajo tres veces con acetato de etilo (1,5 L). La fase orgánica combinada se lavó dos veces (400 mL) con salmuera saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró para eliminar el desecante y el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto **BB-2-2**.
- 10 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,73 (d, J = 8,28 Hz, 2H), 7,27 (d, J = 8,03 Hz, 2H), 4,05-4,10 (m, 2H), 3,50-3,55 (m, 2H), 3,30 (t, J = 6,53 Hz, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,35 - 1,44 (m, 2H), 1,16 - 1,27 (m, 2H), 0,81 (t, J = 7,40 Hz, 3H).

Etapa 2: Síntesis del compuesto **BB-2**.

- 15 Se disolvieron los compuestos **BB-2-2** (170,10 g, 624,54 mmoles) y éster de pinacol del ácido p-hidroxifenilborónico (137,44 g, 624,54 mmoles) en acetonitrilo (1,6 L), y se añadieron a temperatura ambiente carbonato de potasio (86,32 g, 624,54 mmoles) y yoduro de potasio (10,37 g, 62,45 mmoles). La solución resultante se calentó a reflujo y se agitó durante 12 h en una atmósfera de nitrógeno a 60 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a presión reducida para eliminar el disolvente. El residuo se disolvió en agua (500 mL) y la fase acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo (2 L $\times$ 3 veces), se combinaron las fases orgánicas y se filtró a presión reducida para eliminar el disolvente, y se obtuvo el compuesto **BB-2** por cromatografía en columna de gel de sílice.
- 20 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,78 - 7,71 (m, 2H), 6,95 - 6,88 (m, 2H), 4,19 - 4,12 (m, 2H), 3,83 - 3,75 (m, 2H), 3,54 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,65 - 1,57 (m, 2H), 1,44 - 1,36 (m, 2H), 1,34 (s, 12H), 0,93 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo de referencia 5: Fragmento BB-4A y fragmento BB-4B





Etapa 1: Síntesis del compuesto **BB-4-2**

Se disolvió trifenilfosfina (765,61 g, 1,5 eq) en 3,5 L de tetrahidrofurano anhidro con agitación mecánica (219 rpm) en un baño de hielo, la temperatura interna se controló por debajo de 10 °C y se añadió DIAD (567,54 mL) lentamente gota a gota durante 100 minutos, y luego se continuó agitando durante 30 minutos a una velocidad de agitación de 400 rpm, de modo que se dejó que la reacción transcurriera suficientemente para formar un sólido viscoso blanco. Se añadieron continua y lentamente 453,91 mL de etanol absoluto durante 90 min (la reacción exotérmica es violenta al comienzo del goteo por lo que es importante controlar la velocidad de goteo). Cuando los sólidos se disolvieron lentamente para formar una solución transparente se añadió **BB-4-1** (300 g). La solución se agitó mecánicamente a 200 rpm durante 5 h y el baño de hielo se reemplazó por un baño de aceite para controlar la temperatura entre 30-35 °C (cuando la temperatura supera 40 °C, la selectividad es mala y los subproductos aumentan). La solución de reacción se trató a presión reducida a 40 °C para eliminar el tetrahidrofurano, se ajustó a pH 2 con una solución acuosa de ácido clorhídrico 4 mol/L (700 mL) y se añadieron 2 L de una solución de acetato de etilo después de agitar completamente durante 30 min para extraer. Después de 5 extracciones se observó una fase acuosa limpia mediante una placa de TLC y LCMS, se descartó la fase orgánica, se añadieron 65 g de NaOH a la fase acuosa y se agitó durante 40 min, se ajustó a un valor de pH superior a 10 (la reacción exotérmica es violenta, es importante prestar atención a la temperatura), y se extrajo con 3 L de acetato de etilo. Después de extraer 3 veces se observó una fase orgánica limpia mediante una placa de TLC y por LCMS, se combinaron las fases orgánicas y se secaron con 40 g de sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para eliminar el acetato de etilo y obtener **BB-4-2**.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,46 (s, 1H), 4,41 - 4,24 (m, 4H), 2,48 (s, 3H), 1,39 (q, J = 7,4 Hz, 6H).

MS-ESI (m/z): 182,9 [M+H]⁺.

Etapa 2: Síntesis del compuesto **BB-4-3**

Se pesó hidruro de litio y aluminio (59,36 g) y se añadió a 1 L de tetrahidrofurano anhidro en un baño de hielo y se agitó mecánicamente a una velocidad de 289 rpm para formar una solución. El compuesto **BB-4-2** (285 g) se disolvió en 1 L de tetrahidrofurano anhidro y se goteó lentamente sobre la solución anterior durante 1,5 horas a temperatura controlada por debajo de 10 °C en un baño de hielo. La solución se agitó continua y mecánicamente a una velocidad constante durante 12 h a temperatura ambiente bajo la condición de retirar el baño de hielo. En un baño de hielo se añadieron lentamente 60 mL de agua desionizada a la solución con agitación mecánica hasta que la reacción finalizó. Se añadió lentamente gota a gota una solución acuosa de hidróxido de sodio (4 mol/L, 60 mL) al producto de reacción y se agitó durante 15 min, se añadieron 180 mL de agua desionizada y se continuó agitando durante 20 min, y a continuación se añadieron 80 g de sulfato de magnesio anhidro y se agitó bien, y finalmente se filtró a presión reducida. La torta del filtro se lavó repetidamente 5-6 veces con 5 litros de diclorometano, y los filtrados se combinaron y evaporaron a presión reducida a 40 °C para obtener **BB-4-3**.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,51 (s, 1H), 4,82 (s, 3H), 4,27 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 2,33 (s, 3H), 1,69 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Etapa 3: Síntesis del compuesto **BB-4-4**

El compuesto **BB-4-3** (180 g) se disolvió en 1,5 L de diclorometano anhidro y se agitó magnéticamente, seguido de una adición lenta gota a gota de cloruro de tionilo (186,3 mL) en un baño de hielo para formar una mezcla. Después de la adición, la mezcla se calentó a 40 °C, el baño de hielo se reemplazó por un baño de aceite y se agitó durante 6 horas en atmósfera de nitrógeno hasta que se confirmó que la reacción había finalizado mediante detección con una placa de cromatografía en capa fina. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida a 40 °C para eliminar el disolvente. Al residuo de evaporación se añadió diclorometano (1 L), se destiló tres veces a presión reducida y se evaporó en un rotavapor a presión reducida durante 45 minutos cambiando la bomba de agua por una de aceite para obtener 190 g de un producto crudo sólido viscoso rojo. El producto crudo se disolvió en 380 mL de solución de acetonitrilo, se calentó a 70 °C y se reflujo durante 2 horas, luego se apagó el dispositivo de calentamiento para que se enfriara a temperatura ambiente y se continuó agitando durante 12 horas. La solución mixta se añadió lentamente gota a gota a 3 L de acetato de etilo con agitación y la agitación se mantuvo durante 30 minutos después de que finalizara la adición. El compuesto **BB-4-4** se obtuvo mediante filtración por succión a presión reducida.

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 9,19 (s, 1H), 5,06 (s, 2H), 4,24 – 4,20 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,45 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Etapa 4: Síntesis del compuesto **BB-4-5**

Se pesó el p-fluoronitrobenceno (97,64 g) y se disolvió en dimetilsulfóxido (1,1 L), se añadió sulfuro de sodio (59,38 g) en un baño de hielo con agitación y se agitó durante 44 horas para formar una solución de reacción. El compuesto **BB-4-4** (90 g) se disolvió en dimetilsulfóxido (450 mL) y se añadió lentamente gota a gota a la solución de reacción durante 7 h. A continuación, la solución de reacción se ajustó a pH 3 añadiendo una solución acuosa de ácido clorhídrico (4 M, de 0,5 L), se extrajo con 4 L de agua y 4 L de acetato de etilo y se agitó durante media hora. Después de la separación de fases, la fase acuosa se ajustó a pH 10 mediante la adición de hidróxido de sodio sólido y se realizaron dos extracciones con 2 litros de acetato de etilo. Las fases orgánicas obtenidas de las dos extracciones se combinaron, se lavaron con 1 L de salmuera saturada y luego se evaporaron. La fase orgánica se secó mediante la adición de sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. El sólido secado por centrifugación se trituró, se le añadieron 2 mL de acetato de etilo y 100 mL de éter de petróleo, se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se filtró. La torta del filtro se secó a presión reducida para obtener **BB-4-5**.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,07 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 7,37 (s, 1H), 7,30 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 4,13 (s, 2 H), 3,92 (q, J = 7,28 Hz, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,40 (t, J = 7,28 Hz, 3H).

Etapa 5: Síntesis del compuesto **BB-4-6**

Se añadió **BB-4-5** (64,72 g) a una solución de (1R, 2R)-1,2-difeniletano-1,2-diol (100 g) en isopropanol (5.000 mL) y se agitó a 25 °C durante 1 h para formar una mezcla. A continuación, se añadió tetraisopropóxido de titanio (66,32 g) gota a gota y se agitó a 25 °C durante 3 h y se filtró para obtener un sólido amarillo (95 g). El sólido obtenido (72 g) se disolvió en diclorometano (360 mL) y se añadió peróxido de terc-butilo (14,17 mL, 65% de pureza) a la solución y se agitó durante 4 h a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. A continuación, la solución de reacción se inactivó con una solución saturada de sulfito de sodio (200 mL) y se ajustó a pH 3 con una solución de ácido clorhídrico 2 M. Después de la separación de fases, la fase orgánica se descartó y la fase acuosa se ajustó a pH 8 con una solución de hidróxido de sodio 8 M. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (300 mL × 3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (300 mL), se secó, se filtró y se evaporó al vacío para obtener **BB-4-6** (producto crudo).

Etapa 6: Síntesis del compuesto **BB-4A**

A una solución del compuesto **BB-4-6** (19 g) y cloruro de amonio (34,65 g) en metanol (250 mL), se añadió polvo de zinc (42,35 g) y se agitó a 20 °C durante 24 h. Después de la filtración, el filtrado se evaporó a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía de líquidos preparativa de alta resolución para obtener el compuesto **BB-4A**.

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃) δ ppm 7,41 (s, 1H), 7,14-7,09 (m, J = 8,5 Hz, 2H), 6,71-6,66 (m, J = 8,5 Hz, 2H), 4,07-3,94 (m, 4H), 3,84 (dd, J = 1,9, 7,4 Hz, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,38 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

MS-ESI (m/z): 263,7 (M+H)⁺.

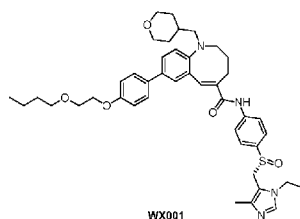
Separación de fases: Síntesis de los compuestos **BB-4A** y **BB-4B**

El compuesto **BB-4** (preparado con referencia al método de síntesis del compuesto **BB-3I** en el documento WO2018103757A1) se sometió a cromatografía de fluidos supercríticos (condiciones de separación: columna: ChiralPaK AD-3, tamaño 150 * 4,6 mm, tamaño de partícula 3 μm; Fase móvil: A: CO₂, B: etanol (0,05% DEA); Gradiente: B de 5% a 40%, 5,5 min, mantener el 40% durante 3 min, luego mantener el 5% de B durante 1,5 min; caudal: 2,5 mL/min; temperatura de la columna: 40°C; longitud de onda de detección: 220 nm) para obtener los isómeros **BB-4A** (tiempo de retención: 5,828 min) y **BB-4B** (tiempo de retención: 6,163 min).

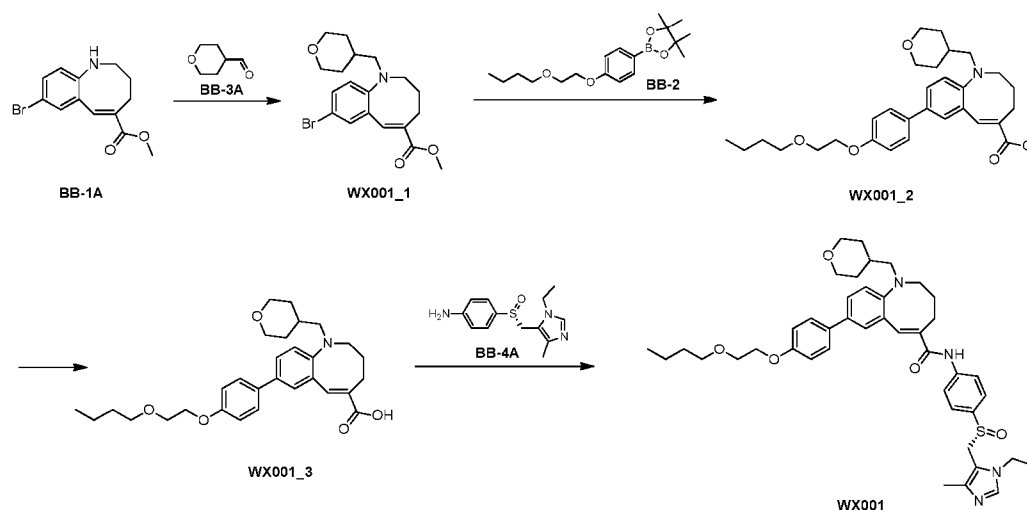
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,43 (s, 1H), 7,15-7,10 (m, 2H), 6,71-6,66 (m, 2H), 4,07-3,95 (m, 4H), 3,85 (dd, J = 1,9, 7,3 Hz, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,39 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

MS-ESI m/z: 264,0 [M+H]⁺.

Ejemplo 1



Ruta sintética:

Etapa 1: Síntesis del compuesto **WX001_1**

- 5 El compuesto **BB-1A** (3,89 g, 13,14 mmoles) y el compuesto **BB-3A** (3 g, 26,28 mmoles) se disolvieron en 1,2-dicloroetano (50 mL) a 25 °C, y luego se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (11,14 g, 52,57 mmoles) y se agitó a 25 °C durante 5 h para formar una solución de reacción. La solución de reacción se ajustó a pH 8 con una solución de hidróxido de sodio 8 M y se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 100 mL de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron para eliminar el desecante. El filtrado se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto **WX001_1**.

- 10 MS-ESI (m/z): 394,20 [M+1]⁺.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,69 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,23 - 7,20 (m, 1H), 6,61 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 4,00 (dd, J = 4,4, 10,9 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,44 - 3,32 (m, 5H), 3,07 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 2,54 - 2,48 (m, 2H), 2,05 - 1,98 (m, 2H), 1,65 (br d, J = 12,3 Hz, 2H), 1,46 - 1,41 (m, 2H).

Etapa 2: Síntesis del compuesto **WX001_2**

- 15 A 25 °C, el compuesto **WX001_1** (0,6 g, 1,52 mmoles), el compuesto **BB-2** (487,29 mg, 1,52 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (630,91 mg, 4,57 mmoles) se disolvieron en un disolvente mixto de dimetilsulfóxido (10 mL) y agua (2 mL), y luego se añadió Pd(dppf)Cl₂ (222,68 mg, 304,34 μmoles) para formar una solución de reacción. La solución de reacción se agitó durante 20 h en una atmósfera de nitrógeno a 80 °C, luego se vertió agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (30 mL × 3). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con salmuera saturada (100 mL), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron para eliminar el desecante. El filtrado se evaporó a presión reducida para obtener un producto crudo. El producto crudo se separó por cromatografía en columna para obtener **WX001_2** (0,603 g).

MS-ESI (m/z): 508,20 [M+1]⁺.

- 25 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,88 (s, 1H), 7,45 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,40 (dd, J = 2,4, 8,9 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,82 - 6,77 (m, 1H), 4,18 - 4,14 (m, 2H), 4,01 (dd, J = 3,8, 11,0 Hz, 2H), 3,83 - 3,78 (m, 7H), 3,56 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,48 (br t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,38 (t, J = 11,0 Hz, 2H), 3,14 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 2,58 - 2,53 (m, 2H), 1,70 (br d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,65 - 1,60 (m, 2H), 1,51 - 1,44 (m, 3H), 1,29 - 1,26 (m, 2H), 0,94 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Etapa 3: Síntesis del compuesto **WX001_3**

- 30 El compuesto **WX001_2** (0,603 g, 872 μmoles) se disolvió en metanol (10 mL) y agua (2 mL) a 25 °C, y se añadió hidróxido de sodio (520,50 mg, 13,01 mmoles) para formar una solución de reacción. La solución de reacción se calentó a 50 °C y se agitó durante 43 h, se ajustó a pH 3 con una solución de ácido clorhídrico diluido 2 M y se extrajo con acetato de etilo (30 mL × 3). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con salmuera saturada (100 mL), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron para eliminar el desecante. El filtrado se concentró a presión reducida y se evaporó a sequedad para obtener **WX001_3** (0,537 g).

- 35 MS-ESI (m/z): 494,20 [M+1]⁺.

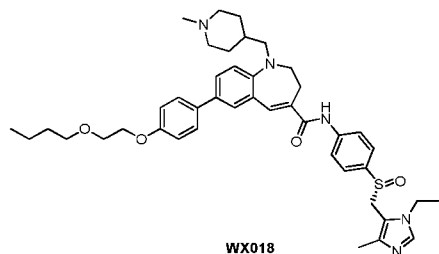
Etapa 4: Síntesis del compuesto **WX001**

A 25 °C, el compuesto **WX001_3** (0,1 g, 202,58 µmoles) y el compuesto **BB-4A** (53,35 mg, 202,58 µmoles) se disolvieron en piridina (5 mL), y luego se añadió EDCI (77,67 mg, 405,16 µmoles) para formar una solución de reacción. La solución de reacción se calentó a 60 °C, se agitó durante 6 h en una atmósfera de nitrógeno y se vertió en agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (30 mL × 3). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con salmuera saturada (100 mL), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron para eliminar el desecante. El filtrado se evaporó a presión reducida para eliminar el disolvente para obtener el producto crudo. El producto crudo se separó mediante HPLC preparativa (condiciones alcalinas) para obtener **WX001** (0,032 g).

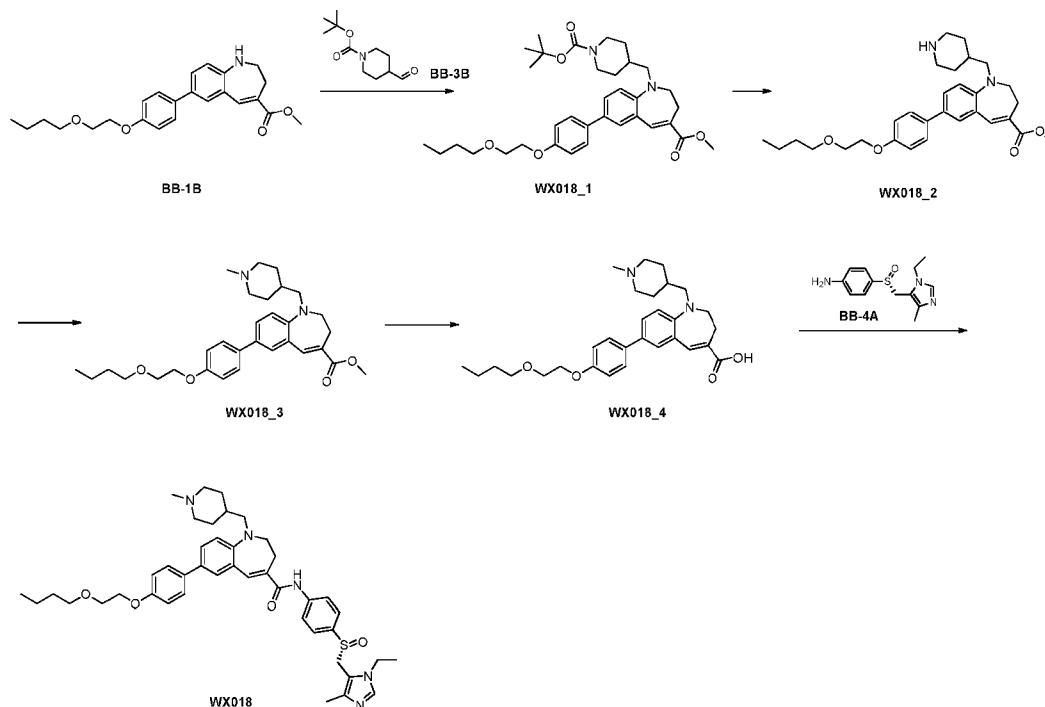
MS-ESI (m/z): 739,90 [M+1]⁺.

¹H-RMN (400M Hz, CDCl₃) δ = 7,92 (br s, 1H), 7,75 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,54 (s, 1H), 7,48 - 7,41 (m, 4H), 7,34 (s, 2H), 7,32 (s, 1H), 6,98 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,84 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,18 - 4,14 (m, 2H), 4,06 (s, 2H), 4,05 - 3,99 (m, 2H), 3,92 - 3,84 (m, 2H), 3,83 - 3,79 (m, 2H), 3,59 - 3,50 (m, 4H), 3,39 (br t, J = 11,0 Hz, 2H), 3,17 (br d, J = 7,0 Hz, 2H), 2,61 (br s, 2H), 2,10 (br s, 1H), 1,72 (br s, 1H), 1,69 (s, 4H), 1,66 - 1,63 (m, 2H), 1,46 - 1,42 (m, 2H), 1,42 - 1,36 (m, 7H), 0,94 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 18



Ruta sintética:

Etapa 1: Síntesis del compuesto **WX018_1**

Se disolvió el compuesto **BB-1B** (200 mg, 937,77 µmoles) en diclorometano (5 mL) a 25 °C para formar una solución. A continuación, se añadieron a la solución los compuestos **BB-3B** (370,88 mg, 937,77 µmoles), cloruro de zinc (63,91 mg, 468,88 µmoles, 21,96 µL) y sulfato de magnesio (225,75 mg, 1,88 mmoles) y se agitó durante 2 horas, seguidos de acetato borohidruro de sodio (596,25 mg, 2,81 mmoles) para formar una solución de reacción. La solución de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 12 h, luego se añadió agua (50 mL) y se extrajo con

diclorometano (30 mL × 2). Las fases orgánicas se combinaron y secaron con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se centrifugó, se separó y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 a 3/1) para obtener **WX018_1** (360 mg).

MS-ESI (m/z): 615,4 [M+23]⁺.

- 5 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,77 (s, 1H), 7,53 (d, J = 2,26 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,53 Hz, 2H), 7,41 (dd, J = 8,78, 2,26 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 8,53 Hz, 2H), 6,88 (d, J = 8,53 Hz, 1H), 4,23 - 4,06 (m, 4H), 3,84 - 3,80 (m, 5H), 3,56 (t, J = 6,65 Hz, 2H), 3,35 - 3,22 (m, 4H), 2,82 (br s, 2H), 2,73 - 2,60 (m, 2H), 1,89 (br s, 1H), 1,74 (br d, J = 12,05 Hz, 2H), 1,66 - 1,59 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,44 - 1,36 (m, 2H), 1,14 (br d, J = 10,54 Hz, 2H), 0,94 (t, J = 7,40 Hz, 3H).

Etapas 2: Síntesis del compuesto **WX018_2**

- 10 El compuesto **WX018_1** (360 mg, 607,32 μmoles) se disolvió en ácido clorhídrico/acetato de etilo (4 M, 5 mL) y se agitó a 25 °C durante 0,5 h para formar una solución de reacción. La solución de reacción se ajustó a pH 8 con una solución saturada de carbonato de sodio, luego se añadió agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (20 mL × 2). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera saturada (20 mL), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron. El filtrado se evaporó para obtener el compuesto **WX018_2** (300 mg).

- 15 Etapas 3: Síntesis del compuesto **WX018_3**

- Se añadió una solución acuosa de formaldehído (45,34 μL, concentración: 37%) a la solución del compuesto **WX018_2** (300 mg, 608,95 μmoles) en metanol (3 mL) y diclorometano (3 mL) y se agitó durante 30 min, luego se añadió acetato borohidrúrico de sodio (193,59 mg, 913,43 μmoles) y se agitó a 25 °C durante 12 h para formar una solución de reacción. Se evaporó la solución de reacción, se añadió agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (20 mL × 2). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera saturada (20 mL) y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, el filtrado se evaporó para obtener el compuesto **WX018_3** (254 mg).

MS-ESI (m/z): 507,1 [M+1]⁺.

Etapas 4: Síntesis del compuesto **WX018_4**

- 25 A 25 °C, se añadió hidróxido de sodio (80,20 mg, 2,01 mmoles) al compuesto **WX018_3** (254 mg, 501,31 μmoles) en etanol (5 mL) y agua (5 mL) y se agitó a 50 °C durante 4 h para formar una solución de reacción. La solución de reacción se evaporó para eliminar el etanol, se ajustó a pH 3 con HCl 3N, se añadió agua (30 mL) y se extrajo con acetato de etilo (30 mL × 2). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera saturada (50 mL), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron. El filtrado se evaporó para obtener el compuesto **WX018_4** (212 mg).

MS-ESI (m/z): 493,0 [M+1]⁺.

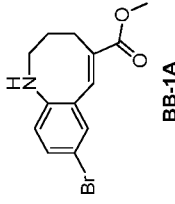
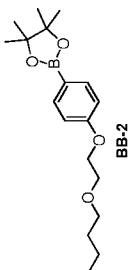
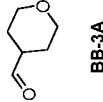
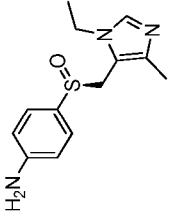
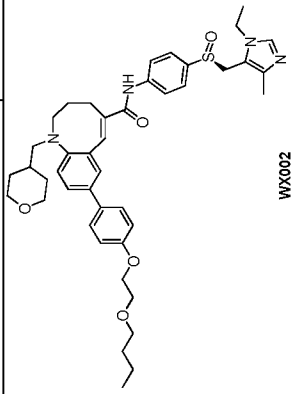
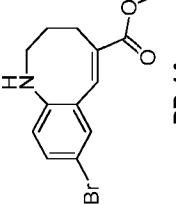
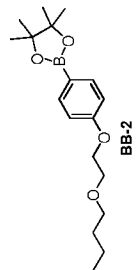
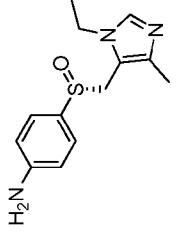
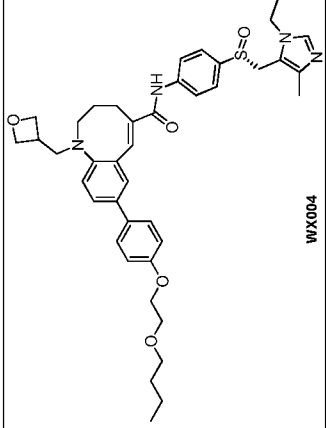
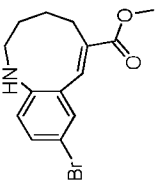
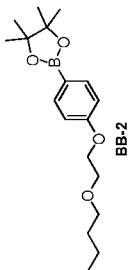
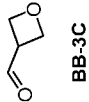
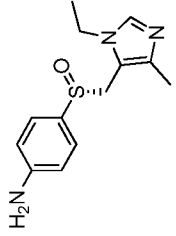
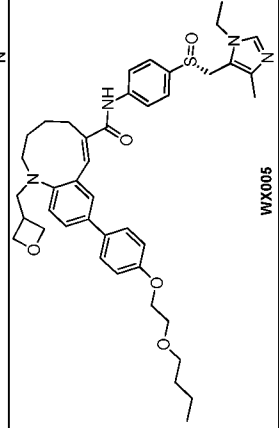
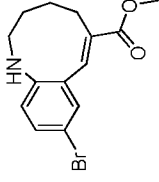
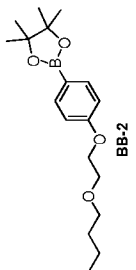
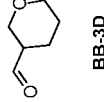
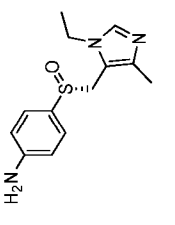
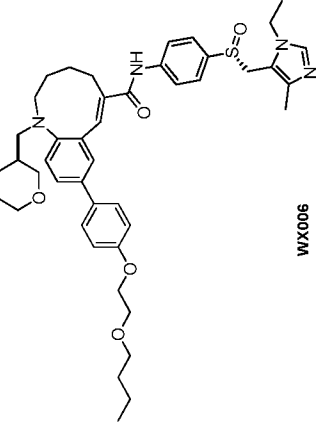
- 30 Etapas 5: Síntesis del compuesto **WX018**

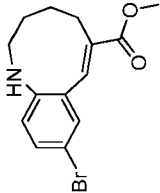
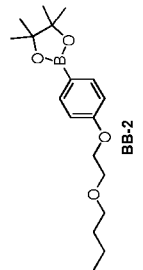
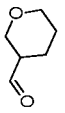
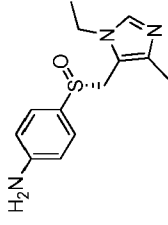
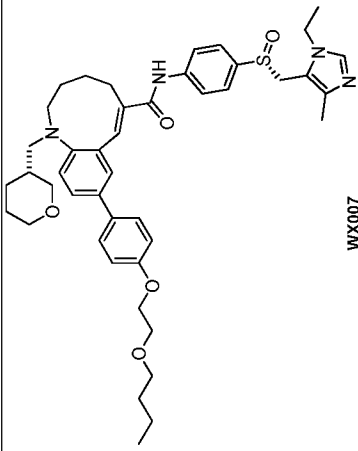
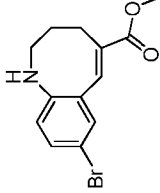
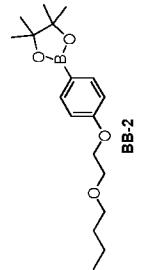
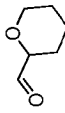
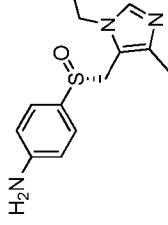
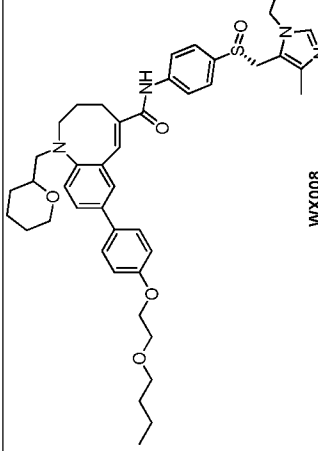
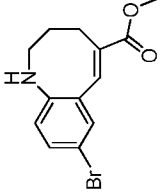
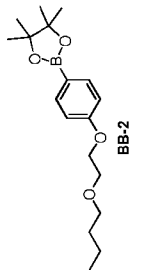
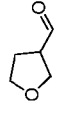
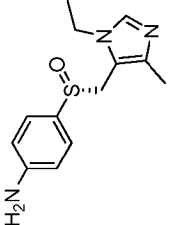
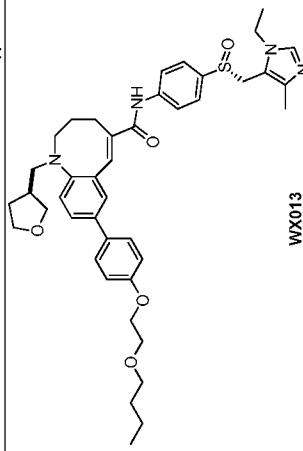
- A 25 °C, se añadió el compuesto **WX018_4** (113,33 mg, 430,33 μmoles) a una solución de **BB-4A** (212 mg, 430,33 μmoles) en piridina (5 mL), y se añadió hidrócloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (82,49 mg, 430,33 μmoles) y se agitó a 60 °C durante 12 h para formar una solución de reacción. A la solución de reacción se añadió agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (20 mL × 2). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera saturada (50 mL), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron y se evaporaron para obtener un producto crudo. El producto crudo se separó y purificó mediante HPLC preparativa (condiciones alcalinas) para dar **WX018** (20 mg).

MS-ESI (m/z): 738,3 [M+1]⁺.

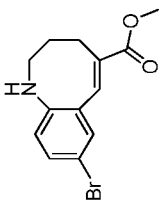
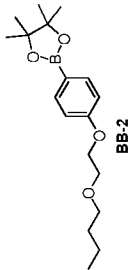
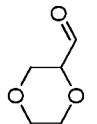
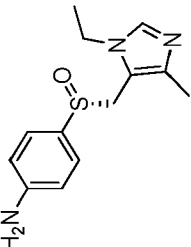
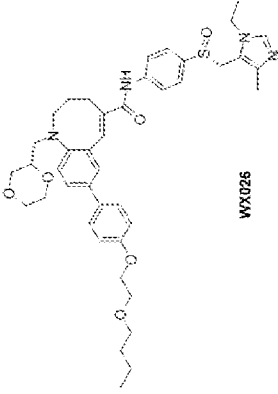
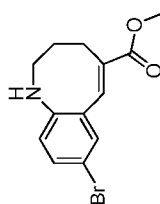
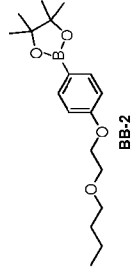
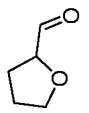
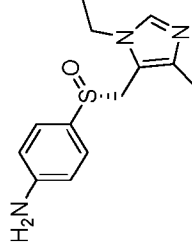
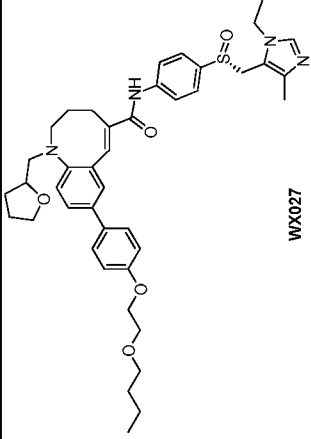
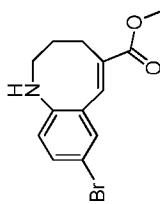
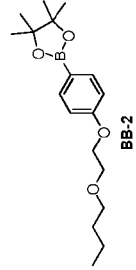
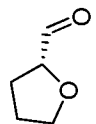
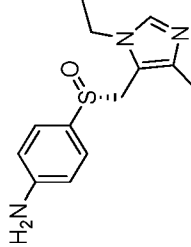
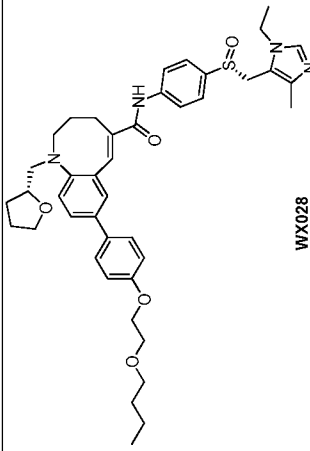
- 40 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,44 (br s, 1H), 7,63 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 7,34 - 7,26 (m, 6H), 7,17 - 7,13 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 6,83 (m, 2H), 6,75 (d, J = 8,53 Hz, 1H), 4,05 - 3,96 (m, 2H), 3,91 - 4,81 (m, 2H), 3,72 - 3,64 (m, 4H), 3,42 (t, J = 6,65 Hz, 2H), 3,21 (br t, J = 4,39 Hz, 2H), 2,13 (s, 2H), 2,80 - 2,70 (m, 4H), 2,13 (s, 3H), 2,03 (br s, 2H), 1,77 (br t, J = 11,17 Hz, 2H), 1,67 - 1,57 (m, 3H), 1,52 - 1,45 (m, 5H), 1,19 (t, J = 7,40 Hz, 5H), 0,80 (t, J = 7,40 Hz, 3H).

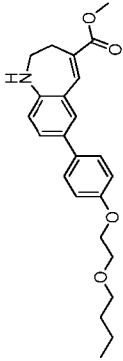
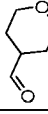
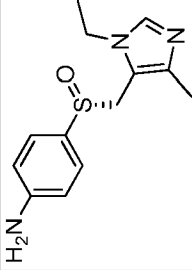
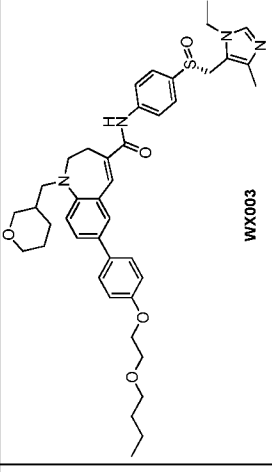
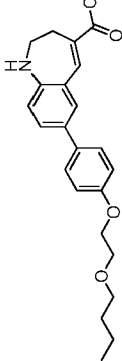
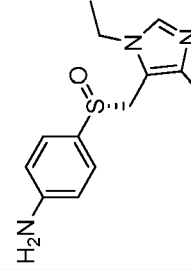
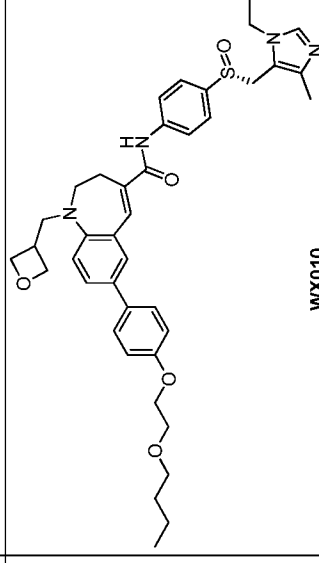
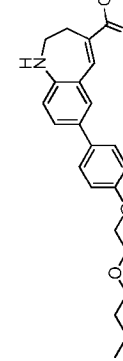
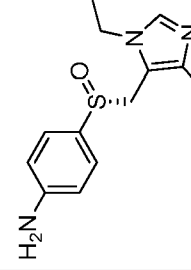
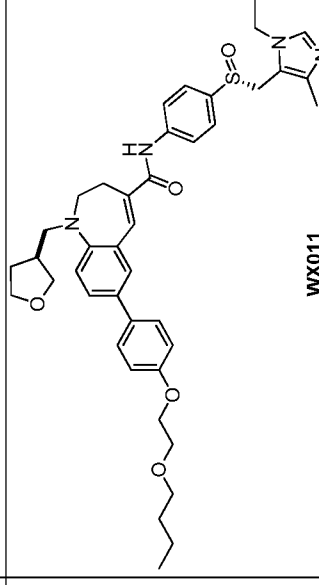
Los compuestos de los Ejemplos en la siguiente tabla se sintetizaron con referencia al método de síntesis de las etapas **BB-1A** a **WX001** en el Ejemplo 1.

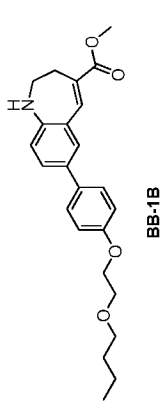
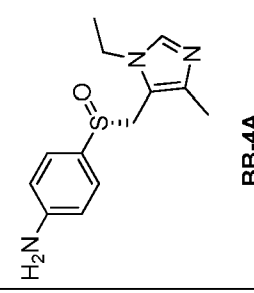
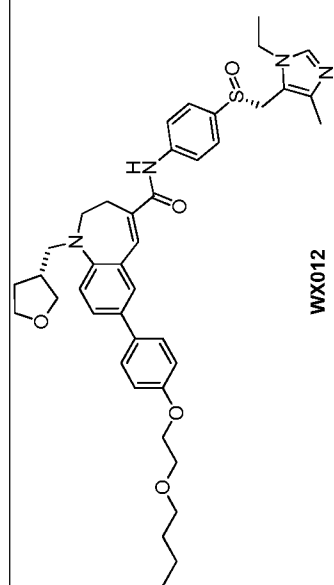
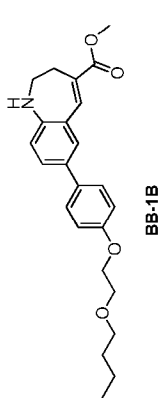
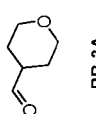
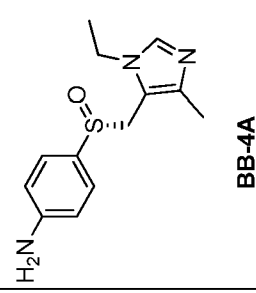
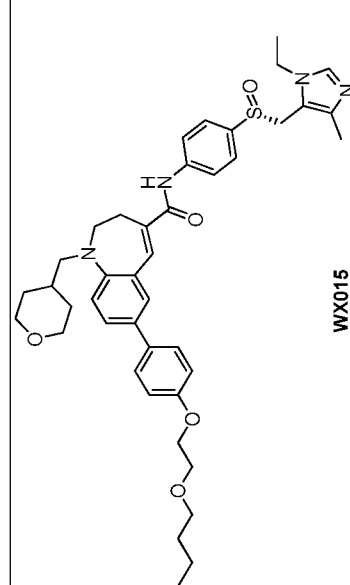
Ejemplos	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Fragmento 4	Estructuras de los Ejemplos y números de los compuestos
2	 BB-1A	 BB-2	 BB-3A	 BB-4B	 WX002
4	 BB-1A	 BB-2	 BB-3C	 BB-4A	 WX004
5	 BB-1C	 BB-2	 BB-3C	 BB-4A	 WX005
6	 BB-1C	 BB-2	 BB-3D	 BB-4A	 WX006

7	 BB-1C	 BB-2	 BB-3D	 BB-4A	 WX007
8	 BB-1A	 BB-2	 BB-3E	 BB-4A	 WX008
13	 BB-1A	 BB-2	 BB-3G	 BB-4A	 WX013

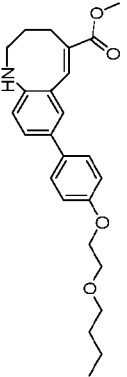
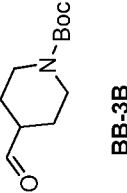
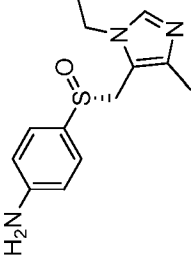
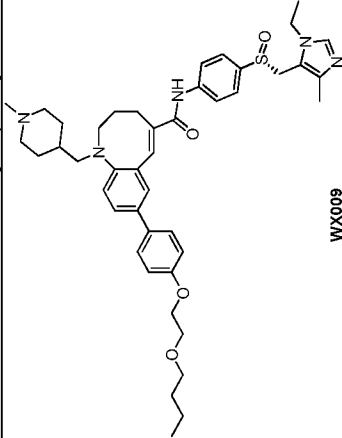
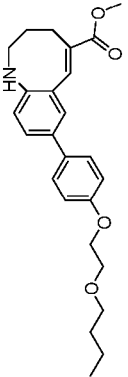
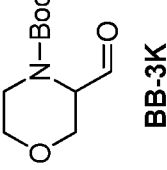
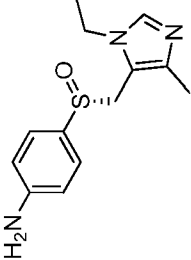
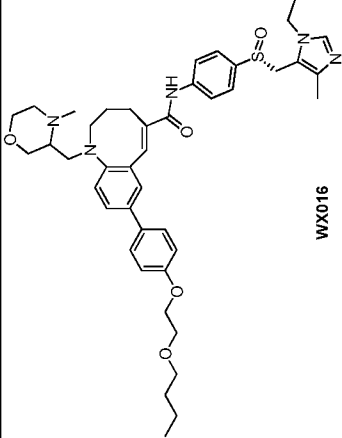
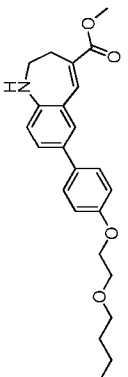
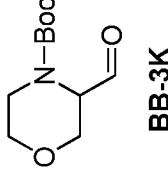
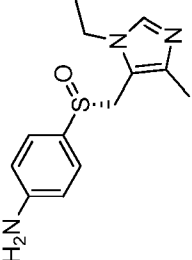
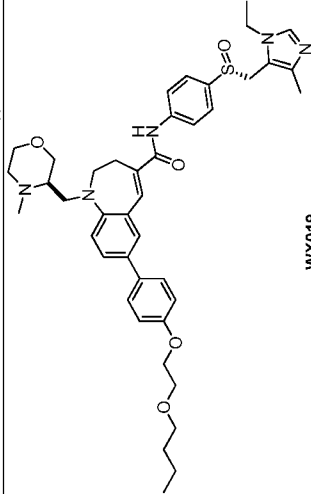
14	BB-1A	BB-2	BB-3G	BB-4A	WX014
17	BB-1A	BB-2	BB-3A	BB-4B	WX017
25	BB-1A	BB-2	BB-3H	BB-4A	WX025

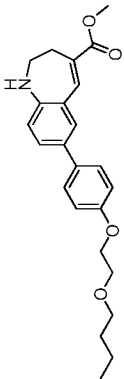
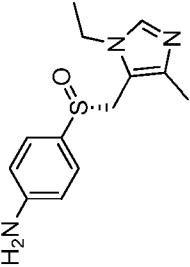
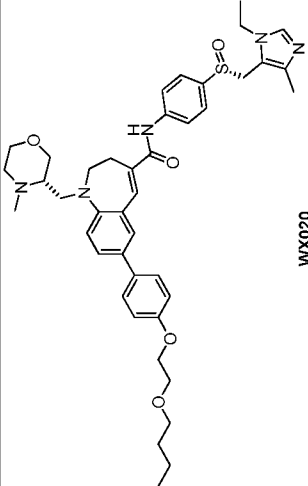
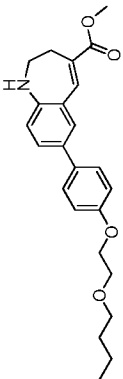
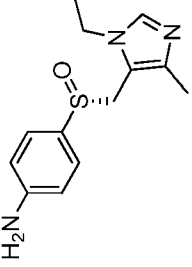
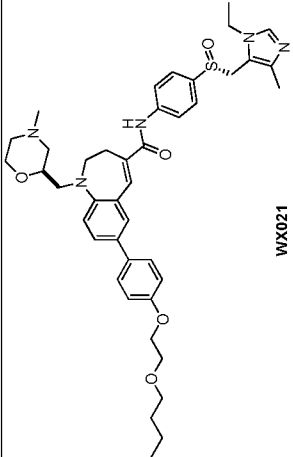
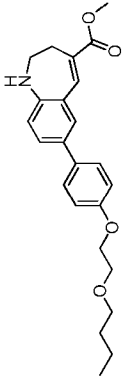
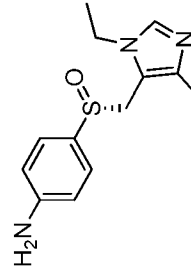
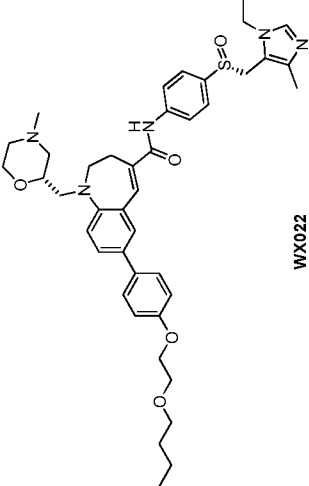
26	 BB-1A	 BB-2	 BB-3H	 BB-4A	 WX026
27	 BB-1A	 BB-2	 BB-3I	 BB-4A	 WX027
28	 BB-1A	 BB-2	 BB-3J	 BB-4A	 WX028

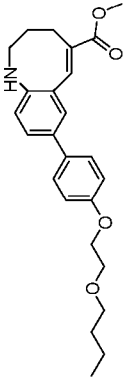
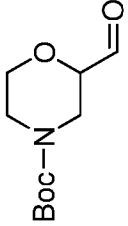
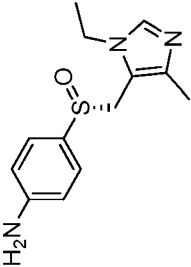
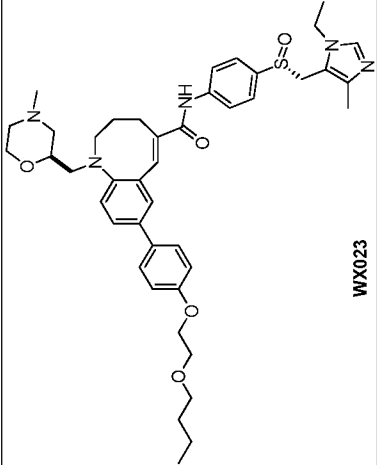
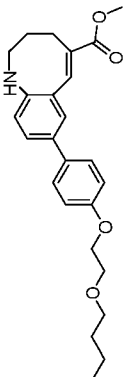
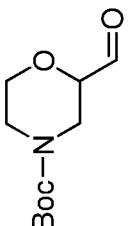
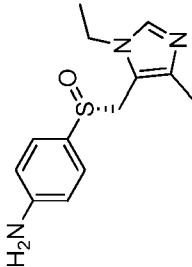
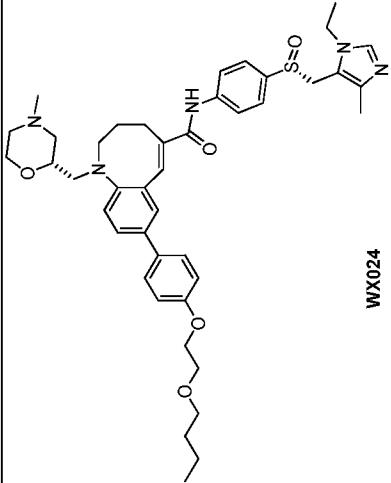
Ejemplos	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Estructuras de los Ejemplos y números de los compuestos
3	 BB-1B	 BB-3A	 BB-4A	 WX003
10	 BB-1B	 BB-3C	 BB-4A	 WX010
11	 BB-1B	 BB-3G	 BB-4A	 WX011

12	 BB-1B	 BB-3G	 BB-4A	 WX012
15	 BB-1B	 BB-3A	 BB-4A	 WX015

Los compuestos de los Ejemplos de la tabla siguiente se sintetizaron con referencia al método de síntesis de las etapas **BB-1B** a **WX018** en el Ejemplo 18.

Ejemplos	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Estructuras de los Ejemplos y números de los compuestos
9	 BB-1A-7	 BB-3B	 BB-4A	 WX009
16	 BB-1A-7	 BB-3K	 BB-4A	 WX016
19	 BB-1B	 BB-3K	 BB-4A	 WX019

20	 BB-1B	 BB-4A	 WX020
21	 BB-1B	 BB-4A	 WX021
22	 BB-1B	 BB-4A	 WX022

23	 BB-1A-7	 BB-3L	 BB-4A	 WX023
24	 BB-1A-7	 BB-3L	 BB-4A	 WX024

Datos de ¹H-RMN y MS en cada uno de los Ejemplos

Ejemplos	Compuesto N ^o	NMR	MS m/z:
2	WX002	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.90 (s, 1H), 7.78 - 7.72 (m, 1H), 7.75 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.48 - 7.40 (m, 4H), 7.35 - 7.33 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.98 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, J=8.8 Hz, 1H), 4.19 - 4.14 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 4.02 (br d, J=11.3 Hz, 2H), 3.92 - 3.84 (m, 2H), 3.84 - 3.79 (m, 2H), 3.58 - 3.50 (m, 4H), 3.39 (br t, J=11.3 Hz, 2H), 3.17 (d, J=6.5 Hz, 2H), 2.64 - 2.56 (m, 2H), 2.10 (br s, 1H), 1.69 (s, 5H), 1.63 (m, 4H), 1.47 - 1.37 (m, 7H), 0.94 (t, J=7.3 Hz, 3H).	739,9
3	WX003	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.81 (s, 1H), 7.74 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.48 - 7.42 (m, 4H), 7.33 (d, J=9.0 Hz, 2H), 6.99 (d, J=8.5 Hz, 2H), 4.17 (t, J=5.1 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.97 (q, J=8.3 Hz, 4H), 3.87 (br d, J=10.3 Hz, 2H), 3.83 - 3.80 (m, 2H), 3.56 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.47 (d, J=6.0 Hz, 2H), 3.43 (br d, J=4.3 Hz, 2H), 2.97 (br s, 1H), 1.82 (br d, J=8.3 Hz, 2H), 1.71 - 1.69 (m, 1H), 1.71 - 1.68 (m, 1H), 1.44 - 1.37 (m, 5H), 1.30 (br s, 2H), 1.26 - 1.26 (m, 3H), 0.96 - 0.92 (m, 3H), 0.89 (br s, 2H).	725,5
4	WX004	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.91 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.42-7.40 (m, 4H), 7.36 (s, 1H), 7.30-7.29 (m, 3H), 6.97-6.95 (m, 2H), 6.89-6.87 (m, 1H), 4.82 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.55 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.15 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.07-3.98 (m, 2H), 3.86-3.78 (m, 4H), 3.57-3.54 (m, 4H), 3.43-3.39 (m, 3H), 2.61 (brs, 2H), 1.65-1.58 (m, 7H), 1.44-1.32 (m, 5H), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H).	711,2
5	WX005	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.72 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.54-7.59 (m, 3H), 7.44 (s, 1H), 7.35-7.32 (m, 5H), 7.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.74 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.45(t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.17 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.90-3.80 (m, 4H), 3.56 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.21 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.10-3.05 (m, 3H), 2.32-2.31 (m, 2H), 1.72-1.65 (m, 5H), 1.64-1.58 (m, 4H), 1.45-1.35 (m, 5H), 0.94 (t, J = 7.2 Hz, 3H).	725,3
6	WX006	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.91 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H), 7.54-7.27 (m, 9H), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.17 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.11-4.02 (m, 2H), 3.88-3.68 (m, 8H), 3.56 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.00-2.61 (m, 5H), 2.01-1.58 (m, 10H), 1.48-1.26 (m, 10H), 0.94 (t, J = 7.2 Hz, 3H).	753,4

7	WX007	¹ H NMR : (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.99 (s, 1H), 7.78 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 2H), 7.52-7.27 (m, 9H), 7.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.04 (brs, 2H), 3.86-3.72 (m, 8H), 3.55 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.96-2.58 (m, 5H), 2.04 (brs, 3H), 1.84-1.35 (m, 17H), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H).	753,4
8	WX008	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.83 ppm (s, 1H), 7.75 (d, J=8.78 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.48 - 7.43 (m, 3H), 7.43 - 7.38 (m, 1H), 7.36 - 7.31 (m, 3H), 6.97 (d, J=8.78 Hz, 2H), 6.86 (d, J=8.78 Hz, 1H), 4.18 - 4.13 (m, 2H), 4.07 (s, 2H), 4.01 (br d, J=14.31 Hz, 1H), 3.91 - 3.83 (m, 2H), 3.83 - 3.79 (m, 2H), 3.73 (br s, 2H), 3.56 (t, J=6.65 Hz, 3H), 3.46 - 3.35 (m, 1H), 3.30 (br d, J=5.27 Hz, 2H), 2.63 - 2.52 (m, 2H), 1.71 (m, 5H), 1.63 (br s, 2H), 1.62 - 1.60 (m, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 2H), 1.42 - 1.35 (m, 5H), 1.26 (s, 2H), 0.94 (t, J=7.40 Hz, 3H).	370, 3(M/2+1) ⁺
9	WX009	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.83 ppm (br s, 1H), 7.86 (br d, J=8.28 Hz, 2H), 7.53 (br s, 1H), 7.45 (br s, 4H), 7.39 (br s, 2H), 7.31 (br d, J=8.03 Hz, 2H), 6.97 (br d, J=8.03 Hz, 2H), 4.15 (br s, 2H), 4.05 (br s, 2H), 3.92 (m, 2H), 3.91 - 3.84 (m, 2H), 3.84 - 3.79 (m, 4H), 3.45 - 3.27 (m, 4H), 2.62 (br s, 5H), 2.48 (br s, 2H), 2.02 (br s, 2H), 1.69 (br s, 3H), 1.61 (br s, 5H), 1.48 - 1.31 (m, 7H), 0.93 (br t, J=7.15 Hz, 3H).	752,3
10	WX010	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.66 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.45-7.38 (m, 6H), 7.27 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.83-4.79 (m, 2H), 4.41 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.05 - 3.95 (m, 2H), 3.85 - 3.79 (m, 4H), 3.71 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 3.55 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.29 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 2.00-1.85 (brs, 1H), 1.65 - 1.58 (m, 5H), 1.44 - 1.31 (m, 5H), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H).	697,1
11	WX011	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.04 (br s, 1H), 7.75 (br d, J=8.3 Hz, 2H), 7.50 (br d, J=11.3 Hz, 2H), 7.45 (br d, J=7.8 Hz, 4H), 7.32 (br d, J=8.0 Hz, 2H), 7.02 - 6.92 (m, 3H), 4.16 (br d, J=4.8 Hz, 2H), 4.05 (br s, 2H), 3.93 - 3.85 (m, 2H), 3.84 - 3.73 (m, 5H), 3.63 (br d, J=8.0 Hz, 2H), 3.56 (br t, J=6.8 Hz, 2H), 3.44 - 3.33 (m, 4H), 2.93 (br s, 2H), 2.72 (br s, 1H), 1.67 (br s, 3H), 1.64 - 1.60 (m, 2H), 1.42 - 1.36 (m, 4H), 1.26 (br s, 2H), 0.94 (br t, J=7.3 Hz, 3H).	711,1
12	WX012	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.74 (br d, J=9.0 Hz, 3H), 7.54 (s, 1H), 7.49 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.44 (s, 2H), 7.34 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.02 - 6.94 (m, 4H), 4.19 - 4.15 (m, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.84 - 3.75 (m, 5H), 3.65 (s, 2H), 3.56 (t, J=6.9 Hz, 2H), 3.39 (br d, J=9.3 Hz, 4H), 2.94 (br s, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.62 (s, 2H), 1.40 (t, J=6.9 Hz, 3H), 1.26 (s, 2H), 0.94 (t, J=7.5 Hz, 3H).	711,5

13	WX013	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.96 (s, 1H), 7.75 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.47 - 7.43 (m, 5H), 7.33 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.00 - 6.94 (m, 3H), 4.19 - 4.14 (m, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.97 (br d, J=4.8 Hz, 2H), 3.87 (br d, J=12.0 Hz, 2H), 3.84 - 3.80 (m, 3H), 3.79 - 3.75 (m, 1H), 3.68 - 3.63 (m, 2H), 3.56 (t, J=6.8 Hz, 2H), 3.49 - 3.43 (m, 2H), 3.31 - 3.24 (m, 2H), 2.71 (br s, 2H), 2.63 (br s, 2H), 2.09 (br d, J=4.5 Hz, 1H), 1.71 (s, 2H), 1.63 (br d, J=7.8 Hz, 4H), 1.41 - 1.37 (m, 3H), 1.26 (s, 2H), 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H).	725,4
14	WX014	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.88 (s, 1H), 7.75 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.49 - 7.43 (m, 5H), 7.38 - 7.31 (m, 3H), 7.01 - 6.94 (m, 3H), 4.18 - 4.14 (m, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.97 (br d, J=5.3 Hz, 2H), 3.87 (br dd, J=4.6, 7.4 Hz, 2H), 3.84 - 3.80 (m, 2H), 3.80 - 3.74 (m, 2H), 3.68 - 3.62 (m, 1H), 3.56 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.45 (br d, J=5.5 Hz, 2H), 3.32 - 3.25 (m, 2H), 2.70 (s, 2H), 2.63 (br s, 2H), 2.11 (br d, J=7.5 Hz, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.67 - 1.61 (m, 4H), 1.39 (s, 3H), 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H).	725,1
15	WX015	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.05 (s, 1H), 7.74 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 6H), 7.31 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.99 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, J=8.5 Hz, 1H), 4.17 (t, J=4.9 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 4.00 (br dd, J=3.4, 11.2 Hz, 2H), 3.90 - 3.79 (m, 4H), 3.56 (t, J=6.8 Hz, 2H), 3.41 - 3.33 (m, 4H), 3.30 (br d, J=7.0 Hz, 2H), 2.92 (br s, 2H), 2.00 (br s, 1H), 1.72 (br s, 2H), 1.66 - 1.57 (m, 5H), 1.46 - 1.28 (m, 7H), 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H).	725,1
16	WX016	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.67 (s, 1H), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.27-7.21 (m, 5H), 7.10-7.08 (m, 3H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.97 (t, J = 4.2 Hz, 2H), 3.81 (dd, J = 23.2, 14.0 Hz, 2H), 3.69-3.58 (m, 6H), 3.52-3.43 (m, 2H), 3.37 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.29-3.09 (m, 3H), 2.97-2.91 (m, 1H), 2.56 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 2.43-2.39 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.23-2.17 (m, 1H), 1.45-1.39 (m, 7H), 1.26-1.19 (m, 2H), 1.14 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.75 (t, J = 7.2 Hz, 3H).	754,3
17	WX017	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.83 (s, 1H), 7.75 (d, J=8.53 Hz, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.50 - 7.41 (m, 4H), 7.33 (d, J=8.78 Hz, 3H), 6.98 (d, J=8.78 Hz, 2H), 6.84 (d, J=8.78 Hz, 1H), 4.16 (d, J=5.52 Hz, 2H), 4.07 (br d, J=5.02 Hz, 4H), 3.89 (br d, J=4.52 Hz, 2H), 3.85 - 3.78 (m, 2H), 3.58 - 3.51 (m, 4H), 3.39 (s, 2H), 3.17 (br d, J=6.78 Hz, 2H), 2.61 (br s, 2H), 2.11 (br s, 1H), 1.69 (s, 5H), 1.64 (br s, 4H), 1.44 - 1.37 (m, 7H), 0.94 (q, J=7.28 Hz, 3H).	739,3

19	WX019	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.67 (br d, J=8.5 Hz, 3H), 7.48 - 7.45 (m, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.40 - 7.35 (m, 4H), 7.27 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.94 - 6.89 (m, 3H), 4.11 - 4.07 (m, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.83 (br s, 1H), 3.78 (d, J=7.5 Hz, 1H), 3.76 - 3.72 (m, 3H), 3.48 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.32 (br s, 2H), 2.90 (br s, 2H), 2.71 (s, 2H), 2.42 (br s, 3H), 1.66 - 1.64 (m, 1H), 1.65 (s, 2H), 1.58 - 1.53 (m, 4H), 1.31 (t, J=7.3 Hz, 5H), 1.20 - 1.17 (m, 4H), 0.88 - 0.85 (m, 3H).	740,4
20	WX020	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.76 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.88 - 7.69 (m, 1H), 7.83 - 7.69 (m, 1H), 7.54 (d, J=9.3 Hz, 1H), 7.51 - 7.43 (m, 5H), 7.34 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.02 - 6.96 (m, 3H), 4.17 (t, J=4.9 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.87 - 3.79 (m, 5H), 3.56 (t, J=6.8 Hz, 2H), 3.40 (br s, 2H), 2.99 (br s, 2H), 2.53 (br s, 1H), 2.59 - 2.45 (m, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.69 - 1.66 (m, 4H), 1.40 (t, J=7.4 Hz, 5H), 1.26 (s, 4H), 0.94 (s, 3H).	740,4
21	WX021	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.85 (s, 1H), 7.74 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.51 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.47 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.45 - 7.41 (m, 3H), 7.33 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.04 - 6.95 (m, 3H), 4.19 - 4.13 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.97 - 3.89 (m, 2H), 3.89 - 3.84 (m, 2H), 3.84 - 3.80 (m, 2H), 3.72 - 3.65 (m, 1H), 3.56 (t, J=6.8 Hz, 2H), 3.53 - 3.45 (m, 2H), 3.44 - 3.36 (m, 2H), 2.93 (br s, 2H), 2.86 - 2.65 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.21 - 2.11 (m, 1H), 1.91 (t, J=10.8 Hz, 1H), 1.70 (s, 3H), 1.65 (br s, 2H), 1.45 - 1.36 (m, 5H), 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H).	740,5
22	WX022	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.81 (s, 1H), 7.74 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.52 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.45 - 7.40 (m, 3H), 7.33 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.03 - 6.97 (m, 3H), 4.17 (t, J=4.9 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.97 - 3.89 (m, 2H), 3.89 - 3.84 (m, 2H), 3.83 - 3.79 (m, 2H), 3.73 - 3.64 (m, 1H), 3.56 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.53 - 3.44 (m, 2H), 3.44 - 3.36 (m, 2H), 2.93 (br s, 2H), 2.82 (br d, J=11.5 Hz, 1H), 2.69 (br d, J=11.8 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.21 - 2.12 (m, 1H), 1.91 (t, J=10.7 Hz, 1H), 1.71 (s, 3H), 1.66 - 1.62 (m, 2H), 1.44 - 1.36 (m, 5H), 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H).	740,5
23	WX023	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.02 (s, 1H), 7.75 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.47 - 7.37 (m, 4H), 7.33 (d, J=8.8 Hz, 3H), 6.97 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, J=8.8 Hz, 1H), 4.18 - 4.14 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.90 (br d, J=13.3 Hz, 2H), 3.85 (dd, J=5.0, 7.3 Hz, 2H), 3.83 - 3.79 (m, 2H), 3.71 - 3.61 (m, 2H), 3.56 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.51 (br d, J=9.3 Hz, 1H), 3.35 - 3.29 (m, 1H), 3.38 - 3.27 (m, 1H), 2.84 (br d, J=10.5 Hz, 1H), 2.67 (br d, J=11.3 Hz, 1H), 2.62 - 2.51 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.16 (dt, J=3.5, 11.4 Hz, 1H), 1.92 (t, J=10.5 Hz, 1H), 1.70 (s, 3H), 1.65 - 1.63 (m, 2H), 1.58 (br s, 2H), 1.44 - 1.36 (m, 5H), 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H).	754,5

24	WX024	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 7.97 (br s, 1H), 7.76 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.47 - 7.38 (m, 4H), 7.33 (d, J=8.5 Hz, 3H), 6.97 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, J=8.8 Hz, 1H), 4.16 (t, J=4.9 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.91 (br d, J=13.3 Hz, 2H), 3.86 (dd, J=5.0, 7.3 Hz, 2H), 3.83 - 3.79 (m, 2H), 3.72 - 3.61 (m, 2H), 3.56 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.50 (br s, 1H), 3.37 - 3.27 (m, 2H), 2.85 (br d, J=9.5 Hz, 1H), 2.68 (br d, J=11.3 Hz, 1H), 2.63 - 2.52 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.20 - 2.13 (m, 1H), 1.92 (t, J=10.9 Hz, 1H), 1.70 (s, 3H), 1.64 (br s, 2H), 1.59 - 1.57 (m, 2H), 1.43 - 1.36 (m, 5H), 0.94 (t, J=7.3 Hz, 3H).	754,5
25	WX025	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.46-8.35 ppm (br s, 1H), 7.68 (d, J=8.53 Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.38-7.29 (m, 4H), 7.22 (d, J=8.53 Hz, 3H), 6.79 (d, J=8.78 Hz, 2H), 6.89 (d, J=8.78 Hz, 1H), 4.08 (t, J=4.89 Hz, 2H), 4.03 - 3.93 (m, 2H), 3.82 - 3.76 (m, 2H), 3.76 - 3.72 (m, 4H), 3.69 - 3.61 (m, 2H), 3.68 - 3.59 (m, 5H), 3.44 - 3.29 (m, 2H), 3.28 - 3.12 (m, 2H), 2.49 (br t, J=5.77 Hz, 2H), 1.60 - 1.48 (m, 7H), 1.37 - 1.31 (m, 2H), 1.30-1.25 (t, J=7.40 Hz, 3H), 0.86 (t, J=7.28 Hz, 3H).	741, 4
26	WX026	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.70 ppm (br s, 1H), 7.77 (d, J=8.53 Hz, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.45 - 7.35 (m, 4H), 7.29 (d, J=8.53 Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.96 (d, J=8.78 Hz, 3H), 6.86 (d, J=8.78 Hz, 1H), 4.15 (t, J=4.89 Hz, 2H), 4.10 - 3.99 (m, 2H), 3.89 - 3.83 (m, 2H), 3.83 - 3.79 (m, 4H), 3.76 - 3.68 (m, 2H), 3.68 - 3.59 (m, 5H), 3.53 - 3.37 (m, 1H), 3.34 - 3.20 (m, 2H), 2.56 (br t, J=5.77 Hz, 2H), 1.66 - 1.56 (m, 7H), 1.46 - 1.36 (m, 2H), 1.34 (t, J=7.40 Hz, 3H), 0.94 (t, J=7.28 Hz, 3H).	741,3
27	WX027	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.13 (br s, 1H), 7.76 (d, J=8.53 Hz, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.48 - 7.37 (m, 4H), 7.32 (d, J=8.78 Hz, 3H), 7.01 - 6.89 (m, 3H), 4.27-12 (br s, 3H), 4.06 (m, 2H), 3.98 - 3.89 (m, 1H), 3.89 - 3.74 (m, 5H), 3.70 (m, 1H), 3.56 (t, J=6.78 Hz, 3H), 3.47 - 3.28 (m, 2H), 2.59 (br s, 2H), 2.28-2.05 (m, 1H), 2.03 - 1.81 (m, 2H), 1.69 (br s, 3H), 1.64 - 1.56 (m, 5H), 1.44 - 1.33 (m, 5H), 0.94 (t, J=7.28 Hz, 3H).	725,4
28	WX028	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ ppm 8.29 (br s, 1H), 7.76 (d, J=8.53 Hz, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.48 - 7.36 (m, 4H), 7.31 (br d, J=8.78 Hz, 3H), 7.01 - 6.89 (m, 3H), 4.22 (br s, 1H), 4.19 - 4.11 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.98 - 3.89 (m, 1H), 3.88 - 3.74 (m, 5H), 3.74 - 3.63 (m, 1H), 3.62 - 3.49 (m, 3H), 3.49 - 3.31 (m, 2H), 2.59 (br s, 2H), 2.11 (br d, J=6.78 Hz, 1H), 2.03 - 1.81 (m, 2H), 1.68 (br s, 3H), 1.64 - 1.56 (m, 5H), 1.44 - 1.33 (m, 5H), 0.94 (t, J=7.28 Hz, 3H).	725,4

Ejemplo experimental 1: Ensayo in vitro CCR2/CCR5

Propósito:

Los cambios en la señalización intracelular del calcio se detectaron utilizando el ensayo de detección de calcio FLIPR, y el valor IC₅₀ del compuesto se utilizó como indicador para evaluar su efecto inhibitorio sobre los receptores CCR2 y CCR5.

5 Materiales experimentales:

1. Líneas celulares: se sembraron células y se incubaron durante la noche en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂.

Densidad de CCR2/CCR5: 1 M (20K / pocillo)

Línea celular	Número de clones	Generación celular	Célula huésped
CCR2	C7	P6	HEK293
CCR5	C13	P4	HEK293

2. Reactivos: Fluo-4 Direct, (Invitrogen, N° Cat f10471)

10 3. Dispositivos y equipos:

384 placas celulares recubiertas con polilisina (Greiner N° 781946)

Placas compuestas de 384 pocillos (Greiner N° 781280)

FLIPR, un dispositivo molecular

Echo Labcyte

15 4. Compuesto:

El compuesto se disolvió en DMSO para preparar una solución 10 mM y la solución del compuesto se colocó en una caja de gas nitrógeno.

ID compuesto ID	Pureza	Peso del compuesto (mg)
CENICRIROC (CVC)	97,00	1,15

Compuesto antagonista de referencia:

MCP-1	Sigma	SRP3109	Disolución madre 10 µM en H ₂ O
Rantes	Sigma	SRP3269	Disolución madre 10 µM en H ₂ O

20

Etapas experimentales y métodos:

Preparación de probenecid en tampón de ensayo FLIPR: Se añadió 1 mL de tampón de ensayo FLIPR a 77 mg de probenecid para preparar una solución 250 mM. La solución de 250 mM se preparó diariamente.

Tampón de carga Fluo-4 Direct™ 2 × (8 µM) (por 10 mL)

25 Se descongeló un frasco de cristal de Fluo-4 Direct™ (F10471).

Se añadieron 10 mL de tampón de ensayo FLIPR a un frasco de muestra.

Se añadieron 0,2 mL de probenecid por cada 10 mL de Fluo-Direct. La concentración final medida fue de 2,5 mM,

Se rotó y se dejó reposar durante > 5 minutos (protegiendo de la luz)

Se preparó cada día.

30 Etapas experimentales:

a) Preparación de un compuesto agonista:

Se diluyó en serie MCP-1 en tampón de ensayo FLIPR a partir de 0,5 µM en una relación de dilución de 1: 2 para un

total de 10 gradientes (concentración final de 100 nM). RANTES se diluyó en serie en el tampón de ensayo FLIPR a partir de 0,5 µM en una relación de dilución de 1:3 para un total de 10 gradientes (concentración final de 100 nM). De acuerdo con el mapa de la placa de compuestos, se añadieron 20 µL de tampón de compuesto diluido en serie a cada pocillo de la placa DRC.

- 5 b) Preparación de compuesto antagonista: compuesto antagonista de referencia

El compuesto estándar se diluyó en serie con DMSO a una relación de dilución de 1:3 partiendo de 1 mM y un total de 11 gradientes. El compuesto de ensayo se diluyó en serie con DMSO en una relación de 1:3 partiendo de 2 mM y un total de 11 gradientes. Se transfirieron 250 nL de la solución del compuesto a la placa de cultivos celulares (Greiner N° 781946) usando Echo.

- 10 c) Se retira la placa de cultivos celulares de la incubadora y usando una pipeta se distribuye suavemente 20 µL de tampón de carga Fluo-4 Direct de no lavado 2 x en cada pocillo de la placa de cultivos celulares de 384 pocillos para obtener un volumen final de 40 µL por pocillo.

d) Se incuba a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 50 minutos, y a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- 15 e) Se retira la placa de cultivos celulares de la incubadora y se coloca en el FLIPR, y se pone la placa compuesta y la caja de puntas en el FLIPR.

f) Para el tablero de DRC:

1) Ejecutar el programa en FLIPRTETRA

2) Leer la señal de fluorescencia

3) Transferir 10 µL del compuesto de la placa DRC a la placa de cultivos celulares

20 4) Leer la señal de fluorescencia

5) Calcular usando FLIPR desde Read 90 hasta el valor máximo permisible "max-min" y calcular el valor EC80 para cada línea celular.

6) Preparación del compuesto agonista de referencia en una concentración del 5 × EC80 g para la placa compuesta (1-add):

25 1) Ejecutar el programa en FLIPRTETRA

2) Transferir 10 µL del compuesto agonista de referencia en una concentración de 5 × EC80 de la placa compuesta a la placa de cultivos celulares.

3) Leer la señal de fluorescencia.

4) Calcular desde Read 90 hasta el máximo permisible "máximo-mínimo".

- 30 h) Analizar de los datos y calcular el valor IC₅₀ del compuesto mediante el uso de Prism.

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del ensayo IC₅₀ (nM) para la detección por FLIPR

Números de los compuestos	CCR2	CCR5	Números de los compuestos	CCR2	CCR5
WX001	1,33	4,25	WX015	7,65	5,62
WX002	3	8,15	WX016	3,9	4,12
WX003	37	8,27	WX017	2,47	1,7
WX004	3,04	6,3	WX018	17,9	3,35
WX005	9,2	4,2	WX019	4,97	0,65
WX006	7,51	8,44	WX020	18,1	6,99
WX007	6,76	6,18	WX021	48,9	15,7
WX008	3,4	6,04	WX022	21	10,3
WX009	4,38	6,78	WX023	2,62	2,45

WX010	7,48	7,33	WX024	1,59	0,76
WX011	6,82	4,33	WX025	0,69	1,38
WX012	6,19	3,29	WX026	0,69	1,37
WX013	3,11	5,45	WX027	0,41	1,44
WX014	3,78	6,28	WX028	1,19	3,15

Conclusión: Los compuestos de la invención tienen efectos antagonistas significativos sobre los receptores CCR2 y CCR5.

Ejemplo experimental 2. Inhibición de la actividad de las isoenzimas (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4) del citocromo P450 microsomal del hígado de ser humano

- 5 Un total de 5 sustratos sonda específicos de 5 isoenzimas CYP, que son fenacetina (Fenacetina, CYP1A2), diclofenaco (Diclofenaco, CYP2C9), (S)-mefenitoína ((S)-MeFenitoína, CYP2C19), dextrometorfano (CYP2D6) y midazolam (Midazolam, CYP3A4), se incubaron con microsomas hepáticos de ser humano respectivamente. A continuación, se añadió nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) reducido para iniciar la reacción. Después de la reacción, la muestra se procesó y se detectaron cuantitativamente las concentraciones de los cinco metabolitos producidos a partir del sustrato específico, acetaminofén (AcetaminoFén), 4'-hidroxiciclofenaco (4'-hidroxiciclofenaco), 4'-hidroximefenitoína (4'-hidroximefenitoína), dextrofrano (Dextrofrano) y 1'-hidroximidazolam (1'-hidroximidazolam) mediante el método de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con cuadrupolo (LC-MS/MS) para calcular la concentración inhibidora media correspondiente (IC₅₀).

Tabla 2. Concentraciones inhibidoras medias de compuestos

Números de los compuestos	IC ₅₀ (μM)				
	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4-M
Compuesto de referencia (CVC)	>50	>50	>50	>50	0,75
Referencia A	>50	>50	>50	>50	0,786
WX001	>50	>50	1,42	>50	>50
WX002	>50	10,9	>50	>50	13,3
WX011	>50	22,8	>50	>50	>50

- 15 Conclusión: WX002 y WX011 no presentan ningún riesgo de inhibición de la actividad de las isoenzimas del citocromo P450 microsomal del hígado de ser humano (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4). Los fármacos en cuyo metabolismo está implicado CYP2C19 representan solo el 2% de los fármacos en el mercado, mientras que los fármacos en cuyo metabolismo está implicado CYP3A representan el 50% de los fármacos en el mercado. El compuesto de referencia y la referencia A tienen un fuerte efecto inhibidor sobre CYP3A4, lo que se refleja en la práctica clínica de inhibir el CYP3A4 para aumentar la exposición a otros fármacos metabolizados por el CYP3A4 y, por lo tanto, tienen un riesgo potencial de seguridad, es decir, interacciones fármaco-fármaco. WX001 no tiene ningún efecto inhibidor sobre CYP3A4, que es la principal enzima metabólica del metabolismo de los fármacos, evitando así la aparición de tales riesgos.

- 25 Ejemplo experimental 3. Actividad antitumoral de compuestos de la invención en modelos tumorales animales in vivo

Propósito:

En un modelo tumoral de cáncer colorrectal MC38 de ratón se investigó el efecto antitumoral de los compuestos de la invención en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 en ratón (RMP1-14, Bioxcell, número de catálogo: BP0146).

Método experimental:

- 30 Se inocularon subcutáneamente ratones hembra C57BL/6 con la línea celular de cáncer colorrectal MC38 en ratones y se agruparon aleatoriamente según su peso corporal después de la inoculación. La dosificación se llevó a cabo como se describe a continuación.

- 35 Grupo 1 (grupo control): el vehículo 1 (5% DMSO/95% (10% HP-β-CD: β-ciclodextrina)) se administró por vía intragástrica dos veces al día en una dosis de 0,1 mL por 10 g de peso corporal, a partir de la tarde del día de la inoculación. El vehículo 2 (DPBS: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) se administró por inyección intraperitoneal los días 11, 14 y 18 después de la inoculación en una dosis de 0,1 mL por 10 g de peso corporal.

Grupo 2: El anticuerpo anti-PD-1 de ratón (RMP1-14) se inyectó una vez mediante inyección intraperitoneal los días 11, 14 y 18 después de la inoculación. La dosis fue de 3 mg/kg de peso corporal el día 11 y de 6 mg/kg de peso corporal los días 14 y 18.

5 Grupo 3: Se administró CVC (Cenicriviroc) (disuelto en 5% DMSO + 95% (10% HP- β -CD), pH 4) por vía intragástrica dos veces al día en una dosis de 100 mg/kg de peso corporal, a partir de la tarde del día de la inoculación. El anticuerpo anti-PD-1 de ratón (RMP1-14) se administró por inyección intraperitoneal los días 11, 14 y 18 después de la inoculación. La dosis fue de 3 mg/kg de peso corporal el día 11 y de 6 mg/kg de peso corporal los días 14 y 18.

10 Grupo 4: Se administró WX001 (disuelto en 5% DMSO + 95% (10% HP- β -CD), pH 4) por vía intragástrica dos veces al día en una dosis de 100 mg/kg de peso corporal, a partir de la tarde del día de la inoculación. El anticuerpo anti-PD-1 de ratón (RMP1-14) se administró por inyección intraperitoneal una vez los días 11, 14 y 18 después de la inoculación. La dosis fue de 3 mg/kg de peso corporal el día 11 y de 6 mg/kg de peso corporal los días 14 y 18.

15 Durante el experimento, los ratones se pesaron tres veces por semana. Después de la formación del tumor, el volumen tumoral se midió tres veces por semana sincrónicamente con el pesaje del peso corporal. El volumen tumoral se calculó según la fórmula "largo x ancho²/5,08 cm (2)". La tasa de proliferación tumoral y la tasa de inhibición tumoral se calcularon de acuerdo con las siguientes fórmulas: tasa de proliferación tumoral = volumen tumoral en el grupo de tratamiento / volumen tumoral en el grupo control $\times$ 100%; tasa de inhibición tumoral = (volumen tumoral en el grupo de control - volumen tumoral del grupo de tratamiento)/volumen tumoral en el grupo de control.

Para el análisis estadístico entre los grupos se utilizó la prueba t de Student y se consideró como diferencia significativa $p < 0,05$.

20 Resultados experimentales:

Tabla 3. Relación de proliferación tumoral en cada uno de los grupos

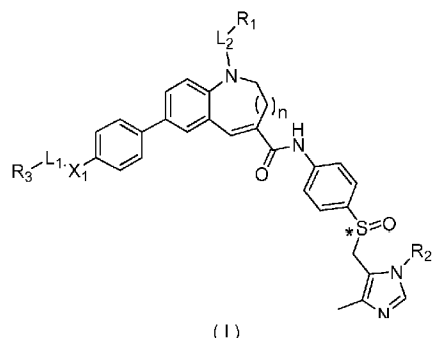
Grupo	Relación de proliferación tumoral
Grupo de anticuerpos anti-PD-1	49,40%
Grupo de combinación CVC + PD-1	52,58%
Grupo de combinación WX001 + PD-1	25,42%

En la Figura 1 se muestra el efecto de WX001 sobre el volumen tumoral en un modelo tumoral de cáncer de colon MC38 de ratón.

25 Conclusión experimental: En el modelo tumoral MC38 de ratón, el grupo de combinación WX001+PD-1 tuvo una eficacia mejorada significativa en comparación con el grupo que solo usaba PD-1. La tasa de proliferación tumoral el día 31 fue 25,42% ($p < 0,01$ en comparación con el grupo vehículo; $p < 0,01$ en comparación con el grupo de combinación CVC+PD-1).

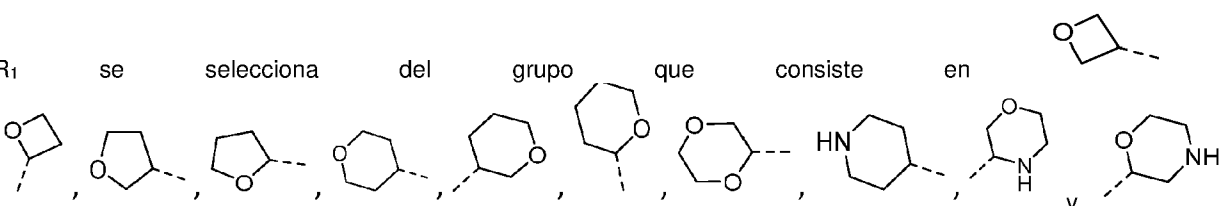
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I), o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables,

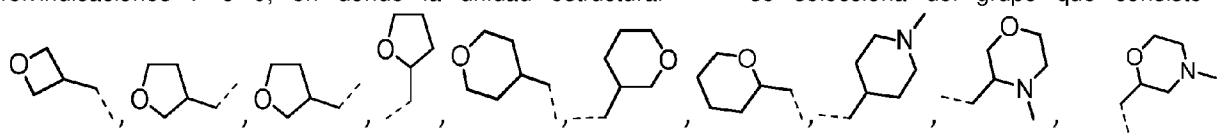


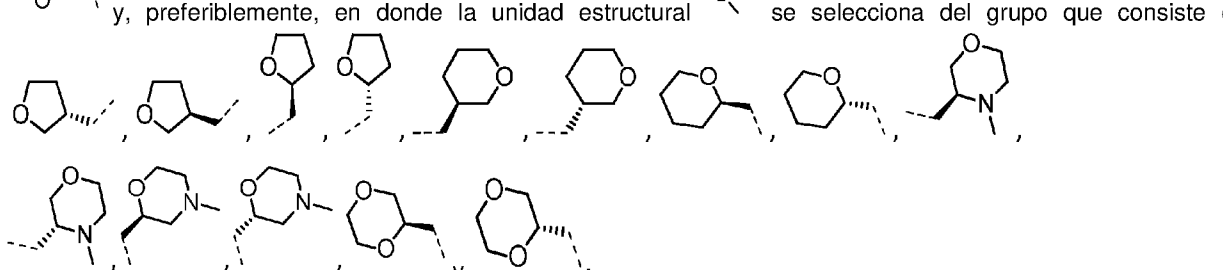
en donde,

- 5 n se selecciona del grupo que consiste en 1, 2 y 3;
 R₁ es heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_a;
 R₂ es un alquilo C₁₋₆, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_b;
 R₃ es un alcoxi C₁₋₆, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_c;
 X₁ es selecciona del grupo que consiste en O, S y -NH-;
- 10 L₁ es -(CRR)_m-;
 L₂ es -CRR-;
 m se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3 y 4;
 R_a, R_b y R_c se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, NH₂, CN, y CH₃;
 Cada R se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, NH₂, CN, y CH;
- 15 El heterocicloalquilo de 4 a 6 miembros comprende 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos o grupos de heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en -NH-, -O-, -S- y N; en donde sus isómeros son isómeros geométricos o estereoisómeros; y el átomo de azufre con "*" es un átomo de azufre quiral que existe como un único enantiómero (R) o (S) o está enriquecido en uno de los enantiómeros.
- 20 2. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, en donde R₂ es un grupo alquilo C₁₋₃, puede estar opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_b y, preferiblemente, en donde R₂ es CH₂CH₃.
3. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1 ó 2, en donde R₃ es un grupo alcoxi C₄₋₆, que está opcionalmente sustituido por 1, 2 ó 3 R_c.
- 25 4. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 3, en donde R₃ es
5. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según las reivindicaciones 1 ó 2 ó 4, en donde L₁ es -CH₂CH₂-.
6. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la unidad estructural es
- 30 7. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, en donde L₂ es -CH₂-.
8. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 7, en donde R₁ se selecciona del grupo que consiste en oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, hexapiridilo, morfolinilo y dioxanilo, que están opcionalmente sustituidos por 1, 2 ó 3 R_a.
- 35 9. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 8, en donde

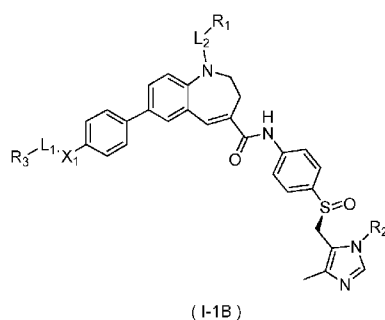
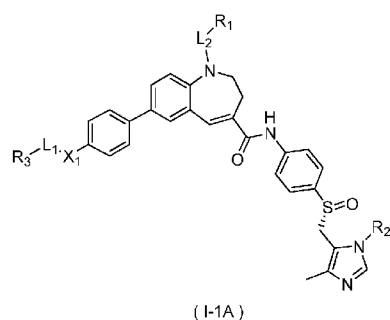
R₁ se selecciona del grupo que consiste en ,
que están opcionalmente sustituidos por 1, 2 ó 3 R_a.

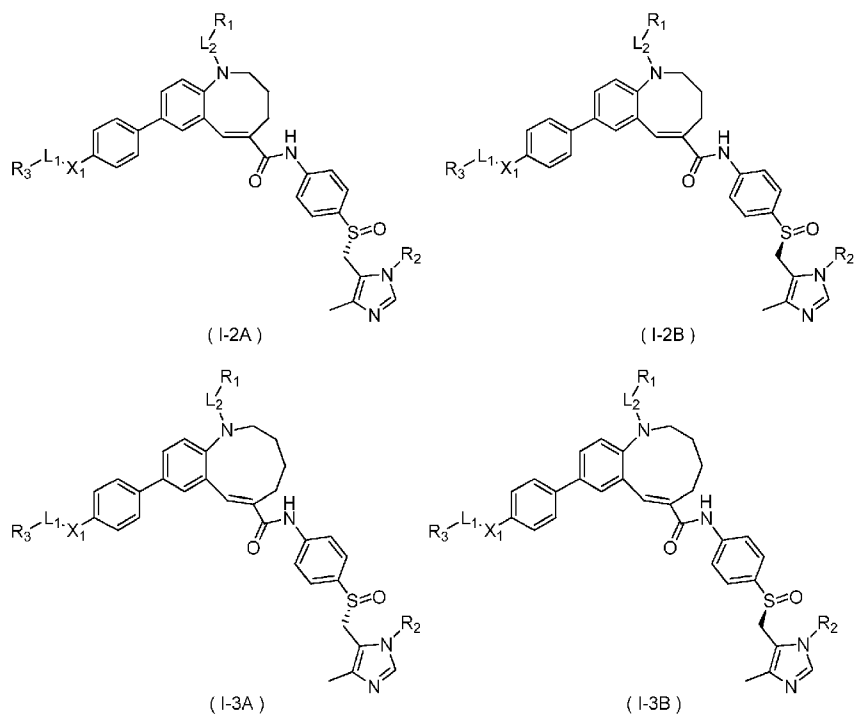
10. Un compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las

5 reivindicaciones 7 ó 9, en donde la unidad estructural  se selecciona del grupo que consiste en 

y, preferiblemente, en donde la unidad estructural  se selecciona del grupo que consiste en 

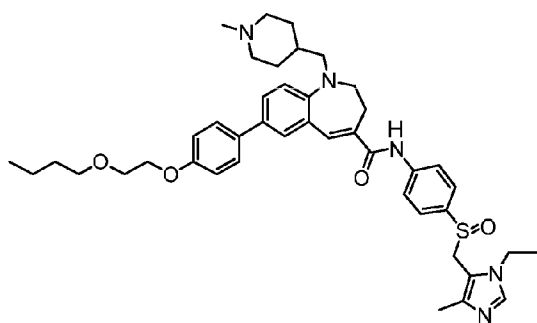
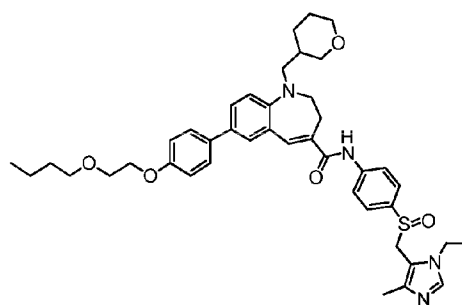
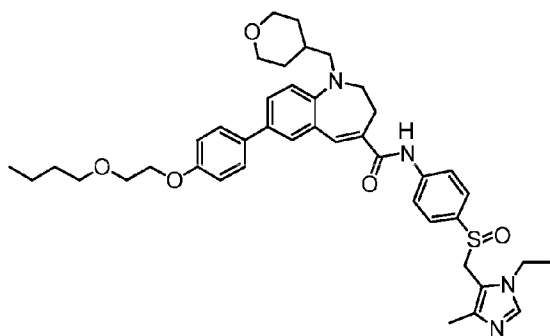
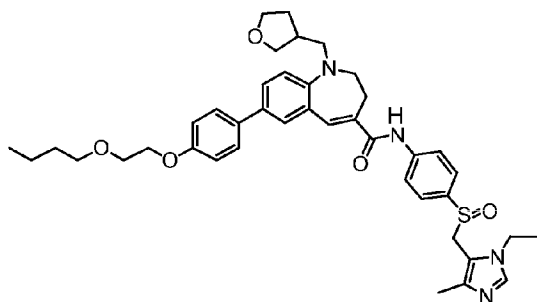
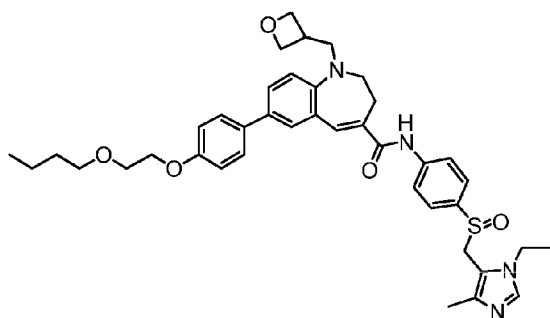
10 11. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en

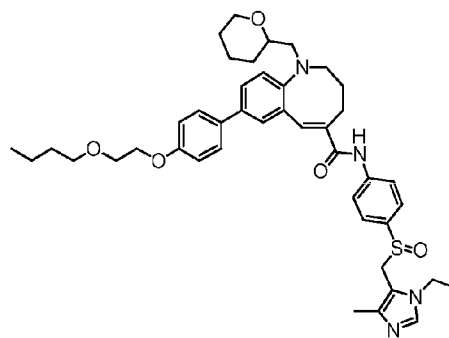
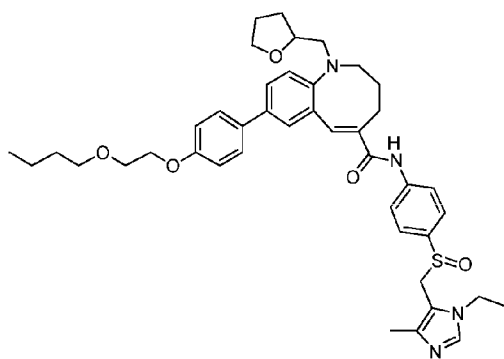
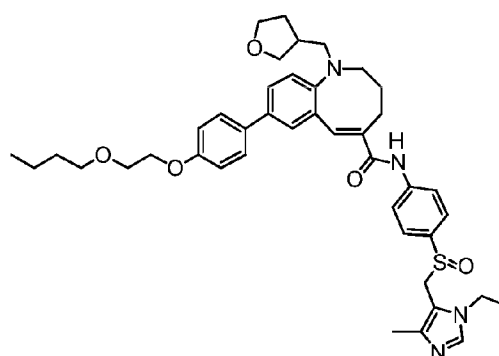
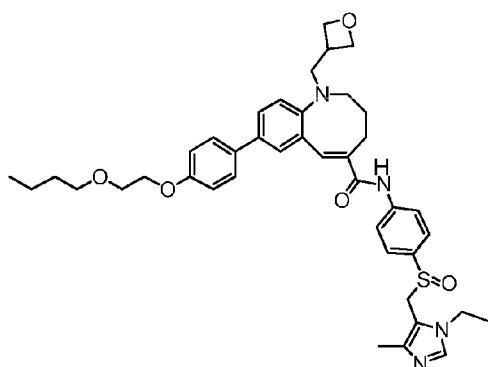
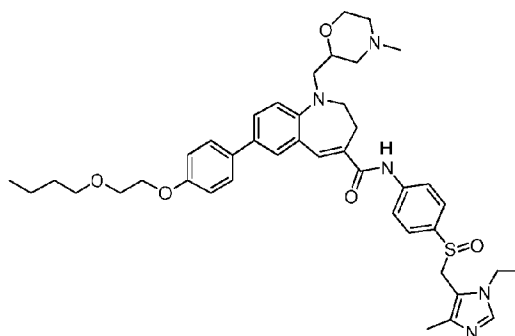
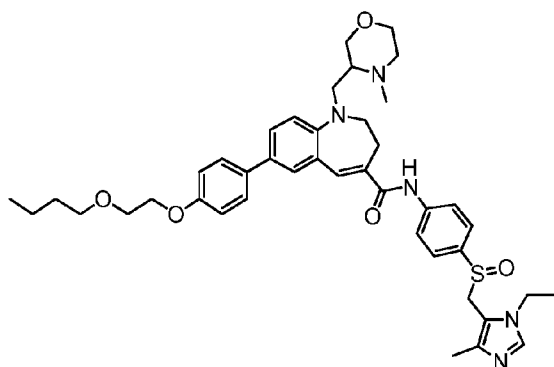


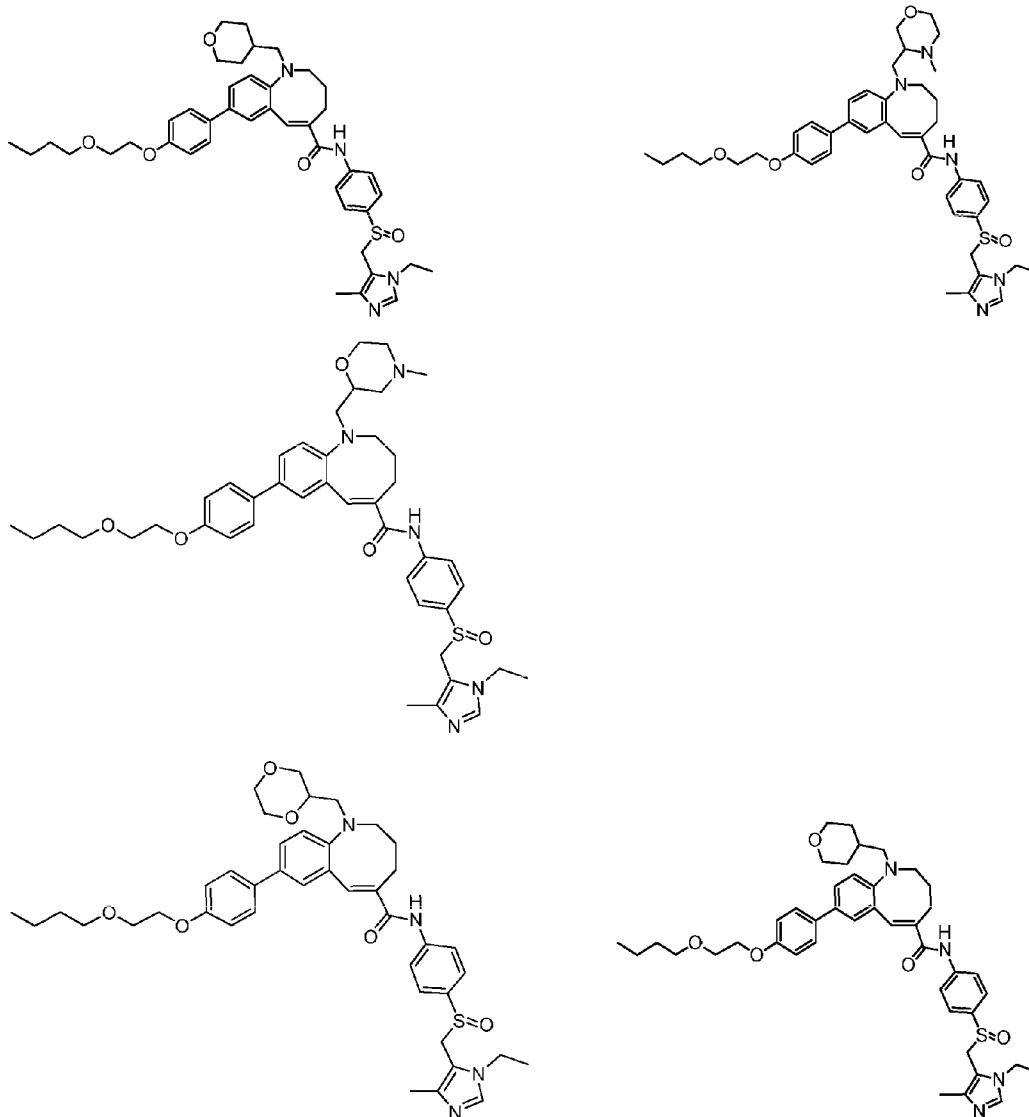


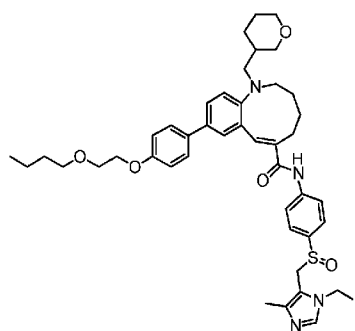
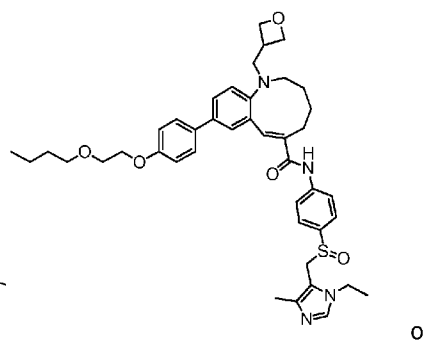
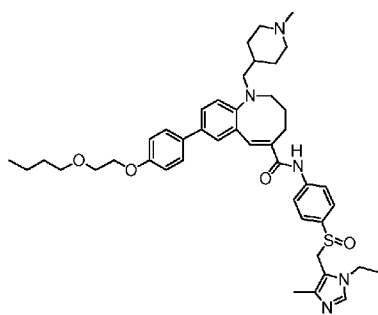
en donde, R₁, R₂, R₃, X₁, L₁, L₂ se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Un compuesto según la reivindicación 1, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables de la siguiente fórmula:

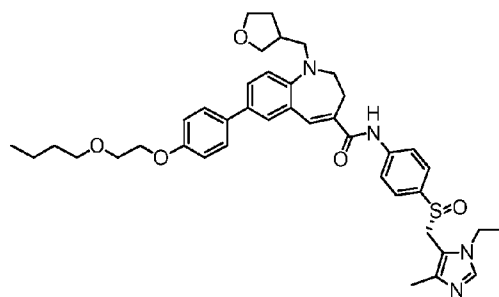
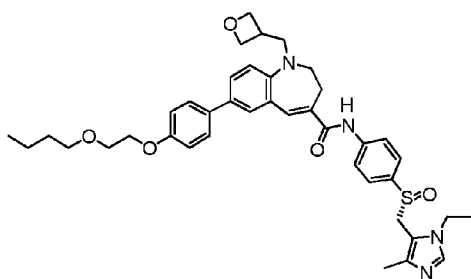


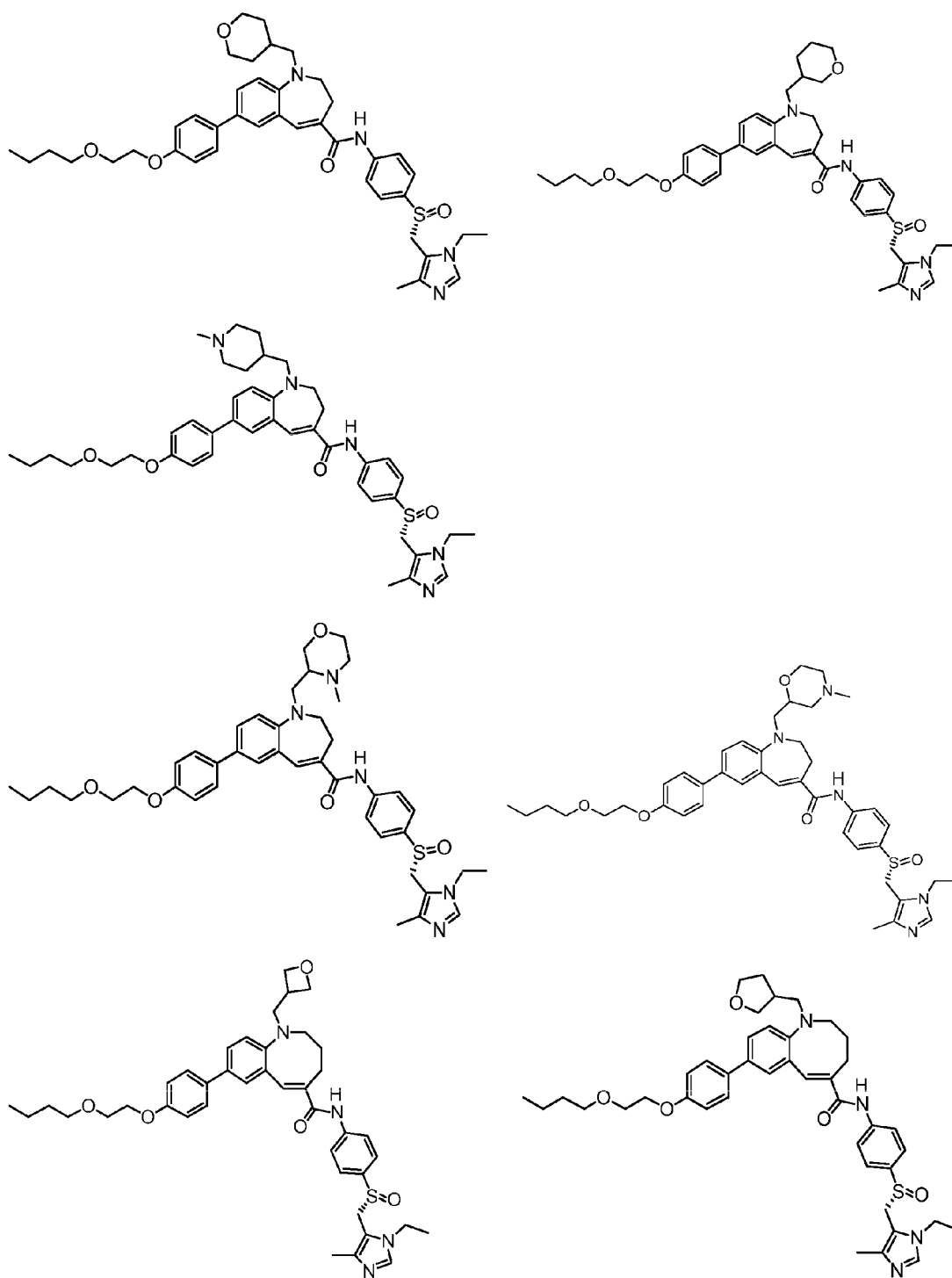


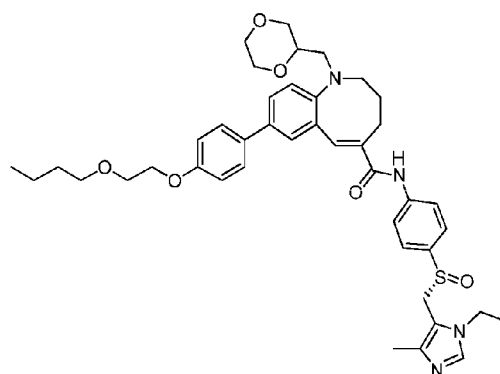
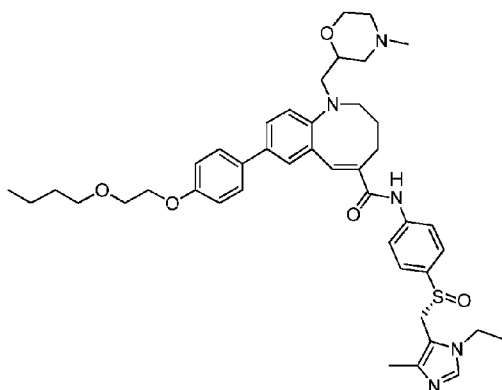
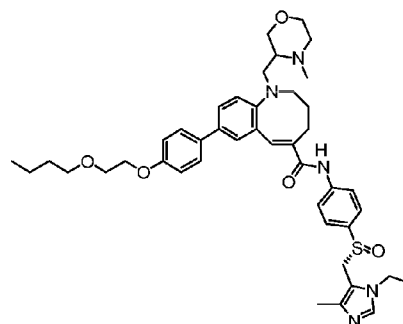
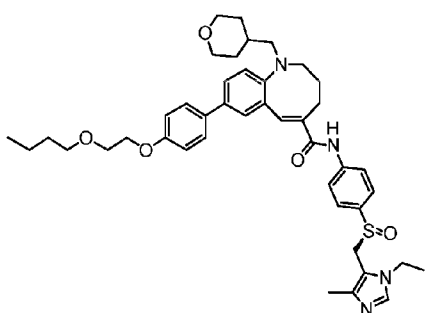
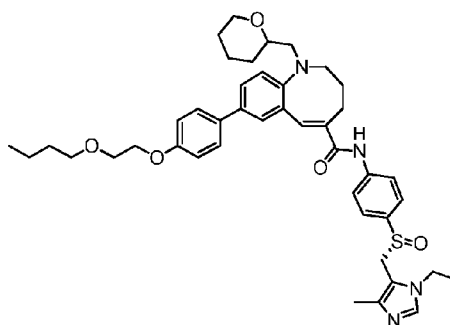
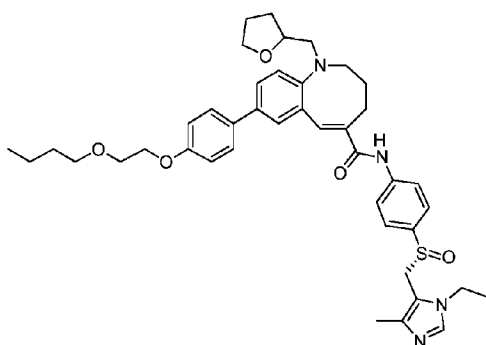


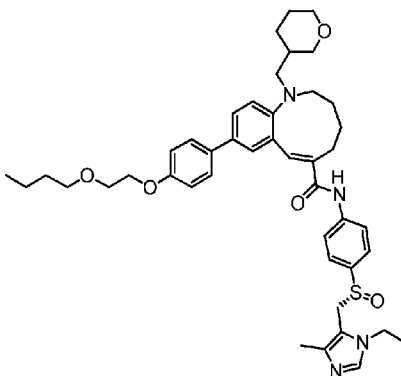
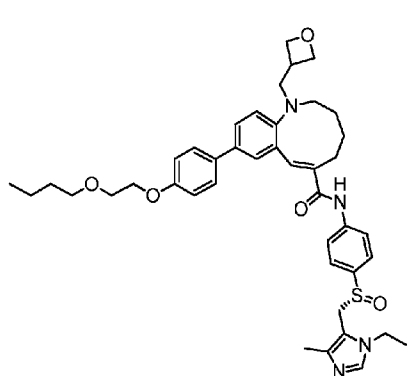
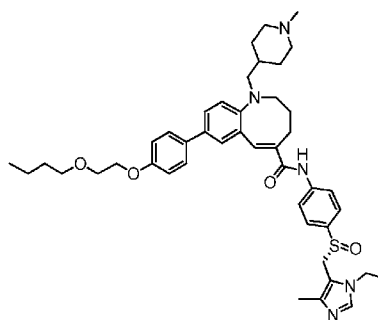
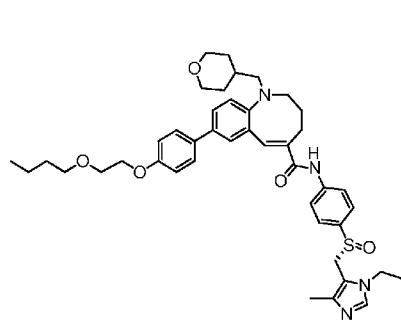


y, preferiblemente, en donde el compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables, se seleccionan del grupo que consiste en

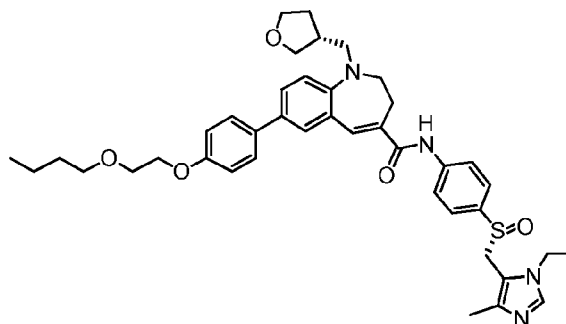
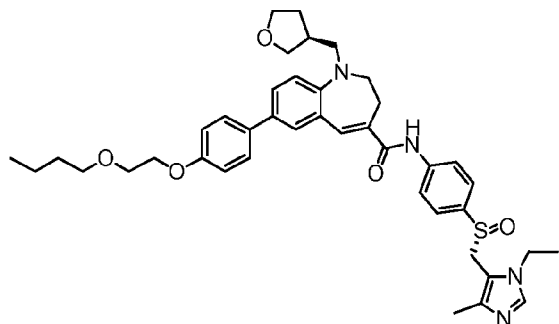


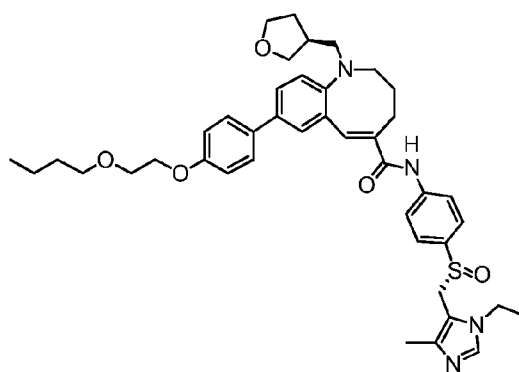
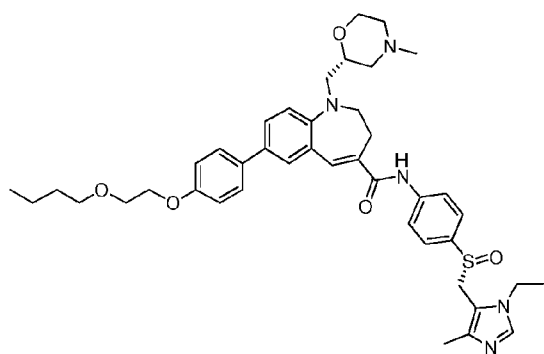
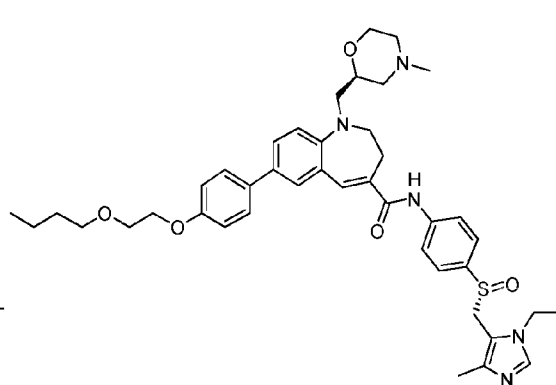
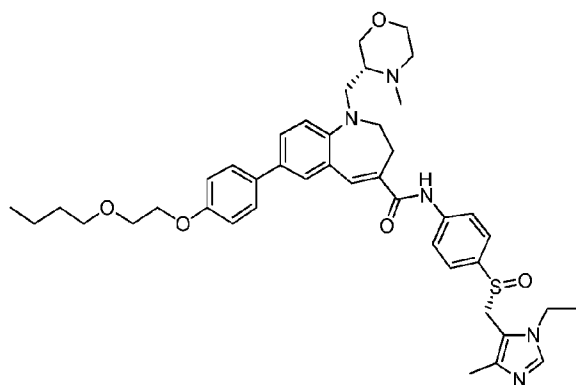
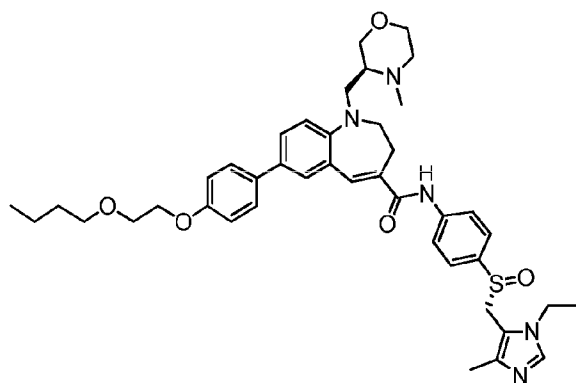
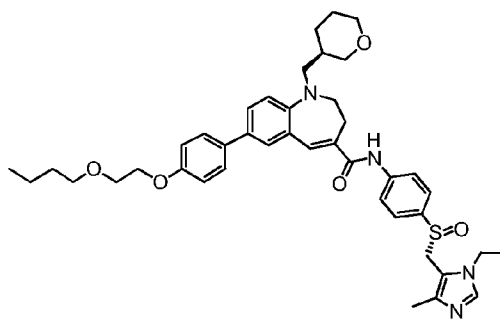
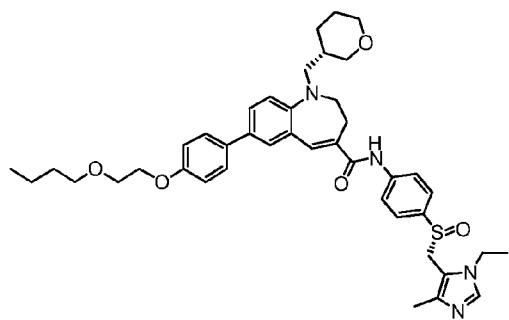


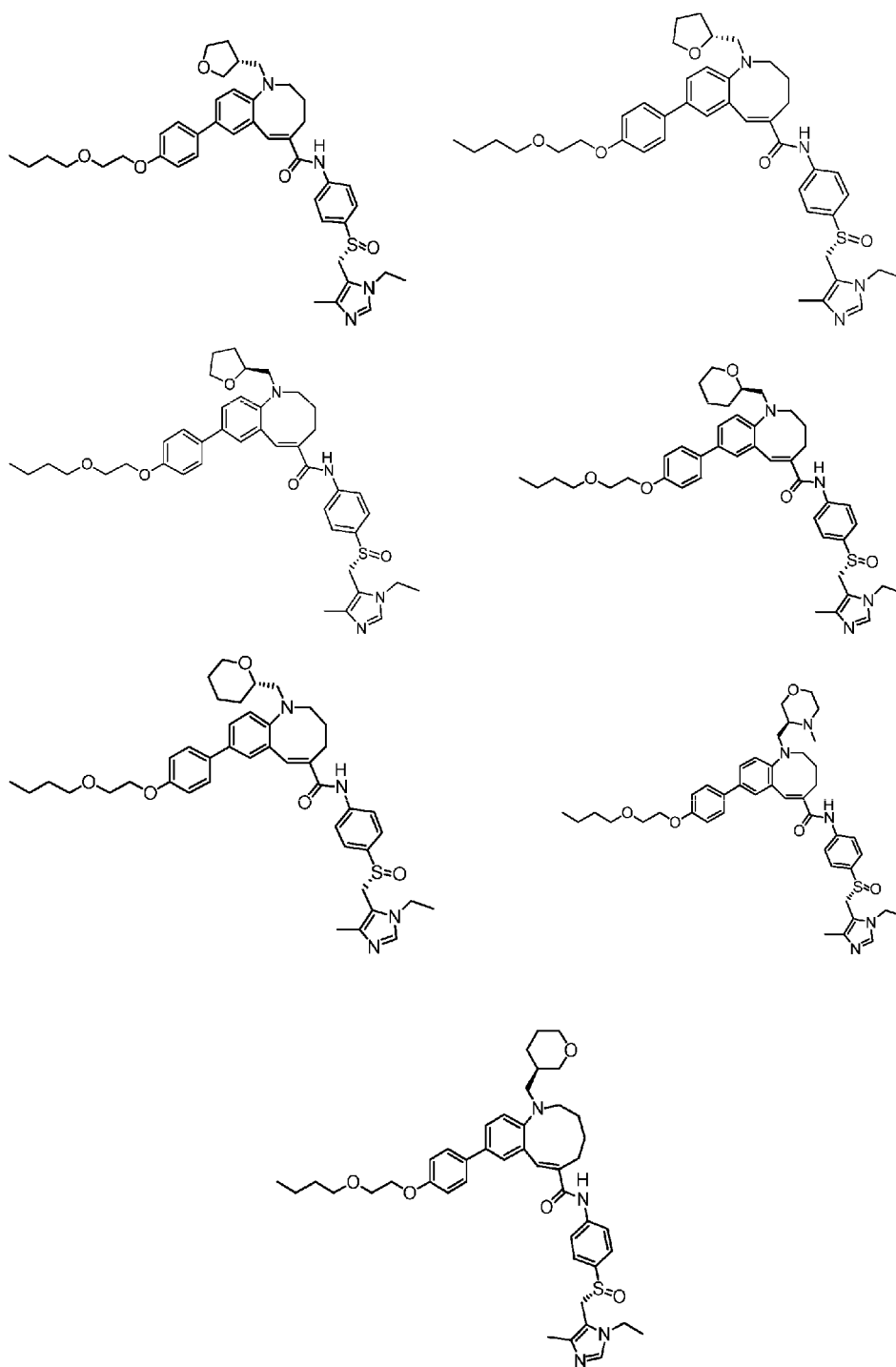




y, aún preferiblemente, en donde el compuesto, sus isómeros o sus sales farmacológicamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en







13. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como ingrediente activo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o la composición farmacéutica según la reivindicación 13 para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con antagonistas de CCR2/CCR5.

15. El compuesto, o sus isómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o la composición farmacéutica según la reivindicación 13, para uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica.

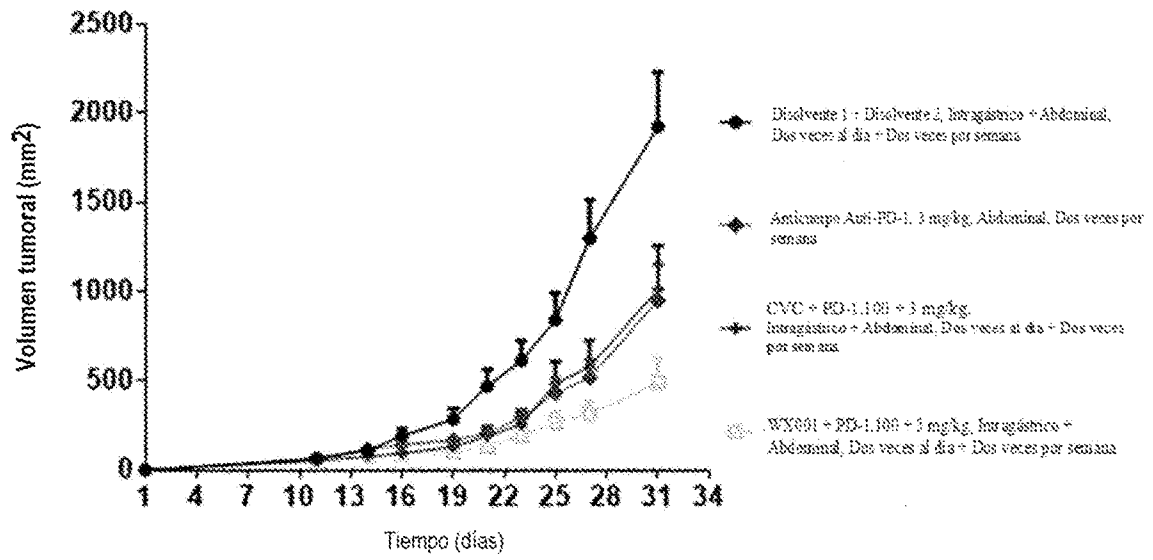


Figura 1