(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 760 992**

(51) Int. Cl.:

***C07D 495/20*** (2006.01)
***A61K 31/438*** (2006.01)
***A61P 37/00*** (2006.01)
***A61P 17/06*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2016** **PCT/US2016/050374**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017** **WO17044410**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2016** **E 16766765 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3347360**

(54) Título: **Compuestos útiles para la inhibición de ror-gamma-t**

(30) Prioridad:

**09.09.2015 US 201562215929 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**18.05.2020**

(73) Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)**
**Lilly Corporate Center**
**Indianapolis, IN 46285, US**

(72) Inventor/es:

**MORPHY, JOHN RICHARD**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 760 992 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 útiles para la inhibición de ror-gamma-t

La presente invención se refiere a compuestos útiles para la inhibición del receptor huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico gamma-t (RORγt), a composiciones farmacéuticas y a los compuestos para su uso en procedimientos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de RORγ.

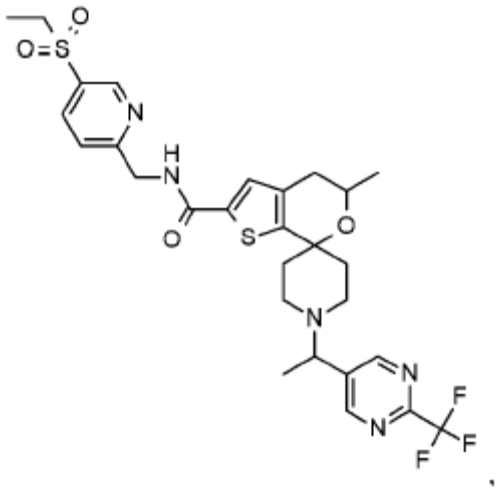
Los receptores huérfanos relacionados con el receptor de ácido retinoico (RORs) son miembros de la superfamilia de receptores nucleares (NR) identificados como reguladores patológicos importantes en muchas enfermedades. La subfamilia ROR consiste en RORα, RORβ y RORγ. El gen RORγ de ratón y humano genera dos isoformas, γ1 y γ2, la última más comúnmente conocida como γt. La señalización RORγt, frecuentemente en respuesta a la señalización del receptor IL-23/IL-23, es necesaria para la diferenciación de células T CD4+ vírgenes en un subconjunto de células T designadas Th17, que son distintas de las células Th1 y Th2 clásicas, y apoya su mantenimiento. Las células Th17 producen interleucina-17A (IL-17) e IL-17F. Además, las células Th17 producen una gama de otros factores que se sabe que desencadenan las respuestas inflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina-6 (IL-6), GM-CSF, CXCL1 y CCL20. Las células NK y las células linfoides innatas, tales como las células tipo inductor de tejido linfoide (LTi) expresan el receptor de IL-23 y RORγt y producen IL-17 en respuesta a la estimulación e IL-23. Existe evidencia sustancial de que las células que responden a IL-23, que expresan RORγt e IL-17 están asociadas con enfermedades autoinmunes (AI), enfermedades inflamatorias y cáncer. De esta manera, la inhibición dirigida de RORγt puede ser importante para reducir la patogénesis de esas enfermedades.

Las enfermedades AI son afecciones crónicas para las cuales no existe cura en la actualidad. El tratamiento de las enfermedades AI implica típicamente un intento de controlar el proceso de la enfermedad y de reducir los síntomas mediante la administración de medicamentos antiinflamatorios, anti-dolor o inmunosupresores. Desafortunadamente, el uso de medicamentos antiinflamatorios y anti-dolor a veces es ineficaz y el uso de inmunosupresores frecuentemente conduce a efectos secundarios devastadores a largo plazo. Los efectos secundarios más importantes de los fármacos inmunosupresores son un mayor riesgo de infección y un mayor riesgo de cáncer.

Se han identificado ligandos naturales y sintéticos para RORγt. Se han reportado en la literatura inhibidores de moléculas pequeñas contra RORγt para enfermedades AI. Véanse los documentos WO 2015/017335 y WO 2014/179564. Sin embargo, la prevalencia de enfermedades AI junto con la ineficacia o los efectos secundarios devastadores de los tratamientos actuales requieren que haya más opciones de tratamiento disponibles para los pacientes. El uso como objetivo de RORγt puede presentar una ventaja sobre las terapias AI actuales al maximizar el beneficio terapéutico al tener como objetivo las células inmunes patógenas mientras se minimiza el riesgo de supresión de las defensas del huésped.

La presente invención proporciona novedosos compuestos que son inhibidores de RORγt. Dichos nuevos compuestos podrían abordar la necesidad de un tratamiento potente y efectivo de la uveítis, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la enfermedad de injerto contra huésped, la enfermedad de Crohn, otras enfermedades inflamatorias del intestino, cáncer, psoriasis y espondiloartropatías seronegativas, tales como la espondiloartritis axial, la espondilitis anquilosante y la artritis psoriásica.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula




o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona también los compuestos para su uso en un procedimiento para el tratamiento de psoriasis en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, la presente invención proporciona los compuestos para su uso en un procedimiento para el tratamiento de espondiloartropatías seronegativas en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En dicha realización, las espondiloartropatías seronegativas son espondiloartritis axial, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización adicional, la composición comprende además uno o más agentes terapéuticos diferentes. En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la psoriasis que comprende un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En todavía otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de espondiloartropatías seronegativas que comprende un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En dicha realización, las espondiloartropatías seronegativas son espondiloartritis axial, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia, en particular para el tratamiento de la psoriasis. Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la psoriasis. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia, en particular para el tratamiento de espondiloartropatías seronegativas. Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de espondiloartropatías seronegativas. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de espondiloartropatías seronegativas. En dichas realizaciones, las espondiloartropatías seronegativas son espondiloartritis axial, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica.

La presente invención divulga también productos intermedios y procesos útiles para la síntesis de un compuesto de la presente invención.

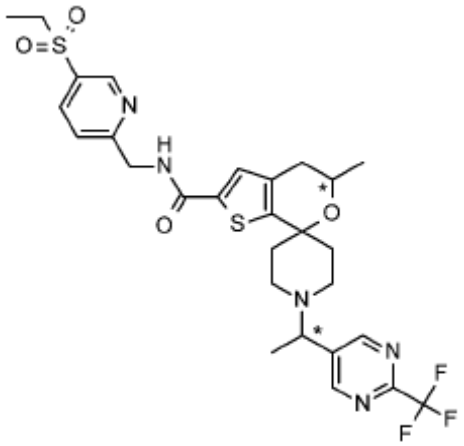
El término "que trata" (o "tratar" o "tratamiento"), tal como se usa en la presente memoria, se refiere a restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, afección o trastorno existente.

El término "espondiloartropatías" se refiere a una serie de enfermedades articulares crónicas que generalmente implican la columna vertebral y las zonas en las que los ligamentos y tendones se unen al hueso. A veces, las espondiloartropatías se denominan también espondiloartropatías o espondiloartritis.

El término "seronegativo" se refiere a una enfermedad que es negativa para el factor reumatoide.

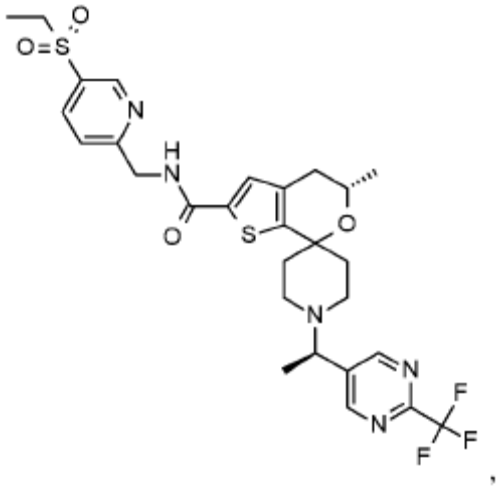
Un compuesto de la presente invención puede reaccionar para formar sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para preparar las mismas son bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Segunda Edición revisada (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, N° 1, Enero de 1977.

El experto en la materia apreciará que un compuesto de la invención, tal como se muestra en (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está compuesto por un núcleo que contiene al menos dos centros quirales, tal como se representa mediante $*$ a continuación:



(I)

Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros individuales, así como las mezclas de los enantiómeros de dichos compuestos que incluyen racematos, los compuestos preferentes de la invención están representados por (II) a continuación:

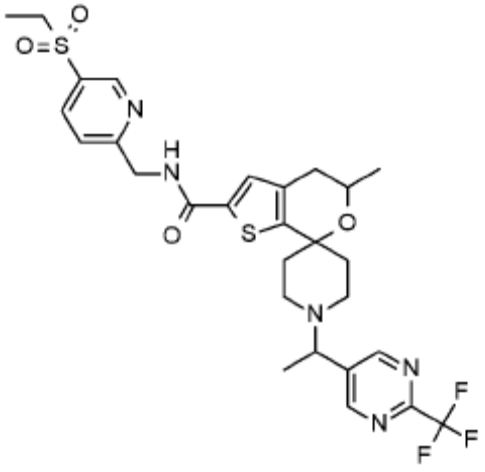


(II)

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

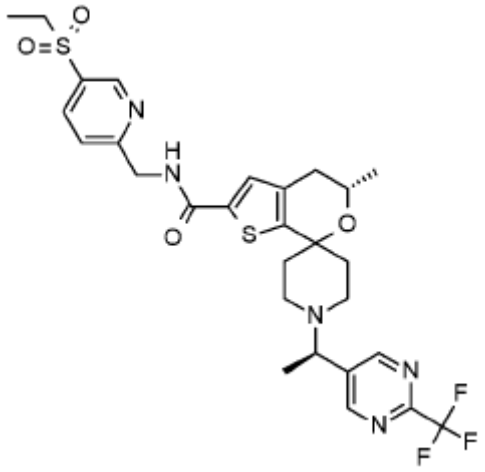
El experto en la materia apreciará también que las designaciones Cahn-Ingold-Prelog (R) o (S) para todos los centros quirales variarán dependiendo de los patrones de sustitución del compuesto particular. Los enantiómeros o diastereómeros individuales pueden prepararse comenzando con reactivos quirales o mediante técnicas de síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. De manera alternativa, los enantiómeros o diastereómeros individuales pueden aislarse a partir de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatografía quiral estándar en cualquier punto conveniente en la síntesis de los compuestos de la invención. Los enantiómeros individuales de los compuestos de la invención son una realización preferente de la invención.

Un compuesto de la presente invención se formula preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas mediante una variedad de rutas. Dichas composiciones farmacéuticas y procesos para preparar las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., Eds., 21ª ed., Mack Publishing Co., 2005). Más particularmente preferente es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula,



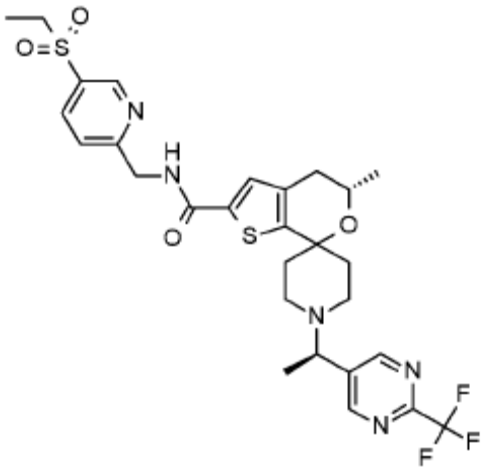
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Una realización especialmente preferente de la presente invención se refiere al compuesto, (5'S)-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamida:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización especialmente preferente de la presente invención se refiere al compuesto,



Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosis por día están comprendidas en el intervalo de aproximadamente 1 mg a 1 g. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo indicado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplear dosis todavía mayores mientras se mantiene un perfil beneficio/riesgo favorable y, por lo tanto, el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar en modo alguno el alcance de la invención. Se entenderá que la cantidad del compuesto administrado realmente será determinada por un médico, según las circunstancias relevantes, incluyendo la condición a ser tratada, la ruta de administración elegida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.

Los isómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales pueden ser separados o resueltos por un experto en la materia en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de Fórmula I, mediante procedimientos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véanse, por ejemplo, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981 y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994) Las designaciones "isómero 1" e "isómero 2" se refieren a los compuestos que se eluyen de la cromatografía quiral primera y segunda, respectivamente y, si la cromatografía quiral se inicia temprano en la síntesis, la misma designación se aplica a los intermedios y los ejemplos posteriores.

Además, ciertos intermedios descritos en la presente memoria pueden contener uno o más grupos protectores. El grupo protector variable puede ser igual o diferente en cada caso dependiendo de las condiciones de reacción particulares y de las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y de desprotección son bien conocidas por el experto en la materia y se describen en la literatura (véase, por ejemplo, " Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", Cuarta Edición, de Peter G.M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Ciertas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "AUC" se refiere a área bajo la curva; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "CFA" se refiere a adyuvante completo de Freund; "DBA" se refiere a marrón claro no Agutí; "DCM" se refiere a diclorometano; "DPBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; "DMEM" se refiere a medio de Eagle modificado de Dulbecco; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "$EC_{50}$" se refiere a la concentración efectiva a la mitad de la respuesta máxima; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "$Et_2O$" se refiere a éter etílico; "EtOH" se refiere a alcohol etílico o etanol; "ee" se refiere a exceso enantiomérico; "Ex" se refiere a ejemplo; "FBS" se refiere a suero fetal bovino; "G" se refiere a fuerza gravitacional; "GAL" se refiere al dominio de unión al ADN de beta-galactosidasa; "GPI" se refiere a glucosa -6-fosfato isomerasa; "HEC" se refiere a hidroxietilcelulosa; "HEK" se refiere a riñón embrionario humano; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico; "$IC_{50}$"se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; "IL" se refiere a interleucina; "IPA" se refiere a alcohol isopropílico o isopropanol; "Kd" se refiere a constante de disociación; "Ki" se refiere a constante de inhibición; "MeOH" se refiere a alcohol metílico o metanol; "MEM" se refiere a Medio Esencial Mínimo; "PBMC" se refiere a células mononucleares de sangre periférica; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "Prep" se refiere a preparación "RAR se refiere a receptor de ácido retinoico; y "RPMI" se refiere al Instituto Roswell Park Memorial. "$R_t$" se refiere al tiempo de retención; "SCX" se refiere a un intercambio catiónico fuerte; "SFC" se refiere a cromatografía de fluidos supercríticos; y "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

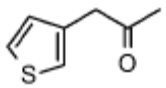
Los compuestos de la presente invención, o sus sales, pueden prepararse mediante una variedad diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en Preparaciones y ejemplos a continuación. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las rutas descritas pueden combinarse de diferentes maneras para preparar los compuestos de la invención, o las sales de los mismos. Los productos de cada etapa a continuación pueden recuperarse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto en la materia.

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención y representan una síntesis típica de los compuestos de la presente invención.

**Preparaciones y ejemplos**

**Preparación 1**

1-(3-tienil)propan-2-ona

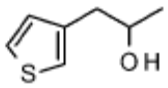



Se suspendió ácido 2-(3-tienil)acético (26,5 g, 146,5 mmol) en anhídrido acético (87,9 ml, 913 mmol,) y se añadió 1-

metilimidazol (7,57 g, 91,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió a 0ºC, se añadió agua (150 ml) y se agitó durante 1 hora. La solución se diluyó con EtOAc (300 ml) y se lavó sucesivamente con NaOH 2 M (2 x 200 ml), agua (200 ml) y salmuera (200 ml). La fase de extractos orgánicos se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta la sequedad para obtener el compuesto del título (28,16 g, 77%) como un aceite de color amarillo. $^1$H NMR (400,13 MHz, $CDCl_3$) δ 2,14 (s 3H), 3,7 (s, 2H), 6,94 (d, J= 5,1 Hz, 1H), 7,08 (bs, 1H), 7,29-7,26 (m, 1H).

**Preparación 2**

1-(3-tienil)propan-2-ol



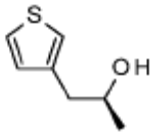

Se añadió MeOH seco (63 ml) a borohidruro de sodio (1,61 g, 41,67 mmol) y la mezcla de reacción se enfrió a -10ºC mientras se añadía MeOH. Se enfrió adicionalmente a -20°C y se añadió una solución de 1-(3-tienil)propan-2-ona (4,92 g, 33,34 mmol) en MeOH seco (26,7 ml), gota a gota, durante 40 minutos y se agitó durante 1,5 horas a -20°C a continuación a temperatura ambiente durante 17 horas. La solución se enfrió a -5°C (temperatura interna) y se inactivó con una solución saturada de cloruro de amonio (15 ml) y a continuación con HCl 1 N (15 ml). Se añadió agua (30 ml) y EtOAc (100 ml). La mezcla se concentró a presión reducida hasta 1/3 del volumen total. La mezcla se extrajo con EtOAc (2 × 100 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron hasta la sequedad para dar el compuesto del título (4,74 g, 100%). Espectro de masas (m/z): 125 (M-OH+H), 164,8 (M+Na).

**Preparación alternativa 2a**

Se añadió borohidruro de sodio (7,06 g, 182,8 mmol) en porciones durante 30 minutos a 0°C a una solución de 1-(3-tienil)propan-2-ona (28,16 g, 140,6 mmol) en MeOH (282 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró hasta la sequedad, se diluyó con EtOAc (200 ml) y se lavó con una solución saturada de cloruro de amonio (150 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 × 200 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluyendo con MeOH:DCM (0:100 a 5:95) para dar el compuesto del título (12,85 g, 64%) como un aceite de color rojo pálido. Espectro de masas (m/z): 125 (M-OH+H).

**Preparación 3**

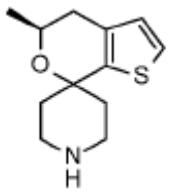
(2S)-1-(3-tienil)propan-2-ol




Se disolvió 3-bromotiofeno (6,88 g, 42,2 mmol) en THF anhidro (10 ml) y tolueno (100 ml). Se enfrió a -78°C. A esto se añadió, mediante una jeringa, sec-butil litio (1,3 mol/l en ciclohexano, 34 ml, 44 mmol) durante 15 minutos. La temperatura se mantuvo a < -60°C, se agitó 10 minutos, a continuación, se añadió (2S)-2-metiloxirano (4,9 g, 84,4 mmol), gota a gota. Después de 5 minutos, se añadió eterato de dietil trifluoruro de boro (5,3 ml, 42 mmol) durante 15 minutos mediante un embudo de goteo. La temperatura se mantuvo a < -55°C. Una vez completada la adición, se agitó a -78°C durante 2 horas. Se desactivó a -78°C con bicarbonato de sodio saturado, se añadió $Et_2O$, y se calentó a temperatura ambiente. Se lavó con bicarbonato de sodio saturado (2x) seguido de salmuera saturada. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluyendo con EtOAc al 15%/hexanos para dar el compuesto del título (3,85 g, 64,2%). Se volvieron a purificar las fracciones mixtas para obtener una cantidad total del compuesto del título (4,29 g, 71,5%) como un líquido incoloro. $^1$H NMR (400,13 MHz, $CDCl_3$) δ 7,28-7,26 (dd, J=2,9, 5,0, 1H), 7,03-7,01 (m, 1H), 6,96 (dd, J=1,2, 4,9, 1H), 4,04-3,95 (m, 1H), 2,83-2,68 (m, 2H), 1,63 (s, 1H), 1,22 (d, J= 6,2, 3H), OR [α]20D +25,50 (c 1,00, $CHCl_3$).

**Preparación 4**

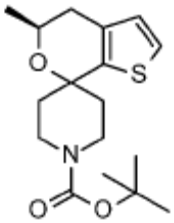
(5'S)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]



Se disolvió 4-oxopiperidin-1-carboxilato de tert-butilo (6,50 g, 32,6 mmol) y (2S)-1-(3-tienil)propan-2-ol (4,64 g, 32,6 mmol) en DCM (100 ml). Se añadió ácido trifluoroacético (20 ml, 264,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y a continuación se añadió agua y $Et_2O$. La capa orgánica se lavó con agua, los lavados acuosos se lavaron y a continuación el pH se ajustó a básico con carbonato de sodio sólido. La capa acuosa se saturó con cloruro de sodio sólido, a continuación, la capa acuosa se lavó con EtOAc (5x). Las capas de EtOAc se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto del título (4,61 g, 63%) como un aceite de color amarillo pálido. Espectro de masas (m/z): 224,2 (M+H).

**Preparación 5**

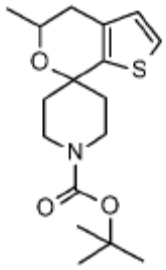
(5'S)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilato de tert-butilo



Se disolvió (5'S)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran] (10,39 g, 46,53 mmol) en DCM (100 ml). Se añadió dicarbonato de di-tert-butilo (11,52 ml, 51,18 mmol) gota a gota y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió dicarbonato de di-tert-butilo adicional (2,00 ml, 9,17 mmol) y se agitó durante 30 minutos, a continuación, se concentró bajo presión reducida. Se añadió imidazol (2,21 g, 32,5 mmol) para destruir el exceso de dicarbonato de di-tert-butilo (Synthesis, 2001, No. 4, 550). Se añadió $Et_2O$ y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluyendo con EtOAc al 10%/hexanos. Se volvió a purificar mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc al 15%/hexanos para dar el compuesto del título (12,92 g, 86%) como un aceite incoloro. $^1$H RMN (400,13 MHz, $d_6$-DMSO) δ 7,33 (d, J=5,1 , 1H), 6,77 (d, J=5,1 , 1H), 3,92-3,72 (m, 3H), 3,15-2,91 (s, 2H), 2,62 (dd, J=15,8, 3,0, 1H), 2,30 (dd, J=15,8, 10,6, 1H), 2,1 (m, 1H), 1,76-1,63 (m, 2H), 1,51-1,40 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,24 (d, J=6,2, 3H), 100% ee basado en la cromatografía SFC, Lux Amylose-2, 5 ml/min, 225 nm, $R_t$ = 1,75 min, OR $[\alpha]^{20}D$ +82,1 (c 1,00, $CHCl_3$).

**Preparación 6**

Tert-butil-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilato



Se añadió ácido trifluoroacético (34,16 ml, 451,8 mmol) gota a gota a 0°C a una solución de 1-(3-tienil)propan-2-ol (12,85 g, 90,35 mmol) y 4-oxopiperidin-1-carboxilato de tert-butilo (23,40 g, 117,5 mmol) en DCM seco (135 ml) y la agitación se mantuvo a temperatura ambiente durante 17 horas. La mezcla se concentró hasta la sequedad, el residuo se diluyó con MeOH y a continuación el disolvente se eliminó a presión reducida. Se tomó el residuo en MeOH y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico. Se combinaron las capas que contenían el producto deseado y se concentraron a

presión reducida co-evaporando con tolueno (3 ×) para dar un sólido de color naranja pálido de 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidina] cruda. Se añadió 4-dimetilaminopiridina (2,23 g, 18,07 mmol) y trietilamina (37,8 ml, 271,1 mmol) gota a gota a una solución de 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidina] (20,18 g, 90,35 mmol) en DCM seco (90,35 ml) enfriada a 0°C. A esto se añadió gota a gota una solución de dicarbonato de di-tert-butilo (30,49 g, 135,5 mmol) en DCM seco (27,1 ml). Se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (100 ml), la capa acuosa se extrajo con DCM (3 × 100 ml), se lavó con salmuera (100 ml) y se concentró a presión reducida. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluyendo con EtOAc:iso-hexano (0:100 a 20:80). El residuo se co-evaporó con DCM (3x) para dar el compuesto del título (27,64 g, 92,7%) como un sólido de color blanco. Espectro de masas (m/z): 346 (M+Na)

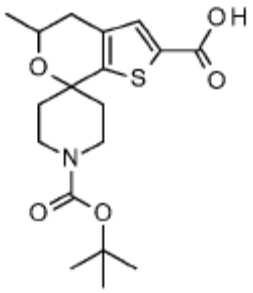
**Preparación alternativa 6a**

Tert-butil-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilato

Se añadió ácido trifluoroacético (20,17 ml, 266,72 mmol) gota a gota a 0°C a una solución de 1-(3-tienil)propan-2-ol (4,74 g, 33,34 mmol) y 4-oxopipendin-1-carboxilato de tert-butilo (7,80 g, 38,34 mmol) en DCM seco (100 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró hasta la sequedad y el residuo se diluyó con MeOH. El material bruto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico. Las capas que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron a presión reducida co-evaporando con DCM (3 ×) para dar 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidina] cruda (8,17 g). Se añadieron 4-dimetilaminopiridina (0,831 g, 6,67 mmol) y trietilamina (9,29 ml, 66,68 mmol) a una solución de 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidina] (8,17 g) en DCM seco (66,7 ml) enfriado a 0°C. A esto se añadió gota a gota una solución de dicarbonato de di-tert-butilo (18,19 g, 83,35 mmol) en DCM seco (16,7 ml). Se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió agua (60 ml), la capa acuosa se extrajo con DCM (3 × 50 ml), se lavó con salmuera (20 ml), se filtró a través de un separador de fases y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluyendo con EtOAc:iso-hexano (0:100 a 20:80). El residuo se co-evaporó con DCM (2x) para dar el compuesto del título (9,41 g, 80%). Espectro de masas (m/z): 346 (M+Na)

**Preparación 7**

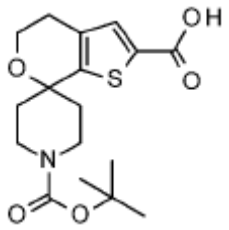
Ácido 1-(tert-butoxicarbonil)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxílico




Se disolvió tert-butil-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilato (7,16 g, 21,71 mmol) en THF (108,5 ml) y se enfrió a -78°C. A esto se añadió butillitio (2,5 M en hexanos, 13 ml, 32,56 mmol) gota a gota durante 20 minutos y la mezcla se agitó durante 30 minutos adicionales después de completada la adición. Se burbujeó en $CO_2$ mediante una cánula y la agitación se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora con adición continua de $CO_2$. Se permitió que la reacción se calentara a 0°C durante 2 horas con adición continua de $CO_2$ y se inactivó cuidadosamente con agua (80 ml). La mezcla de reacción se vertió en agua y la capa acuosa se extrajo con $Et_2O$ (100 ml). La fase orgánica se lavó con NaOH 2 N (3 x 15 ml) y agua (50 ml). La capa acuosa se acidificó con HCl 2 N (3×) a pH = 6 y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto del título (7,89 g, 97%) como un sólido blanquecino. Espectro de masas (m/z): 390 (M+Na).

**Preparación 8**

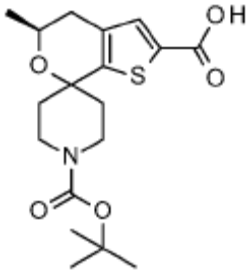
Ácido 1-(tert-butoxicarbonil)-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxílico



Se disolvió tert-butil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilato (preparado tal como se describe en J. Med. Chem., 2011, 54, (8), págs. 2687-2700 y en el documento WO2011060035) (10 g, 32,32 mmol) en THF (100 ml) y se enfrió a -78°C. A esto se añadió butillitio (22,22 ml, 35,55 mmol) gota a gota durante 15 minutos y la mezcla se agitó durante 15 minutos adicionales después de completada la adición. Se burbujeó en $CO_2$ mediante una cánula y se permitió que la mezcla se calentara a temperatura ambiente con la adición continua de $CO_2$. Después de 2 horas, la mezcla se enfrió a 0°C y se añadió agua seguido de $Et_2O$. La capa acuosa se basificó con NaOH 1 N y la capa orgánica se lavó con NaOH 1 N (3x). Los lavados de base se combinaron y se acidificaron a pH 2 con HCl 5 N. La capa acuosa se lavó con EtOAc (3x), los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera. Se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto del título (11,11 g, 97,27%) como un sólido de color blanco. Espectro de masas (m/z): 352,2 (M-H).

**Preparación 9**

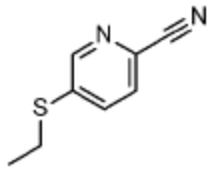
Ácido (5'S)-1-tert-butoxicarbonil)-5'-metil-4',5'dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxílico



Se disolvió (5'S)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilato de tert-butilo (11,19 g, 34,60 mmol) en THF anhidro (200 ml) y se enfrió a -78°C. Se añadió n-butil litio (21 ml, 34,64 mmol) gota a gota durante 20 minutos. Después de completada la adición, se agitó a -78°C durante 20 minutos, a continuación, se burbujeó en gas $CO_2$ a través de una cánula durante 60 minutos. La mezcla se calentó a temperatura ambiente con adición continua de $CO_2$. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se inactivó con agua (3 ml) y se concentró a presión reducida a un volumen del 25%. Se añadieron $Et_2O$ y agua. Se lavó con agua (2x) y los lavados acuosos se combinaron. El pH se ajustó a ácido con HCl 1 N. La capa acuosa se saturó con cloruro de sodio y se extrajo con EtOAc (2x). Los extractos de EtOAc se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto del título (13,40 g, 100%) como una espuma de color blanco. Espectro de masas (m/z): 366 (M-H).

**Preparación 10**

5-(etilsulfanil)piridin-2-carbonitrilo

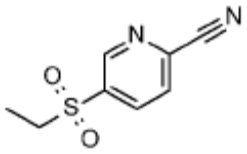


Se disolvió 5-bromopiridin-2-carbonitrilo (49,42 g, 270,1 mmol) y carbonato de potasio (113,5 g, 821,2 mmol) en 1-metil-2-pirrolidinona (280 ml) y se añadió etanetiol (26,4 ml, 356 mmol) en porciones durante 30 minutos de manera que la temperatura se mantuviera por debajo de 50°C. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se diluyó con EtOAc (1200 ml) y agua (2200 ml). La capa orgánica se recogió y se lavó con salmuera (3 x 300 ml), la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título

(44,87 g, 100%) como un sólido blanquecino. $^1$H RMN (400,13 MHz, $d_6$-DMSO) δ 8,63 (s, 1H), 7,93 (s, 2H), 3,17 (q, J=7,3, 2H), 1,29 (t, J=7,3, 3H).

**Preparación 11**

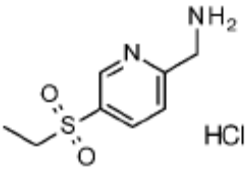
5-(etilsulfonil)piridin-2-carbonitrilo



Se disolvió 5-(etilsulfanil)piridin-2-carbonitrilo (44,36 g, 270,1 mmol) en DCM anhidro (540 ml) y se enfrió a -20°C. Se añadió ácido 3-cloroperoxibenzoico (130 g, 565,0 mmol) en porciones de 10-12 gramos durante 1 hora manteniendo una temperatura interna entre 0°C y -10°C. La mezcla de reacción se agitó en un baño frío permitiendo que se calentara a temperatura ambiente durante la noche. Se lavó con NaOH 1 N (1 l), agua, NaOH 1 N (2×500 ml) y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título (49,52 g, 93%) como un sólido de color blanco. $^1$H RMN (400,13 MHz, $d_6$-DMSO) δ 9,20 (d, J=1,9, 1H), 8,56 (dd, J=2,0, 8,1, 1H), 8,36 (d, J=8,1, 1H), 3,52 (q, J=7,3, 2H), 1,16 (t, J=7,5, 3H).

**Preparación 12**

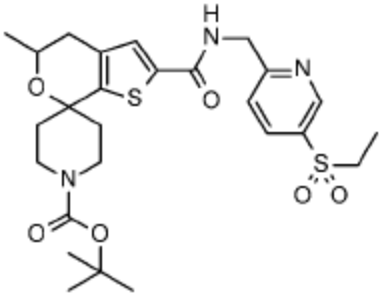
Clorhidrato de 1-[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metanamina



El 5-(etilsulfonil)piridin-2-carbonitrilo (49,52 g, 252,4 mmol) se dividió en tres porciones de 16,5 g. Bajo $N_2$ en una botella Parr de 2.250 ml, se añadió Pd/C al 10% (1,65 g, 15,5 mmol) al recipiente y se humedeció con MeOH (750 ml). A esto se añadió 5-(etilsulfonil)piridin-2-carbonitrilo (16,5 g, 84,09 mmol) disuelto en MeOH (750 ml). A esto se añadió HCl (6 N acuoso, 17,1 ml, 102,6 mmol). La botella se selló, se purgó con $N_2$, se purgó con $H_2$, y se presurizó a 68,9 kPa a temperatura ambiente durante 3 horas. Se purgó con $N_2$, y a continuación la mezcla se filtró. Se repitió en las porciones restantes de 5-(etilsulfonil)piridin-2-carbonitrilo. Todos los filtrados se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto del título (59,61 g, 99%) como un sólido de color beige. Espectro de masas (m/z): 201 (M+H-HCl).

**Preparación 13**

2'-({[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-1-carboxilato de tert-butilo

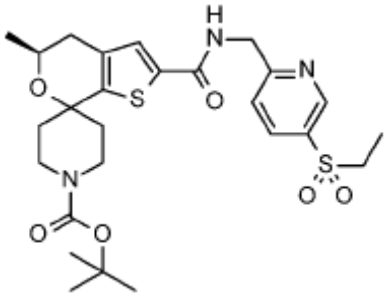


Se disolvió clorhidrato de 1-[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metanamina (3,1 g, 13 mmol), ácido 1-(tert-butoxicarbonil)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxílico (3,9 g, 10 mmol) en DCM anhidro (52 ml). Se enfrió a 0°C y se añadió trimetilamina (10 ml, 73 mmol) gota a gota seguido de una solución 1,67 M de 2,4,6-tripropil-1,3,4,2,4,6-

trioxatrifosforina-2,4,6-trióxido (8,6 g, 14 mmol) en EtOAc. Se permitió que la mezcla se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se añadió con cuidado agua (50 ml) y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La capa acuosa se extrajo con DCM (2x), a continuación, los extractos orgánicos se combinaron. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El material crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de EtOAc/hexanos del 50% al 100% para dar el compuesto del título (4,89 g, 83%) como una espuma de color amarillo. Espectro de masas (m/z): 550 (M+H).

**Preparación 14**

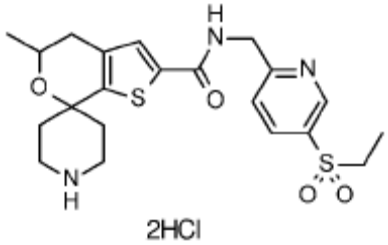
(5'S)-2'-({[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-1-carboxilato de tert-butilo



Se disolvió clorhidrato de 1-[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metanamina (2,86 g, 10,5 mmol), ácido (5'S)-1-tert-butoxicarbonil)-5'-metil-4',5'dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxílico (3,50 g, 9,52 mmol) y 1- hidroxibenzotriazol (1,44 g, 10,5 mmol) en THF anhidro (100 ml) y dimetilformamida (50 ml). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (4,98 ml, 28,6 mmol) seguido de clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropi)-3-etilcarbodiimida y se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró a presión reducida hasta ~40% del volumen, a continuación, se añadió EtOAc. Se lavó con bicarbonato de sodio saturado (2×), agua (2×), salmuera (2×), la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. Se cromatografió sobre gel de sílice con EtOAc al 80%/hexanos para dar el compuesto del título (4,51 g, 86%) como una espuma de color gris. Espectro de masas (m/z): 550 (M+H).

**Preparación 15**

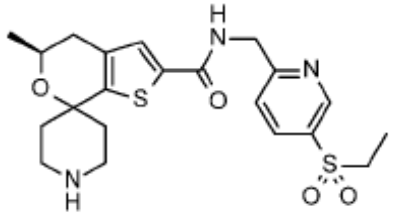
Diclorhidrato de N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-4',5',dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamida



Se disolvió 2'-({[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-1-carboxilato de tert-butilo (0,95 g, 1,68 mmol) en MeOH (10 ml) y se añadió HCl 4 M en dioxano (4,5 ml, 18 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, a continuación, se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título (0,86 g, 100%) como un sólido de color blanco. Espectro de masas (m/z): 450 (M+H-2HCl).

**Preparación 16**

Diclorhidrato de (5'S)-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-4',5',dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamida

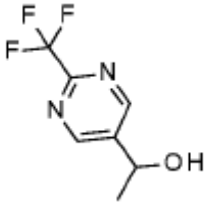


2 HCl

Se disolvió (5'S)-2'-({[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-espiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-1-carboxilato de tert-butilo mmol (1,14 g, 2,0 mmol) en 1,4 dioxano (10 ml) y MeOH (5 ml). Se añadió HCl 4 M en dioxano (5,0 ml, 20 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró a aproximadamente 10 ml, a continuación, se añadió $Et_2O$ y se agitó vigorosamente durante la noche. Se añadieron hexanos, se filtró y se enjuagó con hexanos para dar el compuesto del título (0,99 g, 91%) como un sólido de color amarillo claro. Espectro de masas (m/z): 450 (M+H-2HCl).

**Preparación 17**

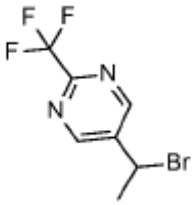
1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etanol



Se disolvió 2-(trifluorometil)pirimidin-5-carbaldehído (11,31 mmol, 1,992 g) en THF (56,56 ml), se enfrió a 0°C y se añadió lentamente bromuro de metilmagnesio (3 M en $Et_2O$) (33,94 mmol, 11,31 ml). Se permitió que la reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 horas. La reacción se inactivó con HCl 1 N. Se añadió EtOAc y se lavó con HCl 1 N. Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto del título (1,663 g, 76,5%). Espectro de masas (m/z): 193,0 (M+H).

**Preparación 18**

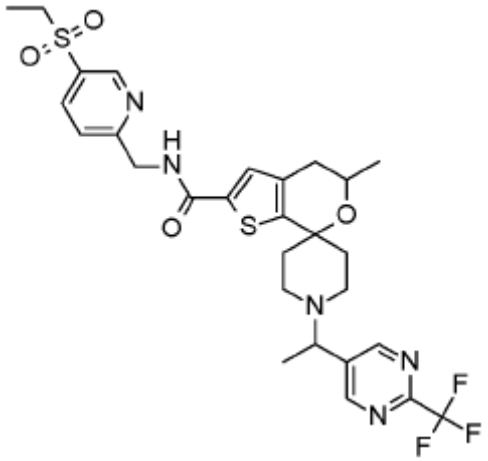
5-(1-bromoetil)-2-(trifluorometil)pirimidina



Se disolvió 1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etanol (8,655 mmol, 1,663 g) y trifenilfosfina (12,98 mmol, 3,405 g) en DCM (86,55 ml) y se añadió N-bromosuccinimida (12,98 mmol, 2,311 g) a temperatura ambiente. Después de tres horas, la reacción se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con EtOAc al 10%/hexanos para dar el compuesto del título (1,641 g, 74,34%). $^1$H RMN (400,13 MHz, $d_6$-DMSO) δ 9,26 (s, 2H), 5,63 (q, J= 7,0 Hz, 1H), 2,09 (d, J= 7,0 Hz, 3H).

**Ejemplo 1**

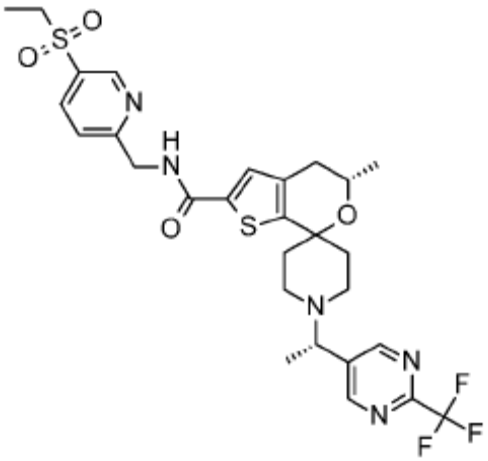
N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida



Se disolvió diclorhidrato de N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-4',5',dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamida (1,12 g, 2,31 mmol) en acetonitrilo (11,6 ml) y diisopropiletilamina (2,42 ml, 13,9 mmol) y se añadió 5-(1-bromoetil)-2-(trifluorometil)pirimidina (0,71 g, 2,77 mmol) . La mezcla se calentó a 60°C durante 90 minutos, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. La mezcla cruda se disolvió en MeOH (5 ml), a continuación, se cargó en una columna SCX de 50 g. Se enjuagó con MeOH (150 ml) y a continuación el producto se eluyó con amoniaco 2 N/MeOH (150 ml). Los lavados de amoniaco/MeOH se concentró a presión reducida a una espuma de color naranja. El material crudo se cromatografió con cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM al 100% a DCM/MeOH al 95% para dar el compuesto del título (1,54 g, 43%). Espectro de masas (m/z): 624 (M+H).

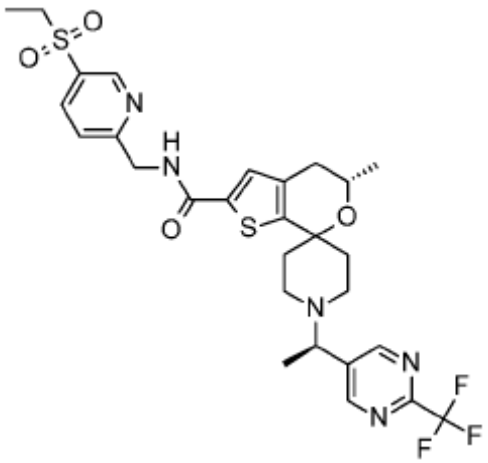
**Ejemplo 2**

(5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida



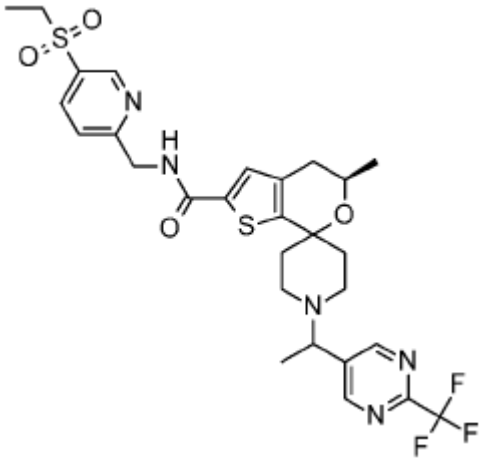
**Ejemplo 3**

(5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida



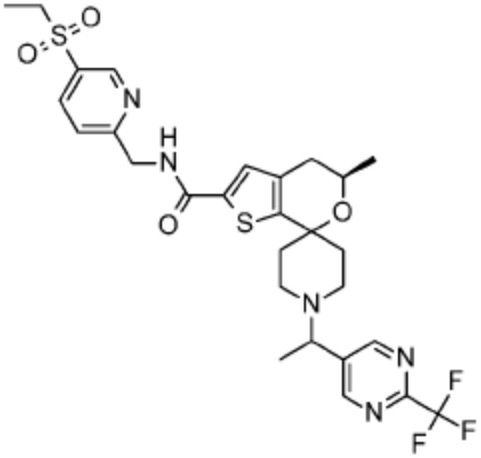
**Ejemplo 4**

Isómero 1 de (5R')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida



**Ejemplo 5**

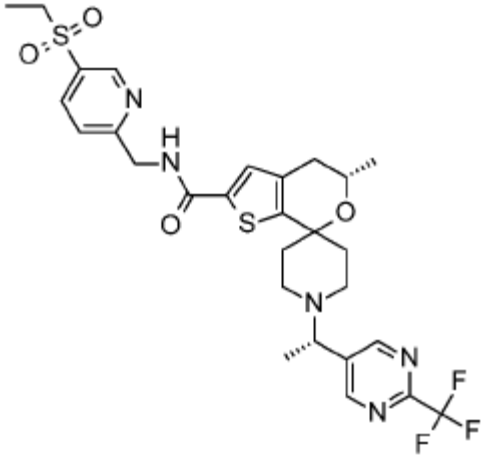
Isómero 2 de (5R')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida



Se disolvió N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'- dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida (1,28 g, 2,05 mmol) en MeOH (58,5 ml). Se separó mediante cromatografía quiral mediante SFC [columna AD-IC (30 x 250 mm, 5 µ) y se eluyó con 50% IPA (20 mM $NH_3$) a 120 ml/minuto con una inyección de 4,5 ml (200 mg) cada 10 minutos para dar el Ejemplo 5, isómero 2 de (5R')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida y fracciones mixtas que contenían, Ejemplo 2, (5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2 -(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida, Ejemplo 3, (5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida y Ejemplo 4, isómero 1 de (5R')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida. Las fracciones mixtas se concentraron y se disolvieron en MeOH (55,5 ml). La mezcla se separó mediante cromatografía quiral por SFC [columna OJ-H (30 x 250 mm, 5 µ) y se eluyó con MeOH al 22% ($NH_3$ 20 mM) a 160 ml/minuto, inyección de 5,0 ml cada 5 minutos para dar el Ejemplo 4, isómero 1 de (5R')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida y un mezcla del Ejemplo 3, (5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida y Ejemplo 2, (5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida. Las fracciones mixtas se concentraron y se disolvieron en MeOH (30,0 ml). La mezcla se separó mediante cromatografía quiral por SFC [columna AD-H (50 x 250 mm, 5 µ) y se eluyó con 50% IPA ($NH_3$ 20 mM) a 200 ml/min, inyección de 3,0 ml cada 32 minutos para dar el Ejemplo 2, (5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida y Ejemplo 3, (5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5 -il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida. Cada conjunto de fracciones puras se concentró, a continuación, los productos separados se disolvieron en acetonitrilo (0,6 ml), se añadió agua, se congeló a -78°C y se liofilizó para dar el Ejemplo 2, 0,214 g, 16%, 99,5% ee, $R_t$ = 2,94 minutos, espectro de masas (m/z): 624 (M+H). Ejemplo 3, 0,203 g, 15%, 98,9% ee, $R_t$ = 2,75 minutos, espectro de masas (m/z): 624 (M+H). Ejemplo 4, 0,251 g, 17%, 98,3% ee, $R_t$ = 4,75 minutos, espectro de masas (m/z): 624 (M+H). Ejemplo 5, 0,272 g, 18%, 100% ee, $R_t$ = 4,33 minutos, espectro de masas (m/z): 624 (M+H). Condiciones analíticas: SFC (220 nm UV), columna: AD-IC 30 x 250 mm, 5 µ, fase móvil: 50% IPA ($NH_3$ 20 mM) Condiciones analíticas Chiral LC: SFC (225 nm UV), columna Chirocel OJ-H, 20% MeOH (0,2% isopropilamina)/$CO_2$, 5 ml/min.

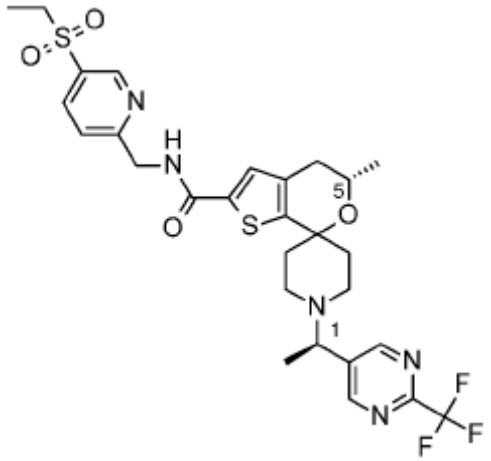
**Preparación alternativa del ejemplo 2**

(5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida



y **preparación alternativa del Ejemplo 3**

(5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamida



Se disolvió diclorhidrato de (5S')-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-4',5',dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamida (28,28 g, 58,19 mmol) en acetonitrilo (280 ml) y diisopropiletilamina (50 ml, 290,9 mmol) y se añadió 5-(1-bromoetil)-2-(trifluorometil)pirimidina (0,71 g, 2,77 mmol), a continuación, se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró a presión reducida, a continuación, la mezcla cruda se disolvió en DCM y se purificó con cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc al 100% para dar la mezcla de compuestos del título. Se separó mediante cromatografía quiral [columna Chiralpak IA (8 x 40,5 cm, 225 nm) y se eluyó con acetonitrilo al 40%/alcohol isopropilal al 60% (con dimetiletilamina al 0,2%) a 400 ml/minuto, inyección de 20 ml (2.000 mg). Cada diastereómero se concentró a presión reducida, a continuación, se disolvió en etanol caliente (250 ml), se filtró en caliente, a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se enjuagó con etanol frío. El sólido se secó en un horno de vacío a 55°C para dar el Ejemplo 2, 9,94 g, 27%, 90,8% ee, $R_t$ = 3,93 minutos, espectro de masas (m/z): 624 (M+H) y Ejemplo 3, 9,42 g, 26%, 98,8% ee, $R_t$ = 9,25 minutos, espectro de masas (m/z): 624 (M+H)) como un material cristalino. Condiciones analíticas: columna Chiralpak IA (4,6 x 150 mm, 225 nm) y eluyendo con acetonitrilo al 40%/alcohol isopropílico al 60% (con dimetiletilamina al 0,2%) a 1 ml/minuto.

**Difracción de rayos X, Ejemplo 3**

Se montó un cristal individual en una fibra MiTeGen delgada a 23°C. Los datos se recopilaron usando una fuente de radiación $CuK_\alpha$ (λ = 1,54178 Å) y un difractómetro goniómetro de 3 círculos basado en Bruker D8 equipado con un detector de área SMART 6000CCD (Bruker-AXS. SHELXTL (V2013 6.2) Madison, Wisconsin, EE. UU.). El refinamiento celular y la reducción de datos se realizaron usando el programa SAINT V8.32b (Sheldrick, G.M., (2008), SHELXS-97, Acta Cryst. A64, 112-122). Se indexó la celda unitaria que tenía los parámetros monoclínicos de a = 10,1624(2) Å, b = 9,9080(2) Å, c = 15,1085(3) Å y α = 90°, β = 100,6879(14)°, γ = 90°. El volumen celular de la estructura cristalina es 1494,87(5) Å3. La densidad calculada de la estructura es 1,386 g/cm$^3$ a 23°C. La estructura se resolvió mediante procedimientos directos (Sheldrick, G.M., (2008), SHELXS-97, Acta Cryst. A64, 112-122). Todos los parámetros atómicos se refinaron independientemente. La elección del grupo espacial, es decir $P2_1$, se confirmó por la convergencia exitosa del refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa en $F^2$ (Sheldrick, G. M., (2013), SHELXL-2013, Programa para el refinamiento de estructuras cristalinas, Institute fur anorg chemie, Gottingen, Alemania) con una calidad de ajuste final de 1,088. El factor residual final, $R_1$, es = 0,0771 y la mayor diferencia de pico y agujero después del ciclo de refinamiento final fue de 0,315 y -0,333 (e.A-3), respectivamente. El parámetro de estructura absoluta se refinó a 0,072(17).

Se determinó la estructura del Ejemplo 3 y la estructura molecular era consistente con la mostrada para el Ejemplo 3. Cabe señalar que la estructura cristalina era de alta calidad y estableció la estereoquímica absoluta de los centros quirales del Ejemplo 3 C5 como (S) y C1 como (R) fuera del grupo de piperdina usando la contribución de dispersión anómala del átomo pesado (azufre) en la estructura. La configuración absoluta se determinó a partir de la estructura cristalina como una configuración (5'S)-N-{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxamida.

**Ensayos biológicos**

Inhibidores de unión de RORa, b y g

El receptor huérfano relacionados con RAR humano, etiquetado con His, alfa (hRORa), el receptor huérfano relacionado con RAR humano, beta (hRORb) y el receptor huérfano relacionado con RAR humano, gamma (hRORg), se usan para

ensayos de unión receptor-ligando competitiva para determinar los valores $K_i$. Los procedimientos típicos se proporcionan a continuación.

Los ensayos de unión competitiva con el receptor se realizan en un tampón compuesto de DPBS (1 l) (Hyclone #SH30028.03), 2,2 g de BSA Fraction v (Roche #9048-46-8), 100 ml de glicerol (Fischer #56-81-5) y 40 ml de DMSO (grado reactivo). Los pocillos finales contenían 20 µg/ml de aprotinina y 20 µg/ml de leupeptina y Pefabloc 10 µM. Típicamente, los ensayos de unión al receptor incluyen ligandos radiomarcados, tales como 7 nM [$^3$H]-25-hidroxicolesterol para la unión alfa, 20 nM Ácido [$^3$H]-3-[[4-[[3-(2,6-diclorofenil)-5-isopropil-isoxazol-4-il]metoxi]-N,2-dimetil-anilino]metil]benzoico para la unión beta, y 6 nM [$^3$H]-25-hidroxicolesterol para la unión gamma, y 0,5 µg de receptor RORa, 0,03 µg de receptor RORb o 0,13 µg de receptor RORg por cada pocillo. Típicamente, los ensayos se realizan en formato de 96 pocillos. Los compuestos de los ensayos competitivos se añaden a diversas concentraciones que varían de aproximadamente 0,4 nM a 25 µM. La unión no específica se determina en presencia de 25-hidroxicolesterol 25 nM para la unión a RORa y RORg, 250 nM ácido 3-[[4-[[3-(2,6-diclorofenil)-5-isopropil-isoxazol-4-il]metoxi]-N,2-dimetil-anilino]metil]benzoico para la unión a RORb. Las soluciones de muestra, etiqueta y receptor se combinaron en una placa de ensayo de 96 pocillos (Costar 3632) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente, a continuación, se añadieron a cada reacción 25 µl de perlas (Amersham YSi (2-5 micrómetros) de cobre His-tag Spa Beads, #RPNQ0096) para una concentración final de perlas de 1 mg/pocillo. Las placas se mezclaron durante 30 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente. Después de una incubación de 4 horas, las placas se leyeron en un contador Wallac MICROBETA®.

Los datos se usaron para calcular un $IC_{50}$ estimado usando un ajuste logístico de cuatro parámetros. El valor Kd para [$^3$H]-25-hidroxicolesterol para RORa y RORg, y ácido [$^3$H]-3-[[4-[[3-(2,6-diclorofenil)-5-isopropil-isoxazol-4-il]metoxi]-N,2-dimetil-anilino]metil]benzoico para la unión a RORb, se determinó mediante unión de saturación. Los valores $IC_{50}$ para los compuestos se convirtieron a valores Ki usando la ecuación de Cheng-Prushoff.

Los resultados de los siguientes compuestos ejemplificados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

| Nº de ejemplo | RORa Ki (nM) | RORb Ki (nM) | RORg Ki (nM) |
|---|---|---|---|
| 1 | >20.400 | >12.500 | 12,0 ± 7,3, n = 2 |
| 2 | >20.400 | >12.500 | 6,24 + 0,73, n = 2 |
| 3 | >20.400 | >12.500 | 16,6 ± 8,8, n = 5 |
| 4 | >20.400 | 2.190 | 148 + 40, n = 2 |
| 5 | >20.400 | 407 | 153 + 25, n = 2 |
| Media ± SEM; SEM = error estándar de la media | | | |

Estos resultados demuestran que los compuestos de la Tabla 2 son selectivos para RORg frente a RORa y RORb.

Ensayo receptor-reportero RORg GAL4 en HEK293

Como un indicador de la actividad agonista inversa, se realizó un ensayo receptor-reportero del receptor huérfano gamma (RORg) relacionado con RAR (RORg-GAL4/pGL4.31) en células HEK293. Las células HEK293 se cotransfectaron usando reactivo Fugene™. Un plásmido reportero que contenía un dominio de unión a GAL4 y un promotor adenovírico mínimo aguas arriba de un gen de luciferasa de luciérnaga se cotransfectaron con un plásmido que expresa constitutivamente un dominio de unión a ligando RORg humano fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4 de levadura. Las células se transfectaron en matraces T150 $cm^2$ en medios MEM sin FBS. Después de 18 horas de incubación, las células transfectadas se tripsinizaron, se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos en 3:1 medio DMEM-F12 que contenía 10% de FBS, se incubaron durante 4 horas y a continuación se expusieron a diversas concentraciones de los compuestos de ensayo que variaban de aproximadamente 0,05 nM a 10 µM. Después de 18 horas de incubaciones con compuestos, las células se lisaron y la actividad de luciferasa se cuantificó usando técnicas estándar. Los datos se ajustaron a una curva logística de ajuste de 4 parámetros para determinar los valores $IC_{50}$.

Los resultados de los siguientes compuestos ejemplificados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

| Nº de ejemplo | $hIC_{50}$ (nM) |
|---|---|
| 1 | 56,5 ± 39,4, n = 2 |
| 2 | 45,8 ± 8,5, n = 4 |
| 3 | 21,8 ± 7,03, n = 7 |
| 4 | 97,9 ± 5,1, n = 2 |
| 5 | 59,5 ± 1,3, n = 2 |
| Media ± SEM; SEM = error estándar de la media | |

Estos resultados demuestran que los compuestos de la Tabla 3 son agonistas inversos para el receptor RORg humano.

ELISA para secreción de IL-17 en PBMC y ensayo de viabilidad de células TiterGlo

Las PBMCs se aislaron de las capas leucocitarias de sangre completa combinando primero capas leucocitarias frescas con volúmenes iguales de solución salina tamponada con fosfato. Treinta y cinco ml de solución PBS/capa leucocitaria se superpusieron suavemente sobre 15 ml de Ficoll en tubos cónicos de 50 ml. Después de una centrifugación durante 30 minutos a 500×g (con aceleración y desaceleración lentas), se descartó la capa superior de plasma y se recogió y se agrupó la capa de células a lo largo de la interfaz Ficoll. Cada tubo de 250 ml se llena hasta arriba con medio RPMI-1640 a temperatura ambiente. Los tubos se hacen girar durante 10 minutos a 500×G (con aceleración y desaceleración lentas), los medios se retiraron mediante aspiración y se repitió la etapa de lavado. Las células se volvieron a suspender en hielo en medio de congelación de cultivo celular de recuperación de Life Technologies (número de catálogo 12648-010) en hielo. La concentración celular se ajustó a 66,7 millones de células/ml. Las células se congelan lentamente a -1°C/minuto en viales con 100 millones de células y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Estimulación de la secreción de IL-17 y adición de compuesto

Las PBMCs se deshielan resuspendiendo con 1 ml de medio completo (RPMI-1640 que contenía HEPES 30 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, L-Glutamina 3,25 mM, beta-mercaptoetanol 0,2 µM y 10% FBS) seguido de la adición gota a gota de 2 ml, 4 ml, 8 ml y 16 ml de medio completo con agitación suave. Las células se centrifugaron durante 5 minutos y el sedimento celular se volvió a suspender en medio completo. Los grupos de células se rompieron haciendo pasar la solución celular a través de una aguja de jeringa de calibre 23 y un filtro de células de 40 µM. Se añadieron cien mil células por pocillo a placas de fondo plano, tratadas con cultivo de tejido de poliestireno de 384 pocillos en un total de 30 µl. El cóctel de estimulación que contenía anticuerpo anti CD3 humano, anticuerpo anti CD28 humano, IL-23 y compuestos preparados en medios completos se añadieron a las células simultáneamente en un volumen total de 30 µl. La concentración final de estimulantes añadidos fue de 160 ng/ml, 500 ng/ml y 5 ng/ml para anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28 e IL-23 respectivamente y el 0,3% para DMSO. Las placas se sellaron con película de sellado AERASEAL® y se incubaron durante 48 horas a 37°C, 95% de humedad y 5% de $CO_2$.

Después del período de incubación, las placas se centrifugaron a 200×g durante cinco minutos. Los sobrenadantes se diluyeron 1:1 con igual volumen de BSA/PBS al 1% y se analizaron para IL-17 con un kit ELISA IL-17 humano del sistema R&D (catálogo #D317E) según el protocolo proporcionado con el kit, con una excepción: se usa el sustrato colorimétrico OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina, Sigma Cat #P6912) en lugar del sustrato suministrado en el kit. La absorbancia a 492 nm se midió con el lector de placas multi-etiqueta Envision. Los valores A492 se convirtieron a concentración de IL-17 en base a la curva estándar de IL-17, tal como se muestra a continuación:

pg/ml IL-17 = EC50*[[(Superior-Inferior)/(A492-Inferior)]-1](1/-Hill).

El valor $IC_{50}$ para la inhibición de la secreción de IL-17 se calcula en base a los valores convertidos usando un ajuste estándar de 4 parámetros con la inhibición máxima determinada a partir de los valores promedio de los pocillos sin estimulantes ni compuestos añadidos y la inhibición mínima a partir de los valores promedio de los pocillos con solo estimulantes y sin compuesto añadido.

Se añadieron volúmenes iguales de reactivo de ensayo de viabilidad celular Cell TITERGLO® (Promega Cat# G7573) a las células que quedaban en las placas y, después de una incubación de quince minutos con agitación suave a

temperatura ambiente, la luminiscencia se midió con el lector de placas multi-etiquetas Envision. El porcentaje de muerte celular se calcula estableciendo el 100% de actividad (muerte celular) a cero unidades de luminiscencia y actividad mínima (número máximo de células viables) como las unidades de luminiscencia promedio de pocillos que contenían solo estimulantes y sin compuesto añadido. Los valores $IC_{50}$ se calcularon usando un ajuste de cuatro parámetros estándar.

Los resultados de los siguientes compuestos ejemplificados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

| Nº de ejemplo | hPBMC IL-17 ELISA (nM) | Viabilidad célula TiterGlo ($EC_{50}$) |
|---|---|---|
| 1 | 77,3 | > 1,0 μM |
| 2 | 33,7 ± 33,1, n = 6 | > 1,0 μM |
| 3 | 20,0 ± 12,6, n = 12 | > 1,0 μM |
| 4 | 106 | > 1,0 μM |
| 5 | 30,5 ± 29,3, n = 4 | > 1,0 μM |
| Media ± SEM; SEM = error estándar de la media | | |

Estos resultados muestran que los compuestos de la Tabla 4 inhiben la secreción de IL-17 estimulada por anti-CD3/anti-CD28/IL-23 en PBMCs sin efecto citotóxico medible.

Modelo de artritis inducida por glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI):

El modelo de artritis inducida por GPI se adaptó de K. Iwanami et al Arthritis Rheumatism 58, 754-763, 2008 y D. Schubert et al. J Immunology 172, 4503-4509, 2004. Ratones (ratones DBA/1 macho de 8-9 semanas de edad) (Harlan) se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento en base a los pesos corporales recogidos el día de la inmunización (día 0). El día de la inmunización (día 0), una mezcla 1:1 (v:v) de GPI humana recombinante (diluida a 4 mg/ml en PBS, Gibco) y adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma) se mezcló en un homogeneizador de alta velocidad (Omni) durante 40 minutos en una habitación fría. Se consiguió una concentración final de 2 mg/ml de GPI en la emulsión. Los ratones se inyectaron en la base de la cola (2 sitios de inyección, por vía subcutánea, 100 μl cada sitio) con la emulsión GPI. Los compuestos de ensayo se dosificaron por vía oral empezando el mismo día de la inmunización (día 0). Empezando el día 0, cada pata se puntuó según la gravedad de la inflamación de la articulación en base a un sistema de puntuación de 0 a 3 (véase K. Iwanami et al Arthritis Rheumatism 58, 754-763, 2008. La puntuación clínica representa la puntuación total de las 4 patas (puntuación máxima = 12). Las puntuaciones clínicas se evaluaron los días 0, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18 y 21.

El AUC se calculó mediante un procedimiento trapezoidal para la puntuación clínica a lo largo del tiempo desde el día de la inmunización (día 0) hasta el día 21. Los valores p del ensayo se derivaron de la prueba t de Student.

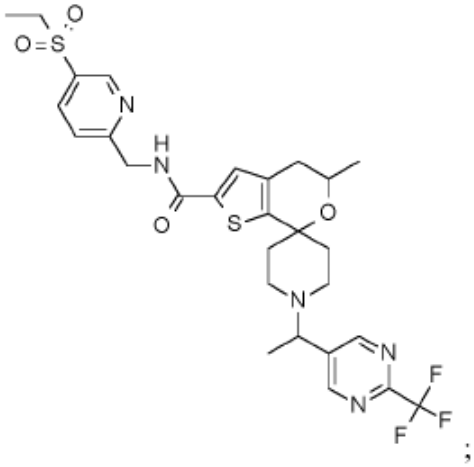
Los tratamientos con Ejemplo 3 (1.000 mg/Kg) y con vehículo (1% HEC, 0.25% Polisorbato 80 y 0,05% de antiespumante en agua purificada) (n=8/grupo) se iniciaron el día 0 y se administraron por vía oral una vez al día. El ejemplo 3 reduce la gravedad de la inflamación de la pata y mantiene las puntuaciones clínicas medias más bajas durante el curso de la enfermedad en comparación con el grupo con vehículo. Este efecto resulta en una reducción del 75% en el AUC de la puntuación clínica, una medida acumulativa de la inflamación de la pata a lo largo del tiempo, que es estadísticamente significativa en comparación con el grupo con vehículo, tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

| Tratamiento | AUC de puntuación clínica (media ± SEM) |
|---|---|
| Vehículo | 87,70 ± 4,88 |
| Ejemplo 3 | 22,20 ± 8,68* |
| Los valores se muestran como media ± SEM. *p <0,05 frente a vehículo (prueba t de Student). SEM = error estándar de la media | |

**REIVINDICACIONES**

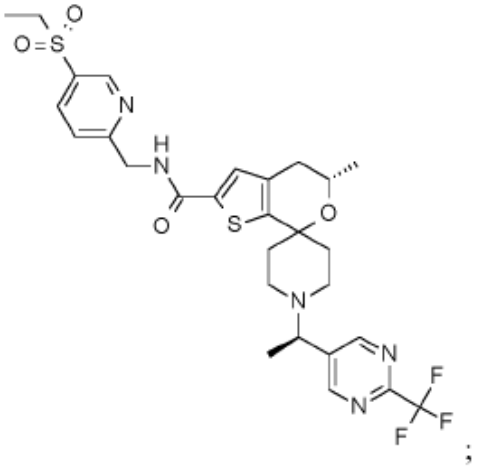
1. Un compuesto de fórmula



;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

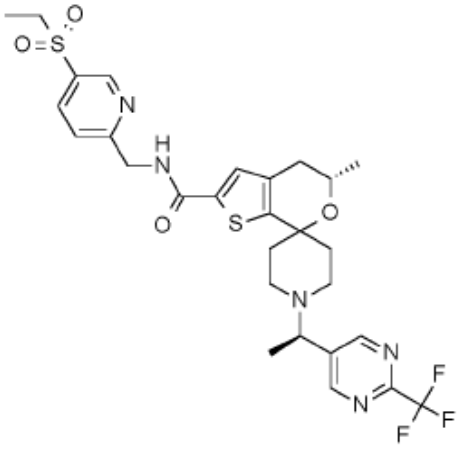
2. El compuesto según la reivindicación 1 de fórmula



;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

3. El compuesto según las reivindicaciones 1 o 2 de fórmula



.

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4 que comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales.

6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de psoriasis.

8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de espondilopatías seronegativas.

9. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 8 en el tratamiento de espondiloartritis axial, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica.