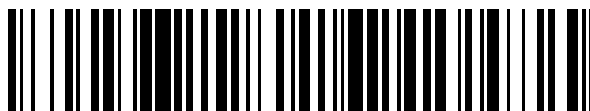


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 293**

51 Int. Cl.:

A61K 31/439 (2006.01)
C07D 453/02 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2012** **PCT/US2012/029417**
87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012** **WO12129084**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2012** **E 12760259 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 2685986**

54 Título: **Inhibidores de la glucosilceramida sintasa**

30 Prioridad:

18.03.2011 US 201161454034 P
25.01.2012 US 201261590711 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2020

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

BOURQUE, ELYSE;
CELATKA, CASSANDRA;
HIRTH, BRADFORD;
METZ, MARKUS;
ZHAO, ZHONG;
SKERLJ, RENATO;
XIANG, YIBIN;
JANCISICS, KATHERINE;
MARSHALL, JOHN;
CHENG, SENG;
SCHEULE, RONALD;
CABRERA-SALAZAR, MARIO y
GOOD, ANDREW

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 774 293 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

Inhibidores de la glucosilceramida sintasa

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de los compuestos terapéuticos para cáncer y enfermedades metabólicas. Más específicamente, la invención se refiere a inhibidores de la glucosilceramida sintasa (GCS) útiles para el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como enfermedades de almacenamiento lisosómico, tanto solo como en combinación con terapia de reemplazo enzimático, y para el tratamiento del cáncer.

Sumario de la técnica relacionada

- 10 La glucosilceramida sintasa (GCS) es una enzima principal que cataliza la etapa de glucosilación inicial en la biosíntesis de glucoesfingolípidos de base de glucosilceramida (GSLs), concretamente mediante la transferencia central de glucosa de UDP-glucosa (UDP-Glc) a ceramida para formar glucosilceramida (véase la Fig. 1). GCS es una proteína integral transmembranaria de tipo III localizada en el Golgi cis/medio. Se cree que los glucoesfingolípidos (GSL) son integrales para la dinámica de muchos acontecimientos de membrana celular, incluyendo interacciones celulares, señalización y tráfico. Se ha mostrado que la síntesis de estructuras de GSL (véase Yamashita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(16), 9142-9147) es esencial para el desarrollo embrionario y para la diferenciación de algunos tejidos. La ceramida desempeña una función central en el metabolismo de esfingolípidos y se ha mostrado que la regulación por disminución de la actividad de GCS tiene efectos notables en el patrón de esfingolípidos con expresión reducida de glucoesfingolípidos. Los esfingolípidos (SLs) tienen una función biomoduladora en afecciones fisiológicas, así como cardiovasculares patológicas. En particular, los esfingolípidos y sus enzimas reguladoras parecen desempeñar una función en respuestas adaptativas a hipoxia crónica en el corazón de rata neonatal (véase, El Alwanit et al., Prostaglandins & Other Lipid Mediators 2005, 78(1-4), 249-263).

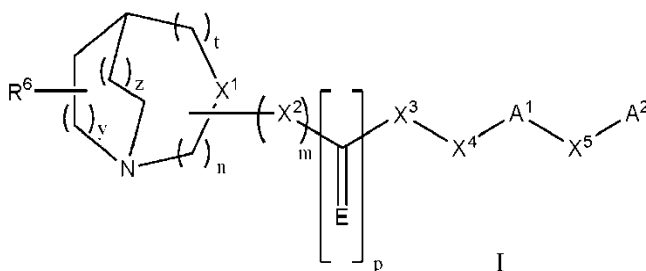
- 25 Se han propuesto inhibidores de GCS para el tratamiento de una variedad de enfermedades (véase, por ejemplo, el documento de patente WO2005068426). Dichos tratamientos incluyen el tratamiento de enfermedades de almacenamiento de glucolípidos (por ejemplo, Tay Sachs, Sandhoffs, deficiencia del activador de GM2, gangliosidosis de GM1 y enfermedades de Fabry), enfermedades asociadas a la acumulación de glucolípidos (por ejemplo, enfermedad de Gaucher; Miglustat (Zavesca), un inhibidor de GCS, ha sido autorizado para terapia en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1, véase, Treiber et al., Xenobiotica 2007, 37(3), 298-314), enfermedades que provocan hipertrofia o hiperplasia renal, tales como nefropatía diabética; enfermedades que provocan hiperglucemia o hiperinsulinemia; cánceres en los que la síntesis de glucolípidos es anómala, enfermedades infecciosas provocadas por organismos que usan glucolípidos de la superficie celular como receptores, enfermedades infecciosas en las que la síntesis de glucosilceramida es esencial o importante, enfermedades en las que la síntesis de glucosilceramida es esencial o importante, enfermedades en las que se produce la excesiva síntesis de glucolípidos (por ejemplo, aterosclerosis, enfermedad poliquística renal e hipertrofia renal), trastornos neuronales, lesión neuronal, enfermedades inflamatorias o trastornos asociados con el reclutamiento y la activación de macrófagos (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, asma y septicemia) y diabetes mellitus y obesidad (véase el documento de patente WO 2006053043). Se proponen otros inhibidores de GCS en el documento de patente WO 2010091164.

- 40 En particular, se ha mostrado que la expresión en exceso de GCS participa en multirresistencia a fármacos y altera la apoptosis inducida por ceramida. Por ejemplo, Turzanski et al., (Experimental Hematology 2005, 33 (1), 62-72) han mostrado que la ceramida induce la apoptosis en células de leucemia mieloide aguda (AML) y que P-glucoproteína (p-gp) confiere resistencia a la apoptosis inducida por ceramida, haciendo la modulación de la ruta ceramida-glucosilceramida una contribución notable a esta resistencia en células TF-1. Así, los inhibidores de GCS pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos proliferativos que inducen apoptosis en células enfermas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un compuesto como se explica en las reivindicaciones adjuntas, así como una composición farmacéutica que comprende el mismo, y métodos y usos del mismo, como se explican en las reivindicaciones adjuntas.

- 50 La presente divulgación se refiere a un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural,



o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo, en donde:

n es 1, 2 o 3;

m es 0 o 1;

5 p es 0 o 1;

t es 0, 1 o 2;

y es 1 o 2;

z es 0, 1 o 2;

E es S, O, NH, NOH, NNO₂, NCN, NR, NOR o NSO₂R;

10 X¹ es CR¹ cuando m es 1 o N cuando m es 0;

X² es O, -NH, -CH₂-, SO₂, NH-SO₂; CH-alquilo (C₁-C₆) o -NR²;

X³ es O, -NH, -CH₂-, CO, -CH-alquilo (C₁-C₆), SO₂NH, -CO-NH- o -NR³;

X⁴ es CR⁴R⁵, CH₂ CR⁴R⁵ o CH₂-alquil (C₁-C₆)-CR⁴R⁵;

15 X⁵ es un enlace directo, O, S, SO₂, CR⁴R⁵; alquilo (C₁-C₆), alquiloxi (C₁-C₆), alquenilo (C₁-C₆), alqueniloxi (C₁-C₆);

R es arilo (C₆-C₁₂), heteroarilo (C₂-C₉), alquilo (C₁-C₆), heteroaril (C₂-C₉)-alquilo (C₁-C₆);

R¹ es H, CN, alquil (C₁-C₆), carbonilo, o alquilo (C₁-C₆);

20 R² y R³ son cada uno independientemente -H, alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo (C₁-C₆), arilo (C₆-C₁₂), heteroarilo (C₂-C₉), alquil (C₁-C₆), arilo (C₆-C₁₂), haloarilo (C₆-C₁₂) y haloheteroarilo (C₂-C₉), u opcionalmente cuando X² es -NR² y X³ es -NR³, R² y R³ se pueden tomar conjuntamente con los átomos de nitrógeno a los que están unidos para formar un anillo heterocíclico no aromático opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno, alquilo (C₁-C₆), arilo (C₆-C₁₂), heteroarilo (C₂-C₉), alquil (C₁-C₆)-arilo (C₆-C₁₂), haloarilo (C₆-C₁₂) y haloheteroarilo (C₂-C₉);

25 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H, alquilo (C₁-C₆), o tomados junto con el carbono al que están unidos forman un anillo de espirocicloalquilo (C₃-C₁₀) o anillo de espirocicloalcoxi (C₃-C₁₀);

R⁶ es -H, halógeno, -CN, arilo (C₆-C₁₂), ariloxi (C₆-C₁₂), alquiloxi (C₁-C₆); alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno a cuatro halógenos o alquilo (C₁-C₆);

30 A¹ es alquínilo (C₂-C₆); arilo (C₆-C₁₂), heteroarilo (C₂-C₉), heterocicloalquilo (C₂-C₉) o benzoheterocicloalquilo (C₂-C₉) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno a tres halógenos; alquenilo (C₁-C₆), amino, alquil (C₁-C₆), amino, dialquil (C₁-C₆), amino, alcoxi (C₁-C₆), nitro, CN, -OH, alquiloxi (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno a tres halógenos; alcoxi (C₁-C₆), carbonilo y alquil (C₁-C₆), carbonilo;

35 A² es H, arilo (C₆-C₁₂), heteroarilo (C₂-C₉), heterocicloalquilo (C₂-C₉) o benzoheterocicloalquilo (C₂-C₉) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno a tres halógenos; alquilenilo (C₁-C₆), amino, (C₁-C₆) alquilamino, dialquil (C₁-C₆), amino, alcoxi (C₁-C₆), O(cicloalquilo C₃-C₆), cicloalcoxi (C₃-C₆), nitro, CN, OH, alquiloxi (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno a tres halógenos; cicloalquilo (C₃-C₆), alcoxi (C₁-C₆), carbonilo, alquil (C₁-C₆), carbonilo, haloalquilo (C₁-C₆);

40 con la condición de que la suma de n + t + y + z no sea superior a 6;

con la condición de que cuando p sea 0; X² sea NH-SO₂ y X³ sea NH;

con la condición de que cuando n sea 1; t sea 0; y sea 1; z sea 1; X² sea NH; E sea O; X³ sea NH; A² sea H y X⁵ sea un enlace directo; A¹ no sea fenilo sin sustituir, halofenilo o isopropilfenilo;

5 con la condición de que cuando n sea 1; t sea 0; y sea 1; z sea 1; X² sea O; E sea O; X³ sea NH; A¹ sea arilo (C₆-C₁₂) y X⁵ sea un enlace directo; A² sea H y R⁴ sea H, entonces R⁵ no sea ciclohexilo; y

10 con la condición de que cuando n sea 1; t sea 0; y sea 1; z sea 1; X² sea NH; E sea O; X³ sea CH₂; R⁴ y R⁵ sean ambos hidrógeno; A² sea H y X⁵ sea un enlace directo; entonces A¹ no sea fenilo sin sustituir. Ciertos aspectos de la divulgación incluyen administrar el compuesto anterior a un paciente como parte de la terapia de combinación que incluye una terapia de reemplazo enzimático (ERT) y terapia de moléculas pequeñas (SMT) para reducir la cantidad de y/o inhibir la acumulación de sustrato en un paciente diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

La presente divulgación se refiere además al compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo, seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 [2-(2,4'-difluorobifenil-4-il)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- {2-[4-(1,3-benzotiazol-6-il)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- {1-[5-(4-fluorofenil)piridin-2-il]ciclopropil]carbamato de 1-azabicyclo[3.2.2]non-4-ilo;
- {1-[3-(4-fluorofenoxi)fenil]ciclopropil]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- {1-[4-(1,3-benzotiazol-5-il)fenil]ciclopropil]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- [1-(4'-fluoro-3'-metoxibifenil-4-il)ciclopropil]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- 20 [3-(4'-fluorobifenil-4-il)oxetan-3-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- {1-[6-(4-fluorofenoxi)piridin-2-il]ciclopropil]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- [3-(4'-fluorobifenil-4-il)pentan-3-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- {2-[2-(4-fluorofenil)-2H-imidazol-6-il]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- {2-[2-(1H-pirrol-1-il)piridin-4-il]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- 25 1-(3-etil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[1-(4'-fluorobifenil-4-il)ciclopropil]urea;
- N-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-N'-[1-(4'-fluorobifenil-4-il)ciclopropil]etandiamida;
- (1-{4[(4,4difluorociclohexil)oxi]fenil}ciclopropil)carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- 1-(4-metil-1-azabicyclo[3.2.2]non-4-il)-3-[1-(5-fenilpiridin-2-il)ciclopropil]urea;
- 1-[1-(4'-fluorobifenil-4-il)ciclopropil]-1-metil-3-(3-metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)urea;
- 30 1-[1-(4'-fluorobifenil-4-il)ciclopropil]-1-metil-3-(3-metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)urea;
- 1-[2-[4'-(2-metoxietoxi)bifenil-4-il]propan-2-il]-3-(3-metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)urea;
- 2-(1-azabicyclo[3.2.2]non-4-il)-N-[1-(5-fenilpiridin-2-il)ciclopropil]acetamida;
- 3-(4'-fluorobifenil-4-il)-3-metil-N-(4-metil-1-azabicyclo[3.2.2]non-4-il)butanamida;
- diamida N-[2-(bifenil-4-il)propan-2-il]-N'-(3-metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)sulfúrica;
- 35 diamida N-[2-(4'-fluorobifenil-4-il)propan-2-il]-N'-(3-metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)sulfúrica;
- 1-(3-butil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[2-[1-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il]propan-2-il]urea;
- [4-(4-fluorofenil)-2-metilbut-3-in-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo;
- 1-(3-butil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[4-(4-fluorofenil)-2-metilbut-3-in-2-il]urea;
- N-[1-(4'-fluorobifenil-4-il)ciclopropil]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida;
- 40 1-(2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)propan-2-il)-3-(3-metil-1-azabicyclo[3.2.2]nonan-3-il)urea;

1-(2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)propan-2-il)-3-(4-metil-1-azabicyclo[4.2.2]decan-4-il)urea;

1-(2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)propan-2-il)-3-(3-metil-1-azabicyclo[4.2.2]decan-3-il)urea; y

1-(2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)propan-2-il)-3-(5-metil-1-azabicyclo[4.2.2]decan-5-il)urea.

- 5 La presente divulgación se refiere además a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o trastorno mediado por glucosilceramida sintasa (GCS) o una enfermedad o trastorno en la que GCS participa en un sujeto en necesidad de tal tratamiento que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de la fórmula I.

La presente divulgación se refiere además a un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por glucosilceramida sintasa (GCS) o una enfermedad o trastorno en el que GCS participa en un sujeto en necesidad de tal tratamiento que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de la fórmula I.

- 10 La presente divulgación se refiere además a un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como cáncer.

La presente divulgación se refiere además a un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como un trastorno metabólico.

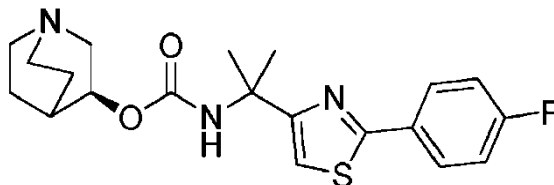
- 15 La presente divulgación se refiere además a un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como una enfermedad neuropática.

La presente divulgación se refiere además a un método en donde la enfermedad neuropática es enfermedad de Alzheimer.

La presente divulgación se refiere además a un método en donde la enfermedad neuropática es enfermedad de Parkinson.

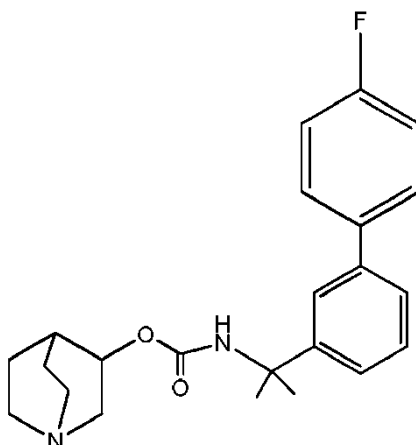
- 20 La presente divulgación se refiere además al método de inducción de actividad catalítica de glucosilceramida sintasa reducida en una célula, *in vitro*, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del compuesto de la fórmula I.

La presente invención se refiere a un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural



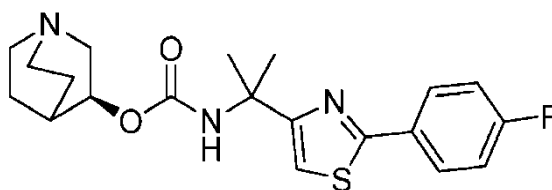
- 25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación se refiere además al compuesto de la fórmula I, representado por la siguiente fórmula estructural



o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

- 30 La presente invención se refiere además a un compuesto para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, en donde el compuesto se representa por siguiente fórmula estructural



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones de la invención, la enfermedad de almacenamiento lisosómico resulta de un defecto en la vía del glucoesfingolípido.

- 5 En ciertas realizaciones de la invención, la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Gaucher, Fabry, gangliosidosis de GM_1 , deficiencia del activador GM_2 , Tay-Sachs o Sandhoff.

La presente invención se refiere además a dicho compuesto para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, en donde el uso comprende además la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima lisosómica.

- 10 En ciertas realizaciones de la invención, la enzima lisosómica es glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, hexosaminidasa A, hexosaminidasa B o β -galactosidasa del gangliósido GM_1 .

En ciertas realizaciones de la invención, el sujeto tiene niveles elevados de un sustrato lisosómico antes del tratamiento y una vez que recibe tratamiento el sujeto tiene menores cantidades combinadas del sustrato lisosómico en la orina y plasma que un sujeto tratado con o la enzima lisosómica o el compuesto solo.

- 15 En ciertos casos de la divulgación, el sustrato es globotriaosilceramida o liso-globotriaosilceramida, y combinaciones de los mismos.

La presente divulgación se refiere además a un método de reducción de la actividad de glucosilceramida sintasa (GCS) en un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, que incluye administrar al paciente una cantidad eficaz del compuesto de la fórmula I, tanto solo como una terapia de combinación con una terapia de reemplazo enzimático.

- 20 La presente divulgación se refiere además a un método de reducción de la acumulación de un material derivado de GCS en un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, que incluye administrar al paciente una cantidad eficaz del compuesto de la fórmula I, tanto solo como una terapia de combinación con una terapia de reemplazo enzimático.

- 25 La presente divulgación proporciona un método de terapia de combinación para el tratamiento de un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende alternar entre administración de una terapia de reemplazo enzimático y una terapia de moléculas pequeñas.

La presente divulgación proporciona un método de terapia de combinación para el tratamiento de un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende administrar simultáneamente una terapia de reemplazo enzimático y una terapia de moléculas pequeñas.

- 30

En las diversas terapias de combinación de la divulgación, se entenderá que la administración de la terapia de moléculas pequeñas puede ocurrir antes de, simultáneamente con, o después de, la administración de la terapia de reemplazo enzimático. Similarmente, la administración de la terapia de reemplazo enzimático puede ocurrir antes de, simultáneamente con, o después de, la administración de terapia de moléculas pequeñas.

- 35 Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" significa o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable o una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable de un compuesto actualmente desvelado que se puede administrar sin ningún efecto biológico no deseable sustancial resultante, o ninguna interacción perjudicial resultante con cualquier otro componente de una composición farmacéutica en la que puede estar contenido.

- 40

Como se usa en el presente documento, el término "profármaco" significa un derivado farmacológico de una molécula de fármaco original que requiere biotransformación, ya sea espontánea o enzimática, dentro del organismo para liberar el fármaco activo. Por ejemplo, los profármacos son variaciones o derivados de los compuestos de la fórmula I que tienen grupos escindibles en ciertas condiciones metabólicas, que cuando se escinden, se convierten en los compuestos de la fórmula I. Dichos profármacos son entonces farmacéuticamente activos *in vivo*, cuando experimentan solvolisis en condiciones fisiológicas o experimentan degradación enzimática. Los compuestos de profármaco en el presente documento se pueden denominar individuales, dobles, triples, etc., dependiendo del número de etapas de biotransformación requeridas para liberar el fármaco activo dentro del organismo, y el número

- 45

de funcionalidades presentes en una forma de tipo precursor. Las formas de profármaco frecuentemente ofrecen ventajas de solubilidad, compatibilidad de tejido, o liberación retardada en el organismo del mamífero (véase Bundgard, Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985 y Silverman.

The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, pp. 352-401, Academic Press, San Diego, Calif., 1992). Los profármacos comúnmente conocidos en la técnica incluyen derivados de ácido bien conocidos, tales como, por ejemplo, ésteres preparados haciendo reaccionar los ácidos originales con un alcohol adecuado, amidas preparadas haciendo reaccionar el compuesto de ácido original con una amina, grupos básicos reaccionados para formar un derivado de base acilado, etc. Por supuesto, se pueden combinar otros derivados de profármaco con otras características desveladas en el presente documento para potenciar la biodisponibilidad. Como tales, los expertos en la técnica apreciarán que ciertos de los compuestos actualmente desvelados que tienen grupos amino libres, amido, hidroxilo o carboxílicos se pueden convertir en profármacos. Los profármacos incluyen compuestos que tienen un resto de aminoácido, o una cadena de polipéptidos de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) restos de aminoácidos que se unen covalentemente mediante enlaces peptídicos a los grupos amino libre, hidroxilo o ácido carboxílico de los compuestos actualmente desvelados. Los restos de aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos que existen de forma natural comúnmente designados por los símbolos de tres letras y también incluyen 4-hidroxi prolina, hidroxilisina, demosina, isodemosina, 3-metilhistidina, norvalina, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, citrulina homocisteína, homoserina, ornitina y metionina sulfona. Los profármacos también incluyen compuestos que tienen un resto carbonato, carbamato, amida o éster alquílico covalentemente unido a cualquiera de los sustituyentes anteriormente desvelados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo (C₁-C₆)" significa un radical libre saturado lineal o ramificado que consiste esencialmente en 1 a 6 átomos de carbono y un número correspondiente de átomos de hidrógeno. Los grupos alquilo (C₁-C₆) a modo de ejemplo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, etc. Por supuesto, otros grupos alquilo (C₁-C₆) serán rápidamente evidentes para los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo (C₃-C₁₀)" significa un radical libre saturado no aromático que forma al menos un anillo que consiste esencialmente en 3 a 10 átomos de carbono y un número correspondiente de átomos de hidrógeno. Como tales, los grupos cicloalquilo (C₃-C₁₀) pueden ser monocíclicos o multicíclicos. Los anillos individuales de tales grupos cicloalquilo multicíclicos pueden tener diferentes conectividades, por ejemplo, condensados, unidos por puente, espiro, etc., además de sustitución de enlace covalente. Los grupos cicloalquilo (C₃-C₁₀) a modo de ejemplo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, norbornanilo, biciclo[3.2.1]octanilo, octahidro-pentalenilo, espiro[4.5]decanilo, ciclopropilo sustituido con ciclobutilo, ciclobutilo sustituido con ciclopentilo, ciclohexilo sustituido con ciclopropilo, etc. Por supuesto, otros grupos cicloalquilo (C₃-C₁₀) serán rápidamente evidentes para los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "heterocicloalquilo (C₂-C₉)" significa un radical libre no aromático que tiene 3 a 10 átomos (es decir, átomos de anillo) que forman al menos un anillo, en donde 2 a 9 de los átomos de anillo son carbono y el (los) restante(s) átomo(s) del anillo (es decir, hetero átomo(s) del anillo) se seleccionan del grupo que consiste en nitrógeno, azufre y oxígeno. Como tal, los grupos heterocicloalquilo (C₂-C₉) pueden ser monocíclicos o multicíclicos. Los anillos individuales de dichos grupos heterocicloalquilo multicíclico pueden tener diferentes conectividades, por ejemplo, condensados, unidos por puente, espiro, etc., además de sustitución de enlace covalente. Los grupos heterocicloalquilo a modo de ejemplo (C₂-C₉) incluyen pirrolidinilo, tetrahydrofuranilo, dihydrofuranilo, tetrahydropiranilo, piranilo, tiopiranilo, aziridinilo, azetidino, oxiranilo, metilendioxi, cromenilo, barbiturilo, isoxazolidinilo, 1,3-oxazolidin-3-ilo, isotiazolidinilo, 1,3-tiazolidin-3-ilo, 1,2-pirazolidin-2-ilo, 1,3-pirazolidin-1-ilo, piperidinilo, tiomorfolinilo, 1,2-tetrahydrotiazin-2-ilo, 1,3-tetrahydrotiazin-3-ilo, tetrahydrotiadiazinilo, morfolinilo, 1,2-tetrahydrodiazin-2-ilo, 1,3-tetrahydrodiazin-1-ilo, tetrahydroazepinilo, piperazinilo, piperizin-2-onilo, piperizin-3-onilo, cromanilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, imidazolidinilo, 2-imidazolidinilo, 1,4-dioxanilo, 8-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 3-azabicyclo[3.2.1]octanilo, 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octanilo, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptanilo, 2,5-diazabicyclo[2.2.2]octanilo, octahidro-2H-pirido[1,2-a]pirazinilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 2-azaespiro[4.4]nonanilo, 7-oxa-1-azaespiro[4.4]nonanilo, 7-azabicyclo[2.2.2]heptanilo, octahidro-1H-indolilo, etc. En general, el grupo heterocicloalquilo (C₂-C₉) normalmente está unido a la estructura principal por un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno. Por supuesto, otros grupos heterocicloalquilo (C₂-C₉) serán rápidamente evidentes para los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo (C₂-C₉)" significa un radical libre aromático que tiene 5 a 10 átomos (es decir, átomos de anillo) que forman al menos un anillo, en donde 2 a 9 de los átomos de anillo son carbono y el (los) átomo(s) de anillo restantes (es decir, heteroátomo(s) de anillo) se seleccionan del grupo que consiste en nitrógeno, azufre y oxígeno. Como tales, los grupos heteroarilo (C₂-C₉) pueden ser monocíclicos o multicíclicos. Los anillos individuales de dichos grupos heteroarilo multicíclicos pueden tener diferentes conectividades, por ejemplo, condensados, etc., además de sustitución de enlace covalente. Los grupos heteroarilo (C₂-C₉) a modo de ejemplo incluyen furilo, tienilo, tiazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, pirrolilo, triazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, 1,3,5-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,3,5-tiadiazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, 1,2,4-triazinilo, 1,2,3-triazinilo, 1,3,5-triazinilo, pirazolo[3,4-b]piridinilo, cinnolinilo, pteridinilo, purinilo, 6,7-dihidro-5H-[1]piridinilo, benzo[b]tiofenilo, 5,6,7,8-

tetrahidro-quinolin-3-ilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, bencisoxazolilo, bencimidazolilo, tianaftenilo, isotianaftenilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, indolilo, indolizínilo, indazolilo, isoquinolilo, quinolilo, ftalazinilo, quinoxalinilo, quiazolinilo y benzoxazinilo, etc. En general, el grupo heteroarilo (C₂-C₉) normalmente se une a la estructura principal por un átomo de carbono, sin embargo, los expertos en la técnica se darán cuenta cuando ciertos otros átomos, por ejemplo, heteroátomos de anillo, se pueden unir a la estructura principal. Por supuesto, otros grupos heteroarilo (C₂-C₉) serán rápidamente evidentes para los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo (C₆-C₁₀)" significa fenilo o naftilo.

Como se usa en el presente documento, el término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo, o yodo.

Como se usa en el presente documento, el término "amino" significa un radical libre que tiene un átomo de nitrógeno y 1 a 2 átomos de hidrógeno. Como tal, el término amino se refiere, en general, a aminas primarias y secundarias. A ese respecto, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, una amina terciaria se representa por la fórmula general RR'N-, en donde R y R' son radicales de carbono que pueden o pueden no ser idénticos. Sin embargo, el término "amino" se puede usar, en general, en el presente documento para describir una amina primaria, secundaria o terciaria, y los expertos en la técnica serán fácilmente capaces de determinar la identificación de cuáles en vista del contexto en el que se usa este término en la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "terapia de combinación" significa tratar un paciente con dos o más plataformas terapéuticas (por ejemplo, terapia de reemplazo enzimático y terapia de moléculas pequeñas) en programas de tratamiento en rotación, alternos y/o simultáneos. Los ejemplos de programas de tratamiento pueden incluir, pero no se limitan a: (1) terapia de reemplazo enzimático, luego terapia de moléculas pequeñas; (2) terapia de moléculas pequeñas, luego terapia de reemplazo enzimático; (3) terapia de reemplazo enzimático concurrente con terapia de moléculas pequeñas, y (4) cualquier combinación de los anteriores. La terapia de combinación puede proporcionar un solapamiento temporal de las plataformas terapéuticas, según se necesite, dependiendo de la evolución clínica de una enfermedad de almacenamiento dada en un sujeto dado.

Como se usa en el presente documento, el término "terapia de reemplazo enzimático", o "ERT", significa administrar una enzima natural o recombinante exógenamente producida a un paciente que está en necesidad de la misma. En el caso de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, por ejemplo, el paciente acumula niveles perjudiciales de un sustrato (es decir, material almacenado) en los lisosomas debido a una deficiencia o defecto en una enzima responsable de metabolizar el sustrato, o debido a una deficiencia en un activador enzimático requerido para la apropiada función enzimática. La terapia de reemplazo enzimático se proporciona al paciente para reducir los niveles de (es decir, citorreducir) sustrato acumulado en tejidos afectados. La Tabla 1 proporciona una lista de enfermedades de almacenamiento lisosómico e identifica la deficiencia enzimática correspondiente y el sustrato acumulado para cada enfermedad. Se conocen en la técnica terapias de reemplazo enzimático para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico. Según una terapia de combinación de la divulgación, las enzimas lisosómicas identificadas en la Tabla 1 se pueden usar para terapia de reemplazo enzimático para reducir los niveles de sustrato correspondiente en un paciente diagnosticado con la respectiva enfermedad de almacenamiento lisosómico.

Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" de una enzima o molécula pequeña, cuando se suministra a un sujeto en una terapia de combinación de la divulgación, es una cantidad suficiente para mejorar la evolución clínica de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, donde la mejora clínica se mide por cualquiera de la variedad de parámetros definidos bien conocidos para el experto.

Abreviaturas

ACN se refiere a acetonitrilo.

DMF se refiere a N,N-dimetilformamida.

DMSO se refiere a sulfóxido de dimetilo.

EtOAc se refiere a acetato de etilo.

EtOH se refiere a etanol.

Base de Hunig se refiere a diisopropiletilamina ("DIPEA").

MeOH se refiere a metanol.

NaOH se refiere a hidróxido sódico.

THF se refiere a tetrahidrofurano.

TFA se refiere a ácido trifluoroacético.

Las características y ventajas adicionales de los compuestos desvelados en el presente documento serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de ciertos casos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- FIG. 1** Presenta la vía metabólica para la posible síntesis de Gb3 y liso-Gb3. Las vías sintéticas documentadas se muestran con flechas negras y las (posibles) vías sin documentar se muestran con flechas grises.
- FIG. 2A** Estructura química de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo
- FIG. 2B** Estructura química de (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo
- FIG. 3**
- Concentración de Gb3 en riñón (A) y corazón (B) de ratones con Fabry de 12 meses de edad tratados con 300 mg/kg/día de sal de ácido L-tartárico de [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidin-1-ilmetil-etil]-amida de ácido (1R,2R)-octanoico ("GZ 638") o 60 mg/kg/día de la sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo ("GZ 452").
- FIG. 4A**
- Cronología del estudio que muestra ratones con Fabry empezando el tratamiento con 60 mg/kg/día de GZ 452 empezando a 3, 8 y 12 meses de edad. Se realizaron análisis periódicos de sangre, análisis de orina, ensayos en placa caliente y cámara de actividad como se indica.
- FIG. 4B**
- Concentración de Gb3 en orina (A) y plasma (B) de ratones con Fabry empezando el tratamiento con 60 mg/kg/día de GZ 452 a cualquiera de 3 u 8 meses de edad. El tratamiento de fármaco (Rx) fue durante 0 2 o 4 meses.
- FIG. 5**
- Concentración de Gb3 (A) y liso-Gb3 (B) en tejido renal de ratones con Fabry de 12 meses de edad que o no fueron tratados (UNT) o se trataron con 60 mg/kg/día de GZ 452 durante 4 meses (SRT).
- FIG. 6A**
- Cronología del estudio que muestra ratones con Fabry que está tratándose con alfa-galactosidasa A (1 mg/kg cada 2 meses) o con 60 mg/kg/día de GZ 452, o una combinación de los 2 tratamientos empezando a los 3 meses de edad. Se realizaron análisis periódicos de sangre, análisis de orina y ensayos en placa caliente como se indica.
- FIG. 6B**
- Concentraciones de plasma (A y C) y orina (B y D) Gb3 (A y C) y liso-Gb3 (C y D) de ratones con Fabry de 5 meses de edad tratados con alfa-galactosidasa A solo (ERT), GZ 452 solo (SRT), o una combinación de los dos (E+S) durante 2 meses.
- FIG. 7**
- Análisis de isoformas de la cadena de acilo unida a N de Gb3 aislada de plasma, orina y riñón de ratones con Fabry.
- FIG. 8**
- Latencia (tiempo hasta responder) a un estímulo de calor (placa caliente a 55 °C) de ratones con Fabry de 10 meses de edad después de 7 meses tratamiento con alfa-galactosidasa A (ERT), GZ 452 (SRT) o una combinación de los dos (E+S) con respecto a ratones sin tratar (UNT) y ratones no mutantes (WT).
- FIG. 9** La glucosilceramida (GluCer) y glucosilesfingosina (GluEsf) son significativamente elevadas en los cerebros de ratones K14 neonatales. El análisis de espectrometría de masas de glucosil- y galactosilceramidas muestra que (A) GluCer se elevó 10 veces en ratones K14 (un modelo animal de enfermedad de Gaucher neonatal, también conocida como enfermedad de Gaucher tipo 2) en comparación con ratones WT durante las primeras 2 semanas de vida, (B) los niveles de GalCer fueron similares con el tiempo para tanto ratones K14 como WT, (C) los niveles de GluEsf fueron ≥10 veces superiores en ratones K14 que los ratones WT de la misma edad durante las primeras 2 semanas de vida; los niveles de GluEsf en animales WT estuvieron por debajo del nivel de detección (<0,3 ng/mg). (D) No hubo diferencias significativas en los pesos de los cerebros entre ratones K14 y WT durante las primeras 2 semanas de vida. Los puntos de datos representan valores medios y las barras de error EEM para N=4.

FIG. 10 La administración sistémica de (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo ("GZ 161") reduce los niveles de GluCer y GluEsf en el cerebro de ratones K14. Se trataron ratones K14 y WT diariamente (IP) empezando en P4 con vehículo o 5 mg/kg de GZ 161, y se analizaron los cerebros para GluCer y GluEsf en P10. Los animales tratados con GZ 161 fueron asintomáticos en este momento. El tratamiento con GZ 161 redujo en K14 (A) los niveles de GluCer en ~70 % y (B) GluEsf en ~60 %. Los niveles post-tratamiento de ambos glucoesfingolípidos siguieron siendo significativamente elevados en comparación con sus compañeros de camada WT y los genotipos se confirmaron por análisis de ADN en la autopsia. *p<0,05. N=4/grupo.

FIG. 11 La administración sistémica de GZ 161 reduce la tinción de CD68 en todo el cerebro de ratones K14. (Paneles superiores) Tinción inmunohistoquímica de CD68 representativa en P10 en el hipocampo, tálamo, tronco encefálico y cerebelo de ratones K14 tratados diariamente (IP) empezando en el día postnatal 4 (P4) con vehículo o GZ 161 y ratones WT. (Paneles inferiores) Cuantificación de la tinción en los grupos mostrados anteriormente, que muestra que el tratamiento sistémico con GZ 161 da como resultado reducciones significativas de las células CD68+ en todas las regiones del cerebro. Se observaron reducciones similares en otras estructuras tales como el bulbo olfativo y la corteza frontal (datos no mostrados). **p<0,01. N=4/grupo

FIG. 12 La administración sistémica de GZ 161 reduce la tinción de F4/80 en algunas regiones del cerebro de ratones K14. (Paneles superiores) Tinción inmunohistoquímica de F4/80 representativa en P10 en el hipocampo, tálamo, tronco encefálico y cerebelo de ratones K14 tratados diariamente (IP) empezando en P4 con vehículo o GZ 161, y ratones WT. (Paneles inferiores) Cuantificación de la tinción en los grupos mostrados anteriormente, que muestra que el tratamiento sistémico con GZ 161 da como resultado reducciones significativas de las células F4/80+ en el tálamo y el tronco encefálico. Se observaron reducciones similares en otras estructuras tales como el bulbo olfativo y la corteza frontal; se observaron diferencias estadísticas en ambas estructuras (datos no mostrados). *p<0,05. N=4/grupo

FIG. 13 La administración sistémica de GZ 161 disminuye la gliosis en ratones K14. (Paneles superiores) Tinción inmunohistoquímica de GFAP representativa en P10 en el hipocampo, tálamo, tronco encefálico y cerebelo de ratones K14 tratados diariamente (IP) empezando en P4 con vehículo o GZ 161, y ratones WT. (Paneles inferiores) Cuantificación de la tinción en los grupos mostrados anteriormente, que muestra que el tratamiento sistémico con GZ 161 da como resultado reducciones significativas de las células GFAP+ en el hipocampo y cerebelo; se observaron diferencias estadísticas en ambas estructuras (datos no mostrados).

FIG. 14 La administración sistémica de GZ 161 aumenta la mediana de la esperanza de vida de ratones K14. Se inyectaron (IP) ratones K14 diariamente empezando en P4 con vehículo o GZ 161 o se administraron con un tratamiento combinado de tres inyecciones intracerebroventriculares (ICV) de rhGC en P1, 2, 3 junto con inyecciones diarias (IP) de GZ 161 empezando en P4. Los ratones tratados con vehículo tuvieron una mediana de la esperanza de vida de 15 días (N=25); los ratones tratados con GZ 161 tuvieron una mediana de la esperanza de vida de 18 días (N=12; p<0,0001 en comparación con los tratados con vehículo); los ratones coadministrados con GZ 161 y rhGC tuvieron una mediana de la esperanza de vida de 26 días (N=13)

FIG. 15 GZ 161 parece que atraviesa la barrera hemato-placentaria. La administración sistémica (20 mg/kg/día en comida) de GZ 161 a ratones WT preñados reduce la carga de GluCer en homogeneizados de cerebro completos de ratones al nacer (P0). N=7; p<0,0001)

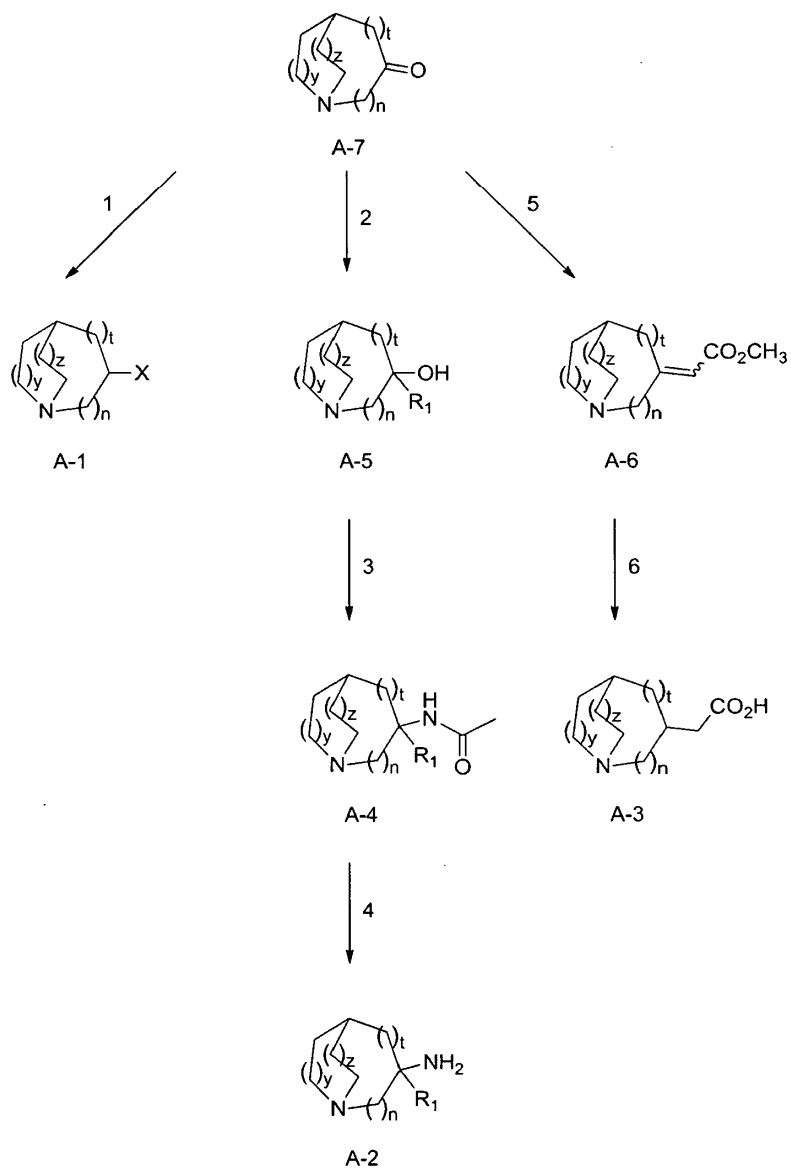
FIG. 16 Tratar ratones K14 con GZ 161 en el útero no tiene un efecto mínimo sobre la supervivencia. Los ratones K14 tratados diariamente (IP) empezando en P4 con vehículo tuvieron una mediana de la esperanza de vida de 14 días (N=13). La administración sistémica (20 mg/kg/día en comida) de GZ 161 a ratones K14 preñados y luego la administración sistémica diaria (IP) de GZ 161 (5 mg/kg) a las crías empezando en P0 prolongó la esperanza de vida hasta 19 días (N=13), un resultado similar a tratar crías diariamente por vía sistémica (IP) con GZ 161 a 5 mg/kg empezando en P4 (N=12).

FIG. 17 Niveles de Gb3 en tejido renal de ratones con Fabry macho y hembra de 12 meses de edad tratados con GZ 452, GZ 161 y GZ 638. Los ratones empezaron el tratamiento a ~8 meses de edad y se trataron durante 4 meses con: 60 mg/kg/día de GZ 452, 120 mg/kg/día de GZ 452, 20 mg/kg/día de GZ 161, 300 mg/kg/día de GZ 638, más WT y controles UNT.

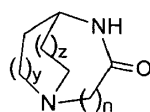
DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Ciertos métodos preferidos de la divulgación se describen ahora en el contexto de las siguientes preparaciones y esquemas.

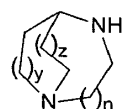
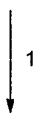
PREPARACIÓN A



PREPARACIÓN B

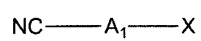


B-2

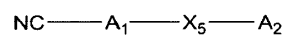
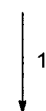


B-1

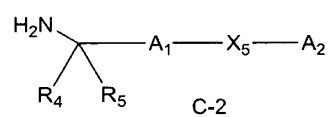
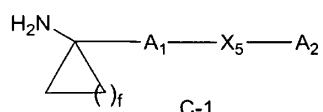
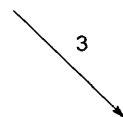
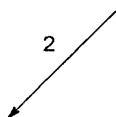
PREPARACIÓN C



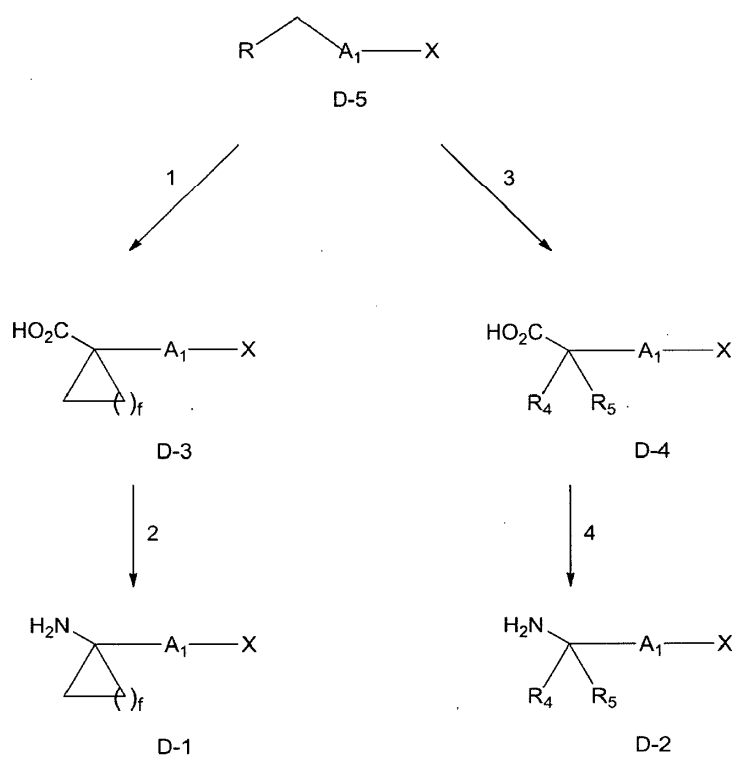
C-4



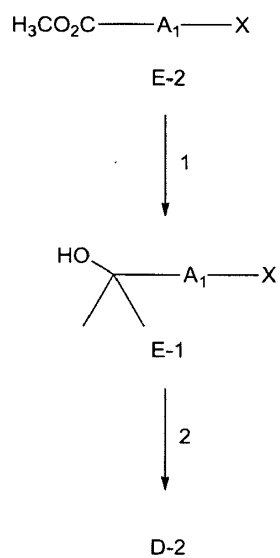
C-3



PREPARACIÓN D

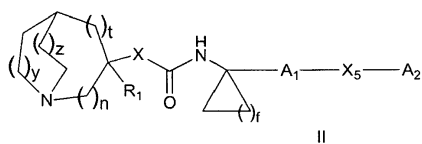


PREPARACIÓN E

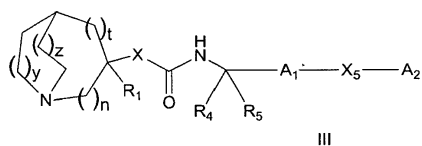


ESQUEMA 1

A-1 o A-2

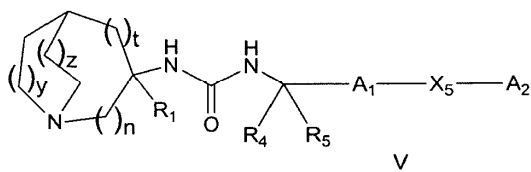
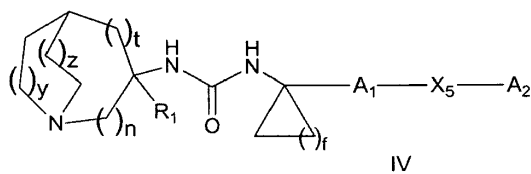
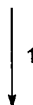


o

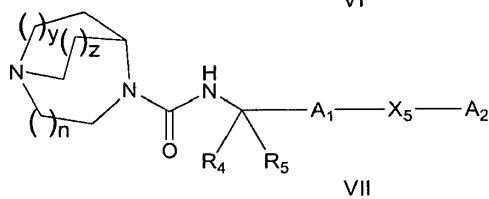
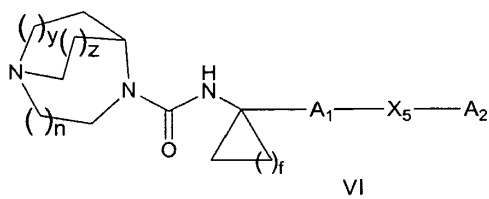


ESQUEMA 2

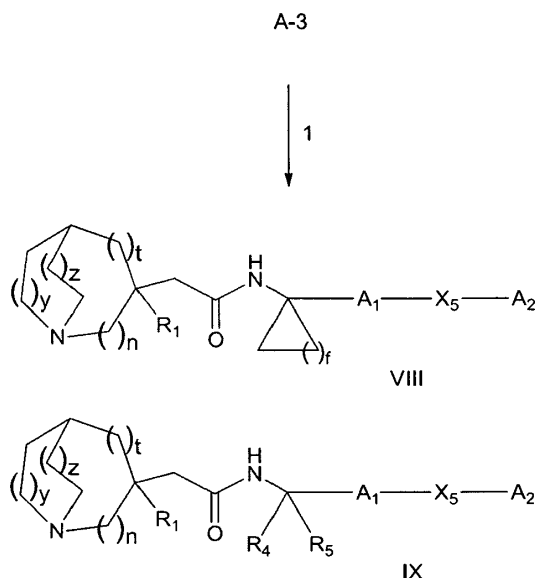
A-1 o A-2 o B-1



o



ESQUEMA 3



En la reacción 1 de la Preparación A, el compuesto de la fórmula A-7 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-1, en donde X es OH, reduciendo A-7 con un agente reductor, preferentemente hidruro de litio y aluminio en disolvente aprótico tal como tetrahidrofurano. La reacción se agita a una temperatura entre 0 °C y temperatura ambiente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente aproximadamente 30 minutos. Alternativamente, el compuesto de la fórmula A-7 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-1, en donde X es OH, reduciendo A-7 bajo aproximadamente 1 atmósfera de hidrógeno en presencia de un catalizador, preferentemente óxido de platino, y un disolvente polar tal como metanol o etanol durante un periodo de 2 horas a 6 horas, preferentemente 4 horas. Alternativamente, el compuesto de la fórmula A-7 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-1, en donde X es NH, haciendo reaccionar A-7 con clorhidrato de hidroxilamina y acetato sódico en un disolvente polar tal como etanol, metanol, isopropanol, preferentemente isopropanol. La mezcla de reacción se agita a una temperatura entre 50-80 °C durante un periodo de 2 horas a 7 horas, preferentemente 3 horas. Posteriormente, el compuesto así formado anteriormente se convierte en el compuesto de la fórmula A-1 con un agente reductor, preferentemente sodio metálico en un disolvente prótico polar tal como etanol, metanol, propanol, preferentemente *n*-propanol. La reacción se agita durante la noche a 50-80 °C, preferentemente temperatura de reflujo del disolvente.

En la reacción 2 de la Preparación A, el compuesto de la fórmula A-7 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-5, en donde R1, n y z son como se han definido anteriormente, añadiendo una disolución de R1-bromuro de magnesio en éter a una disolución de A-7 en un disolvente aprótico, tal como éter, a una temperatura entre aproximadamente -60 °C y aproximadamente -90 °C, preferentemente aproximadamente -78 °C durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 4 horas, preferentemente aproximadamente 2 horas. Alternativamente, el compuesto de la fórmula A-7 se puede hacer reaccionar con R1-litio para proporcionar el compuesto de la fórmula A-5.

En la reacción 3 de la Preparación A, el compuesto de la fórmula A-5 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-4, en donde R1, n y z son como se han definido anteriormente, tratando A-5 con un ácido fuerte, preferentemente ácido sulfúrico, en presencia de acetonitrilo. La reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente.

En la reacción 4 de la Preparación A, el compuesto de la fórmula A-4 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-3, en donde R1, n y z son como se han definido anteriormente, tratando A-4 con un ácido, preferentemente ácido clorhídrico. La reacción se agita a reflujo durante un periodo de 18 horas a 72 horas, preferentemente 24 horas y se basifica hasta pH=8 mediante tratamiento con una base inorgánica en disolución acuosa, tal como hidróxido sódico.

En la reacción 5 de la Preparación A, el compuesto de la fórmula A-7 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-6, en donde R1, n y z son como se han definido anteriormente, haciendo reaccionar A-7 con un iluro de trifenilfosfonio dando el alqueno correspondiente el compuesto de la fórmula A-6. La reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche.

En la reacción 6 de la Preparación A, el compuesto de la fórmula A-6 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula A-3, en donde R1, n y z son como se han definido anteriormente, reduciendo A-6 bajo

aproximadamente 1 atmósfera de hidrógeno en presencia de un catalizador, preferentemente paladio sobre carbono, y un disolvente polar, tal como metanol, etanol o acetato de etilo. La reacción se agita a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 24 horas, preferentemente aproximadamente 18 horas. Posteriormente, el compuesto así formado se trata con una base, preferentemente hidróxido de litio, en una mezcla de disolvente tal como tetrahidrofurano, metanol y agua para proporcionar el compuesto de A-3. La reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente.

En la reacción 1 de la Preparación B, el compuesto de la fórmula B-2 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula B-1, reduciendo B-2 con un agente reductor, preferentemente hidruro de litio y aluminio en disolvente aprótico tal como tetrahidrofurano. La reacción se agita a una temperatura entre 0 °C y temperatura ambiente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente aproximadamente 30 minutos.

En la reacción 1 de la Preparación C, el compuesto de C-4 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula C-3, en donde X es bromo o cloruro, haciendo reaccionar C-4 con ácido borónico en presencia de un catalizador, preferentemente dicloruro de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno-paladio (II), y carbonato de potasio. La reacción se calienta en microondas en una mezcla de dimetoxietano y agua a una temperatura entre aproximadamente 130 °C y aproximadamente 170 °C, preferentemente aproximadamente 150 °C, durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 15 min y aproximadamente 1 hora, preferentemente aproximadamente 30 min. Alternativamente, la reacción se puede realizar usando disolvente tal como dioxano y se agita durante la noche a 100 °C con calentamiento convencional.

En la reacción 2 de la Preparación C, el compuesto de C-3 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula C-1, en donde f es 1 a 8 y A1, X5 y A2 son como se han definido anteriormente, añadiendo bromuro de etilmagnesio gota a gota a una mezcla de C-3 e isopropóxido de titanio en éter. La reacción se agita a una temperatura entre aproximadamente -50 °C y aproximadamente -90 °C, preferentemente aproximadamente -70 °C. La mezcla de reacción resultante se dejó calentar a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, preferentemente aproximadamente 25 °C, y se dejó agitar durante un periodo de tiempo adicional entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente aproximadamente 1 hora. Entonces se añade trifluoruro de boro-eterato de dietilo a la mezcla gota a gota a una temperatura entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C, preferentemente aproximadamente 25 °C.

En la reacción 3 de la Preparación C, el compuesto de C-3 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula C-2, en donde A1, X5 y A2 son como se han definido anteriormente, agitando primero una suspensión de cloruro de cerio (III) en un disolvente aprótico, tal como tetrahidrofurano, a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente aproximadamente 1 hora. La suspensión resultante se enfría hasta una temperatura entre aproximadamente -60 °C y aproximadamente -90 °C, preferentemente aproximadamente -78 °C, y se añade un agente de organolitio, preferentemente metil-litio en una disolución de éter. Se dejó formar el complejo de organocerio resultante durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente aproximadamente 1 hora, seguido por la adición de C-3 en un disolvente aprótico, tal como tetrahidrofurano. Entonces se calentó la mezcla de reacción resultante hasta temperatura ambiente y se dejó con agitación durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 16 horas y aproximadamente 20 horas, preferentemente aproximadamente 18 horas.

En la reacción 1 de la Preparación D, el compuesto de D-5, en donde R es CO₂Et o CN y X es bromo o cloruro, se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula D-3, haciendo reaccionar D-5 con un dihaluro de alquilo tal como 1,2-dibromoetano. Posteriormente, el compuesto así formado se trata con una base inorgánica tal como hidróxido de litio o hidróxido potásico, en una mezcla de disolvente tal como tetrahidrofurano, metanol, glucol y agua para proporcionar el compuesto de D-3, en donde f es 1 a 8. La reacción se agita durante la noche a una temperatura entre 25 °C y 130 °C. Alternativamente, para formar el compuesto correspondiente de la fórmula D-3, en donde X es X5-A2, D-5, primero se debe hacer reaccionar según el procedimiento tratado anteriormente en la reacción 1 de la Preparación C.

En la reacción 2 de la Preparación D, el compuesto de D-3 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula D-1 haciendo reaccionar D-3 con una base tal como trietilamina y difenilfosforilazida en disolvente aprótico tal como tolueno. La reacción se calentó hasta un intervalo de temperatura entre 80 °C-110 °C, preferentemente a 110 °C durante 15 min a 1 hora, preferentemente 30 minutos. El producto intermedio así formado se trata entonces con alcohol *tert*-butilico durante un periodo durante la noche a 60-110 °C, preferentemente 90 °C. Posteriormente, el carbamato así formado se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula D-1, en donde f es 1 a 8, por un tratamiento bajo medios ácidos usando preferentemente ácido trifluoroacético en diclorometano a temperatura ambiente durante un periodo de 30 min a 5 horas, preferentemente 2 horas.

En la reacción 3 de la Preparación D, el compuesto de D-5, en donde R es CO₂Et o CN y X es bromo o cloruro, se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula D-4, haciendo reaccionar D-5 con un haluro de alquilo tal como MeI. Posteriormente, el compuesto así formado se trata con una base inorgánica tal como hidróxido de litio o hidróxido potásico, en una mezcla de disolvente tal como tetrahidrofurano, metanol, glucol y agua para proporcionar el compuesto de D-4. La reacción se agita durante la noche a una temperatura entre 25 °C y 130 °C.

Alternativamente, para formar el compuesto correspondiente de la fórmula D-4, en donde X es X5-A2, D-5 se debe hacer reaccionar primero según el procedimiento tratado anteriormente en la reacción 1 de la Preparación C.

En la reacción 4 de la Preparación D, el compuesto de D-4 se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula D-2, haciendo reaccionar D-4 con una base tal como trietilamina y difenilfosforilazida en disolvente aprótico tal como tolueno. La reacción se calentó hasta un intervalo de temperatura entre 80 °C-110 °C, preferentemente a 110 °C durante 15 min a 1 hora, preferentemente 30 minutos. El producto intermedio así formado se trata entonces con alcohol *tert*-butílico durante un periodo durante la noche a 60-110 °C, preferentemente 90 °C. Posteriormente, el carbamato así formado se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula D-1 por un tratamiento bajo medios ácidos usando preferentemente ácido trifluoroacético en diclorometano a temperatura ambiente durante un periodo de 30 min a 5 horas, preferentemente 2 horas.

En la reacción 1 de la Preparación E, el compuesto de la fórmula E-2, en donde X es bromuro o cloruro, se convierte en el compuesto correspondiente de la fórmula E-1, haciendo reaccionar E-2 con bromuro de metilmagnesio en éter, a una temperatura entre aproximadamente -60 °C a aproximadamente -90 °C, preferentemente aproximadamente -78 °C durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 30 min y aproximadamente 3 horas, preferentemente aproximadamente 2 horas. Alternativamente, para formar el compuesto correspondiente de la fórmula E-1, en donde X es X5-A2, E-2 se debe hacer reaccionar primero según el procedimiento tratado anteriormente en la reacción 1 de la Preparación C.

En la reacción 2 de la Preparación E, el compuesto de la fórmula E-1 se convierte en el compuesto correspondiente de D-2 tratando E-1 con un ácido fuerte, preferentemente ácido sulfúrico, en presencia de cloroacetónitrilo. La reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, el compuesto así formado se trata con tiourea en un disolvente prótico polar tal como etanol durante un durante la noche a 80 °C para formar el compuesto correspondiente de la fórmula D-2. Alternativamente, E-1 se trata con azida de sodio y ácido trifluoroacético en un disolvente aprótico tal como diclorometano en un intervalo de temperatura de -10 °C hasta temperatura ambiente, preferentemente 0 °C. El compuesto así formado se reduce en presencia de trifenilfosfina en una disolución de tetrahidrofurano y agua para formar el compuesto correspondiente de la fórmula D-2. La reacción se agita a un intervalo de temperatura 25-80 °C, preferentemente a temperatura ambiente durante un periodo de 2 horas a 24 horas, preferentemente 18 horas.

En la reacción 1 de Esquema 1, los compuestos de la fórmula A-1 o A-2 se convierten en los compuestos correspondientes de la fórmula II, en donde f es 1 a 8, o III, respectivamente, añadiendo trifosgeno a una suspensión de C-1 o C-2 y trietilamina en un disolvente aprótico, tal como tetrahidrofurano. La reacción se agita a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 20 minutos, preferentemente aproximadamente 15 minutos, y se añadió una pequeña cantidad de éter. La sal de trietilamonio generada se separa por filtración. Por separado, se añade hidruro de sodio a una suspensión de A-1 o A-2, en donde X es OH o NH, en un disolvente aprótico, tal como tetrahidrofurano, a 0 °C o temperatura ambiente. La reacción se agita a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 20 minutos, preferentemente aproximadamente 15 minutos, y se añade gota a gota la disolución de isocianato en tetrahidrofurano/éter así formada anteriormente. Alternativamente, los compuestos de la fórmula II y III se pueden formar haciendo reaccionar los compuestos de D3 o D4 con A-1 y A-2 en presencia de una base tal como trietilamina y difenilfosforilazida en disolvente aprótico tal como tolueno como se describe en el procedimiento tratado anteriormente en la reacción 4 de la Preparación D.

En la reacción 1 del Esquema 2, los compuestos de la fórmula A-1, A-2 o B-1 se convierten en los compuestos correspondientes de la fórmula IV, V, VI y VII, en donde f es 1 a 8, respectivamente, añadiendo trifosgeno a una suspensión de C-1, C-2, D-1 o D-2 y trietilamina en un disolvente aprótico, tal como tetrahidrofurano o tolueno. La reacción se agita a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 20 minutos, preferentemente aproximadamente 15 minutos, y se añadió una pequeña cantidad de éter. Posteriormente, A-1 o A-2, en donde X es NH, se añade a la disolución de isocianato así formada anteriormente y la reacción se agita a un intervalo de temperatura de 25-100 °C, preferentemente a temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 2 horas a 24 horas, preferentemente 18 horas.

En la reacción 1 de Esquema 3, el compuesto de la fórmula A-3 se convierte en los compuestos correspondientes de la fórmula VIII, en donde f es 1 a 8, y IX, respectivamente haciendo reaccionar A3 con C1, C-2, D-1 o D-2 por acoplamiento peptídico usando un agente de acoplamiento de carbodiimida tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol o hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio en disolvente tal como tetrahidrofurano o dimetilformamida. La reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Ciertos métodos preferidos de la divulgación se describen ahora en el contexto de las siguientes preparaciones y esquemas.

Todas las sales farmacéuticamente aceptables, profármacos, tautómeros, hidratos y solvatos de los compuestos actualmente desvelados también están dentro del alcance de la presente divulgación.

Los compuestos actualmente desvelados que son de naturaleza básica, en general, son capaces de formar una amplia variedad de diferentes sales con diversos ácidos inorgánicos y/u orgánicos. Aunque tales sales, en general, son farmacéuticamente aceptables para la administración a animales y seres humanos, se desea frecuentemente en la práctica aislar inicialmente un compuesto de la mezcla de reacción como una sal farmacéuticamente inaceptable y luego simplemente convertir esta última de nuevo en el compuesto de base libre mediante tratamiento con un reactivo alcalino, y posteriormente convertir la base libre en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido de los compuestos de base se pueden preparar fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, tratando el compuesto de base con una cantidad sustancialmente equivalente del ácido mineral u orgánico elegido en un medio de disolvente acuoso o en un disolvente orgánico adecuado tal como, por ejemplo, metanol o etanol. Tras la cuidadosa evaporación del disolvente, se obtiene la sal sólida deseada.

Los ácidos que se pueden usar para preparar las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de base son los que pueden formar sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como sales cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato o bisulfato, fosfato o fosfato ácido, acetato, lactato, citrato o citrato ácido, tartrato o bitartrato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, sacarato, benzoato, metanosulfonato y pamoato [es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)].

Los compuestos actualmente desvelados que son de naturaleza ácida, por ejemplo, contienen un resto COOH o tetrazol, en general, son capaces de formar una amplia variedad de diferentes sales con diversas bases inorgánicas y/u orgánicas. Aunque dichas sales, en general, son farmacéuticamente aceptables para administración a animales y seres humanos, se desea frecuentemente en la práctica aislar inicialmente un compuesto de la mezcla de reacción como sal farmacéuticamente inaceptable y entonces simplemente convertir esta última de nuevo en el compuesto de ácido libre mediante tratamiento con un ácido reactivo, y posteriormente convertir el ácido libre en una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable. Estas sales de adición de base se pueden preparar fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, tratando los compuestos ácidos correspondientes con una disolución acuosa que contiene los cationes farmacológicamente aceptables deseados, y luego evaporando la disolución resultante a sequedad, preferentemente a presión reducida. Alternativamente, también se pueden preparar mezclando juntas disoluciones alcanólicas inferiores de los compuestos ácidos y el alcóxido de metal alcalino deseado, y luego evaporando la disolución resultante a sequedad del mismo modo que antes. En cualquier caso, se emplean cantidades estequiométricas de reactivos preferentemente para garantizar la completitud de la reacción y los máximos rendimientos de producto de la sal sólida deseada.

Las bases que se pueden usar para preparar las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables de los compuestos de base son las que pueden formar sales de adición de base no tóxicas, es decir, sales que contienen cationes farmacológicamente aceptables, tales como cationes de metal alcalino (por ejemplo, potasio y sodio), cationes de metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio y magnesio), amonio u otras sales de adición de amina solubles en agua tales como N-metilglucamina-(meglumina), alcanolammonio inferior y otras de dichas bases de aminas orgánicas.

Los compuestos isotópicamente marcados también están dentro del alcance de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, un "compuesto isotópicamente marcado" se refiere a un compuesto actualmente desvelado que incluye sales farmacéuticas y profármacos de las mismas, cada uno como se describe en el presente documento, en el que uno o más átomos están sustituidos por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico normalmente encontrado en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos actualmente desvelados incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente.

Por marcar isotópicamente los compuestos actualmente desvelados, los compuestos pueden ser útiles en ensayos de distribución en tejido de fármaco y/o sustrato. Son particularmente preferidos los compuestos tritiados (^3H) y marcados con carbono-14 (^{14}C) por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (^2H) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de mayor estabilidad metabólica, por ejemplo elevada semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos y, por tanto, se pueden preferir en algunas circunstancias. Los compuestos isotópicamente marcados actualmente desvelados, que incluyen sales farmacéuticas y profármacos de los mismos, se pueden preparar mediante cualquier medio conocido en la técnica.

Los estereoisómeros (por ejemplo, isómeros cis y trans) y todos los isómeros ópticos de un compuesto actualmente desvelado (por ejemplo, enantiómeros R y S), así como mezclas racémicas, diaestereoméricas y otras mezclas de dichos isómeros, están dentro del alcance de la presente divulgación.

Los compuestos, sales, profármacos, hidratos y solvatos actualmente desvelados pueden existir en varias formas tautómeras, que incluyen la forma de enol e imina, y la forma ceto y enamina, e isómeros geométricos y mezclas de los mismos. Los tautómeros existen como mezclas de un conjunto tautómero en disolución. En forma sólida,

normalmente predomina un tautómero. Aún cuando se pueda describir un tautómero, todos los tautómeros están dentro del alcance de la presente divulgación.

Los atropisómeros también están dentro del alcance de la presente divulgación. Atropisómeros se refieren a compuestos que se pueden separar en isómeros rotacionalmente restringidos.

- 5 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto actualmente desvelado y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de dicho vehículo conocido en la técnica que incluye aquellos descritos en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A. R. Gennaro edit. 1985). Las composiciones farmacéuticas de los compuestos actualmente desvelados se pueden preparar mediante medios convencionales conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, mezclar al menos un compuesto actualmente desvelado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Las composiciones farmacéuticas actualmente desveladas se pueden usar en un animal o humano. Así, un compuesto actualmente desvelado se puede formular como una composición farmacéutica para administración oral, bucal, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea), tópica, rectal o intranasal, o en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación.

Los compuestos actualmente desvelados también se pueden formular para administración sostenida según métodos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Los ejemplos de dichas formulaciones se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos 3.119.742. 3.492.397. 3.538.214. 4.060.598 y 4.173.626.

- 20 Para administración por vía oral, la composición farmacéutica puede tomar la forma de, por ejemplo, un comprimido o cápsula preparada mediante medios convencionales con un excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s) tal(es) como un aglutinante (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); carga (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de calcio); lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregante (por ejemplo, almidón de patata o glucolato sódico de almidón); y/o agente humectante (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración por vía oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, una disolución, jarabe o suspensión, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar mediante medios convencionales con un aditivo(s) farmacéuticamente aceptable(s) tal(es) como un agente de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agente emulsionante (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículo no acuoso (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos o alcohol etílico); y/o conservante (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico).

Para administración por vía oral, la composición puede tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de un modo convencional.

- 35 Los compuestos actualmente desvelados se pueden formular para administración parenteral por inyección, que incluye usando técnicas convencionales de cateterización o infusión. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener un agente de formulación tal como un agente de suspensión, estabilizante y/o dispersante reconocido por los expertos en la técnica. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

Para administración tópica, se puede formular un compuesto actualmente desvelado como una pomada o crema.

- 45 Los compuestos actualmente desvelados también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 50 Para administración intranasal o administración por inhalación, los compuestos actualmente desvelados se pueden administrar convenientemente en forma de una disolución o suspensión de un recipiente de espray de bomba que es apretado o bombeado por el paciente o como una presentación de espray en aerosol de un recipiente presurizado o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. El recipiente presurizado o nebulizador puede contener una disolución o suspensión del compuesto actualmente desvelado. Se pueden formular cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo de un compuesto actualmente desvelado y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Una dosis propuesta de un compuesto actualmente desvelado para administración oral, parenteral o por vía oral al humano adulto medio para el tratamiento o la prevención de un estado de enfermedad relacionado con TPO es

aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2000 mg. En ciertos casos, la dosis propuesta es desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 200 mg del principio activo por dosis unitaria. Independientemente de la cantidad de la dosis propuesta, la administración del compuesto puede ocurrir, por ejemplo, 1 a 4 veces por día.

- 5 Las formulaciones en aerosol para el tratamiento o la prevención de las afecciones denominadas anteriormente en el humano adulto medio se disponen preferentemente de manera que cada dosis medida o "descarga" de aerosol contenga aproximadamente 20 mg a aproximadamente 10.000 mg, preferentemente, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 1000 mg de un compuesto actualmente desvelado. La dosis diaria global con un aerosol estará dentro del intervalo desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 100 mg. En ciertos casos, la dosis
- 10 diaria global con un aerosol, en general, estará dentro del intervalo desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 10 mg. La administración puede ser varias veces al día, por ejemplo 2, 3, 4 o 8 veces, administrando, por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis cada vez.

- 15 Las formulaciones de combinación de aerosol para el tratamiento o la prevención de las condiciones denominadas anteriormente en el humano adulto medio se disponen preferentemente de manera que cada dosis medida o "descarga" de aerosol contenga desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 1000 mg de una combinación que comprende un compuesto actualmente desvelado. En ciertos casos, cada dosis medida o "descarga" de aerosol contiene aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg de una combinación que comprende un compuesto actualmente desvelado. En ciertos casos, cada dosis medida o "descarga" de aerosol
- 20 contiene aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg de una combinación que comprende un compuesto actualmente desvelado. La administración puede ser varias veces al día, por ejemplo 2, 3, 4 o 8 veces, dando por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis cada vez.

Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento o la prevención que comprenden administrar profármacos de al menos un compuesto actualmente desvelado también están dentro del alcance de la presente divulgación.

25 Ensayo de glucosilceramida sintasa

Un ensayo enzimático usando microsomas como fuente de actividad de glucosilceramida sintasa. Se suministra sustrato fluorescente de ceramida a enzima unida a membrana como un complejo con albúmina. Después de la reacción, se separan la ceramida y la glucosilceramida y se cuantifican por HPLC de fase inversa con detección de fluorescencia.

30 Procedimiento

Preparación de microsomas a partir de células A375 de melanoma humano:

Se sonicó sobre hielo la suspensión de células para completar la lisis celular, seguido por centrifugación a desaceleración a 10.000 g durante 10 min a 4 °C

- 35 Se aclaró el sobrenadante por centrifugación otra vez a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C y el sedimento se resuspendió en tampón de lisis, se separó en alícuotas y se guardó a -80 °C.

Ensayo de glucosilceramida sintasa

Se combinaron sustrato y microsoma 1:1, mezclar bien en un agitador de placas, sellar la placa e incubar 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad

La reacción se detuvo con disolución de parada en la placa de reacción y se transfirió a placa de análisis;

40 Análisis de RP-HPLC

- columna: cartucho reemplazable MercuryMS™ (Phenomenex) (Luna C₈, 3 µm, 20 x 4 mm)
- sistema: Agilent 1100 con detector de fluorescencia serie Agilent 1200
- fase móvil: 1 % de ácido fórmico en 81 % de metanol, 19 % de agua, caudal 0,5 mL/min, ciclo isocrático, 4 min
- diluyente de muestra: ceramida C₈ 0,1 mM (bloqueante de la adsorción) en 50 % de isopropanol, 50 % de agua (v/v)
- detección de fluorescencia: λ_{ex} = 470 nm, λ_{em} = 530 nm
- en estas condiciones, NBD C₆ GluCer tuvo un tiempo de retención de aproximadamente 1,7 min y NBD C₆ Cer se procesó a aproximadamente 2,1 min; los picos estaban claramente separados en el nivel inicial y se integraron automáticamente por el software HPLC

45

- se usó el % de conversión de sustrato a producto como la lectura para ensayo de inhibidor para evitar la variabilidad debido a error de dilución o evaporación de muestra

Todos los compuestos ejemplificados tuvieron un valor de CI_{50} inferior a 5 μ M en el ensayo indicador.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

5 Procedimiento general A: Formación de carbamato/urea con trifosgeno

A una suspensión de clorhidrato de amina (1 equivalente) y trietilamina (3-4 equivalentes) en THF (concentración ~ 0,2 M) a temperatura ambiente se añadió trifosgeno (0,35 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó durante 10 min y se añadió una pequeña cantidad de éter (1-2 mL). Se separó por filtración la sal de trietilamonio para proporcionar una disolución transparente de isocianato en THF/éter.

- 10 A una disolución de alcohol (1,5 equivalentes) en THF (concentración ~ 0,2 M) a temperatura ambiente se añadió NaH [60 %, aceite] (1,5 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min y se añadió gota a gota la disolución anterior (isocianato en THF/éter).

En un procesamiento estándar, se inactivó la reacción con salmuera. La disolución se extrajo con EtOAc y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó en CombiFlash (cartucho SiO_2 , $CHCl_3$ y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando el carbamato correspondiente.

- 15 Alternativamente: A una suspensión de clorhidrato de amina A (1 equivalente) y trietilamina (3-4 equivalentes) en THF (concentración ~ 0,2 M) a temperatura ambiente se añadió trifosgeno (0,35 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó durante 10 min y se añadió una pequeña cantidad de éter (1-2 mL). Se separó la sal de trietilamonio por filtración proporcionando una disolución transparente de isocianato en THF/éter.

- 20 A una disolución de amina B (1 equivalente) en THF (concentración ~ 1,0 M) a temperatura ambiente se añadió gota a gota la disolución anterior (isocianato en THF/éter). La reacción se agitó durante un periodo de 18 h y se concentró. El material en bruto se purificó en CombiFlash (cartucho de SiO_2 , $CHCl_3$ y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando la urea correspondiente.

Procedimiento general B: Alquilación con organocerio

- 25 Se agitó una suspensión de $CeCl_3$ (4 equivalentes) en THF (concentración ~ 0,2 M) a temperatura ambiente durante 1 h. La suspensión se enfrió hasta -78 °C y se añadió gota a gota MeLi /éter [1,6 M] (4 equivalentes). Se dejó formar el complejo de organocerio durante un periodo de 1 h y se añadió gota a gota una disolución de nitrilo (1 equivalente) en THF (concentración 2,0 M). Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. Se enfrió la disolución hasta 0 °C y se extinguió con agua (~ 1 mL), seguido por la adición de disolución acuosa al 50 % de hidróxido de amonio (~ 3 mL) hasta que se formó el precipitado y sedimentó en el fondo del matraz. Se filtró la mezcla a través de una almohadilla de Celite y se concentró. Se trató el material en bruto con una disolución de HCl/dioxano [4,0 M]. Se trituró el producto intermedio clorhidrato de arilpropan-2-amina en éter y se usó tal cual para la siguiente etapa. Alternativamente, se purificó la amina de base libre en bruto en CombiFlash (cartucho de SiO_2 , $CHCl_3$ y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando la arilpropilamina correspondiente.

35 Procedimiento general C: Formación de urea con carbonildiimidazol (CDI)

Se agitó a reflujo una disolución de amina A (1 equivalente) y CDI (1,3 equivalentes) en THF (concentración ~ 0,15 M) durante 1 h. Se añadió una disolución de amina B (1,3 equivalentes) en THF y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h adicionales. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con éter. Precipitó el compuesto deseado y se separó por filtración. El material en bruto se purificó en CombiFlash (cartucho de Al_2O_3 básico, $CHCl_3$ y MeOH) o (cartucho de SiO_2 , $CHCl_3$ y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando la urea correspondiente.

- 40

Procedimiento general D: Formación de urea con trifosgeno

A una suspensión de amina A (1 equivalente) y trietilamina (4 equivalentes) en un THF (concentración ~ 0,15 M) a temperatura ambiente se añadió trifosgeno (0,35 equivalente). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min y se añadió amina B (1,1 equivalentes). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 h y entonces se diluyó con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con NaOH acuoso [1,0 M], se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó en CombiFlash (cartucho de SiO_2 , $CHCl_3$ y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando la urea correspondiente.

- 45

Procedimiento general E: Acoplamiento de Suzuki

A una disolución de haluro de arilo (1 equivalente) en una mezcla de DME/agua [4:1] (concentración ~ 0,2 M) se añadió ácido borónico (2 equivalentes), catalizador de paladio (0,1 - 0,25 equivalentes) y carbonato sódico (2 equivalentes). Se calentó en microondas la mezcla de reacción 25 min a 150 °C. Después de filtrar a través de un tapón de Celite y concentrar, el producto en bruto se purificó en CombiFlash (cartucho de SiO_2 , $CHCl_3$ y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando el aducto de acoplamiento correspondiente.

- 50

- Alternativamente: A una disolución de haluro de arilo (1 equivalente) en una mezcla de tolueno/agua [20:1] (concentración ~ 0,2 M) se añadió ácido borónico (1,3-2,5 equivalentes), catalizador de paladio (0,05-0,15 equivalentes), triciclohexilfosfina (0,15-0,45 equivalentes) y fosfato de potasio (5 equivalentes). Se calentó en microondas la mezcla de reacción 25 min a 150 °C. Después de filtrar a través de un tapón de Celite y concentrar, el producto en bruto se purificó en CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH) proporcionando el aducto de acoplamiento correspondiente.

Procedimiento general F: Hidrogenación

- A una disolución de sustrato en metanol, etanol o EtOAc (concentración ~ 0,2 M) se añadió catalizador de paladio (20 % p/p de sustrato). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo 1 atm de H₂ hasta que se completó. La reacción se filtró a través de un tapón de Celite, seguido por dos aclarados con cloroformo. Se concentró el producto en bruto y se purificó en CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH) proporcionando el producto hidrogenado. Alternativamente, el material final se purificó mediante precipitación o recristalización.

Procedimiento general G: Ciclopropanación

- A una mezcla de arilnitrilo (1 equivalente) y Ti(Oi-Pr)₄ (1,7 equivalentes) con agitación a -70 °C, se añadió gota a gota EtMgBr [3,0 M en éter] (1,1 equivalentes). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta 25 °C y se agitó durante 1 h. A la mezcla anterior se añadió BF₃·Et₂O (3 equivalentes) gota a gota a 25 °C. Después de la adición, la mezcla se agitó durante otras 2 h, y luego se extinguió con HCl acuoso [2 M]. Entonces se basificó la disolución resultante añadiendo NaOH acuoso [2 M]. Se extrajo el material orgánico con etil éter. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el material en bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyendo con éter de petróleo/EtOAc: 10/1 a 1/1) dando la 1-arilciclopropanamina correspondiente.

Procedimiento general H: Acoplamiento por reordenamiento de Curtius *in situ*

- Se sometió a reflujo una mezcla de ácido (1 equivalente), trietilamina (2,5 equivalentes), DPPA (1,0 equivalente) en tolueno (concentración ~ 0,3 M) durante 30 min. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió alcohol (1 equivalente). Después de la adición, la mezcla se calentó a 90 °C durante 18 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc y se lavó con dicarbonato sódico acuoso saturado. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se concentró y se purificó por CCF prep (EtOAc/MeOH 5:1, que contenía 1 % de TEA) proporcionando el carbamato correspondiente.

Procedimiento general I: Formación de amida usando EDCI

- A una disolución de amina (1 equivalente) en DMF o THF (concentración ~ 0,3 M) se añadió EDCI (1,2-2,5 equivalentes), HOBT (1,2-2,5 equivalentes), DIPEA (1,2-2,5 equivalentes) y trietilamina (algunas gotas). Se agitó la mezcla de reacción y se añadió el ácido (1,2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y luego se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con salmuera. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se purificó el material en bruto por HPLCMS prep o por CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH).

Preparación A

Producto intermedio 1

Clorhidrato de 2-(3-bromofenil)propan-2-amina

- A una disolución de 3-bromobenzoato de metilo (15,0 g, 69,8 mmoles) en THF (140 mL) a -78 °C se añadió gota a gota una disolución de MeMgBr/dietil éter [3,0 M] (58 mL). Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. Se vertió la disolución en una disolución saturada acuosa de cloruro de amonio y el material orgánico se extrajo con EtOAc. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró proporcionando el alcohol correspondiente (14,9 g) que se usó sin más purificación.
- A una disolución de 2-(3-bromofenil)propan-2-ol (17,2 g, 79,8 mmoles) en cloroacetnitrilo (160 mL) se añadió ácido acético (14 mL). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se añadió gota a gota H₂SO₄ (14 mL). Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. Entonces se vertió la reacción en hielo y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con disolución acuosa de NaOH [1,0 M] y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró proporcionando la cloroacetamida correspondiente (21,4 g) que se usó sin más purificación.
- A una disolución de N-(2-(3-bromofenil)propan-2-il)-2-cloroacetamida (20,3 g) en etanol (120 mL) se añadió ácido acético (20 mL). Se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 18 h. La disolución se enfrió hasta temperatura ambiente y el precipitado se separó por filtración sobre una almohadilla de Celite. Se concentró el filtrado y el residuo se disolvió en EtOAc. Se trató la fase orgánica con disolución acuosa de NaOH [1,0 M], se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se trató el material en bruto con una disolución de HCl/dioxano [4 M]. Se trituró el producto intermedio

clorhidrato de 2-(3-bromofenil)propan-2-amina en éter y se usó tal cual para la siguiente etapa (7,50 g, 43 %). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 7,69 (c, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,55 (ddd, $J = 1,0, 1,8, 7,9$ Hz, 1H), 7,49 (ddd, $J = 1,0, 2,0, 8,0$ Hz, 1H), 7,38 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 1,71 (s, 6H) ppm.

Preparación B

5 Producto intermedio 2

Clorhidrato de 2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-amina

A una disolución de ácido 5-bromo-2-fluorobenzoico (4,85 g, 22,8 mmoles) en metanol (45 mL) se añadió H_2SO_4 (4,5 mL). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 h y se concentró la disolución. Se trató el residuo con una disolución acuosa de NaOH [10 % p/v] y se extrajo el material orgánico con CHCl_3 . Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró proporcionando el éster correspondiente (4,69 g, 91 %) que se usó sin más purificación.

Se convirtió el producto intermedio de éster (4,69 g, 20,1 mmoles) en el producto intermedio 2 usando el mismo procedimiento informado en el producto intermedio 1 de ejemplo proporcionando la sal de amonio correspondiente (3,94 g, 67 % de rendimiento global) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 7,67 - 7,57 (m, 2H), 7,21 (dd, $J = 8,7, 12,3$ Hz, 1H), 1,77 (s, 6H) ppm.

Producto intermedio 3

Clorhidrato de 2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-amina

Se transformó ácido 5-bromo-2-fluorobenzoico en el producto intermedio 3 usando el mismo procedimiento informado en el producto intermedio 2 de ejemplo proporcionando la sal de amonio correspondiente (2,79 g, 49 % de rendimiento global) como un sólido blanco.

Producto intermedio 4

2-(3-bromo-2-fluorofenil)propan-2-amina

Se transformó ácido 3-bromo-2-fluorobenzoico en el producto intermedio 4 usando el mismo procedimiento informado en el producto intermedio 2 de ejemplo proporcionando la amina correspondiente como un aceite amarillo pálido.

Producto intermedio 5

Clorhidrato de 2-(4-bromofenil)propan-2-amina

Usando el procedimiento general B, se convirtió bromobenzonitrilo (2,00 g, 11,0 mmoles) en la 2-(4-bromofenil)propan-2-amina correspondiente, que se proporcionó como un aceite marrón (1,20 g, 51 %).

30 Preparación C

Producto intermedio 6

1,4-Diazabicyclo[3.2.2]nonano

A una disolución con agitación de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonan-3-ona (1,0 g, 7,2 mmoles) en 1,4-dioxano (7,2 mL) a temperatura ambiente se añadió hidruro de litio y aluminio [2,0 M/THF] (4,1 mL, 8,2 mmoles). Entonces se calentó a reflujo la mezcla de reacción durante 6 horas antes de enfriar hasta temperatura ambiente. Se inactivó la reacción por la adición escalonada de 200 μL de H_2O , 200 μL de 15 % de NaOH acuoso y 600 μL de H_2O . Se filtró la mezcla a través de Celite que posteriormente se lavó con EtOAc. Se concentró a vacío el filtrado combinado proporcionando el producto (0,82 g, 90 %) que se usó sin más purificación. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,28-3,25 (m, 1H), 2,99-2,95 (m, 8H), 1,86-1,80 (m, 3H), 1,69-1,64 (m, 2H) ppm.

40 Preparación D

Producto intermedio 7

2-Metilquinuclidin-3-ol

Se disolvió en H_2O (15,6 mL) una disolución de carbonato de potasio (11,4 g, 82,8 mmoles) e hidrato de quinuclidina (5,00 g, 20,4 mmoles). Cuando se disolvió completamente, se añadió diclorometano (20,4 mL) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con cloroformo (3 x 50 mL). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a vacío. El producto se usó sin más purificación. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) 2,79 (s, 1H), 5,19 (s, 1H), 3,14-3,06 (m, 2H), 2,99-2,91 (m, 2H), 2,57-2,55 (m, 1H), 1,98-1,93 (m, 4H) ppm.

Se redujo la 2-metilenquinuclidin-3-ona (3,50 g) en etanol (30 mL) sobre 10 % de Pd/C (50 % en peso) bajo una atmósfera de H₂. Cuando se evaluó completa por CCF (~3 días), se separó por filtración el catalizador y la torta de filtración se lavó con acetato de etilo. Se retiró a vacío el disolvente proporcionando el producto deseado (2,80 g, 80 %) que se obtuvo y se usó sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,37-3,31 (m, 1H), 3,21-3,13 (m, 2H), 3,09-3,00 (m, 1H), 2,97-2,89 (m, 1H), 2,46-2,43 (m, 1H), 2,05-1,91 (m, 4H), 1,34 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H) ppm.

A 2-metilquinuclidin-3-ona (0,50 g, 3,60 mmoles) en 1,4-dioxano (18 mL) a temperatura ambiente se añadió hidruro de litio y aluminio [1,0 M/THF] (4,1, 4,1 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se inactivó la reacción por la adición escalonada de 116 µL de H₂O, 116 µL de 15 % de NaOH acuoso y 348 µL de H₂O. Se filtró la mezcla a través de Celite que posteriormente se lavó con EtOAc. Se retiró el disolvente a vacío proporcionando el producto (0,48 g, 95 %) que se usó sin más purificación como una mezcla 2:1 de diaestereómeros.

Preparación E

Producto intermedio 8

1-azabicyclo[3.2.2] nonan-4-ol

A 1-azabicyclo[3.2.2]nonan-4-ona (0,20 g, 1,4 mmoles) en 1,4-dioxano (2,8 mL) a 0 °C se añadió hidruro de litio y aluminio [1,0 M/THF] (1,7 mL, 1,7 mmoles). Se mantuvo la mezcla de reacción a 0 °C durante 15 minutos. Se inactivó la reacción por la adición escalonada de 46 µL de H₂O, 46 µL de 15 % de NaOH acuoso y 138 µL de H₂O. Se filtró la mezcla a través de Celite que posteriormente se lavó con EtOAc. Se retiró el disolvente a vacío proporcionando el producto (0,19 g, 96 %) que se usó sin más purificación. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,90-3,86 (m, 1H), 3,09-3,03 (m, 1H), 2,96-2,91 (dd, *J* = 9,2, 6,8 Hz, 1H), 2,86-2,75 (m, 3H), 2,71-2,64 (m, 1H), 2,34-2,27 (s a s, 1H), 1,98-1,86 (m, 3H), 1,71-1,59 (m, 3H), 1,51-1,35 (m, 1H) ppm.

Preparación F

Producto intermedio 9

1-Azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ol

A una mezcla de metóxido de sodio (2,00 g, 37,9 mmoles) en metanol (9 mL) a 0 °C se añadió clorhidrato de éster metílico de glicina (4,76 g, 37,9 mmoles) e itaconato de dimetilo (5,00 g, 31,6 mmoles). Se calentó la reacción a reflujo durante 16 horas antes enfriarse hasta temperatura ambiente. Se separó por filtración el sólido y se lavó con diclorometano. Se concentró el filtrado y el residuo se diluyó con HCl 5 N (50 mL). Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (4 x 50 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío. El producto se usó sin más purificación. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,04 (dd, *J* = 82,0, 17,6 Hz), 3,74-3,64 (m, 8H), 3,32-3,24 (m, 1H), 2,77-2,63 (m, 2H) ppm.

A 1-(2-metoxi-2-oxoetil)-5-oxopirrolidin-3-carboxilato de metilo (3,40 g, 16,0 mmoles) en THF (20 mL) a 0 °C se añadió borano-THF [1,0 M/THF] (32,0 mL, 32,0 mmoles). Se agitó a reflujo la reacción durante 1 hora y luego se enfrió hasta temperatura ambiente donde se dejó con agitación 12 horas adicionales. Se inactivó la reacción mediante la adición de una disolución saturada de carbonato de potasio (5,52 g en 20 mL de H₂O) y se calentó a reflujo durante 1 hora adicional antes de enfriar hasta temperatura ambiente. Se retiró el disolvente a vacío y el residuo se acidificó mediante la adición de HCl 5 N (25 mL). Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (2 x 30 mL). Entonces se basificó el pH de la fase acuosa mediante la adición de carbonato de potasio sólido. Se extrajo adicionalmente la fase acuosa con diclorometano (5 x 30 mL). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío. El producto se usó sin más purificación. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,66 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,29 (ABq, 2H, *J* = 24,0, 16,8 Hz), 3,06-3,02 (m, 2H), 2,87-2,81 (m, 1H), 2,71-2,65 (m, 1H), 2,56-2,50 (m, 1H), 2,09-2,04 (m, 2H) ppm.

A una disolución a reflujo de *tert*-butoxido de potasio (2,46 g, 22,0 mmoles) en tolueno (32 mL) se añadió gota a gota una disolución de 1-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidina-3-carboxilato de metilo (2,00 g, 10,0 mmoles) en tolueno (10 mL) durante 1 hora. Se dejó con agitación la reacción y 3 horas adicionales a reflujo antes del primer enfriamiento hasta temperatura ambiente, luego se enfrió hasta -10 °C. Entonces se añadió ácido acético (1,3 mL) con agitación. Se extrajo la fase de tolueno con HCl 5 N (4 x 50 mL). Se calentaron las fases acuosas combinadas a 110 °C durante 8 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y el volumen se redujo a la mitad a vacío. Se basificó el pH de la mezcla de reacción mediante la adición de carbonato de potasio sólido. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (5 x 50 mL) y se concentraron a vacío las fases orgánicas combinadas. Al producto en bruto se añadió etil éter. El sólido se separó por filtración proporcionando el producto deseado (0,30 g, 27 %) que se usó sin más purificación. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,05-2,96 (m, 3H), 2,76 (s, 2H), 2,72-2,66 (m, 2H), 2,09-2,01 (m, 1H), 1,78-1,71 (m, 1H) ppm.

Se redujo la 1-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona (0,30 g, 2,7 mmoles) en etanol (2-3 mL) sobre PtO₂ (50 % en peso) bajo una atmósfera de H₂. Después de agitar 4 horas, se separó por filtración el catalizador y se lavó la torta de filtración con etanol. Se retiró a vacío el etanol proporcionando el producto deseado (0,29 g, 95 %). ¹H RMN (400 MHz,

CDCl_3) δ 4,36-4,35 (m, 1H), 3,10-3,05 (m, 1H), 2,95-2,88 (m, 1H), 2,72-2,66 (m, 1H), 2,63-2,57 (m, 2H), 2,48-2,44 (dd, $J = 10,0, 3,2$ Hz, 1H), 2,11-2,05 (m, 2H), 1,51-1,44 (m, 1H) ppm.

Preparación G

Producto intermedio 10

5 (R)-3-metilquinelidín-3-amina y (S)-3-metilquinelidín-3-amina

A una disolución bien agitada de MeLi [3,0 M/dietil éter] (67,0 mL, 201 mmoles) en dietil éter anhidro (150 mL) a -78 °C se añadió, gota a gota, una disolución de quinelidín-3-ona (12,5 g, 100 mmoles) en dietil éter (100 mL). La disolución resultante se mantuvo a -78 °C durante 1 hora, luego a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió gota a gota agua (60 mL) a 0 °C y la mezcla se concentró a vacío dando un residuo, que se purificó por cromatografía en columna de óxido de aluminio neutro (0-20 % de MeOH en CHCl_3) dando 3-metilquinelidín-3-ol (10,0 g, 71 %) como un sólido amarillo claro. A acetonitrilo con agitación (250 mL) a 0 °C se añadió lentamente ácido sulfúrico concentrado (100 mL). La disolución resultante se añadió gota a gota a una mezcla de 3-metilquinelidín-3-ol (9,10 g, 64,5 mmoles) en acetonitrilo (250 mL) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 60 horas, luego se enfrió con un baño de hielo y se basificó con disolución acuosa de hidróxido sódico hasta pH 10. La mezcla se extrajo con 5:1 (v/v) de CHCl_3 /i-PrOH. Se concentró la fase orgánica proporcionando un residuo que se diluyó con HCl 2 N ac. y se lavó con 5:1 (v/v) de CHCl_3 /i-PrOH. Entonces se basificó la fase acuosa restante con NaOH 2 N y se extrajo con 5:1 (v/v) de CHCl_3 /i-PrOH. Se lavaron con agua las fases orgánicas combinadas, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron dando 9,5 g (82 %) del compuesto deseado como un aceite amarillo claro. Los 2 enantiómeros del producto intermedio anterior se separan entre sí usando columna quiral en el sistema de cromatografía de fluido supercrítico (SFC).

Se sometió a reflujo una disolución del producto intermedio de acetamida quiral anterior (9,50 g, 52,0 mmoles) en HCl conc. (100 mL) durante 3 días, se enfrió con un baño de hielo y se neutralizó con disolución acuosa de hidróxido sódico hasta pH 1. Se lavó la mezcla con 5:1 (v/v) de CHCl_3 /i-PrOH. Entonces se basificó la fase acuosa con NaOH 2 N y se extrajo con 5:1 (v/v) de CHCl_3 /i-PrOH. Se lavaron con agua los extractos combinados, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron dando 5,00 g (69 %) del compuesto quiral deseado como un semisólido amarillo claro. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2,72-2,39 (m, 6H), 2,01-1,96 (m, 1H), 1,67-1,61 (m, 1H), 1,43-1,36 (m, 2H), 1,23-1,17 (m, 1H), 1,09 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 65,3, 48,3, 46,6, 46,4, 34,2, 30,0, 24,8, 22,8 ppm. Pureza: > 99 % (GC-MS); tiempo de retención 6,63 min; (M) 140,1.

Preparación H

30 Producto intermedio 11

2-(3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-il)propan-2-amina

A una suspensión con agitación de 4-fluorobenzamida (70,00 g, 503,1 mmoles) en tolueno (900 mL) se añadió cloruro de clorocarbonilsulfenilo (83,0 mL, 1,00 mol). La mezcla se calentó durante la noche a 60 °C y se concentró. Se trituró el sólido resultante de color tostado con cloruro de metileno (200 mL), se recogió por filtración por succión y se aclaró con cloruro de metileno adicional (4 x 70 mL). El producto en bruto se impregnó sobre sílice (100 g) y se sometió a cromatografía en un gran embudo de filtración cargado en seco con sílice usando un gradiente de hexano/acetato de etilo. El producto 5-(4-fluorofenil)-1,3,4-oxatiazol-2-ona se proporcionó como un sólido blanquecino (55,98 g, 56 %).

A una disolución con agitación de 5-(4-fluorofenil)-1,3,4-oxatiazol-2-ona (42,80 g, 217,1 mmoles) en *o*-diclorobenceno (600 mL) se añadió propionato de etilo (66,0 mL, 651 mmoles). La mezcla se calentó durante la noche a 135 °C y se concentró. El aceite residual se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de hexano/acetato de etilo proporcionando 3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-carboxilato de etilo como un sólido dorado pálido (17,35 g, 32 %). Se desechó el isómero de 3-(4-fluorofenil)isotiazol-4-carboxilato de etilo más polar (generado en la relación ~57/43 frente al producto deseado).

A una disolución agitada y enfriada (0 °C) de 3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-carboxilato de etilo (38,50 g, 153,2 mmoles) en THF (400 mL) se añadió una disolución de bromuro de metilmagnesio en dietil éter (3,0 M, 128 mL, 384 mmoles), gota a gota durante 20 minutos. Después de otras 1,5 horas a 0 °C, se inactivó la reacción por la lenta adición de acetato de etilo (20 mL) y se concentró. El residuo se recogió en NH_4Cl acuoso (400 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 mL). Los extractos combinados se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El jarabe ámbar resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de hexano/acetato de etilo proporcionando 2-(3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-il)propan-2-ol como un sólido dorado blando (29,02 g, 80 %).

Se recogió 2-(3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-il)propan-2-ol (29,00 g, 122,2 mmoles) en cloruro de tionilo (75 mL). La mezcla se enfrió (baño de hielo) brevemente y se agitó. Después de 4 horas, se concentró la reacción y el residuo se repartió entre acetato de etilo (200 mL) y NaHCO_3 acuoso (300 mL). Se combinó la fase orgánica con un retroextracto de la fase acuosa (acetato de etilo, 1 x 100 mL), se secó (Na_2SO_4) y se concentró proporcionando una mezcla de producto de 5-(2-cloropropan-2-il)-3-(4-fluorofenil)isotiazol y subproducto de eliminación de 3-(4-

fluorofenil)-5-(prop-1-en-2-il)isotiazol (relación ~63/39) como un aceite ámbar oscuro (29,37 g). Este material se usó sin purificación en la siguiente reacción.

A una disolución con agitación del producto de la etapa previa en DMSO (80 mL) se añadió azida de sodio (14,89 g, 229,0 mmoles). La mezcla se calentó a 50 °C durante la noche, se diluyó con acetato de etilo (250 mL) y se lavó con agua (6 x 400 mL). Se secó la fase orgánica (Na₂SO₄) y se concentró proporcionando una mezcla de 5-(2-azidopropan-2-il)-3-(4-fluorofenil)isotiazol y 3-(4-fluorofenil)-5-(prop-1-en-2-il)isotiazol (relación ~56/44) como un aceite ámbar oscuro (29,10 g). Este material se usó sin purificación en la siguiente reacción.

Se combinó el producto de la etapa previa con 10 % de paladio sobre carbono (50 % de agua; 7,50 g) y se absorbió en metanol (350 mL). La suspensión en agitación se sometió a un ciclo entre vacío y una purga de nitrógeno tres veces. Después de una evacuación adicional, la reacción se volvió a cargar con gas hidrógeno (depósito de globo) y se agitó durante la noche. La reacción se filtró a través de Celite. El filtrado se combinó con aclarados de metanol de Celite y se concentró. El aceite de color ámbar resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de cloruro de metileno/metanol proporcionando 2-(3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-il)propan-2-amina como aceite viscoso de color ámbar (14,23 g, 49 % durante 3 etapas).

Se están usando o se persiguen varios enfoques para el tratamiento de LSD, la mayoría de los cuales se centran en la terapia de reemplazo enzimático para su uso solamente en el tratamiento de la enfermedad. Están disponibles en el mercado numerosas terapias de reemplazo enzimático aprobadas para tratar LSDs (por ejemplo, Myozyme® para enfermedad de Pompe, Aldurazyme® para mucopolisacaridosis I, Cerezyme® para enfermedad de Gaucher y Fabrazyme® para enfermedad de Fabry). Además, los inventores han identificado varias moléculas pequeñas para su uso solamente en el tratamiento de LSDs. Los métodos terapéuticos de la divulgación descritos en el presente documento proporcionaron opciones de tratamiento para el médico que se enfrenta al tratamiento de diversas enfermedades de almacenamiento lisosómico, como se describe en detalle a continuación.

En ciertos aspectos, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar para tratar una enfermedad metabólica, tal como una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD), ya sea solos o como una terapia de combinación con una terapia de reemplazo enzimático. En otros aspectos, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar para inhibir o reducir la actividad de GCS en un sujeto diagnosticado con una enfermedad metabólica, tal como una LSD, ya sea solos o como una terapia de combinación con una terapia de reemplazo enzimático. En otros aspectos, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar para reducir y/o inhibir la acumulación de un material almacenado (por ejemplo, sustrato lisosómico) en un sujeto diagnosticado con una enfermedad metabólica, tal como una LSD. En ciertos casos de los aspectos anteriores, la LSD es Gaucher (tipo 1, tipo 2 o tipo 3), Fabry, gangliosidosis de GM₁ o gangliosidosis de GM₂ (por ejemplo, deficiencia del activador de GM₂, Tay-Sachs y Sandhoff). La Tabla 1 enumera numerosas LSDs e identifica la enzima deficiente correspondiente que se puede usar con una ERT en los anteriores aspectos de la divulgación.

En otros escenarios puede ser necesario proporcionar SMT a un paciente cuya afección requiere la reducción de sustratos en el cerebro y así no es tratable por administración sistémica de ERT. Mientras que la administración intracerebroventricular o intratecal directa puede reducir los niveles de sustrato en el cerebro, la administración sistémica de ERT no es responsable de LSDs con participación del sistema nervioso central (SNC) debido a su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y SMT puede demostrar ser beneficiosa en pacientes que tienen actividades enzimáticas residuales en el SNC.

Según la presente divulgación, SMT se proporciona a un paciente para tratar un cáncer y/o enfermedad metabólica, tal como una enfermedad de almacenamiento lisosómico. La SMT puede incluir una o más moléculas pequeñas. La SMT de la divulgación incluye administrar al paciente compuestos de la presente divulgación. En casos particulares, el compuesto es (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (compuesto de la invención) o (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (compuesto de la divulgación), o combinaciones de los mismos.

Se pueden usar (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (compuesto de la invención) y (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (compuesto de la divulgación) para el tratamiento de prácticamente cualquier enfermedad de almacenamiento lisosómico resultante de un defecto en la vía de glucoesfingolípidos (por ejemplo Gaucher (es decir, tipo 1, tipo 2 tipo 3), Fabry, gangliosidosis de GM₁, gangliosidosis de GM₂ (por ejemplo, deficiencia del activador de GM₂, Tay-Sachs y Sandhoff)). En un caso particularmente preferido de la divulgación, se usa (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para inhibir y/o reducir la acumulación de Gb3 y/o liso-Gb3 en un paciente con enfermedad de Fabry, ya sea solo o como una terapia de combinación con terapia de reemplazo enzimático (véase Ejemplos). En un caso preferido, la terapia de reemplazo enzimático incluye administrar alfa-galactosidasa A al paciente con Fabry. De hecho, los ejemplos de a continuación demuestran que un inhibidor de GCS de la divulgación reduce eficazmente el almacenamiento de Gb3 y liso-Gb3 en un modelo de ratón de enfermedad de Fabry, soportando así su uso como un enfoque viable para el tratamiento de enfermedad de Fabry. Además, los datos de terapia de combinación *in vivo* proporcionados en los ejemplos sugieren fuertemente que un enfoque terapéutico combinado podría ser tanto aditivo como complementario.

Se pueden usar (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (compuesto de la invención) y (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (compuesto de la divulgación) para reducir el nivel de GluCer y GluEsf en el cerebro de un sujeto diagnosticado con enfermedad neuropática de Gaucher, tanto solo como en combinación con ERT (por ejemplo, administración de glucocerebrosidasa).

- 5 Las pautas posológicas para un componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación de la divulgación son determinadas, en general, por el profesional clínico experto y se espera que varíen significativamente dependiendo de la enfermedad de almacenamiento particular que está tratándose y el estado clínico del individuo afectado particular. Los principios generales para determinar una pauta posológica para una SMT dada de la divulgación para el tratamiento de cualquier enfermedad de almacenamiento se conocen bien por el experto. Se puede obtener orientación para pautas posológicas de cualquiera de las muchas referencias bien conocidas en la técnica sobre este tema. Está disponible orientación adicional, entre otros, de una revisión de las referencias específicas citadas en el presente documento. En ciertos casos, dichas dosificaciones pueden variar desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg, preferentemente desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg (por ejemplo, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg y 60 mg/kg) por administración intraperitoneal, oral o equivalente de una a cinco veces al día. Dichas dosificaciones pueden variar desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 5 g/kg, preferentemente desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg por administración oral, intraperitoneal o equivalente desde una hasta cinco veces al día. En un caso, la dosis oscila desde aproximadamente aproximadamente 10 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día (por ejemplo, 10 mg/día, 20 mg/día, 30 mg/día, 40 mg/día, 50 mg/día, 60 mg/día, 70 mg/día, 80 mg/día, 90 mg/día, 100 mg/día, 110 mg/día, 120 mg/día, 130 mg/día, 140 mg/día, 150 mg/día, 160 mg/día, 170 mg/día, 180 mg/día, 190 mg/día, 200 mg/día, 210 mg/día, 220 mg/día, 230 mg/día, 240 mg/día, 250 mg/día, 260 mg/día, 270 mg/día, 280 mg/día, 290 mg/día, 300 mg/día). Un intervalo de dosis oral particularmente preferido es desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 100 mg, en donde la dosis se administra dos veces al día. Un intervalo de dosis oral particular para un compuesto de la presente divulgación es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 600 mg/kg/día. Un intervalo de dosis oral particular para un compuesto de la presente divulgación es desde aproximadamente 1 mg/kg/día hasta aproximadamente 120 mg/kg/día, por ejemplo, 1 mg/kg/día, 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 35 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, 45 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, 55 mg/kg/día o 60 mg/kg/día, 65 mg/kg/día, 70 mg/kg/día, 75 mg/kg/día, 80 mg/kg/día, 85 mg/kg/día, 90 mg/kg/día, 95 mg/kg/día, 100 mg/kg/día, 105 mg/kg/día, 110 mg/kg/día, 115 mg/kg/día o 120 mg/kg/día.

En ciertos casos, la divulgación se refiere a terapias de combinación de SMT usando compuestos de la divulgación y terapia ERT para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico. Una lista parcial de enfermedades de almacenamiento lisosómico conocidas que se pueden tratar según la divulgación se expone en la Tabla 1, que incluye nombre de la enfermedad común, material almacenado y deficiencia enzimática correspondiente (adaptado de la Tabla 38-4 de Kolodny et al., 1998, Ídem).

TABLA 1

Enfermedades de almacenamiento lisosómico		
Enfermedad	Material almacenado	Deficiencia de enzima
<u>Esfingolipidosis</u>		
Gaucher	Glucocerebrósido, glucosilesfingosina	Glucocerebrosidasa
Niemann-Pick	Esfingomielina	Esfingomielinasa
Niemann-Pick B	Esfingomielina	Esfingomielinasa
Farber	Ceramida	Ceramidasa
Gangliosidosis de GM ₁	Gangliósido GM ₁ , glucoproteína	Gangliósido GM ₁ -β-galactosidasa
Gangliosidosis de (Sandhoff)	GM ₂ Gangliósido GM ₂ , globósido	Hexosaminidasa A y B
Tay-Sachs	Gangliósido GM ₂	Hexosaminidasa A
Krabbe	Galactosilceramida	β-Galactocerebrosidasa
<u>Mucopolisacaridosis</u>		
Hurler-Scheie (MPS I)	Sulfato de dermatano, sulfato de heparina	α-L-iduronidasa

Hunter (MPS II)	Sulfato de dermatano, sulfato de heparina	Iduronato sulfatasa
Sanfilippo (MPS III)		
Tipo A	Sulfato de heparano	Heparan-N-sulfatasa
Tipo B	Sulfato de heparano	N-acetil- α -glucosaminidasa
Tipo C	Sulfato de heparano	Acetil CoA: α -glucosaminidasa acetil-transferasa
Tipo D	Sulfato de heparano	N-acetil- α -glucosamina-6-sulfatasa
Marquio (MPS IV)		
Tipo A	Sulfato de queratano	Galactosamina-6-sulfatasa
Tipo B	Sulfato de queratano	β -galactosidasa
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Sulfato de dermatano	Galactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B)
Sly (MPS VII)	Sulfato de dermatano, sulfato de heparano	β -glucuronidasa
Mucosulfatidosis	Sulfatidas, mucopolisacáridos	Arilsulfatasa A, B y C, otras sulfatasas
Mucopolisacaridosis		
Sialidosis	Sialiloligosacáridos, glucoproteínas	α -neuraminidasa
Mucopolisacaridosis II	Sialiloligosacáridos, glucoproteínas, glucolípidos	Suero alto, enzimas de alto fibroblasto; N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa
Mucopolisacaridosis III	Glucoproteínas, glucolípidos	Mismo que antes
Mucopolisacaridosis IV	Glucolípidos, glucoproteínas	Proteína transm Mcoln 1
Otras enfermedades del metabolismo complejo de los hidratos de carbono		
Fabry	Globotriaosilceramida (Gb3), liso-Gb3	α -galactosidasa A
Schindler	Glucopéptidos unidos a O	α -N-acetilgalactosaminidasa
Pompe	Glucógeno	α -glucosidasa
Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico	Ácido siálico libre	Desconocido
Fucosidosis	Fucoglucolípidos, fucosiloligosacáridos	α -fucosidasa
Manosidosis aspartilglucosaminuria amidasa	Manosiloligosacáridos Aspartilglucosamina	α -manosidasa Aspartilglucosamina
Wolman	Ésteres de colesterol, triglicéridos	Lipasa ácida
Lipofuscinosis ceroides neuronales (NCLs)*		
NCL infantil	Depósitos osmófilos granulares, saposinas A y D	Palmitoil-proteína tioesterasa (PPT1)
Infantil tardía	Perfiles curvilíneos, ATP sintasa subunidad c	Tripeptidil proteasa 1 (TPP1)
Variante finlandesa	Perfiles huella / rectilíneos, ATP sintasa subunidad c	CLN5

Variante	Perfiles huella / rectilíneos, ATP sintasa subunidad c	CLN6
Juvenil	Perfil huella, ATP sintasa subunidad c	CLN3
Adulto	Variable	Desconocido
Epilepsia del Norte	Perfil rectilíneo, ATP sintasa subunidad c	CLN8
Variante turca	Perfiles huella / rectilíneos - constituyentes desconocidos	Desconocido

Enfermedades lisosomales de transporte y metabolismo del colesterol

Niemann-Pick tipo C Colesterol no esterificado NPC1 o NPC2

* Davidson et al., The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Clinical Features and Molecular Basis of Disease. En Barranger JA y Cabrera-Salazar MA (Eds) Lysosomal Storage Disorders. 2007. pp. 371-388. Springer, New York, EE. UU.

- Se puede usar cualquier método conocido por el experto para monitorizar el estado de enfermedad y la eficacia de una terapia de combinación de la divulgación. Los monitores clínicos del estado de enfermedad pueden incluir, pero no se limitan a, volumen del órgano (por ejemplo, hígado, bazo), hemoglobina, cifra de eritrocitos, hematocrito, trombocitopenia, caquexia (debilitamiento) y niveles de quitinasa en plasma (por ejemplo, quitotriosidasa). Se conoce que la quitotriosidasa, una enzima de la familia de las quitinasa, es producida por los macrófagos en altos niveles en sujetos con enfermedades de almacenamiento lisosómico (véase Guo et al., 1995, J. Inherit. Metab. Dis. 18, 717-722; den Tandt et al., 1996, J. Inherit. Metab. Dis. 19, 344-350; Dodelson de Kremer et al., 1997, Medicina (Buenos Aires) 57, 677-684; Czartoryska et al., 2000, Clin. Biochem. 33, 147-149; Czartoryska et al., 1998, Clin. Biochem. 31, 417-420; Mistry et al., 1997, Baillieres Clin. Haematol. 10, 817-838; Young et al., 1997, J. Inherit. Metab. Dis. 20, 595-602; Hollak et al., 1994, J. Clin. Invest. 93, 1288-1292). La quitotriosidasa se mide preferentemente junto con la enzima convertidora de angiotensina y fosfatasa ácida no resistente a tartrato para monitorizar la respuesta al tratamiento de pacientes con Gaucher.
- Los métodos y formulaciones para administrar las terapias de combinación de la divulgación incluyen todos métodos y formulaciones bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980 y años posteriores, 16ª ed. y ediciones posteriores, A. Oslo editor, Easton Pa.; Controlled Drug Delivery, 1987, 2ª rev., Joseph R. Robinson & Vincent H. L. Lee, eds., Marcel Dekker, ISBN: 0824775880; Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, 1999, Edith Mathiowitz, John Wiley & Sons, ISBN: 0471148288; patente de EE.UU. Nº 6.066.626 y referencias citadas en su interior; véanse, por tanto, las referencias citadas en secciones posteriores).
- Según la divulgación, se proporcionan los siguientes enfoques generales para la terapia de combinación en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico. Cada enfoque general implica combinar la terapia de reemplazo enzimático con la terapia de moléculas pequeñas de un modo de acuerdo con la optimización del beneficio clínico mientras que se minimizan las desventajas asociadas al uso de cada terapia sola.
- En un caso de la divulgación, se administra terapia de reemplazo enzimático (sola o en combinación con la terapia de moléculas pequeñas) para iniciar el tratamiento (es decir, citorreducir el sujeto) y la terapia de moléculas pequeñas después de la fase citorreductora para lograr y mantener un efecto terapéutico estable a largo plazo sin la necesidad de inyecciones intravenosas frecuentes para ERT. Por ejemplo, la terapia de reemplazo enzimático se puede administrar por vía intravenosa (por ejemplo, durante un periodo de una a dos horas) una vez, semanalmente, una vez cada dos semanas, o una vez cada dos meses, durante varias semanas o meses, o más (por ejemplo, hasta que un órgano indicador implicado tal como el bazo o el hígado muestre una disminución en el tamaño). Además, la fase de ERT de tratamiento citorreductor inicial se puede realizar sola o en combinación con una terapia de moléculas pequeñas. Es particularmente preferido un componente terapéutico de moléculas pequeñas donde la molécula pequeña es compatible con la administración por vía oral, proporcionando así alivio adicional de la frecuente intervención intravenosa.
- Alternar entre ERT y SMT, o complementar SMT con ERT según se necesite, proporciona una estrategia para aprovechar simultáneamente las fortalezas y trata las debilidades asociadas a cada terapia cuando se usa sola. Una ventaja de ERT, si se usa para la citorreducción y/o para cuidado a más largo plazo, es la experiencia clínica mucho más amplia disponible para informar las decisiones del médico. Además, un sujeto se puede valorar eficazmente con ERT durante la fase de citorreducción, por ejemplo, monitorizando metabolitos bioquímicos en la orina u otras muestras del cuerpo, o midiendo el volumen de órgano afectado. Una desventaja de ERT, sin embargo, es la frecuencia de la administración requerida, que normalmente implica inyección intravenosa semanalmente o cada dos

semanas debido a la constante re-acumulación del sustrato. El uso de terapia de moléculas pequeñas para reducir la cantidad o inhibir la acumulación de sustrato en un paciente puede reducir a su vez la frecuencia de administración de ERT. Por ejemplo, en una pauta posológica de terapia de reemplazo enzimático cada dos semanas se puede ofrecer un "descanso de ERT" (por ejemplo, usando una SMT) de manera que las inyecciones enzimáticas frecuentes no sean terapia requerida. Además, tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico con terapia de combinación puede proporcionar enfoques terapéuticos complementarios. De hecho, como se demuestra en los ejemplos posteriores, una terapia de combinación de SMT y ERT puede proporcionar mejoras significativas sobre cualquier plataforma terapéutica sola. Estos datos sugieren que la terapia de combinación usando SMT y ERT puede ser tanto aditiva como complementaria. En un caso, se puede usar ERT como una estrategia citorreductora (es decir, para iniciar el tratamiento), seguida por o complementada simultáneamente con SMT usando un compuesto de la presente divulgación. En otro caso, un paciente se trata primero con SMT usando un compuesto de la presente divulgación, seguida por o complementada simultáneamente con ERT. En otros casos, se usa una SMT para inhibir o reducir la acumulación adicional de sustrato (o re-acumulación de sustrato si se usa después de la citorreducción con ERT) en un paciente con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, y opcionalmente se proporciona ERT según se necesite para reducir cualquier acumulación adicional de sustrato. En un caso, la presente divulgación proporciona un método de terapia de combinación para el tratamiento de un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende alternar entre administración de una terapia de reemplazo enzimático y una terapia de moléculas pequeñas. En otro caso, la presente divulgación proporciona un método de terapia de combinación para el tratamiento de un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende administrar simultáneamente una terapia de reemplazo enzimático y una terapia de moléculas pequeñas. En las diversas terapias de combinación de la divulgación, se entenderá que la administración de la terapia de moléculas pequeñas puede ocurrir antes de, simultáneamente con, o después de, la administración de la terapia de reemplazo enzimático. Similarmente, la administración de terapia de reemplazo enzimático puede ocurrir antes de, simultáneamente con, o después de, la administración de la terapia de moléculas pequeñas.

En cualquiera de los casos de la divulgación, la enfermedad de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en Gaucher (tipos 1, 2 y 3), Niemann-Pick, Farber, gangliosidosis de GM₁, gangliosidosis de GM₂ (por ejemplo, deficiencia del activador de GM₂, Tay-Sachs y Sandhoff), Krabbe, Hurler-Scheie (MPS I), Hunter (MPS II), Sanfilippo (MPS III) Tipo A, Sanfilippo (MPS III) Tipo B, Sanfilippo (MPS III) Tipo C, Sanfilippo (MPS III) Tipo D, (MPS IV) Tipo A, Marquio (MPS IV) Tipo B, Maroteaux-Lamy (MPS VI), Sly (MPS VII), mucosulfatidosis, Marquio sialidosis, mucopolisacáridosis II, mucopolisacáridosis III, mucopolisacáridosis IV, Fabry, Schindler, Pompe, enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, fucosidosis, mannosidosis, aspartilglucosaminuria, Wolman y lipofuscinosis ceroides neuronal.

Además, la ERT proporciona una cantidad eficaz de al menos una de las siguientes enzimas: glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, ceramidasa, gangliósido GM₁-beta-galactosidasa, hexosaminidasa A, hexosaminidasa B, beta-galactocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, N-acetil-alfa-glucosaminidasa, acetil CoA:alfa-glucosaminidasa acetil-transferasa, N-acetil-alfa-glucosamina-6-sulfatasa, galactosamina-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, galactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B), beta-glucuronidasa, arilsulfatasa A, arilsulfatasa C, alfa-neuraminidasa, N-acetil-glucosamina-1-fosfato transferasa, alfa-galactosidasa A, alfa-N-acetilgalactosaminidasa, alfa-glucosidasa, alfa-fucosidasa, alfa-manosidasa, aspartilglucosamina amidasa, lipasa ácida, palmitoil-proteína tioesterasa (CLN-1), PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, NPC1 o NPC2.

Según la divulgación, la SMT y/o ERT producen una disminución en al menos uno de los siguientes materiales almacenados: glucocerebrósido, esfingomielina, ceramida, gangliósido GM₁, gangliósido GM₂, globósido, galactosilceramida, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, sulfatidas, mucopolisacáridos, sialiloligosacáridos, glucoproteínas, sialiloligosacáridos, glucolípidos, globotriaosilceramida, glucopéptidos unidos a O, glucógeno, ácido siálico libre, fucoglucolípidos, fucosiloligosacáridos, mannosiloligosacáridos, aspartilglucosamina, ésteres de colesterol, triglicéridos, depósitos osmófilos granulares - Saposinas A y D, ATP sintasa subunidad c, NPC1 o NPC2.

En ciertas realizaciones de la invención, la terapia de moléculas pequeñas comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (véase Fig. 2A). En ciertos casos de la divulgación, la terapia de moléculas pequeñas comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (véase Fig. 2B). La terapia de moléculas pequeñas puede incluir administrar a un sujeto uno o más compuestos. En ciertos casos, al menos uno de los compuestos es un compuesto de la presente divulgación.

La terapia de reemplazo enzimático puede provocar respuestas inmunitarias no deseadas. Por consiguiente, se pueden usar agentes inmunosupresores junto con un componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación de la divulgación. Dichos agentes también se pueden usar con un componente de terapia de moléculas pequeñas, pero la necesidad de intervención es aquí, en general, menos probable. Se puede emplear cualquier agente inmunosupresor conocido para el experto junto con una terapia de combinación de la divulgación. Dichos agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, ciclosporina, FK506, rapamicina, CTLA4-Ig, y agentes anti-TNF tales como etanercept (véase, por ejemplo, Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999,

Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). El anticuerpo anti-receptor de IL2 (subunidad alfa) daclizumab (por ejemplo, Zenapax.TM.), que se ha demostrado eficaz en pacientes con trasplante, también se puede usar como un agente inmunosupresor (véanse, por ejemplo, Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl. J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60; Berard et al., 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159). Los agentes inmunosupresores adicionales incluyen, pero no se limitan a, anti-CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152) y ligando anti-CD40 (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

Se puede usar cualquier combinación de agentes inmunosupresores conocidos por el experto junto con una terapia de combinación de la divulgación. Una combinación de agente inmunosupresor de particular utilidad es tacrolimus (FK506) más sirolimus (rapamicina) más daclizumab (anticuerpo anti-receptor de IL2 - subunidad alfa). Se ha demostrado que esta combinación es eficaz como una alternativa a esteroides y ciclosporina, y cuando se dirige específicamente al hígado. Además, se ha mostrado recientemente que esta combinación permite trasplantes de células de los islotes pancreáticos satisfactorios. Véase Denise Grady, The New York Times, sábado, 27 de mayo de 2000, páginas A1 y A11. Véase también A. M. Shapiro et al., 27 de Julio de 2000, "Islet Transplantation In Seven Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Using A Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen", N. Engl. J. Med. 343, 230-238; Ryan et al., 2001, Diabetes 50, 710-719. También se puede usar plasmaforesis por cualquier método conocido en la técnica para retirar o empobrecer los anticuerpos que se pueden desarrollar contra diversos componentes de una terapia de combinación.

Los indicadores del estado inmunitario de uso con la divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y cualquiera de las citocinas conocidas por el experto, por ejemplo, las interleucinas, CSFs e interferones (véanse, en general, Leonard et al., 2000, J. Allergy Clin. Immunol. 105, 877-888; Oberholzer et al., 2000, Crit. Care Med. 28 (4 Suppl.), N3-N12; Rubinstein et al., 1998, Cytokine Growth Factor Rev. 9, 175-181). Por ejemplo, se pueden monitorizar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con la enzima de reemplazo para determinar el estado inmunitario del sujeto. Entre las aproximadamente dos docenas de interleucinas conocidas, son indicadores del estado inmunitario particularmente preferidos IL-1 alfa, IL-2, IL-4, IL-8 e IL-10. Entre los factores estimulantes de colonias (CSFs), son indicadores de estado inmunitario particularmente preferidos G-CSF, GM-CSF y M-CSF. Entre los interferones, se prefieren uno o más interferones alfa, beta o gamma como indicadores del estado inmunitario.

En las secciones a continuación, se desvelan diversos componentes que se pueden usar para ocho enfermedades de almacenamiento lisosómico específicas (es decir, Gaucher (incluyendo tipos 1, 2 y 3), Fabry, Niemann-Pick B, Hunter, Marquio, Maroteaux-Lamy, Pompe y Hurler-Scheie). En secciones posteriores, se proporciona divulgación habilitante adicional para los componentes de la terapia de reemplazo enzimático y de la terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación de la divulgación.

Gaucher

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad de Gaucher está provocada por la deficiencia de la enzima glucocerebrosidasa (beta-D-glucosil-N-acil esfingosina glucohidrolasa, EC 3.2.1.45) y la acumulación de glucocerebrósido (glucosilceramida). Para un componente de la terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación de la divulgación para el tratamiento de enfermedad de Gaucher, están disponibles varias referencias que exponen pautas posológicas satisfactorias y otra información útil referente al tratamiento (véanse Morales, 1996, Gaucher's Disease: A Review, The Annals of Pharmacotherapy 30, 381-388; Rosenthal et al., 1995, Enzyme Replacement Therapy for Gaucher Disease: Skeletal Responses to Macrophage-targeted Glucocerebrosidase, Pediatrics 96, 629-637; Barton et al., 1991, Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency--Macrophage-targeted Glucocerebrosidase for Gaucher's Disease, New England Journal of Medicine 324, 1464-1470; Grabowski et al., 1995, Enzyme Therapy in Type 1 Gaucher Disease: Comparative Efficacy of Mannose-terminated Glucocerebrosidase from Natural and Recombinant Sources, Annals of Internal Medicine 122, 33-39; Pastores et al., 1993, Enzyme Therapy in Gaucher Disease Type 1: Dosage Efficacy and Adverse Effects in 33 Patients treated for 6 to 24 Months, Blood 82, 408-416); y Weinreb et al., Am. J. Med.;113(2): 112-9 (2002).

En un caso, se proporciona una pauta posológica de ERT de desde 2,5 unidades por kilogramo (U/kg) tres veces a la semana hasta 60 U/kg una vez cada dos semanas, donde la enzima se administra por infusión intravenosa durante 1-2 horas. Una unidad de glucocerebrosidasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un micromol del sustrato sintético para-nitrofenil-p-D-glucopiranosido por minuto a 37 °C. En otro caso, se proporciona una pauta posológica de desde 1 U/kg tres veces a la semana hasta 120 U/kg una vez cada dos semanas. En otro caso más, se proporciona una pauta posológica de desde 0,25 U/kg al día o tres veces a la semana hasta 600 U/kg una vez cada dos a seis semanas.

Desde 1991, ha estado disponible alglucerasa (Ceredase®) de Genzyme Corporation. La alglucerasa es una forma de glucocerebrosidasa modificada derivada de placenta. En 1994, también se puso a disposición imiglucerasa (Cerezyme®) de Genzyme Corporation. Imiglucerasa es una forma modificada de glucocerebrosidasa derivada de la

expresión de ADN recombinante en un sistema de cultivo celular de mamífero (células de ovario de hámster chino). La imiglucerasa es una glicoproteína monomérica de 497 aminoácidos que contiene cuatro sitios de glucosilación unido a N. La imiglucerasa tiene las ventajas de un aporte teóricamente ilimitado y una probabilidad reducida de contaminantes biológicos con respecto a la aglucerasa derivada de placenta. Estas enzimas están modificadas en sus sitios de glucosilación para exponer restos de manosa, una maniobra que mejora el direccionamiento lisosómico mediante el receptor de manosa-6-fosfato. La imiglucerasa se diferencia de la glucocerebrosidasa placentaria por un aminoácido en la posición 495 donde la histidina se sustituye por arginina. Se conocen varias pautas posológicas de estos productos por ser eficaces (véase Morales, 1996, Id.; Rosenthal et al., 1995, Id.; Barton et al., 1991, Id.; Grabowski et al., 1995, Id.; Pastores et al., 1993, Id.). Por ejemplo, una pauta posológica de 60 U/kg una vez cada dos semanas es de beneficio clínico en sujetos con enfermedad de moderada a grave. Las referencias citadas anteriormente y los prospectos para estos productos deben ser consultados por el médico habitual para información adicional de la pauta posológica y administración. Véanse también las patentes de EE.UU. Nº 5.236.838 y 5.549.892 cedidas a Genzyme Corporation.

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad de Gaucher resulta de una deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa (GC). En el fenotipo más común de enfermedad de Gaucher (tipo 1), la patología se limita a los sistemas reticuloendotelial y esquelético y no existen síntomas neuropáticos. Véase Barranger, Glucosylceramide lipidosis: Gaucher disease. En: Scriver CR BA, Sly WS, Valle D, editor. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. pp. 3635-3668 (2001). En enfermedad de Gaucher neuropática (nGD), subdividida en enfermedad de Gaucher tipo 2 y tipo 3, la deficiencia de glucocerebrosidasa (GC) provoca que se acumulen glucosilceramida (GluCer; GL-1) y glucosilesfingosina (GluEsf) en el cerebro, que conducen a alteración neurológica. La enfermedad de Gaucher tipo 2 se caracteriza por aparición temprana, progresión rápida, patología extensiva en las vísceras y el sistema nervioso central, y muerte normalmente a los 2 años de edad. La enfermedad de Gaucher tipo 3, también conocida como nGD subaguda, es un fenotipo intermedio con edad de aparición variable y diferentes grados de gravedad y velocidades de progresión. Goker-Alpan et al., *The Journal of Pediatrics* 143: 273- 276 (2003). Un avance reciente ha producido el modelo de ratón K14 Inl/Lnl de enfermedad de Gaucher tipo 2 (en lo sucesivo, el "ratón K14"); este modelo de ratón sintetiza estrechamente la enfermedad humana que muestra ataxia, convulsiones, espasticidad y una mediana de esperanza de vida reducida de solo 14 días. Enquist et al., *PNAS* 104: 17483-17488 (2007).

Como en los pacientes con nGD, varios modelos de ratón de la enfermedad tienen niveles aumentados de GluCer y GluEsf en el cerebro debido a la deficiencia en la actividad de GC. Liu et al., *PNAS* 95: 2503-2508 (1998) y Nilsson, J. *Neurochem* 39: 709-718 (1982). Los ratones "K14" muestran un fenotipo neuropático que comparte muchas características patológicas con enfermedad de Gaucher tipo 2, tal como neurodegeneración, astrogliosis, proliferación de la microglía y niveles aumentados de GluCer y GluEsf en regiones cerebrales específicas. Enquist et al. (2007).

El tratamiento clínico de pacientes afectados por nGD plantea un reto para los médicos prácticos tanto debido a la gravedad de la enfermedad tipo 2 como a la incapacidad de las terapias actuales para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB). El tratamiento actual de no nGD se basa en la administración intravenosa de glucocerebrosidasa humana recombinante (Imiglucerasa; Cerezyme™) para reemplazar la enzima ausente o la administración de inhibidores de la glucosilceramida sintasa para atenuar la producción de sustrato (GL-1). Sin embargo, estos fármacos no atraviesan la barrera hematoencefálica, y así no se espera que proporcionen beneficio terapéutico para pacientes con nGD. No es probable que los actuales inhibidores de la glucosilceramida sintasa de molécula pequeña en la clínica traten los fenotipos neuropáticos de nGD. Una evaluación de un compuesto de la presente divulgación, (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (en lo sucesivo, "Gz161"), en el modelo de ratón K14 de enfermedad de Gaucher tipo 2 demostró que de hecho podría reducir GluCer y GluEsf cerebrales (véanse los Ejemplos 122-125). También redujo la neuropatología cerebral y prolongó la esperanza de vida de este modelo. Además, un enfoque combinado usando tanto reemplazo enzimático como reducción de sustrato de molécula pequeña puede representar una terapia superior para enfermedad de Gaucher tipo 2.

Fabry

Como se mencionó previamente, la enfermedad de Fabry está provocada por la deficiencia de la enzima lisosómica alfa-galactosidasa A. El defecto enzimático conduce a la deposición sistémica de glucoesfingolípidos que tienen restos alfa-galactosilo terminales, predominantemente globotriaosilceramida (GL3 o Gb3) y, a un menor grado, galabiosilceramida y glucoesfingolípidos del grupo sanguíneo B.

Están disponibles varios ensayos para monitorizar la progresión de la enfermedad y para determinar cuándo cambiar de una modalidad de tratamiento a otra. En un caso, se puede usar un ensayo para determinar la actividad específica de la alfa-galactosidasa A en una muestra de tejido. En otro caso, se puede usar un ensayo para determinar la acumulación de Gb3. En otro caso, el médico puede ensayar la deposición de sustratos de glucoesfingolípidos en líquidos corporales y en lisosomas de células vasculares endoteliales, periteliales y de músculo liso de vasos sanguíneos. Otras manifestaciones clínicas que pueden ser indicadores útiles del manejo de la enfermedad incluyen proteinuria, u otros signos de insuficiencia renal tales como glóbulos rojos o glóbulos lipídicos en la orina, y elevada tasa de sedimentación eritrocítica. También se pueden monitorizar anemia, disminución de la

concentración sérica de hierro, alta concentración de beta-tromboglobulina, y elevado recuento de reticulocitos o agregación plaquetaria. De hecho, se puede usar cualquier enfoque para monitorizar la progresión de la enfermedad que sea conocido por el experto (véase, en general, Desnick RJ et al., 1995, .alpha.-Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease, en: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver et al., eds., McGraw-Hill, N.Y., 7ª ed., páginas 2741-2784). Un marcador sustituto preferido es el dolor para la monitorización del manejo de la enfermedad de Fabry. Otros métodos preferidos incluyen la medición de la eliminación total de la enzima y/o sustrato de un líquido corporal o espécimen de biopsia. Una pauta posológica preferida para la terapia de reemplazo enzimático en la enfermedad de Fabry es 1-10 mg/kg i.v. cada dos días. Se puede usar una pauta posológica desde 0,1 hasta 100 mg/kg i.v. a una frecuencia de desde cada dos días hasta una vez a la semana o cada dos semanas.

10 Niemann-Pick B

Como se mencionó previamente, la enfermedad de Niemann-Pick B está provocada por la reducida actividad de la enzima lisosómica esfingomielinasa ácida y la acumulación de lípido de membrana, principalmente esfingomielina. Una dosificación eficaz de esfingomielinasa ácida de reemplazo a administrar puede variar desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a una frecuencia de desde cada dos días hasta 15 semanalmente, una vez cada dos semanas, o una vez cada dos meses. En otros casos, una dosificación eficaz puede variar desde aproximadamente 0,03 mg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg; desde aproximadamente 0,03 mg/kg hasta aproximadamente 0,1 mg/kg; y/o desde aproximadamente 0,3 mg/kg hasta aproximadamente 0,6 mg/kg. En un caso particular, un paciente se administra con esfingomielinasa ácida en una pauta posológica creciente a las siguientes dosis secuenciales: 0,1 mg/kg; 0,3 mg/kg; 0,6 mg/kg; y 1,0 mg/kg, en donde cada dosis de 20 esfingomielinasa ácida se administra al menos dos veces, y cada dosis se administra a intervalos de dos semanas, y en donde el paciente se monitoriza para efectos secundarios tóxicos antes de elevar la dosis hasta el siguiente nivel (véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2011/0052559).

Hurler-Scheie (MPS I)

La enfermedad de Hurler, Scheie, y Hurler-Scheie, también conocida como MPS I, está provocada por la inactivación de alfa-iduronidasa y la acumulación de sulfato de dermatano y sulfato de heparano. Están disponibles varios 25 ensayos para monitorizar la progresión de la enfermedad MPS I. Por ejemplo, se puede monitorizar la actividad enzimática de alfa-iduronidasa en biopsia de especímenes de tejido o células cultivadas obtenidas de sangre periférica. Además, una medida conveniente de progresión de la enfermedad en MPS I y otras mucopolisacaridosis es la eliminación urinaria de los glucosaminoglicanos sulfato de dermatano y sulfato de heparano (véase Neufeld et 30 al., 1995, Ídem). En un caso particular, se administra la enzima alfa-iduronidasa una vez a la semana como una infusión intravenosa a una dosis de 0,58 mg/kg de peso corporal.

Hunter (MPS II)

La enfermedad de Hunter (también conocida como MPS II) está provocada por la inactivación de iduronato sulfatasa y la acumulación de sulfato de dermatano y sulfato de heparano. La enfermedad de Hunter se presenta clínicamente 35 en formas graves y leves. Se prefiere una pauta posológica de enzima terapéutica desde 1,5 mg/kg cada dos semanas hasta 50 mg/kg cada semana.

Marquio (MPS IV)

El síndrome de Marquio (también conocido como MPS IV) resulta de la acumulación de sulfato de queratano debido a la inactivación de cualquiera de dos enzimas. En MPS IVA, la enzima inactivada es galactosamina-6-sulfatasa y en 40 MPS IVB la enzima inactivada es beta-galactosidasa. Se prefiere una pauta posológica de enzima terapéutica desde 1,5 mg/kg cada dos semanas hasta 50 mg/kg cada semana.

Maroteaux-Lamy (MPS VI)

El síndrome de Maroteaux-Lamy (también conocido como MPS VI) está provocado por la inactivación de alactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B) y la acumulación de sulfato de dermatano.

45 Una pauta posológica de desde 1,5 mg/kg cada dos semanas hasta 50 mg/kg cada semana es un intervalo preferido de enzima terapéutica eficaz proporcionada por ERT. Óptimamente, la dosis empleada es inferior o igual a 10 mg/kg por semana. Un marcador sustituto preferido para la progresión de la enfermedad MPS VI es los niveles de proteoglicanos.

Pompe

50 La enfermedad de Pompe está provocada por la inactivación de la enzima alfa-glucosidasa ácida y la acumulación de glucógeno. El gen de la alfa-glucosidasa ácida reside en el cromosoma 17 humano y se designa GAA. H. G. Hers propuso por primera vez el concepto de enfermedad lisosómica congénita basándose en sus estudios de esta enfermedad, a la que denominó enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSD II) y que ahora también se denomina de deficiencia maltasa ácida (AMD) (véase Hers, 1965, Gastroenterology 48, 625). En un caso

particular, GAA se administra cada 2 semanas como una infusión intravenosa a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal.

Están disponibles varios ensayos para monitorizar la progresión de la enfermedad de Pompe. Se puede usar cualquier ensayo conocido por el experto. Por ejemplo, se puede ensayar la acumulación intra-lisosómica de gránulos de glucógeno, particularmente en miocardio, hígado y fibras musculares esqueléticas obtenidas de biopsia. También se puede monitorizar la actividad enzimática de alfa-glucosidasa en especímenes de biopsia o células cultivadas obtenidas de sangre periférica. Se puede monitorizar la elevación sérica de creatina cinasa (CK) como una indicación de la progresión de la enfermedad. La CK sérica se puede elevar hasta diez veces en pacientes de aparición en la infancia y normalmente se eleva hasta un menor grado en pacientes de aparición en la edad adulta. Véase Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid alpha-Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency. En: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver et al., eds., McGraw-Hill, N.Y., 7ª ed., páginas 2443-2464.

Terapia de reemplazo enzimático

Las siguientes secciones exponen la divulgación específica y casos alternativos disponibles para el componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación de la divulgación. En general, las pautas posológicas para un componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación de la divulgación se determinan, en general, por el profesional clínico experto. Se proporcionan anteriormente varios ejemplos de pautas posológicas para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher con glucocerebrosidasa. Los principios generales para determinar una pauta posológica para cualquier componente de ERT dado de una terapia de combinación de la divulgación para el tratamiento de cualquier LSD serán evidentes para el experto a partir de información públicamente disponible, tal como, por ejemplo, una revisión de las referencias específicas citadas en las secciones para cada LSD específica. Se puede administrar una ERT a un paciente por infusión intravenosa. Se pueden usar infusión intracerebroventricular y/o intratecal (por ejemplo, además de infusión intravenosa) administrando ERT a un paciente diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico que tiene manifestaciones del SNC.

Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de las enzimas que se van a usar en un componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación de la divulgación. Muchos de dichos métodos se conocen e incluyen, pero no se limitan a la tecnología de activación de genes desarrollada por Shire plc (véanse las patentes de EE.UU. Nº 5.968.502 y 5.272.071).

Terapia de moléculas pequeñas

La siguiente sección también expone divulgaciones específicas y casos alternativos disponibles para el componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación de la divulgación. Las pautas posológicas para un componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación de la divulgación se determinan, en general, por el profesional clínico experto y se espera que varíen significativamente dependiendo de la enfermedad de almacenamiento particular que está tratándose y el estado clínico del individuo afectado particular. Se conocen bien por el experto los principios generales para determinar una pauta posológica para un componente de SMT dado de cualquier terapia de combinación de la divulgación para el tratamiento de cualquier enfermedad de almacenamiento. Se puede obtener orientación para pautas posológicas de cualquiera de las muchas referencias bien conocidas en la técnica sobre este tema. Está disponible orientación adicional, entre otros, de una revisión de las referencias específicas citadas en el presente documento.

Se pueden usar (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (compuesto de la invención) y (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (compuesto de la divulgación) en las terapias de combinación de la divulgación para el tratamiento de prácticamente cualquier enfermedad de almacenamiento lisosómico resultante de una lesión en la vía de los glucoesfingolípidos (por ejemplo, Gaucher, Fabry, gangliosidosis de GM₁ y gangliosidosis de GM₂ (por ejemplo, deficiencia del activador de GM₂, Tay-Sachs y Sandhoff)). Asimismo, se pueden usar aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina, G418) en las terapias de combinación de la divulgación para cualquier enfermedad de almacenamiento individual que tenga una mutación del codón de parada prematuro (es decir, mutación terminadora). Dichas mutaciones son particularmente predominantes en el síndrome de Hurler. Se prefiere particularmente un componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación de la divulgación donde existe una manifestación del sistema nervioso central a la enfermedad de almacenamiento que está tratándose (por ejemplo, Sandhoff, Tay-Sachs, Niemann-Pick Tipo A, y Gaucher tipos 2 y 3), puesto que las moléculas pequeñas pueden, en general, atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad cuando se compara con otras terapias.

Las dosificaciones preferidas de inhibidores de sustrato usadas en una terapia de combinación de la divulgación se determinan fácilmente por el experto. En ciertos casos, dichas dosificaciones pueden variar desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg, preferentemente desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg (por ejemplo, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg y 60 mg/kg) por administración intraperitoneal, oral o equivalente desde una hasta cinco veces al día. Dichas dosificaciones pueden variar desde aproximadamente 5 mg/kg hasta

aproximadamente 5 g/kg, preferentemente desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg por administración oral, intraperitoneal o equivalente de una a cinco veces al día. En un caso, las dosis varían desde aproximadamente 10 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día (por ejemplo, 10 mg/día, 20 mg/día, 30 mg/día, 40 mg/día, 50 mg/día, 60 mg/día, 70 mg/día, 80 mg/día, 90 mg/día, 100 mg/día, 110 mg/día, 120 mg/día, 130 mg/día, 140 mg/día, 150 mg/día, 160 mg/día, 170 mg/día, 180 mg/día, 190 mg/día, 200 mg/día, 210 mg/día, 220 mg/día, 230 mg/día, 240 mg/día, 250 mg/día, 260 mg/día, 270 mg/día, 280 mg/día, 290 mg/día, 300 mg/día). Un intervalo de dosis oral particularmente preferido es desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 100 mg, en donde la dosis se administra dos veces al día. Un intervalo de dosis oral particular para un compuesto de la presente divulgación es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 600 mg/kg/día. Un intervalo de dosis oral particular para un compuesto de la presente divulgación es desde aproximadamente 1 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, por ejemplo, 1 mg/kg/día, 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 35 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, 45 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, 55 mg/kg/día o 60 mg/kg/día, 65 mg/kg/día, 70 mg/kg/día, 75 mg/kg/día, 80 mg/kg/día, 85 mg/kg/día, 90 mg/kg/día, 95 mg/kg/día o 100 mg/kg/día.

Se prefiere una combinación en rotación de plataformas terapéuticas (es decir, terapia de reemplazo enzimático y de moléculas pequeñas). Sin embargo, los sujetos también se pueden tratar por solapamiento de ambos enfoques según se necesite, como se ha determinado por el profesional clínico experto. Los ejemplos de programas de tratamiento pueden incluir, pero no se limitan a: (1) SMT seguido por ERT; (2) ERT seguido por SMT; y (3) ERT y SMT proporcionados a aproximadamente la misma vez. Como se mencionó previamente, también se puede realizar el solapamiento temporal de plataformas terapéuticas, según se necesite, dependiendo de la evolución clínica de una enfermedad de almacenamiento dada en un sujeto dado.

Los intervalos de tratamiento para diversas terapias de combinación pueden variar ampliamente y pueden ser, en general, diferentes entre diferentes enfermedades de almacenamiento y diferentes individuos dependiendo de cómo de agresivamente se acumulen los productos de almacenamiento. Por ejemplo, la acumulación de productos de almacenamiento de Fabry puede ser lenta en comparación con la rápida acumulación de productos de rápido almacenamiento en Pompe. La valoración de una enfermedad de almacenamiento particular en un individuo particular se lleva a cabo por el experto monitorizando los signos clínicos de progresión de la enfermedad y el éxito del tratamiento.

Las diversas macromoléculas que se acumulan en enfermedades de almacenamiento lisosómico no se distribuyen uniformemente, sino que en su lugar se depositan en ciertos sitios anatómicos preferidos para cada enfermedad. Sin embargo, una enzima exógenamente suministrada es, en general, absorbida por células del sistema reticuloendotelial y se clasifican en el compartimento lisosómico donde actúa para hidrolizar el sustrato acumulado. Además, la absorción celular de enzima terapéutica puede ser aumentada por ciertas maniobras para aumentar el direccionamiento lisosómico (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.549.892 por Friedman et al., cedida a Genzyme Corporation, que describe glucocerebrosidasa recombinante que tiene farmacocinética mejorada en virtud de cadenas laterales remodeladas de oligosacáridos reconocidas por receptores de manosa de la superficie celular que son endocitadas y transportadas a los lisosomas).

Algunas modalidades de tratamiento se dirigen a algunos órganos afectados mejor que otras. En Fabry, por ejemplo, si ERT no llega al riñón suficientemente bien para un desenlace clínico satisfactorio, se puede usar SMT para reducir los niveles de sustrato en el riñón. Como se demuestra en el Ejemplo 112 y Fig. 6B, SMT redujo eficazmente los niveles de Gb3 (es decir, el sustrato acumulado en pacientes con Fabry) en la orina de un modelo de ratón con Fabry hasta un mayor grado que ERT. Se cree que los riñones son la principal fuente de orina Gb3. A diferencia, la Fig. 6B muestra que ERT redujo eficazmente los niveles de Gb3 en el plasma hasta un mayor grado que SMT. Estos resultados demuestran que una terapia de combinación de ERT y SMT proporciona una estrategia terapéutica complementaria que se aprovecha de las fortalezas y trata las debilidades asociadas a cada terapia empleada sola. SMT es capaz de atravesar la BBB, proporcionando un poderoso enfoque, cuando se combina con ERT, para tratar LSDs que tienen manifestaciones del CNS, tales como Niemann Pick Tipo A y enfermedad de Gaucher neuropática (nGD). Además, la reducción de sustrato por SMT combinada con el reemplazo enzimático tratan el problema del almacenamiento en puntos de intervención separados y distintos que pueden potenciar el desenlace clínico.

Se entenderá que la referencia a administración simultánea o concurrente de dos o más terapias no requiere que se administren al mismo tiempo, solo que están actuando en el sujeto al mismo tiempo.

A continuación, los Ejemplos 75, 111-114 y 127 son representativos de la invención. Los Ejemplos 1-74, 76-110 y 115-126 son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1

1-fenilciclobutilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 1-fenilciclobutanamina (100 mg, 0,540 mmoles) y quinuclidin-3-ol (103 mg, 0,810 mmoles) dieron 1-fenilciclobutilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (76 mg, 47 %) como un sólido blanco.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,43 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,34 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,23 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 5,75 - 5,25 (m,

1H), 4,60 (s a, 1H), 3,25-2,22 (m, 9H), 2,16 - 2,03 (m, 1H), 2,02- 0,94 (m, 6H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 158,1, 128,5, 126,9, 125,6, 71,4, 59,4, 55,7, 47,5, 46,6, 34,0, 31,8, 29,9, 25,5, 24,7, 22,9, 19,7, 15,3, 14,4 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,62 min; (M+1) 331.

Ejemplo 2

5 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general B, benzo[d][1,3]dioxol-5-carbonitrilo (1,00 g, 6,81 mmoles) se convirtió en clorhidrato de 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)propan-2-amina (692 mg, 47 %).

Usando el procedimiento general A, el producto intermedio de cloruro de amonio anterior (150 mg, 0,695 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (125 mg, 54 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,91 (dd, $J = 1,9$ Hz, 1H), 6,87 (dd, $J = 1,9, 8,2$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 5,93 (s, 2H), 5,12 (s, 1H), 4,69-4,66 (m, 1H), 3,26-2,11 (m, 7H), 2,03-1,07 (m, 4H), 1,63 (s, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 156,7, 147,9, 118,0, 108,1, 106,1, 101,2, 71,2, 55,9, 55,3, 47,6, 46,7, 29,9, 29,7, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 97,5% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,65 min; (M+1) 333.

Ejemplo 3

15 2-(naftalen-1-il)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(naftalen-1-il)propan-2-amina (100 mg, 0,450 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(naftalen-1-il)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (115 mg, 59 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,79-8,46 (m, 1H), 7,99-7,72 (m, 2H), 7,69-7,36 (m, 4H), 5,86 -5,37 (m, 1H), 4,72 -4,34 (m, 1H), 3,25-2,20 (m, 6H), 2,16-0,41 (m, 5H), 1,93 (s, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 154,6, 135,2, 130,7, 129,7, 128,8, 125,9, 125,3, 123,9, 72,2, 71,1, 56,5, 55,7, 47,6, 46,6, 31,8, 31,2, 25,5, 24,8, 22,9, 19,7, 14,4 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,80 min; (M+1) 339.

Preparación I

Ejemplo 4

2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)propan-2-ilcarbamato de (*R*)-quinuclidin-3-ilo

A una disolución de (*R*)-quinuclidin-3-ol (194 mg, 1,52 mmoles) en THF (5 mL) a temperatura ambiente se añadió NaH [60 %, aceite] (64 mg, 1,6 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min y se añadió 1-(2-isocianatopropan-2-il)-3-(prop-1-en-2-il)benzeno (302 μL , 1,53 mmoles) gota a gota. La reacción se agitó durante un periodo de 30 min y se extinguió con salmuera. Se extrajo la disolución con EtOAc y se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 y se concentró. Se purificó el material en bruto sobre una CombiFlash (cartucho de SiO_2 , CHCl_3 y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando el carbamato correspondiente (475 mg, 95 %) como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,49 (s, 1H), 7,31 (s a, 3H), 5,33 (s, 1H), 5,17 (s, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,77 - 4,61 (m, 1H), 3,33 - 2,27 (m, 5H), 2,14 (s, 3H), 2,25-0,75 (m, 6H), 1,68 (s a, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 154,7, 147,2, 143,7, 141,6, 128,5, 124,2, 122,1, 112,8, 70,9, 55,7, 55,5, 47,5, 46,6, 32,2, 31,5, 29,9, 29,6, 25,5, 24,6, 22,9, 22,2, 19,6 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,84 min; (M+1) 329,2. Anal. calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0,06 (\text{CHCl}_3)$: C, 71,59; H, 8,40; N, 8,58. Hallado: C, 71,51; H, 9,05; N, 8,60.

Preparación J

Ejemplo 5

2-(3-isopropoxifenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Se agitó a reflujo una disolución de 3-cianofenol (1,00 g, 8,39 mmoles), 2-yodopropano (839 μL , 8,39 mmoles) y carbonato de cesio (2,73 g, 8,39 mmoles) en 1:1 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ (16 mL) durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de Celite. Se concentró el filtrado y el material en bruto se purificó sobre una CombiFlash (cartucho de SiO_2 , CH_2Cl_2) proporcionando el éter correspondiente (763 mg, 57 %) como un sólido blanco.

Usando el procedimiento general B, se convirtió 3-isopropoxibenzonitrilo (763 mg, 4,24 mmoles) en la 2-(3-isopropoxifenil)propan-2-amina (362 mg, 45 %) correspondiente como un aceite transparente.

Usando el procedimiento general A, la amina anterior (100 mg, 0,520 mmoles) y quinuclidin-3-ol 2-(3-isopropoxifenil)propan-2-ilcarbamato dieron de quinuclidin-3-ilo (110 mg, 61 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,17 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,92 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,89 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 6,70 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,38 - 5,13 (m, 1H), 4,58 (s a, 1H), 4,49 (hept, $J = 6,1$ Hz, 1H), 3,31-2,04 (m, 6H), 2,00-0,79 (m, 5H) 1,60 (s a, 6H), 1,28

(d, $J = 6,1$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 158,1, 129,5, 117,2, 113,6, 71,1, 69,9, 55,8, 55,4, 47,6, 46,6, 29,4, 25,6, 24,8, 22,3, 19,7 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,83 min; (M+1) 347.

Ejemplo 6

2-(3-bromo-2-fluorofenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

- 5 Usando el procedimiento general A, 2-(3-bromo-2-fluorofenil)propan-2-amina (1,0 g, 4,3 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(3-bromo-2-fluorofenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (957 mg, 58 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,45 (ddd, $J = 1,6, 6,3, 7,9$ Hz, 1H), 7,31 (td, $J = 1,6, 7,7$ Hz, 1H), 6,99 (td, $J = 1,0, 8,0$ Hz, 1H), 5,31-5,15 (s a, 1H), 4,59 (s a, 1H), 3,25-2,19 (m, 6H), 2,06-0,81 (m, 5H), 1,73 (s, 3H), 1,71 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 158,1, 155,6, 132,5, 127,1, 127,0, 124,8, 124,8, 110,6, 110,4, 71,5, 55,7, 54,2, 47,5, 46,7, 29,9, 28,4, 25,5, 24,8, 19,7 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,79 min; (M+1) 385.

Ejemplo 7

(1R,2S)-2-fenilciclopropilcarbamato de (+/-)quinuclidin-3-ilo

- 15 Usando el procedimiento general A, (+/-)((1S,2R)-2-isocianatociclopropil)benceno (117 μL , 0,780 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron (+/-) (1R,2S)-2-fenilciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (63 mg, 28 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,30-7,05 (m, 5H), 5,43 (s a, 1H), 4,77 (s a, 1H), 3,23 (dd, $J = 9,0, 14,0$ Hz, 1H), 2,97-2,65 (m, 6H), 2,15-1,12 (m, 8H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 157,1, 140,7, 140,2, 128,5, 126,8, 126,3, 71,5, 55,7, 47,5, 46,6, 32,7, 25,6, 25,2, 24,5, 19,5, 16,2 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,67 min; (M+1) 287.

Ejemplo 8

1-fenilciclohexilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

- 20 Usando el procedimiento general A, 1-fenilciclohexanamina (36 mg, 0,21 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 1-fenilciclohexilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (40 mg, 58 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,32 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,21 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 5,19-4,98 (s a, 1H), 4,70-4,56 (s, 1H), 3,34-0,83 (m, 21H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 158,4, 128,3, 126,5, 124,9, 57,2, 46,3, 36,1, 25,4, 24,2, 22,0, 19,2, 15,2 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,84 min; (M+1) 329.

Preparación K

Ejemplo 9

(R)-1-(2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)propan-2-il)-3-(quinuclidin-3-il)urea

- 30 A una disolución de diclorhidrato de (R)-quinuclidin-3-amina (120 mg, 0,603 mmoles) y 1-(2-isocianatopropan-2-il)-3-(prop-1-en-2-il)benceno (119 mg, 0,597 mmoles) en THF (3 mL) se añadió trietilamina (168 μL , 1,21 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 h y entonces se extinguió con salmuera. La mezcla se extrajo con CHCl_3 y se secó la fase orgánica (Na_2SO_4) y se concentró. Se purificó el material en bruto sobre una CombiFlash (cartucho de SiO_2 , CHCl_3 y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando la urea correspondiente (163 mg, 50 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,62 (t, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,44 (dt, $J = 1,9, 7,0$ Hz, 1H), 7,41 - 7,33 (m, 2H), 5,35 (s a, 1H), 5,11 (p, $J = 1,4$ Hz, 1H), 4,84 (s, 1H), 4,21 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 3,70-3,61 (m, 1H), 3,13 (ddd, $J = 2,3, 9,3, 14,2$ Hz, 1H), 2,71 - 2,54 (m, 3H), 2,30-2,22 (m, 1H), 2,15 (dd, $J = 0,8, 1,4, 3\text{H}$), 2,05-1,96 (m, 1H), 1,65 (s, 3H), 1,64 (s, 3H), 1,65-1,60 (m, 1H), 1,54-1,45 (m, 2H), 1,22-1,12 (m, 1H), 0,95-0,80 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 157,4, 148,5, 143,8, 141,3, 128,4, 124,4, 123,8, 122,2, 112,6, 55,2, 53,4, 46,2, 46,1, 44,5, 30,5, 30,4, 25,0, 22,2, 17,7, 8,9 ppm. Pureza: 97,5% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,83 min; (M+1) 328.

Ejemplo 10

1-(2-(naftalen-2-il)propan-2-il)-3-(quinuclidin-3-il)urea

Usando el procedimiento general B, se convirtió naftaleno-2-carbonitrilo (1,00 g, 6,53 mmoles) en la 2-(naftalen-2-il)propan-2-amina correspondiente (294 mg, 25 %) como un aceite transparente.

- 45 Usando el procedimiento general C, quinuclidin-3-amina (102 mg, 0,808 mmoles), CDI (131 mg, 0,808 mmoles) y 2-(naftalen-2-il)propan-2-amina (150 mg, 0,819 mmoles) dieron 1-(2-(naftalen-2-il)propan-2-il)-3-(quinuclidin-3-il)urea (132 mg, 49 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,94-7,78 (m, 4H), 7,69 (dd, $J = 2,0, 8,7$ Hz, 1H), 7,53-7,46 (m, 2H), 4,84 (s, 1H), 4,23 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 3,68-3,54 (m, 1H), 3,07 (ddd, $J = 2,3, 9,3, 14,1$ Hz, 1H), 2,61-2,51 (m, 2H), 2,42-2,32 (m, 1H), 1,95-1,83 (m, 2H), 1,75 (s, 3H), 1,74 (s, 3H), 1,58-1,54 (m, 1H), 1,46-1,40 (m, 2H), 1,03-0,91 (m, 1H), 0,72-0,60 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 157,5, 143,7, 133,4, 132,8, 129,3, 128,1, 127,8, 126,9, 126,7, 124,4, 124,0, 57,0, 55,0, 47,1, 47,1, 46,6, 30,5, 30,3, 26,0, 25,9, 20,0 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,71 min; (M+1) 338.

Ejemplo 11**1-(2-metil-2-(*m*-tolil)propil)-3-(3-metilquinuclidin-3-il)urea**

Usando el procedimiento general D, clorhidrato de 2-metil-2-(*m*-tolil)propan-1-amina (100 mg, 0,501 mmoles), trietilamina (279 μ L, 2,00 mmoles), trifosgeno (47 mg, 0,18 mmoles) y 2,2,2-trifluoroacetato de 3-metilquinuclidin-3-amina (140 mg, 0,550 mmoles) dieron 1-(2-metil-2-(*m*-tolil)propil)-3-(3-metilquinuclidin-3-il)urea (41 mg, 25 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,23 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,18-7,12 (m, 2H), 7,04 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 4,12 (s, 1H), 4,08 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 3,39-3,22 (m, 2H), 2,81-2,62 (m, 6H), 2,34 (s, 3H), 1,98-1,89 (m, 1H), 1,80-1,63 (m, 2H), 1,51-1,23 (m, $J = 26,9$ Hz, 2H), 1,37 (s, 3H), 1,30 (s, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 157,9, 147,1, 138,2, 128,6, 127,1, 127,1, 123,3, 64,0, 52,2, 52,1, 46,9, 46,7, 39,2, 31,2, 27,1, 26,8, 25,4, 23,5, 22,7, 21,9. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,79 min; (M+1) 330.

Ejemplo 12**1-(2-(3-metoxifenil)propan-2-il)-3-(quinuclidin-3-il)urea**

Usando el procedimiento general C, quinuclidin-3-amina (380 mg, 3,01 mmoles), CDI (489 mg, 3,01 mmoles) y 2-(3-metoxifenil)propan-2-amina (506 mg, 3,07 mmoles) dieron 1-(2-(3-metoxifenil)propan-2-il)-3-(quinuclidin-3-il)urea (560 mg, 59 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,35-7,29 (m, 1H), 7,14-7,07 (m, 2H), 6,87-6,81 (ddd, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,19 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,70-3,62 (m, 1H), 3,19-3,10 (m, 1H), 2,74-2,59 (m, 3H), 2,37-2,26 (m, 1H), 2,07-1,98 (dd, 1H), 1,80 (s a, 1H), 1,69-1,63 (m, 1H), 1,63 (s, 3H), 1,62 (s, 3H), 1,58-1,44 (m, 2H), 1,28-1,14 (m, 1H), 1,02-0,90 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 160,0, 157,5, 148,4, 129,9, 117,7, 112,0, 111,9, 56,7, 55,3, 54,6, 47,2, 46,8, 46,4, 30,1, 25,8, 20,0 ppm. Pureza: >99,4% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,73 min; (M+1) 318.

Ejemplo 13**2-(3-metoxifenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Usando el procedimiento general A, 1-(3-metoxifenil)propan-2-amina (327 mg, 1,98 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(3-metoxifenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (370 mg, 59 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,30-7,20 (m, 1H), 7,03-6,97 (m, 1H), 6,97-6,93 (m, 1H), 6,80-6,74 (dd, 1H), 5,18-5,00 (s a, 1H), 4,67-4,57 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,30-2,12 (a m, 7H), 2,02-1,00 (m, 10H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 159,7, 154,5, 149,0, 129,3, 117,2, 111,4, 111,0, 70,9, 55,7, 55,1, 47,4, 46,5, 29,4, 25,4, 24,6, 19,6 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,85 min; (M+1) 319.

Ejemplo 14**2-(3-metoxifenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 1-(4-metoxifenil)propan-2-amina (316 mg, 1,57 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(3-metoxifenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (370 mg, 59 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (d, 2H), 6,86 (d, 2H), 5,15-5,01 (s a, 1H), 4,66-4,57 (m, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,33-2,12 (m, 7H), 2,10-0,96 (m, 10H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 158,1, 154,5, 139,2, 125,8, 113,5, 70,7, 55,7, 55,2, 54,6, 47,2, 46,3, 31,2, 29,4, 25,3, 24,5, 19,4 ppm. Pureza: >94,1% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,81 min; (M+1) 319.

Ejemplo 15**2-(4-terc-butilfenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Usando el procedimiento general A, 1-(4-terc-butilfenil)propan-2-amina (348 mg, 1,82 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(4-terc-butilfenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

(427 mg, 68 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,34 (s, 4H), 5,09 (s a, 1H), 4,69-4,52 (m, 1H), 3,47-2,05 (m, 7H), 3,33-2,12 (m, 7H), 2,00-0,80 (m, 20H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 156,2, 149,4, 144,5, 125,3, 124,5, 70,9, 55,8, 55,1, 47,5, 46,6, 34,4, 31,4, 29,8, 29,3, 25,5, 24,6, 19,6 ppm. Pureza: >98,2% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 2,29 min; (M+1) 345.

Ejemplo 16**2-(4-isopropilfenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Usando el procedimiento general A, 1-(4-isopropilfenil)propan-2-amina (158 mg, 0,891 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(4-isopropilfenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (205 mg, 70 %) como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 7,19 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 5,09 (s, 1H), 4,69-4,51 (s a, 1H), 3,30-1,30 (m, 17 H), 1,24 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 1,06-0,77 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 156,2, 147,1, 144,4, 126,4,

124,7, 70,9, 55,7, 55,0, 47,4, 46,5, 33,6, 29,8, 29,4, 25,4, 24,6, 24,0, 19,5 ppm. Pureza: >98,3% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 2,19 min; (M+1) 331.

Ejemplo 17

2-(4-etilfenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

- 5 Usando el procedimiento general A, 1-(4-etilfenil)propan-2-amina (230 mg, 1,41 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(4-etilfenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (248 mg, 56 %) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,19 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 5,09 (s, 1H) 4,69-4,51 (s a, 1H) 3,34-0,73 (m, 22 H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 154,5, 144,3, 142,4, 127,8, 124,7, 71,0, 55,6, 55,1, 47,4, 46,5, 29,6, 28,3, 25,4, 24,6, 19,5, 15,8, 15,4 ppm. Pureza: >99,5% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 2,07 min; (M+1) 317.

10 Ejemplo 18

2-*o*-tolilpropan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

- 15 Usando el procedimiento general A, 2-*o*-tolilpropan-2-amina (230 mg, 1,52 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-*o*-tolilpropan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (200 mg, 44 %) como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (rotámeros) δ 7,33 (s, a, 1H), 7,15-7,10 (m, 3H), 5,35-5,20 (m, 1H), 4,60 (s a, 1H), 3,20-2,60 (m, 5H), 2,5 (s, 3H), 2,15 (s a, 1H), 1,80-1,30 (m, 10 H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) (rotámeros) δ 154,2, 144,5, 140,2, 133,0, 127,1, 126,2, 126,1, 72,2, 71, 56,0, 46,6, 46,7, 31,0, 29,0, 26,0, 24,7, 22,3, 19,7. Pureza: >95 % UPLCEM (210 nm); (M+1) 303.

Ejemplo 19

2-(2-metoxifenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

- 20 Usando el procedimiento general A, 2-(2-metoxifenil)propan-2-amina (150 mg, 0,908 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 2-(2-metoxifenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (60 mg, 21 %) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) (rotámeros) δ 7,3 (m, 1H), 7,2 (m, 1H), 6,9 (m, 2H), 5,4 (s, a, 1H), 4,6 (m, 1H), 3,8 (s, 1H), 3,1 (m, 1H), 2,4-2,8 (m, 5H), 1,9 (s, 1H), 1,3-1,7 (m, 10H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) (rotámeros) δ 157, 155, 140, 134, 129, 127, 121, 111, 70, 56, 55, 48, 47, 29, 26, 25, 20. Pureza: > 99 % UPLCMS (210 nm); (M+1) 319.

25 Preparación L

Ejemplo 20

1-(3-cianoquinuclidin-3-il)-3-(2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)propan-2-il)urea

Se preparó 3-amino-3-cianoquinuclidina como se describe en la bibliografía (Fernandez, M. A.; Gonzalez, G.; Martinez, M.; Galvez, E. Anales de la Real Academia de Farmacia 1988, 54, 502).

- 30 A una disolución de 3-amino-3-cianoquinuclidina (100 mg, 0,661 mmoles) en CH₂Cl₂ (5 mL) se añadió, gota a gota, 3-isopropenil-□,□-dimetilbencilisocianato (0,13 mL, 0,66 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas, se concentró y se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (19:1 de CH₂Cl₂/NH₃ 7 M (CH₃OH)). Se obtuvo el producto del título como un sólido blanco (155 mg, 67 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,52 (s, 1H), 7,35-7,25 (m, 3H), 5,34 (s, 1H), 5,05 (s, 1H), 2,60-3,41 (m, 6H), 2,25-2,32 (m, 1H), 2,13 (s, 3H), 1,42-2,10 (m, 4H), 1,64 (s, 6H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD) δ 157,0, 147,9, 144,0, 141,4, 128,1, 124,0, 123,4, 121,9, 121,7, 111,5, 61,0, 55,1, 50,4, 30,9, 23,3, 22,5, 21,0 19,0 ppm. Pureza: >99,9% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,82 min; (M+1) 353.

Preparación M

Ejemplo 21

40 1-[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-3-{2-[3-(prop-1-en-2-il)fenil]propan-2-il}urea

- A una suspensión de diclorhidrato de (S)-(-)-3-aminoquinuclidina (120 mg, 0,603 mmoles) y trietilamina (168 uL, 1,21 mmoles) en THF (2 mL) a temperatura ambiente se añadió 3-isopropenil-□,□-dimetilbencilisocianato (121 mg, 0,601 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción durante 18 h y entonces se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se purificó el material en bruto sobre una CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH) proporcionando el compuesto del título (29 mg, 47 %) como un sólido blanquecino. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,51 (dt, *J* = 2,5, 1,2 Hz, 1H), 7,41-7,14 (m, 3H), 5,32 (dd, *J* = 1,6, 0,8 Hz, 1H), 5,06 (s, 1H), 3,74-3,60 (m, 1H), 3,31-3,29 (m, 2H), 3,19 (ddd, *J* = 13,7, 9,5, 1,6 Hz, 1H), 2,88-2,50 (m, 4H), 2,37 (ddd, *J* = 14,0, 4,9, 2,2 Hz, 1H), 2,14 (ddd, *J* = 2,3, 1,8, 1,0 Hz, 3H), 1,81-1,63 (m, 4H), 1,62 (d, *J* = 6,2 Hz, 6H), 1,55-1,38 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD) δ 158,4, 148,4, 144,0, 141,3, 128,0, 124,1, 123,3, 121,9, 111,4, 55,7, 54,7, 46,7, 46,4, 46,0, 29,6, 29,4, 28,4, 26,1, 25,1, 21,0, 19,4 ppm. Pureza: >96% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,81 min; (M+1) 329,5.

Preparación N**Ejemplo 22****1-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-{2-[3-(propan-2-il)fenil]propan-2-il}urea**

A una disolución de 3-aminoquinuclidina (150 mg, 1,19 mmoles) en THF (5 mL) se añadió 3-isopropenil- α,α -dimetilbencilisocianato. La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, entonces se concentró sobre gel de sílice y se purificó sobre una CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH) proporcionando un sólido blanquecino (299 mg, 77 %).

Usando el procedimiento general F, la isoprenilurea anterior (150 mg, 1,19 mmoles) e hidróxido de paladio (30 mg, 20 % en peso sobre carbono) dieron 1-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-{2-[3-(propan-2-il)fenil]propan-2-il}urea (116 mg, 77 %) como un sólido blanquecino. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,38-7,28 (m, 3H), 7,16 (dt, J = 6,9, 1,6 Hz, 1H), 4,93 (s, 1H), 4,26 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 3,70-3,58 (m, 1H), 3,11 (ddd, J = 14,1,9,4,2,3 Hz, 1H), 2,90 (hept, J = 6,9 Hz, 1H), 2,71-2,52 (m, 4H), 2,31-2,19 (m, 1H), 1,98 (dd, J = 14,2, 2,9 Hz, 1H), 1,61 (d, J = 2,0 Hz, 6H), 1,52-1,43 (m, 2H), 1,23 (d, J = 6,9 Hz, 6H), 1,19-1,09 (m, 1H), 0,92-0,79 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 157,6, 150,1, 146,1, 129,2, 125,8, 124,1, 123,3, 57,1, 54,9, 47,4, 47,0, 46,6, 34,5, 30,7, 30,5, 26,1, 26,0, 24,3, 24,2, 20,3 ppm. Pureza: 94% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,87 min; (M+1) 329,3.

Ejemplo 23**1-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[1-(naftalen-1-il)etil]urea**

Se mezcló diclorhidrato de 3-aminoquinuclidene (150 mg, 0,753 mmoles) con THF (3 mL) y trietilamina (152 mg, 1,50 mmoles) antes de añadir 1-(1-naftil)etilisocianato (149 mg, 0,752 mmoles). La mezcla se agitó 48 h a temperatura ambiente. Se concentró la disolución de reacción y se purificó sobre una CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH) proporcionando el compuesto del título como un sólido blanquecino (46 mg, 19 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,20-8,05 (m, 1H), 7,85 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,59 - 7,34 (m, 4H), 5,55 (hept, 1H), 5,35 - 5,19 (m, 1H), 4,84 (dd, 1H), 3,70 - 3,53 (m, 1H), 3,09 (ddd, 1H), 2,74 - 2,28 (m, 4H), 2,17 (ddd, J = 1,8,4,5, 14,1 Hz, 1H), 1,75 - 1,62 (m, 1H), 1,55 (dd, J = 1,8, 6,8 Hz, 3H), 1,52 - 1,06 (m, 4H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 157,7, 140,0, 134,1, 130,9, 129,2, 128,3, 126,8, 126,7, 126,7, 126,0, 125,6, 123,2, 123,1, 122,8, 122,7, 56,9, 56,7, 47,4, 47,3, 46,7, 46,4, 26,1, 25,9, 22,7, 22,6, 20,1, 20,0 ppm. Pureza: 97% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,68 min; (M+1) 324,2

Ejemplo 24**1-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[2-(3-bromofenil)propan-2-il]urea**

Usando el procedimiento general C, quinuclidin-3-amina (100 mg, 0,792 mmoles), CDI (128 mg, 0,789 mmoles) y 2-(3-bromofenil)propan-2-amina (170 mg, 0,791 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (166 mg, 75 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,50 (s, 1H), 7,30 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 7,15 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 5,54 (d, J = 22,7 Hz, 1H), 5,16 (d, J = 29,7 Hz, 1H), 3,60 (s, 1H), 3,14 (ddd, J = 13,3, 9,4, 1,6 Hz, 1H), 2,61 (d, J = 52,6 Hz, 4H), 2,18 (dd, J = 14,1, 2,8 Hz, 1H), 1,66 (d, J = 3,0 Hz, 2H), 1,51 (d, J = 7,6 Hz, 6H), 1,28 (s, 3H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 157,1, 150,4, 130,3, 130,0, 128,6, 124,0, 123,0, 57,0, 54,6, 47,6, 47,2, 46,8, 30,5, 30,3, 26,3, 26,2, 20,2 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,66 min; (M+1) 367,8.

Ejemplo 25**1-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[2-(bifenil-3-il)propan-2-il]urea**

Usando el procedimiento general E, 1-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[2-(3-bromofenil)propan-2-il]urea (111 mg, 0,301 mmoles), ácido fenilborónico (78,8 mg, 0,606 mmoles) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (21 mg, 11 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (s, 1H), 7,52-7,40 (m, 8H), 4,89 (s, 1H), 4,28 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 3,75-3,59 (m, 1H), 3,15 (ddd, J = 1,9, 9,3, 13,9 Hz, 1H), 2,46 (m, 4H), 2,05 (dd, J = 3,5, 14,0 Hz, 1H), 1,68 (d, J = 4,7 Hz, 6H), 1,66-0,76 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 157,4, 146,9, 142,5, 141,1, 129,7, 129,1, 127,8, 127,4, 126,7, 124,8, 124,7, 57,1, 55,1, 30,7, 30,1, 26,1, 26,0, 20,2 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,78 min; (M+1) 364,0.

Ejemplo 26**{2-[3-(propan-2-il)fenil]propan-2-il}carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo**

Usando el procedimiento general F, {2-[3-(prop-1-en-2-il)fenil]propan-2-il}carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (48,8 mg, 0,146 mmoles) e hidróxido de paladio (30 mg, 20 % en peso sobre carbono) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (16 mg, 33 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,24 (d, J = 5,1 Hz, 3H), 7,10 (d, 1H), 5,12 (s, 1H), 4,63 (s, 1H), 3,54-2,96 (m, 1H), 2,89 (s, 1H), 2,68 (s, 5H), 2,17-1,75 (m, 2H), 1,67 (s, 6H), 1,62-1,30 (m, 2H), 1,24 (d, J = 6,9 Hz, 6H), 1,15-0,85 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 149,1, 128,5, 124,9, 123,1, 122,5,

55,8, 55,6, 46,6, 34,5, 25,6, 24,6, 24,3, 19,7 ppm. Pureza: 94% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,89 min; (M+1) 331,1.

Ejemplo 27

[2-(3-bromofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 5 Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(3-bromofenil)propan-2-amina (2,00 g, 7,89 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un sólido blanco (2,23 g, 76 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,54 (s, 1H), 7,41-7,30 (m, 2H), 7,19 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,68-4,54 (m, 1H), 3,51-2,11 (m, 6H), 2,04-1,68 (m, 2H), 1,63 (d, *J* = 10,2 Hz, 6H), 1,51-0,67 (m, 3H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 156,0, 154,7, 150,6, 149,7, 130,2, 130,0, 128,4, 123,7, 72,5, 71,6, 71,5, 55,8, 55,1, 47,6, 46,7, 31,2, 29,9, 29,8, 29,5, 25,6, 24,8, 19,7 ppm.
- 10 Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,69 min; (M+1) 368,8.

Ejemplo 28

[2-(3-ciclopropilfenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 15 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (44,3 mg, 0,121 mmoles), ácido ciclopropilborónico (14 mg, 0,16 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (21 mg, 11 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,54 (s, 1H), 7,41-7,30 (m, 2H), 7,19 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,68-4,54 (m, 1H), 3,51-2,11 (m, 6H), 2,04-1,68 (m, 2H), 1,63 (d, *J* = 10,2 Hz, 6H), 1,36 (d, *J* = 9,5 Hz, 3H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 147,2, 144,2, 128,6, 128,4, 125,0, 123,7, 122,8, 122,1, 110,0, 72,2, 71,4, 55,9, 55,4, 47,7, 47,3, 46,7, 33,1, 31,6, 30,0, 29,6, 25,6, 24,8, 19,8, 19,3, 15,8, 9,5 ppm. Pureza: 91% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,75 min; (M+1) 329,0.

20 Ejemplo 29

[2-(bifenil-3-il)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 25 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (600 mg, 1,63 mmoles), ácido fenilborónico (398 mg, 3,27 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (379 mg, 64 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,61 (s, 1H), 7,56 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,50-7,38 (m, 4H), 7,34 (m, 2H), 5,16 (s, 1H), 4,63 (s, 1H), 3,39-2,09 (m, 6H), 1,72 (s, 6H), 2,02-0,73 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 154,8, 147,8, 141,6, 129,0, 129,0, 128,6, 127,5, 125,8, 125,0, 124,0, 71,6, 71,3, 55,9, 55,5, 47,6, 46,8, 31,5, 30,2, 30,0, 29,5, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,84 min; (M+1) 365,0. Anal. Calculado. for C₂₃H₂₈N₂O₂·0,29(CHCl₃): C, 70,02; H, 7,14; N, 7,01. Encontrado: C, 70,02; H, 7,37; N, 6,84.

30 Ejemplo 30

[2-[3-(2-metilpropil)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 35 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (75 mg, 0,20 mmoles), ácido 2-metilpropilborónico (28,1 mg, 0,276 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (50 mg, 71 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,21 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H), 7,16 (s, 1H), 7,00 (s, 1H), 5,17 (s, 1H), 4,60 (s, 1H), 3,35-2,10 (m, 6H), 2,45 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,82 (dt, *J* = 6,8, 13,5 Hz, 1H), 2,03-0,94 (m, 5H), 1,65 (s, 6H), 0,89 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 172,6, 172,1, 170,8, 170,2, 160,1, 160,0, 157,8, 157,7, 140,4, 139,8, 130,5, 130,4, 130,0, 129,8, 129,5, 129,3, 127,9, 127,7, 120,8, 120,7, 120,3, 113,9, 113,6, 113,2, 113,0, 110,5, 110,4, 66,6, 66,5, 56,8, 56,3, 55,4, 55,4, 54,0, 53,7, 51,1, 46,6, 43,8, 43,7, 42,0, 38,4, 37,8, 37,7, 33,8, 33,2, 27,4, 27,0, 25,7, 25,5, 20,9, 20,9 ppm. Pureza: 90% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,89 min; (M+1) 345.
- 40

Ejemplo 31

[2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 45 Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-amina (100 mg, 0,372 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un sólido blanco (90,3 mg, 98 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45 (dd, *J* = 2,3, 7,3 Hz, 1H), 7,31 (ddd, *J* = 2,5, 4,2, 8,6 Hz, 1H), 6,88 (dd, *J* = 8,6, 11,9 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 4,82-4,33 (m, 1H), 3,28-2,28 (m, 6H), 1,68 (d, *J* = 9,0 Hz, 6H), 1,98-1,27 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 161,1, 158,6, 131,7, 131,6, 131,0, 131,0, 118,6, 118,3, 116,8, 55,8, 54,0, 47,6, 46,7, 28,5, 25,6, 24,8, 19,7 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,81 min; (M+1) 386,7. Anal. Calculado. for C₁₇H₂₂BrFN₂O₂·0,37(CHCl₃): C, 52,20; H, 5,66; N, 7,14. Encontrado: C, 52,21; H, 5,57; N, 7,13.

50 Ejemplo 32

[2-(4'-fluorobifenil-3-il)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (600 mg, 1,63 mmoles), ácido 4-fluorofenilborónico (457 mg, 3,27 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (373 mg, 60 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,56 (s, 1H), 7,52 (dd, *J* = 5,4, 8,4 Hz, 2H), 7,42-7,38 (m, 3H), 7,12 (m, 2H), 5,18 (s, 1H), 4,62 (s, 1H), 2,66 (m, 6H), 1,72 (s, 6H), 2,01-0,83 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 125,0, 124,0, 123,8, 116,0, 116,0, 71,3, 55,9, 55,5, 47,6, 46,7, 29,6, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 98,0% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,95 min; (M+1) 382,9. Anal. Calculado. for C₂₃H₂₇FN₂O₂·0,37(CHCl₃): C, 65,86; H, 6,47; N, 6,57. Encontrado: C, 65,85; H, 6,69; N, 6,49.

Ejemplo 33

[2-(4-fluorobifenil-3-il)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 10 Usando el procedimiento general E, [2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (990 mg, 2,57 mmoles), ácido fenilborónico (209 mg, 1,71 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (257 mg, 26 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,58-7,49 (m, 3H), 7,44-7,38 (m, 3H), 7,35-7,29 (m, 1H), 7,08 (dd, *J* = 8,4, 12,1 Hz, 1H), 5,30 (s, 1H), 4,75-4,42 (m, 1H), 2,89 (d, *J* = 10,2 Hz, 6H), 1,81-1,66 (m, 6H), 2,04-1,18 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 161,7, 159,3, 140,7, 137,3, 137,3, 131,7, 131,7, 131,0, 129,0, 127,5, 127,3, 126,7, 117,1, 116,9, 71,4, 55,8, 54,3, 47,6, 46,7, 28,6, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 92,0% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,95 min; (M+1) 382,9. Anal. Calculado. for C₂₃H₂₇FN₂O₂·0,4(CHCl₃): C, 65,39; H, 6,43; N, 6,52. Encontrado: C, 65,39; H, 6,51; N, 6,42.

Ejemplo 34

[2-[2-fluoro-5-(2-metilpropil)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 20 Usando el procedimiento general E, [2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (120 mg, 0,312 mmoles), ácido 2-metilpropilborónico (79,4 mg, 0,779 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el título como un compuesto sólido blanco (37 mg, 33 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,08 (dd, *J* = 2,0, 8,2 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 6,93-6,85 (m, 1H), 5,23 (s, 1H), 4,72-4,52 (m, 1H), 3,20-2,47 (m, 6H), 2,41 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,89-1,76 (m, 1H), 2,02-1,26 (m, 5H), 1,70 (d, *J* = 7,6 Hz, 6H), 0,88 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 160,4, 158,0, 137,1, 137,1, 129,2, 129,1, 128,1, 116,2, 116,0, 71,2, 55,8, 54,2, 47,6, 46,7, 45,1, 30,5, 29,9, 28,6, 27,0, 25,6, 24,8, 22,5, 19,8, 19,5 ppm. Pureza: 95,0% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,02 min; (M+1) 363.

Ejemplo 35

[2-(5-ciclopropil-2-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 30 Usando el procedimiento general E, [2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (750 mg, 0,649 mmoles), ácido ciclopropilborónico (139 mg, 1,62 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (727 mg, 86 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,08 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 6,97-6,78 (m, 2H), 5,19 (s, 1H), 4,65-4,57 (m, 1H), 2,66 (s, 6H), 1,85 (tt, *J* = 5,1, 8,4 Hz, 1H), 2,00-1,17 (m, 5H), 1,71 (d, *J* = 8,7 Hz, 6H), 0,92 (ddd, *J* = 4,6, 6,3, 8,4 Hz, 2H), 0,62 (dt, *J* = 4,7, 6,4 Hz, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 160,2, 157,8, 139,2, 139,2, 125,6, 125,5, 125,4, 116,5, 116,3, 71,3, 55,8, 54,2, 47,6, 46,7, 29,9, 29,6, 28,6, 25,6, 24,8, 19,6, 15,2, 9,1 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,87 min; (M+1) 347,2. Anal. Calculado. for C₂₀H₂₇FN₂O₂·0,07(CHCl₃): C, 68,00; H, 7,70; N, 7,90. Encontrado: C, 67,99; H, 7,86; N, 7,81.

Ejemplo 36

[2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 40 Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-amina (1,00 g, 3,72 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un sólido blanco (434 mg, 30 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,57 (s, 1H), 7,38-7,25 (m, 1H), 7,06 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 5,62 (s, 1H), 4,86-4,32 (m, 1H), 3,33-2,12 (m, 6H), 1,73 (t, *J* = 7,2 Hz, 5H), 1,61 (d, *J* = 9,6 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 159,1, 156,7, 154,6, 130,4, 125,8, 125,7, 116,4, 116,2, 109,1, 108,9, 71,3, 55,7, 54,7, 47,4, 46,5, 29,9, 29,6, 25,5, 24,6, 22,9, 19,6 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,79 min; (M+1) 387,8. Anal. Calculado. for C₁₇H₂₂BrFN₂O₂·0,27(CHCl₃): C, 49,68; H, 5,38; N, 6,71. Encontrado: C, 49,67; H, 5,39; N, 6,74.

Ejemplo 37

[2-(6-fluorobifenil-3-il)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

- 50 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (750 mg, 1,95 mmoles), ácido fenilborónico (418 mg, 4,87 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (195 mg, 29 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,49 (s, 2H), 7,46-7,38 (m, 3H), 7,35 (dd, *J* = 4,3, 11,7 Hz, 2H), 7,08 (dd, *J* = 8,6, 10,1 Hz, 1H), 5,10 (s, 1H), 4,60 (s, 1H), 3,33-2,10 (m, 6H), 1,67 (d, *J* = 7,9 Hz, 6H), 1,67 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 159,9, 157,4, 136,2, 129,3, 129,0, 128,7, 127,9, 127,6, 125,7, 125,6, 71,0, 66,1, 55,7, 55,1, 47,5, 46,6, 29,9, 29,6, 25,5, 24,5, 19,5, 15,5 ppm. Pureza: 98% UPLCMS (210 nm);

tiempo de retención 0,95 min; (M+1) 382,9. Anal. Calculado. for $C_{23}H_{27}FN_2O_2 \cdot 0,29(CHCl_3)$: C, 67,08; H, 6,60; N, 6,72. Encontrado: C, 67,09; H, 6,95; N, 6,37.

Ejemplo 38

[2-[4-fluoro-3-(2-metilpropil)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

5 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (125 mg, 0,324 mmoles), ácido 2-metilpropilborónico (66 mg, 0,65 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (27 mg, 23 %). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,23-7,11 (m, 2H), 7,04-6,82 (m, 1H), 5,11 (s, 1H), 4,59 (s, 1H), 3,32-2,12 (m, 6H), 2,48 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,86 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 2,05-0,96 (m, 5H), 1,62 (d, $J = 5,8$ Hz, 6H), 0,90 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 161,4, 159,0, 154,7, 142,5, 128,3, 124,0, 115,1, 114,9, 71,2, 66,1, 55,8, 55,0, 47,6, 46,7, 38,7, 29,9, 29,6, 25,6, 24,8, 22,6, 19,7, ppm. Pureza: 85% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,0 min; (M+1) 362,9.

Ejemplo 39

[2-(4',6-difluorobifenil-3-il)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

15 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (125 mg, 0,324 mmoles), ácido 4-fluoroborónico (64 mg, 0,46 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (76 mg, 56 %). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,48 (t, 2H), 7,44-7,29 (m, 2H), 7,21-7,00 (m, 3H), 5,27 (s, 1H), 4,68-4,55 (m, 1H), 3,29-2,10 (m, 6H), 1,67 (d, $J = 9,4$ Hz, 6H), 2,01-0,69 (m, 5H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 163,9, 161,4, 159,8, 157,3, 154,8, 143,5, 132,2, 130,9, 127,9, 127,8, 127,4, 125,9, 125,8, 116,2, 116,0, 115,7, 115,5, 71,4, 66,1, 55,9, 47,6, 46,7, 30,0, 39,7, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 98% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,96 min; (M+1) 400,9.

Ejemplo 40

[2-[4-fluoro-3-(pirimidin-5-il)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

25 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (150 mg, 0,389 mmoles), ácido pirimidin-5-borónico (75,9 mg, 0,613 mmoles) y tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (49 mg, 31 %). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,22 (s, 1H), 8,92 (s, 2H), 7,55-7,41 (m, 2H), 7,19 (dd, $J = 8,7, 9,9$ Hz, 1H), 5,37 (s, 1H), 4,72-4,49 (m, 1H), 3,34-2,04 (m, 6H), 2,04-0,98 (m, 5H), 1,66 (t, $J = 10,9$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 159,9, 157,9, 157,4, 156,6, 154,7, 130,2, 127,85, 127,77, 126,9, 122,0, 121,8, 116,7, 116,5, 116,2, 71,6, 55,9, 54,9, 47,6, 46,7, 30,3, 29,6, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 93% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,63 min; (M+1) 384,9

Ejemplo 41

[2-[4-fluoro-3-(piridin-3-il)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

35 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (110 mg, 0,286 mmoles), ácido piridin-3-borónico (53 mg, 0,43 mmoles) y tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (42 mg, 39 %). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,78 (s, 1H), 8,62 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,46 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,38 (dd, $J = 4,9, 7,9$ Hz, 1H), 7,15 (dd, $J = 8,7, 9,9$ Hz, 1H), 5,32 (s, 1H), 4,69-4,57 (m, 1H), 2,68 (s, 6H), 1,70 (d, $J = 11,3$ Hz, 6H), 2,08-0,94 (m, 5H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 160,0, 157,5, 149,9, 149,0, 136,6, 132,1, 127,3, 126,8, 126,7, 125,5, 125,3, 123,5, 116,4, 116,2, 71,5, 55,9, 55,0, 47,6, 46,7, 30,1, 29,66, 25,6, 24,8, 19,7 ppm. Pureza: 100% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,54 min; (M+1) 367,8.

Ejemplo 42

[2-[4-fluoro-3-(furano-3-il)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

45 Usando el procedimiento general E, [2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo (110 mg, 0,296 mmoles), ácido furano-3-borónico (47,9 mg, 0,428 mmoles) y tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (47 mg, 44 %). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,88 (ddd, $J = 0,9, 1,5, 2,5$ Hz, 1H), 7,53 (dd, $J = 2,5, 7,1$ Hz, 1H), 7,50 (t, $J = 1,7$ Hz, 1H), 7,31-7,23 (m, 1H), 7,08 (dd, $J = 8,6, 10,6$ Hz, 1H), 6,76 (dt, $J = 0,8, 1,7$ Hz, 1H), 5,22 (s, 1H), 4,62 (s, 1H), 3,40-2,11 (m, 6H), 2,02-0,87 (m, 5H), 1,59 (dd, $J = 11,6, 70,3$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 160,0, 157,5, 150,2, 143,9, 127,44, 127,36, 127,0, 126,1, 123,8, 116,6, 116,4, 71,5, 55,9, 55,0, 47,6, 46,7, 30,1, 29,9, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 96% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,85 min; (M+1) 372,9.

Ejemplo 43

[2-[4-fluoro-3-(piridin-4-il)fenil]propan-2-il]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo [2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]carbamato (130 mg, 0,291 mmoles), ácido piridin-4-borónico (54 mg, 0,43 mmoles) y tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (46 mg, 41 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,68 (dd, *J* = 1,6,4,5 Hz, 2H), 7,61-7,39 (m, 4H), 7,15 (dd, *J* = 8,6, 10,2 Hz, 1H), 5,31 (s, 1H), 4,69-4,57 (m, 1H), 3,40-2,07 (m, 6H), 1,69 (d, *J* = 10,8 Hz, 6H), 2,06-0,74 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 160,0, 157,6, 143,3, 141,6, 141,5, 126,7, 126,6, 124,9, 124,8, 120,1, 119,9, 116,1, 115,9, 115,4, 115,1, 109,2,71,4, 55,9, 55,0, 47,6, 46,7, 29,9, 25,6, 24,8, 19,8 ppm. Pureza: 97% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,82 min; (M+1) 384,6.

Ejemplo 44

1-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3-(2-fenilpropan-2-il)urea

Usando el procedimiento general C, quinuclidin-3-amina (102 mg, 0,6 mmoles), CDI (131 mg, 0,789 mmoles) y cumilamina (95 mg, 0,70 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (21 mg, 10 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,61-7,47 (m, 2H), 7,44-7,37 (m, 2H), 7,34-7,28 (m, 1H), 4,86 (s, 1H), 4,20 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 3,71-3,60 (m, 1H), 3,14 (ddd, *J* = 2,3, 9,4, 14,2 Hz, 1H), 2,79-1,89 (m, 6H), 1,64 (d, *J* = 3,3 Hz, 6H), 1,58-1,10 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 157,4, 146,2, 129,3, 127,8, 125,8, 57,1, 54,9, 47,7, 47,1, 46,7, 30,6, 30,5, 26,0, 20,3 ppm. Pureza: 79% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,61 min; (M+1) 288,2.

Preparación O

Ejemplo 45

{2-[3-(prop-1-en-2-il)fenil]propan-2-il}carbamato de 3-ciano-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

A una disolución de 3-hidroxiquinuclidin-3-carbonitrilo (38 mg, 0,25 mmoles) en acetonitrilo/dioxano (3 mL) a temperatura ambiente se añadió trietilamina (7,0 uL, 0,05 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min y se añadió 1-(2-isocianatopropan-2-il)-3-(prop-1-en-2-il)benceno (49,0 uL, 0,248 mmoles) gota a gota. La reacción se agitó durante un periodo de 18 h a 65 °C y se concentró. Se purificó el material en bruto sobre una CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH) proporcionando el carbamato correspondiente como un aceite transparente (57 mg, 65 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,42-7,20 (s, 5H), 6,61 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 3,29 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 3,09 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 2,93 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 2,79-2,68 (m, 2H), 2,13 (s, 6H), 2,05-2,00 (m, 2H), 1,91 (s, 3H), 1,87 (s, 2H), 1,50-1,37 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 135,4, 128,7, 125,2, 124,5, 124,0, 122,0, 112,9, 61,2, 47,0, 46,2, 32,4, 31,8, 29,9, 29,4, 29,2, 26,6, 25,7, 23,7, 22,8, 22,2, 19,2 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,81 min; (M+1) 354.

Preparación P

Ejemplo 46

N-(2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)propan-2-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida

A una disolución de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano (350 mg, 2,77 mmoles) y 1-(2-isocianatopropan-2-il)-3-(prop-1-en-2-il)benceno (1,09 mL, 5,55 mmoles) en cloroformo (2 mL) se añadieron 3-4 trozos de tamices moleculares. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 h y luego se concentró. Se purificó el material en bruto sobre una CombiFlash (cartucho de SiO₂, CHCl₃ y NH₃ 2 N en MeOH) proporcionando la urea correspondiente como un sólido blanquecino (650 mg, 36 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,48 (s, 1H), 7,31-7,26 (m, 3H), 5,34 (s, 1H), 5,07 (s, 1H), 4,73 (s a, 1H), 4,03 (s a, 1H), 3,64 (m, 2H), 3,14-3,03 (m, 6H), 2,15 (s, 3H), 2,06 (m, 2H), 1,72 (m, 8H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 155,7, 148,3, 143,8, 141,3, 128,5, 124,1, 123,9, 122,0, 112,5, 57,8, 55,8, 48,1, 46,4 (2x), 41,2, 30,2 (2x), 27,3 (2x), 22,1 ppm. Pureza: >98% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,71 min; (M+1) 328

Ejemplo 47

1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxilato de bifenil-2-ilo

Se trató carbonocloridato de bifenil-2-ilo (83,0 mg, 0,358 mmoles) con 1,4-diazabicyclo[3.2.2] nonano (113 mg, 0,896 mmoles) usando el mismo procedimiento informado en el Ejemplo 46 proporcionando el compuesto del título como un sólido blanquecino (17 mg, 15 %). Pureza: >99 % UPLGEM (210 nm); tiempo de retención 0,75 min; (M+1) 323.

Ejemplo 48

N-{2-[3-(propan-2-il)fenil]propan-2-il}-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida

Usando el procedimiento general F, N-(2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)propan-2-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida (100 mg, 0,305 mmoles) y paladio, (20 mg, 20 % en peso sobre carbono) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (60 mg, 57 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28-7,21 (m, 3H), 7,11 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,71 (s, 1H), 4,02 (s, 1H), 3,66 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,15 (m, 7H), 2,06 (s a, 2H), 1,77 (s, 7H), 1,26 (d, *J* = 4,0 Hz, 6H)

ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 155,8, 148,9, 148,5, 128,5, 124,7, 123,1, 122,4, 57,8, 56,0, 48,1, 46,4, 41,2, 34,5, 32,2, 30,4, 30,0, 29,9, 27,3, 24,3, 22,9 ppm. Pureza: >91% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,74 min; (M+1) 330.

Preparación Q

5 Ejemplo 49

(+/-)-(3S,4S)-1-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-il-2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)propan-2-ilcarbamato

A una disolución de (+/-)-(3S,4S)-1-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ol (294 mg, 2,6 mmoles) en THF (5 mL) a temperatura ambiente se añadió NaH [60 %, aceite] (107 mg, 2,67 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min y se añadió 1-(2-isocianatopropan-2-il)-3-(prop-1-en-2-il)benceno (344 μL , 1,73 mmoles) gota a gota. La reacción se agitó durante un periodo de 30 min y se extinguió con salmuera. Se extrajo la disolución con EtOAc y se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 y se concentró. Se purificó el material en bruto sobre una CombiFlash (cartucho de SiO_2 , CHCl_3 y NH_3 2 N en MeOH) proporcionando el carbamato correspondiente como un aceite transparente (140 mg, 26 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,26-7,20 (m, 3H), 7,11 (m, 1H), 5,18 (s, 1H), 5,19 (s a, 1H), 5,01 (s, 1H), 4,81 (s a, 1H), 2,99 (s a, 1H), 2,82 (s a, 1H), 2,70 (s a, 1H), 2,53 (s a, 2H), 2,33 (s a, 1H), 2,02 (s, 3H), 1,76 (s a, 1H), 1,61 (s a, 6H), 1,52 (s a, 1H), 1,37 (s a, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 147,1, 143,7, 141,5, 128,5, 124,1, 122,1, 112,7, 75,6, 60,6, 59,4, 55,4, 54,3, 53,9, 41,5, 29,9, 29,8, 29,4, 22,2, 21,6 ppm. Pureza: >98% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,83 min; (M+1) 315

Ejemplo 50

[2-[3-(propan-2-il)fenil]propan-2-il]carbamato de (+/-)-(3S,4S)-1-azabicyclo[2.2.1]hept-3-ilo

Usando el procedimiento general F, 2-(3-(prop-1-en-2-il)fenil)propan-2-ilcarbamato de (+/-)-(3S,4S)-1-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ilo (110 mg, 0,350 mmoles) y paladio (20 mg, 20 % en peso sobre carbono) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (36 mg, 46 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,25-7,19 (m, 3H), 7,11 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 5,19 (s, 1H), 4,91 (s, 1H), 3,44 (t, $J = 4,0$ Hz, 2H), 3,19 (s a, 1H), 3,02 (s a, 1H), 2,89 (m, 2H), 2,69 (s a, 1H), 2,39 (s a, 1H), 1,91 (s a, 1H), 1,66 (s a, 7H), 1,26 (d, $J = 4,0$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 128,5 (2x), 124,8, 123,1 (2x), 122,4(2x), 77,4, 60,6, 59,4, 55,5, 41,5, 34,5, 29,9, 29,9, 29,5, 24,3 (2x), 21,6 ppm. Pureza: >95% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,88 min; (M+1) 317.

Ejemplo 51

N-[2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida

Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-amina (1,00 g, 3,72 mmoles) y 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano dieron el compuesto del título como un sólido blanco (265 mg, 18 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,54-7,52 (m, 1H), 7,31-7,25 (m, 1H), 7,04 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 4,71 (s, 1H), 3,99 (s a, 1H), 3,59 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,13-2,95 (m, 6H), 2,04-1,97 (m, 2H), 1,77-1,67 (m, 2H), 1,65 (s, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 158,9, 156,4, 155,4, 145,9, 130,2, 125,6, 116,2, 57,8, 54,9, 48,3, 46,6, 46,6, 41,6, 30,5, 30,5, 27,6, 27,6 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,73 min; (M+1) 384.

35 Ejemplo 52

N-[2-(6-fluorobifenil-3-il)propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida

Usando el procedimiento general E, N-[2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida (100 mg, 0,261 mmoles), ácido fenilborónico (79 mg, 0,65 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (66 mg, 66 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,54 (m, 2H), 7,44-7,40 (m, 5H), 7,08 (m, 1H), 4,78 (s a, 1H), 4,00 (s a, 1H), 3,60 (m, 2H), 3,11-2,92 (m, 6H), 2,00 (m, 2H), 1,67 (m, 7H), 1,26 (s, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 159,6, 155,6, 144,6, 136,5, 129,3, 128,6, 128,5, 127,8, 127,5, 125,7, 125,6, 116,1, 115,9, 57,9, 55,3, 48,2, 46,4, 46,4, 41,6, 30,6, 30,5, 29,9, 27,6 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,88 min; (M+1) 382.

Ejemplo 53

45 N-[2-(4',6-difluorobifenil-3-il)propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida

Usando el procedimiento general E, N-[2-(3-bromo-4-fluorofenil)propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida (100 mg, 0,261 mmoles), ácido 4-fluorofenilborónico (91 mg, 0,65 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (64 mg, 62 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,48 (m, 2H), 7,37-7,30 (m, 2H), 7,10-7,03 (m, 3H), 4,77 (s, 1H), 3,99 (s a, 1H), 3,58 (m, 2H), 3,10-2,90 (m, 6H), 1,98 (m, 2H), 1,71 (m, 8H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 163,7, 161,3, 159,5, 157,1, 155,6, 144,6, 131,0, 130,9, 127,4, 127,2, 125,7, 116,1, 115,6, 57,9, 55,2, 48,2, 46,4, 46,4, 41,5, 30,6, 30,6, 27,6, 27,6 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,90 min; (M+1) 400.

Ejemplo 54**N-[2-(naftalen-1-il)propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida**

Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(naftalen-1-il)propan-2-amina (227 mg, 1,23 mmoles) y 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano dieron el compuesto del título como un sólido blanco (206 mg, 50 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,63-8,60 (m, 1H), 7,90-7,87 (m, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,47-7,42 (m, 3H), 4,86 (s, 1H), 3,94 (s a, 1H), 3,61 (m, 2H), 3,11-2,88 (m, 7H), 2,01-1,91 (m, 7H), 1,68-1,62 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 176,2, 155,5, 142,6, 135,3, 130,6, 129,9, 128,8, 126,3, 125,4, 125,2, 123,9, 57,3, 57,1, 47,7, 45,8, 45,8, 40,7, 29,4, 29,4, 26,9, 26,9 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,72 min; (M+1) 338.

Ejemplo 55**N-(2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida**

Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-amina (100 mg, 0,372 mmoles) y 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano dieron el compuesto del título como un sólido blanco (70 mg, 49 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,48 (m, 1H), 7,28 (m, 1H), 6,86 (m, 1H), 4,85 (s, 1H), 3,98 (s a, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,14-2,91 (m, 7H), 1,99 (m, 2H), 1,71 (m, 7H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 161,1, 158,6, 155,7, 131,3, 113,1, 118,3, 118,0, 57,8, 54,0, 48,1, 46,4, 46,4, 41,5, 29,1, 29,1, 27,5, 27,5 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,73 min; (M+1) 384.

Ejemplo 56**N-[2-(4-fluorobifenil-3-il)propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida**

Usando el procedimiento general E, N-(2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida (100 mg, 0,261 mmoles), ácido fenilborónico (30 mg, 0,25 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (27 mg, 39 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,56-7,51 (m, 3H), 7,41-7,37 (m, 3H), 7,32-7,30 (m, 1H), 7,03 (m, 1H), 4,90 (s, 1H), 4,00 (s a, 1H), 3,59 (m, 2H), 3,11-2,92 (m, 6H), 2,04-1,98 (m, 2H), 1,78 (s, 6H), 1,73-1,67 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 161,8, 159,4, 155,9, 140,9, 137,2, 134,6, 128,9, 127,4, 127,3, 127,2, 127,1, 127,0, 116,9, 57,9, 54,4, 48,1, 46,5, 46,5, 41,4, 29,9, 29,3, 27,5, 27,5 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,90 min; (M+1) 400.

Ejemplo 57**N-(2-(3-isopropoxifenil)propan-2-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida**

Usando el procedimiento general A, clorhidrato de 2-(3-isopropoxifenil)propan-2-amina (60 mg, 0,31 mmoles) y 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano dieron el compuesto del título como un sólido blanco (70 mg, 57 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,17 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,92-6,87 (m, 2H), 6,69 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,66 (s a, 1H), 4,48 (m, 1H), 3,94 (s a, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,08-2,90 (m, 5H), 1,96 (m, 2H), 1,69-1,60 (m, 7H), 1,27 (d, *J* = 8,0 Hz, 6H), 1,17 (s a, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 158,0, 155,7, 150,3, 129,4, 117,1, 113,4, 113,1, 77,5, 69,8, 55,7, 48,2, 46,4, 46,4, 46,3, 41,5, 30,3, 30,0, 29,9, 27,6, 22,3 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,75 min; (M+1) 346.

Ejemplo 58**N-(bifenil-3-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida**

Usando el procedimiento general A, bifenil-3-amina (100 mg, 0,592 mmoles) y 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (93 mg, 49 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,60 (m, 1H), 7,56-53 (m, 2H), 7,39-7,21 (m, 6H), 6,67 (s a, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,16 (s a, 1H), 3,66-3,61 (m, 2H), 3,07-2,86 (m, 6H), 1,97 (m, 2H), 1,68 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 154,7, 142,0, 141,1, 139,9, 129,3, 128,8, 128,8, 127,5, 127,3, 127,3, 122,0, 119,4, 119,2, 57,5, 48,4, 46,3, 46,3, 42,1, 27,5, 27,5 ppm. Pureza: >96% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,75 min; (M+1) 333.

Ejemplo 59**N-[2-[2-fluoro-5-(2-metilpropil)fenil]propan-2-il]-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida**

Usando el procedimiento general E, N-(2-(5-bromo-2-fluorofenil)propan-2-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida (100 mg, 0,261 mmoles), con ácido isopropilborónico (66 mg, 0,65 mmoles) y acetato de paladio (II) dieron el compuesto del título como un sólido blanquecino (27 mg, 39 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,08 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,93-6,81 (m, 2H), 4,85 (s, 1H), 3,96 (s a, 1H), 3,65 (c, *J* = 8,0 Hz, 1H), 3,55 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,09-2,90 (m, 5H), 2,40 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 2,01-1,92 (m, 2H), 1,81-1,61 (m, 8H), 1,22-1,17 (m, 2H), 0,87 (d, *J* = 8,0 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 160,5, 158,0, 155,9, 137,0, 133,6, 128,8, 116,0, 57,9, 54,3, 48,1, 46,4 (2x),

45,2, 41,4, 30,5, 29,9, 29,2, 29,2, 27,5, 22,6, 22,6 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,94 min; (M+1) 362.

Ejemplo 60

N-(bifenil-2-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida

- 5 Usando el procedimiento general A, 1-isocianatobifenilo (50 mg, 0,26 mmoles) y 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano dieron el compuesto del título como un sólido blanco (55 mg, 65 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,15 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,45-7,31 (m, 6H), 7,16 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,04 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 6,47 (s a, 1H), 3,63 (s a, 1H), 3,57 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,00-2,80 (m, 6H), 1,68 (m, 2H), 1,43 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 154,2, 138,9, 136,6, 131,7, 129,7, 129,5, 129,5, 129,3, 129,3, 128,7, 128,1, 122,6, 120,5, 57,6, 48,5, 46,2, 46,2, 41,6, 29,9, 27,3 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,64 min; (M+1) 322.

Ejemplo 61

N-(naftalen-1-il)-1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano-4-carboxamida

- 15 Usando el procedimiento general A, 1-isocianatonaftaleno (208 mg, 1,23 mmoles) y 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonano dieron el compuesto del título como un sólido blanco (150 mg, 48 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,80-7,72 (m, 2H), 7,64 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,44-7,35 (m, 3H), 6,65 (s a, 1H), 4,18 (s a, 1H), 3,64 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,09-2,91 (m, 6H), 2,08-1,93 (m, 2H), 1,74-1,66 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 155,3, 134,4, 134,3, 128,9, 128,2, 126,2, 126,1, 126,0, 125,1, 121,2, 121,0, 57,6, 48,7, 46,4, 46,4, 42,2, 27,6, 27,6 ppm. Pureza: >99% UPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,53 min; (M+1) 296.

Ejemplo 62

2-(bifenil-4-il)propan-2-ilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general B, se convirtió bromobenzonitrilo (2,00 g, 11,0 mmoles) en la 2-(4-bromofenil)propan-2-amina correspondiente (1,20 g, 51 %) como un aceite marrón.

Usando el procedimiento general A, 2-(4-bromofenil)propan-2-amina (1,0 g, 4,7 mmoles) y (S)-quinuclidin-3-ol dieron 2-(4-bromofenil)propan-2-ilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (1,0 g, 58 %) como un aceite marrón.

- 25 Usando el procedimiento general E, el bromuro anterior (200 mg, 0,540 mmoles), ácido fenilborónico (133 mg, 1,10 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (70 mg, 35 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,60-7,53 (m, 4H), 7,47 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,42 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,33 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 5,26 (s a, 1H), 4,64 (m, 1H), 3,33-3,15 (m, 1H), 3,10-2,45 (m, 5H), 2,40-1,80 (m, 2H), 1,78-1,58 (m, 7H), 1,55-1,33 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 154,5, 146,1, 140,8, 139,5, 128,7, 127,2, 127,1, 127,1, 125,2, 70,9, 55,5, 55,1, 47,4, 46,4, 31,1, 29,5, 25,3, 24,5, 19,5 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,56 min; (M+1) 365.

Ejemplo 63

2-(4-(pirimidin-5-il)fenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

- 35 Usando el procedimiento general E, 2-(4-bromofenil)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (200 mg, 0,540 mmoles), ácido pirimidin-5-ilborónico (136 mg, 1,12 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (80 mg, 40 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 9,17 (s, 1H), 8,92 (s, 2H), 7,58-7,51 (m, 4H), 5,34 (s, 1H), 4,61 (m, 1H), 3,20-3,10 (m, 1H), 2,92-2,41 (m, 5H), 2,00-1,76 (m, 2H), 1,72-1,53 (m, 7H), 1,52-1,32 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 157,4, 154,8, 154,5, 148,2, 134,0, 132,5, 127,0, 126,0, 71,2, 55,6, 55,0, 47,4, 46,3, 29,7, 29,4, 25,4, 24,5, 19,5 ppm. Pureza: > 96 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,34 min; (M+1) 366.

Ejemplo 64

1-(bifenil-4-il)ciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general G, se convirtió bromobenzonitrilo (3,00 g, 16,5 mmoles) en la 1-(4-bromofenil)ciclopropanamina correspondiente (1,80 g, 51 %) como un sólido amarillo.

- 45 Usando el procedimiento general A, 1-(4-bromofenil)ciclopropanamina (1,0 g, 4,7 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron 1-(4-bromofenil)ciclopropil-carbamato de quinuclidin-3-ilo (1,3 g, 75 %) como un semisólido blanco.

- Usando el procedimiento general E, el carbamato anterior (400 mg, 1,12 mmoles), ácido fenilborónico (267 mg, 2,22 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ el compuesto del título como un aceite viscoso (100 mg, 25 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,47 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,43 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,33 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,26-7,15 (m, 3H), 5,93 (s a, 0,6H), 5,89 (s a, 0,4H), 4,67 (m, 1H), 3,20-3,06 (m, 1H), 2,88-2,42 (m, 5H), 1,98-1,08 (m, 9H) ppm. ¹³C RMN (125

MHz, CDCl₃) δ 155,0, 141,0, 139,7, 138,2, 127,7, 126,1, 126,0, 124,8, 124,1, 70,0, 54,5, 46,3, 45,4, 34,1, 24,3, 23,2, 18,3, 17,0 ppm. Pureza: 100 % LCMC (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,52 min; (M+1) 363.

Preparación R

Ejemplo 65

5 1-(4-(piridin-2-il)fenil)ciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

A una disolución de 1-(4-bromofenil)ciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (870 mg, 2,43 mmoles) en 30 mL de 1,4-dioxano, se añadió bis(pinacolato)diboro (1,81 g, 7,22 mmoles), CH₃COOK (2,10 g, 21,4 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ (97 mg, 0,12 mmoles). La mezcla se agitó a 80 °C durante 18 h. Se evaporó el disolvente y el residuo se extrajo con EtOAc. Se concentraron los extractos y se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyendo con EtOAc/metanol de 20/1 a 10/1, que contiene 1 % de TEA) dando 1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)ciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (260 mg, 33 %) como un semi-sólido marrón.

Usando el procedimiento general E, el boronato anterior (260 mg, 0,632 mmoles), 2-bromopiridina (149 mg, 0,941 mmoles) y Pd₂(dba)₃ (32,0 mg, 0,036 mmoles) dieron el título como un compuesto semi-sólido blanco (70 mg, 31 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,58 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,82 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 7,66-7,57 (m, 2H), 7,23-7,15 (m, 2H), 7,11 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 6,16 (s a, 0,6H), 5,97 (s a, 0,4H), 4,63 (m, 1H), 3,17-3,02 (m, 1H), 2,90-2,38 (m, 5H), 1,90-1,10 (m, 9H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 156,1, 155,2, 148,6, 143,0, 136,3, 135,7, 125,9, 124,5, 120,9, 119,4, 70,3, 54,6, 46,3, 45,4, 34,1, 24,4, 23,5, 18,5, 17,3 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,18 (M+H) 364.

Ejemplo 66

20 1-(4-(pirimidin-5-il)fenil)ciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, el 1-(4-bromofenil)ciclopropil-carbamato de quinuclidin-3-ilo anterior (400 mg, 1,10 mmoles), ácido pirimidin-5-ilborónico (204 mg, 1,64 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un aceite viscoso (110 mg, 28 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (s, 1H),



(s, 2H), 7,44 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,33-7,25 (m, 2H), 6,02 (s a, 0,7H), 6,02 (s a, 0,3H), 4,65 (m, 1H), 3,20-3,05 (m, 1H), 2,86-2,40 (m, 5H), 1,98-1,12 (m, 9H) ppm. RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 156,3, 155,1, 153,7, 143,3, 132,9, 131,1, 126,0, 125,3, 70,5, 54,7, 46,4, 45,4, 34,1, 24,4, 23,5, 18,5, 17,5 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm y 254 nm); tiempo de retención 1,29 min; (M+1) 365.

Ejemplo 67

30 1-(4'-fluorobifenil-4-il)ciclopropilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 1-(4-bromofenil)ciclopropilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, ácido 4-F-fenilborónico y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (45 %). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,06-7,83 (d, 1H), 7,69-7,66 (m, 2H), 7,59-7,55 (m, 2H), 7,29-7,22 (m, 4H), 4,56-4,54 (m, 1H), 3,13-2,32 (m, 6H), 1,91-1,19 (m, 9H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ 163,2, 161,2, 156,4, 143,7, 136,9, 128,9, 128,8, 126,8, 125,6, 116,2, 116,0, 70,7, 55,8, 47,4, 46,4, 34,8, 25,7, 24,6, 19,6, 18,7, 18,6 ppm. Pureza: > 97 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,96 min; (M+1) 381,2.

Ejemplo 68

1-(4'-fluorobifenil-4-il) ciclopropilcarbamato de 1-azabicyclo[3.2.2]nonan-4-ilo

Usando el procedimiento general E, 1-(4-bromofenil)-ciclopropilcarbamato de 1-azabicyclo[3.2.2]nonan-4-ilo, ácido 4-F-fenilborónico y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (27 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,52-7,48 (m, 4H), 7,33-7,28 (m, 2H), 7,14-7,11 (t, J = 8,5 Hz, 2H), 5,47-5,33 (d, 1H), 4,93-4,89 (m, 1H), 3,15-2,75 (m, 6H), 2,10-0,88 (m, 11H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 163,4, 161,4, 155,7, 142,1, 138,3, 136,9, 128,5, 128,5, 127,0, 125,9, 125,4, 115,7, 115,5, 78,8, 51,7, 48,3, 44,9, 35,2, 33,7, 30,6, 29,7, 24,8, 22,2, 18,1 ppm. Pureza: > 99 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,56 min; (M+1) 395,2.

45 Ejemplo 69

1-(4-(5-fluoropiridin-2-il)fenil)ciclopropilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, (1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)ciclopropil)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, 2-bromo-5-fluoropiridina y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (34 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,51-8,52 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 7,87-7,85 (d, J = 10,5 Hz, 2H), 7,69-7,67 (m, 1H), 7,47-7,42 (m, 1H), 7,32-7,27 (m, 2H), 5,79- 5,66 (d, 1H), 4,73-4,71 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 3,22-3,19 (m, 1H),

2,87-2,61 (m, 5H), 2,01-1,22 (m, 9H) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 160,8, 157,4, 156,1, 153,5, 144,4, 137,8, 136,3, 126,7, 125,7, 124,9, 123,6, 121,1, 71,6, 55,7, 47,4, 46,5, 35,3, 29,7, 25,4, 24,8, 19,4, 18,2 ppm. Pureza: > 99 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,41 min; (M+1) 382,2.

Preparación S

5 Ejemplo 70

(S)-1-(1-(4'-fluorobifenil-4-il)ciclopropil)-3-(3-metilquinuclidin-3-il)urea

En un matraz redondo de tres bocas equipado con dos embudos de adición ecualizadores de la presión y un tubo de goma conectado con un caudalímetro de gas, se agitó una suspensión de 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)ciclopropanamina (1,50 g, 7,07 mmoles) en una mezcla de 20 mL de agua y 1 mL de HCl conc. durante 10 min. Se añadió tolueno (10 mL) y la disolución se mantuvo con agitación vigorosa y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió una disolución de trifosgeno (3,10 g, 10,6 mmoles) en 20 mL de tolueno y 40 mL de NaHCO_3 acuoso saturado gota a gota dura un periodo de 1 h. Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min adicionales. Se detuvo la agitación y entonces se separó la capa de tolueno superior, se secó (Na_2SO_4) y se concentró proporcionando el isocianato correspondiente que se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

A una disolución del isocianato anterior (134 mg, 0,571 mmoles) en 15 mL de tolueno se añadió (S)-3-metilquinuclidin-3-amina (80 mg, 0,57 mmoles). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante la noche, se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró a vacío dando un residuo, que se purificó por cromatografía de fase inversa sobre una CombiFlash (0-20 % de MeCN en agua) proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (73 mg, 33 %). ^1H RMN (500 MHz CDCl_3) δ 7,52-7,48 (m, 4H), 7,27-7,25 (d, J = 10,0 Hz, 2H), 7,13-7,09 (m, 2H), 5,39 (s, 1H), 4,78 (s, 1H), 2,95-2,71 (m, 5H), 2,65-2,64 (m, 1H), 1,94-1,93 (m, 1H), 1,69-1,68 (m, 1H), 1,46-1,38 (m, 5H), 1,36-1,33 (m, 4H), 1,26-1,23 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz CDCl_3) δ 163,5, 161,5, 157,5, 141,5, 138,5, 136,6, 136,6, 128,5, 128,4, 127,2, 124,7, 115,8, 115,6, 63,8, 52,3, 46,6, 46,3, 34,9, 31,0, 25,0, 23,2, 22,5, 20,2, 20,0 ppm. Pureza: > 99 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,51 min; (M+H⁺) 394,2.

Ejemplo 71

25 [1-(2',4'-difluorobifenil-4-il)ciclopropil]carbamato de (S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 1-(4-bromofenil)ciclopropilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (0,446 g, 1,22 mmoles), ácido 2,4-difluorofenilborónico (0,386 g, 2,44 mmoles) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,015 g, 0,067 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido de color tostado (0,111 g, 23 %). ^1H RMN (CDCl_3) 7,43 (dd, J = 8,4, 1,6 Hz, 2H), 7,40-7,33 (m, 1H), 7,31 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 6,99-6,81 (m, 2H), 5,54 (d, J = 48,0 Hz, 1H), 4,82-4,65 (m, 1H), 3,30-3,07 (m, 1H), 2,98-2,44 (m, 5H), 1,97 (d, J = 32,7 Hz, 1H), 1,83 (d, J = 10,3 Hz, 1H), 1,64 (s, 1H), 1,52 (s, 1H), 1,39 (s, 1H), 1,31 (d, J = 6,8 Hz, 4H) ppm. ^{13}C RMN rotámetro mayoritario (CDCl_3) δ 162,2 (dd, J = 12,8, 249,1 Hz), 159,8 (dd, J = 11,8, 251,0 Hz), 156,9, 156,0, 142,6, 133,1, 131,3 (m), 128,9, 125,6, 124,9, 111,5 (dd, J = 3,9, 21,2 Hz) 104,4 (dd, J = 25,2, 29,4 Hz), 72,1, 71,6, 55,7, 47,4, 46,5, 35,7, 35,3, 25,5, 24,6, 24,4, 19,5, 18,1 ppm. Pureza: LCMS > 99,3 % (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 0,90 min; (M+1) 399,0

35 Ejemplo 72

[1-(4'-metoxibifenil-4-il)ciclopropil]carbamato de 1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 1-(4-bromofenil)ciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (0,485 g, 1,33 mmoles), ácido 4-metoxifenilborónico (0,404 g, 2,66 mmoles) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,016 g, 0,071 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido gris (0,337 mg, 65 %). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,48 (dd, J = 8,6, 5,5 Hz, 4H), 7,29 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 5,58 (d, J = 48,7 Hz, 1H), 4,83-4,63 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,20 (dd, J = 24,0, 15,5 Hz, 1H), 2,97-2,42 (m, 5H), 1,97 (d, J = 30,9 Hz, 1H), 1,81 (s, 1H), 1,75-1,33 (m, 3H), 1,28 (d, J = 6,8 Hz, 4H) ppm. ^{13}C RMN rotámetro mayoritario (CDCl_3) δ 159,1, 156,0, 141,4, 139,0, 133,4, 128,0, 126,7, 125,9, 114,2, 71,5, 55,7, 55,3, 47,4, 46,5, 35,3, 25,5, 24,6, 19,6, 17,8 ppm. Pureza: LCMS >97,1 % (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 0,88 min; (M+1) 393,4.

45 Preparación T

Ejemplo 73

2-(5-(4-fluorofenil)tiopen-3-il)propan-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

A una disolución con agitación y enfriada (0 °C) de 5-bromotiofeno-3-carboxilato de etilo (13,30 g, 56,57 mmoles) en THF (100 mL) se añadió una disolución de bromuro de metilmagnesio en dietil éter [3,0 M] (55,0 mL, 165 mmoles), gota a gota durante 20 minutos. Después de 2 horas, se concentró la disolución de reacción. El residuo se recogió en NH_4Cl acuoso (200 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 mL). Se secaron los extractos combinados (Na_2SO_4) y se concentraron. Se purificó el aceite de color ámbar resultante por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de hexano/acetato de etilo proporcionando 2-(5-bromotiofeno-3-il)propan-2-ol como aceite de color ámbar pálido (8,05 g, 64 %).

A una disolución con agitación de 2-(5-bromotiofen-3-il)propan-2-ol (8,03 g, 36,3 mmoles) en cloruro de metileno (80 mL) se añadió azida de sodio (7,08 g, 109 mmoles) seguido por ácido trifluoroacético (8,0 mL; gota a gota durante 5-6 minutos). Se agitó la suspensión espesante durante 1,5 hora antes de diluir con agua (350 mL) y extraer con acetato de etilo (1 x 200 mL). Se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ acuoso (1 x 250 mL), se secó (Na₂SO₄) y se concentró proporcionando el producto en bruto de azida. A una disolución con agitación de este material en THF (160 mL) se añadió agua (11 mL) seguido por trifenilfosfina (23,8 g, 90,7 mmoles). La reacción se agitó durante 2 días antes de concentrar. El residuo resultante se disolvió en acetato de etilo (250 mL) y se extrajo con HCl 1 N acuoso (4 x 75 mL). Se basificaron los extractos combinados con NH₄OH concentrado y se extrajeron con acetato de etilo (2 x 100 mL). Estos extractos se secaron nuevamente (Na₂SO₄) y se concentraron. Se purificó el aceite de color ámbar resultante por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de cloruro de metileno/metanol/amoniaco proporcionando una mezcla de 2-(5-bromotiofen-3-il)propan-2-amina y óxido de trifenilfosfina (relación ~70/30) como aceite viscoso de color ámbar (1,32 g, 17 %).

A una disolución con agitación de 3-quinuclidinol (3,00 g, 23,6 mmoles) en THF (100 mL) se añadió cloroformiato de 4-nitrofenilo (5,94 g, 29,5). Después de agitar durante 4 horas, se separó por filtración el precipitado, se aclaró con THF y se secó al aire sobre la frita a vacío doméstico. Se disolvió la torta de filtración en acetato de etilo (150 mL) y se lavó con NaHCO₃ acuoso (1 x 150 mL) y agua (2 x 150 mL). Se secó la fase orgánica (Na₂SO₄) y se concentró proporcionando producto en bruto de quinuclidin-3-il carbonato de 4-nitrofenilo, que se usó en la siguiente etapa sin purificación.

A una disolución con agitación de 2-(5-bromotiofen-3-il)propan-2-amina (0,366 g, 1,66 mmoles) en THF (10 mL) se añadió quinuclidin-3-il carbonato de 4-nitrofenilo (0,571 g, 1,95 mmoles) y algunos gránulos de 4-(dimetilamino)piridina. La mezcla se sometió a reflujo durante la noche, se concentró y se repartió entre acetato de etilo (50 mL) y NaHCO₃ acuoso (50 mL). Se lavó nuevamente la fase orgánica con NaHCO₃ acuoso (1 x 50 mL), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Se purificó la goma amarilla oscura resultante por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de cloroformo/metanol/amoniaco proporcionando (1-(5-bromotiofen-3-il)ciclopropil)carbamato de quinuclidin-3-ilo como un sólido blanquecino (0,305 g, 49 %).

Usando el procedimiento general E, (1-(5-bromotiofen-3-il)ciclopropil)carbamato de quinuclidin-3-ilo (0,227 g, 0,742 mmoles), ácido 4-fluorofenilborónico (0,208 g, 1,49 mmoles), triciclohexilfosfina (0,021 g, 0,075 mmoles), fosfato de potasio (0,866, 4,08 mmoles) y acetato de paladio (8,0 mg, 36 μ moles) dieron el compuesto del título como un sólido gris (0,142 g, 49 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,60-7,45 (m, 2H), 7,24-7,19 (m, 1H), 7,10-6,97 (m, 3H), 5,23 (s a, 1H), 4,72-4,61 (m, 1H), 3,30-3,04 (m, 1H), 3,03-2,25 (m, 5H), 2,09-1,02 (m, 11H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 162,3 (d, *J* = 247,1 Hz), 154,5, 149,8, 143,6, 130,7, 127,4 (d, *J* = 8,1 Hz), 121,8, 118,9, 115,8 (d, *J* = 21,6 Hz), 70,8, 55,5, 53,4, 47,3, 46,4, 29,0, 25,4, 24,4, 19,4 ppm. Pureza: 95,8 % UPLCMS (210 nm & 254 nm); tiempo de retención 0,90 min; (M+1) 389.

Preparación U

Ejemplo 74

2-(3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-il)propan-2-ilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

A la disolución con agitación de 2-(3-(4-fluorofenil)isotiazol-5-il)propan-2-amina (1,21 g, 5,12 mmoles) en tolueno se añadió una disolución de fosgeno en tolueno [~1,9 M] (10,8 mL, 20,5 mmoles). La reacción se calentó a reflujo durante dos horas y luego se concentró. El residuo se coevaporó con tolueno (2 x 15 mL) proporcionando el producto intermedio de isocianato en bruto como un aceite dorado. Este material se recogió en tolueno (10 mL) y se trató con (S)-3-quinuclidinol (0,749 g, 5,89 mmoles). La reacción se calentó a reflujo durante la noche y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de cloroformo/metanol/amoniaco proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (0,971 g, 49 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,09-8,00 (m, 2H), 7,87 (s a, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,35-7,25 (m, 2H), 4,54-4,45 (m, 1H), 3,14-2,92 (m, 1H), 2,87-2,17 (m, 5H), 1,98-0,98 (m, 11H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 180,1, 165,6, 162,6 (d, *J* = 246,4 Hz), 154,7, 131,2 (d, *J* = 3,0 Hz), 128,7 (d, *J* = 8,4 Hz), 118,2, 115,7 (d, *J* = 21,8 Hz), 70,6, 55,3, 52,8, 46,9, 45,9, 29,9, 25,2, 24,2, 19,2 ppm. Pureza: 100 % UPLCMS (210 nm & 254 nm); tiempo de retención 0,82 min; (M+1) 390.

Preparación V

Ejemplo 75

2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-ilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

A una disolución con agitación de 4-fluorotiobenzamida (8,94 g, 57,6 mmoles) en etanol (70 mL) se añadió 4-cloroacetoacetato de etilo (7,8 mL, 58 mmoles). La reacción se calentó a reflujo durante 4 horas, se trató con una alícuota de adición de 4-cloroacetoacetato de etilo (1,0 mL, 7,4 mmoles) y se sometió a reflujo durante 3,5 horas adicionales. Entonces se concentró la reacción y el residuo se repartió entre acetato de etilo (200 mL) y NaHCO₃ acuoso (200 mL). Se combinó la fase orgánica con un retroextracto de la fase acuosa (acetato de etilo, 1 x 75 mL), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Se purificó el aceite de color ámbar resultante por cromatografía ultrarrápida

usando un gradiente de hexano/acetato de etilo proporcionando 2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)acetato de etilo como un sólido casi incoloro de baja fusión (13,58 g, 89 %).

A una disolución con agitación de 2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)acetato de etilo (6,28 g, 23,7 mmoles) en DMF (50 mL) se añadió hidruro de sodio [dispersión al 60 % en aceite mineral] (2,84 g, 71,0 mmoles). Se agitó la mezcla espumosa durante 15 minutos antes de enfriar en un baño de hielo y añadir yodometano (4,4 mL, 71 mmoles). Se agitó la reacción durante la noche, dejando que el baño de refrigeración se calentara lentamente hasta temperatura ambiente. Entonces se concentró la mezcla y el residuo se repartió entre acetato de etilo (80 mL) y agua (200 mL). Se lavó la fase orgánica con una segunda porción de agua (1 x 200 mL), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. Se purificó el aceite de ámbar resultante por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de hexano/acetato de etilo proporcionando 2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)-2-metilpropanoato de etilo como un aceite incoloro (4,57 g, 66 %).

A una disolución con agitación de 2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)-2-metilpropanoato de etilo (4,56 g, 15,5 mmoles) en 1:1:1 de THF/etanol/agua (45 mL) se añadió hidróxido de litio monohidratado (2,93 g, 69,8 mmoles). Se agitó la reacción durante la noche, se concentró y se redisolvió en agua (175 mL). La disolución se lavó con éter (1 x 100 mL), se acidificó mediante la adición de HCl 1,0 N (80 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 70 mL). Los extractos combinados se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron proporcionando ácido 2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)-2-metilpropanoico como un sólido blanco (4,04 g, 98 %). Este material se usó en la siguiente etapa sin purificación.

A una disolución con agitación y enfriada (0 °C) de ácido 2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)-2-metilpropanoico (4,02 g, 15,2 mmoles) en THF (100 mL) se añadió trietilamina (4,2 mL, 30 mmoles) seguido por cloroformiato de isobutilo (3,0 mL, 23 mmoles). Se agitó la reacción fría durante 1 hora más antes de añadir una disolución de azida de sodio (1,98 g, 30,5 mmoles) en agua (20 mL). Se agitó la reacción durante la noche, dejando que el baño de refrigeración se calentara lentamente hasta temperatura ambiente. Entonces se diluyó la mezcla con agua (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 60 mL). Se lavaron los extractos combinados con NaHCO_3 acuoso (1 x 150 mL) y salmuera (1 x 100 mL), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. Después de coevaporar con tolueno (2 x 50 mL), se recogió el sólido blanco resultante en tolueno (100 mL) y se sometió a reflujo durante 4 horas. Entonces se añadió (S)-3-quinuclidinol (3,87 g, 30,4 mmoles) y el reflujo continuó durante la noche. Se concentró la reacción y el residuo se repartió entre acetato de etilo (100 mL) y NaHCO_3 acuoso (150 mL). Se lavó la fase orgánica con agua (1 x 150 mL), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El sólido blanquecino resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de cloroformo/metanol/amoniaco proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (4,34 g, 73 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,96-7,88 (m, 2H), 7,16-7,04 (m, 3H), 5,55 (s, 1H), 4,69-4,62 (m, 1H), 3,24-3,11 (m, 1H), 3,00-2,50 (m, 5H), 2,01-1,26 (m, 11H) ppm. ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 166,4, 165,1, 163,8 (d, J = 250,3 Hz), 162,9, 155,0, 130,1 (d, J = 3,3 Hz), 128,4 (d, J = 8,5 Hz), 115,9 (d, J = 22,3 Hz), 112,5, 71,2, 55,7, 54,2, 47,5, 46,5, 28,0, 25,5, 24,7, 19,6 ppm. Pureza: 100 % UPLCMS (210 nm & 254 nm); tiempo de retención 0,83 min; (M+1) 390.

Preparación W

Ejemplo 76

2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)propan-2-ilcarbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

A una disolución con agitación de 3-amino-3-tioxopropanoato de etilo (20,00 g, 135,9 mmoles) en etanol (120 mL) se añadió 2-bromo-4'-fluoroacetofenona (29,49 g, 135,9 mmoles). La mezcla se sometió a reflujo durante 1 hora, se concentró y se repartió entre acetato de etilo (300 mL) y NaHCO_3 acuoso (400 mL). Se combinó la fase orgánica con un retroextracto de la fase acuosa (acetato de etilo, 1 x 100 mL), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. Se purificó el sólido marrón claro resultante por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de hexano/acetato de etilo proporcionando 2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)acetato de etilo como un sólido blanquecino (29,92 g, 83 %).

A una disolución con agitación y enfriada (-78 °C) de 2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)acetato de etilo (10,00 g, 37,69 mmoles) en THF (250 mL) se añadió una disolución de t-butoxido de potasio en THF [1,0 M] (136 mL, 136 mmoles), gota a gota durante 15 minutos, seguido por 18-corona-6 (1,6 mL, 7,5 mmoles). Después de 30 minutos adicionales a -78 °C, se añadió yodometano (8,5 mL), gota a gota, durante 5 minutos. Se agitó la reacción fría durante otras 2 horas antes de verter en agua (450 mL) y extraer con acetato de etilo (2 x 150 mL). Se lavaron los extractos combinados con salmuera (1 x 200 mL), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. Se purificó el aceite marrón resultante por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de hexano/acetato de etilo proporcionando 2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)-2-metilpropanoato de etilo como un aceite de color ámbar pálido (8,64 g, 78 %).

A una disolución con agitación de 2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)-2-metilpropanoato de etilo (0,900 g, 3,07 mmoles) en 1:1:1 de THF/etanol/agua (15 mL) se añadió hidróxido de litio monohidratado (0,451 g, 10,7 mmoles). Después de agitación durante la noche, la reacción se concentró y se redisolvió en agua (80 mL). Se lavó la disolución con éter (1 x 50 mL), se acidificó con la adición de HCl 1 N (15 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 mL). Se secaron los extractos combinados (Na_2SO_4) y se concentraron proporcionando ácido 2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)-2-metilpropanoico como un sólido dorado pálido (0,808 g, 99 %).

A la disolución con agitación y enfriada (0 °C) de ácido 2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)-2-metilpropanoico (0,784 g, 2,96 mmoles) en THF (25 mL) se añadió trietilamina (0,82 mL, 5,9 mmoles) seguido por cloroformiato de isobutilo

(0,58 mL, 4,4 mmoles). Se agitó la reacción fría durante 1 hora más antes de añadir una disolución de azida de sodio (0,385 g, 5,92 mmoles) en agua (7 mL). Se agitó la reacción durante la noche, dejando que el baño de refrigeración se calentara lentamente hasta temperatura ambiente. Entonces se diluyó la mezcla con agua (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 60 mL). Se lavaron los extractos combinados con NaHCO₃ acuoso (1 x 150 mL) y salmuera (1 x 100 mL), se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. Después de coevaporar con tolueno (2 x 30 mL), se recogió el sólido blanquecino resultante en tolueno (25 mL) y se sometió a reflujo durante 4 horas. Entonces se añadió (S)-3-quinuclidinol (0,753 g, 5,92 mmoles) y el reflujo continuó durante 3 horas. Se concentró la reacción y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de cloroformo/metanol/amoniaco proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (0,793 g, 69 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,90-7,81 (m, 2H), 7,32 (s, 1H), 7,14-7,05 (m, 2H), 5,76 (s a, 1H), 4,72-4,65 (m, 1H), 3,26-3,10 (m, 1H), 3,03-2,37 (m, 5H), 2,05-1,23 (m, 11H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 177,6, 162,6 (d, J = 248,4 Hz), 154,8, 153,6, 130,8 (d, J = 3,2 Hz), 128,1 (d, J = 8,1 Hz), 115,9 (d, J = 21,7 Hz), 112,2, 71,6, 55,7, 47,4, 46,5, 29,1, 25,4, 24,7, 19,6 ppm. Pureza: 100 % UPLCMS (210 nm & 254 nm); tiempo de retención 0,82 min; (M+1) 390.

Ejemplo 77

1-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Se agitó una mezcla de 4-cianofenol (5,0 g, 42 mmoles), bromuro de bencilo (8,6 g, 50 mmoles), carbonato de potasio (11,6 g, 84,0 mmoles) en DMF (40 mL) a 100 °C durante 3 h. Se separó por filtración el precipitado y el filtrado se diluyó con EtOAc y se lavó con agua. Se secó la fase orgánica (Na₂SO₄) y se concentró. Se purificó el producto en bruto resultante por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyendo con éter de petróleo/EtOAc de 20/1 a 5/1) dando 4-(benciloxi)benzonitrilo como un sólido blanco (8,1 g, 92 %).

Usando el procedimiento general G, se convirtió 4-(benciloxi)benzonitrilo (6,00 g, 28,7 mmoles) en la 1-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropanamina correspondiente como un sólido amarillo (1,8 g, 26 %).

Usando el procedimiento general A, 1-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropanamina (600 mg, 2,51 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un aceite viscoso (170 mg, 17 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,34 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 7,30 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 7,25 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,07 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,50 (s a, 0,6H), 5,40 (s a, 0,4H), 4,96 (s, 2H), 4,64 (m, 1H), 3,20-3,15 (m, 1H), 2,88-2,50 (m, 5H), 1,95-1,05 (m, 9H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 156,6, 154,8, 136,0, 134,2, 127,6, 126,9, 126,4, 125,4, 113,7, 70,0, 69,0, 54,5, 46,3, 45,4, 34,2, 24,3, 23,3, 18,3, 15,8 ppm. Pureza: > 90 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,57 min; (M+1) 393.

Ejemplo 78

bifenil-3-ilmetilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

A una disolución con agitación y enfriada (0 °C) de trifosgeno (0,80 g, 2,7 mmoles) en THF (20 mL) se añadió, gota a gota, una mezcla de (3-bromofenil)metanamina (1,0 g, 5,4 mmoles) y trietilamina (1,08 g, 10,7 mmoles) en THF (30 mL) durante 2 h. Después de completarse la adición, la mezcla se sometió a reflujo durante 1 h y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió quinuclidin-3-ol (1,40 g, 10,7 mmoles), y la mezcla se sometió a reflujo durante 18 h. Se retiró el disolvente a vacío, y el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se purificó el residuo en bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyendo con EtOAc/metanol = 10/1) dando 3-bromobencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo como líquido incoloro (0,68 g, 37 %).

Usando el procedimiento general E, 3-bromobencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (237 mg, 0,700 mmoles), ácido fenilborónico (171 mg, 1,4 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un semi-sólido viscoso (110 mg, 47 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,57 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,50 (m, 2H), 7,62-7,38 (m, 3H), 7,35 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,28 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,32-5,17 (m, 1H), 7,78 (m, 1H), 4,42 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 3,26 (m, 1H), 2,95-2,65 (m, 5H), 2,05 (m, 1H), 1,84 (m, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,42 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 155,2, 140,7, 139,8, 138,0, 128,1, 127,8, 126,4, 126,1, 125,5, 125,4, 125,3, 70,1, 54,4, 46,2, 45,3, 44,1, 24,3, 23,1, 18,2 ppm. Pureza: > 98 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,44 min; (M+1) 337.

Ejemplo 79

3-(pirimidin-5-il)bencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 3-bromobencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (203 mg, 0,600 mmoles), ácido pirimidin-5-ilborónico (149 mg, 1,2 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un semi-sólido viscoso (110 mg, 54 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 9,20 (s, 1H), 8,94 (s, 2H), 7,51 (m, 3H), 7,40 (m, 1H), 5,62 (m, 1H), 4,81 (m, 1H), 4,50-4,40 (m, 2H), 3,30 (m, 1H), 2,97-2,65 (m, 5H), 2,12 (m, 1H), 1,92-1,82 (m, 1H), 1,79-1,69 (m, 1H), 1,65-1,56 (m, 1H), 1,50-1,42 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 157,6, 156,2, 154,9, 140,1, 134,7, 134,1, 129,8, 128,2, 126,2, 70,9, 55,2, 47,2, 46,2, 44,8, 25,2, 23,8, 19,0 ppm. Pureza: > 95 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,22 min; (M+1) 339.

Ejemplo 80

3-(benciloxi)bencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Se sometió a reflujo una mezcla de ácido 2-(3-hidroxifenil)acético (0,6 g, 3,95 mmoles), bromuro de bencilo (0,710 g, 4,14 mmoles), hidróxido potásico (0,550 g, 9,87 mmoles), KI (13 mg, 0,079 mmoles) en THF (20 mL) durante 18 h. Se retiró el disolvente y el residuo se disolvió en 50 mL de agua y se extrajo con éter. Se acidificó la fase acuosa con acuosa HCl 1 N y el precipitado blanco que se formó se separó por filtración proporcionando ácido 2-(3-(benciloxi)fenil)acético como un sólido gris (0,87 g, 91 %).

Usando el procedimiento general H, ácido 2-(3-(benciloxi)fenil)acético (242 mg, 1,00 mmol) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un semi-sólido viscoso (200 mg, 55 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,42 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,38 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,32 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,88 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H), 5,30 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,32 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,23 (m, 1H), 2,93-2,60 (m, 5H), 2,08-1,96 (m, 1H), 1,88-1,75 (m, 1H), 1,72-1,62 (m, 1H), 1,60-1,50 (m, 1H), 1,42-1,34 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 159,1, 156,3, 140,2, 136,8, 129,7, 128,6, 128,0, 127,5, 120,0, 114,1, 113,6, 71,3, 70,0, 55,5, 47,3, 46,4, 45,0, 25,4, 24,3, 19,3 ppm. Pureza: > 95 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,51 min; (M+1) 367

Ejemplo 81**4-fenoxibencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Usando el procedimiento general H, ácido 2-(3-fenoxifenil)acético (228 mg, 1,00 mmol), y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un semi-sólido viscoso (70 mg, 20 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,29-7,18 (m, 3H), 7,03 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,96-6,90 (m, 3H), 6,86 (s, 1H), 6,82 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 5,40-5,15 (m, 1H), 4,70 (m, 1H), 4,25 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,18 (m, 1H), 2,90-2,60 (m, 5H), 2,03-1,92 (m, 1H), 1,82-1,74 (m, 1H), 1,68-1,60 (m, 1H), 1,57-1,45 (m, 1H), 1,40-1,32 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 156,6, 155,9, 155,1, 139,6, 129,0, 128,8, 122,4, 121,1, 118,0, 116,7, 69,7, 54,1, 46,1, 45,2, 43,7, 24,2, 22,7, 18,0 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,50 min; (M+1) 353.

Ejemplo 82**3-isopropoxibencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Se sometió a reflujo durante 18 h una mezcla que contenía ácido 2-(3-hidroxifenil)acético (0,800 g, 5,26 mmoles), 2-bromopropano (0,971 g, 7,89 mmoles), hidróxido potásico (0,740 g, 13,2 mmoles), KI (18 mg, 0,11 mmoles) en 20 mL de EtOH. Se retiró el disolvente y el residuo se disolvió en 50 mL de agua y se extrajo con éter. Se acidificó la fase acuosa con HCl 1 N acuoso y se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron proporcionando un residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc 4:1) obteniéndose ácido 2-(3-(benciloxi)fenil)acético como un sólido blanco (0,45 g, 44 %).

Usando el procedimiento general H, ácido 2-(3-isopropoxifenil)acético (291 mg, 1,50 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un semi-sólido viscoso (120 mg, 25 %). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,23 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,86-6,77 (m, 3H), 5,16-5,00 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 4,55 (m, 1H), 4,32 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,26 (m, 1H), 2,95-2,70 (m, 5H), 2,10-2,05 (m, 1H), 1,90-1,80 (m, 1H), 1,75-1,65 (m, 1H), 1,63-1,53 (m, 1H), 1,47-1,37 (m, 1H), 1,33 (d, *J* = 5,5 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 158,1, 156,2, 140,1, 129,7, 119,6, 115,2, 114,6, 71,0, 69,8, 55,3, 47,2, 46,3, 45,0, 25,3,

24,1, 22,0, 19,2 ppm. Pureza: > 90 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,42 min; (M+1) 319.

Ejemplo 83**3-isobutoxibencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Se sometió a reflujo durante 18 h una mezcla que contenía ácido 2-(3-hidroxifenil)acético (1,0 g, 6,6 mmoles), 1-bromo-2-metilpropano (1,08 g, 7,91 mmoles), hidróxido potásico (0,920 g, 16,4 mmoles), KI (22 mg, 0,13 mmoles) en EtOH (20 mL). Se retiró el disolvente y el residuo se disolvió en 50 mL de agua y se extrajo con éter. Se acidificó la fase acuosa con HCl 1 N acuoso y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas (Na₂SO₄) y se concentraron proporcionando un residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc 4:1) obteniéndose ácido 2-(3-(benciloxi)fenil)acético como un sólido blanco (0,42 g, 31 %).

Usando el procedimiento general H, ácido 2-(3-isobutoxifenil)acético (208 mg, 1,00 mmol) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un semi-sólido viscoso (130 mg, 39 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,23 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,86-6,76 (m, 3H), 5,35-5,10 (m, 1H), 4,77 (m, 1H), 4,31 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,69 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,26 (m, 1H), 2,95-2,70 (m, 5H), 2,10-2,00 (m, 2H), 1,88-1,80 (m, 1H), 1,75-1,63 (m, 1H), 1,62-1,52 (m, 1H), 1,45-1,36 (m, 1H), 1,01 (d, *J* = 6,5 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 159,6, 156,1, 139,9, 129,7, 119,6, 113,9, 113,4, 74,4, 70,9, 55,3, 47,2, 46,3, 45,1, 28,3, 25,3, 23,9, 19,3, 19,1 ppm. Pureza: > 95 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,50 min; (M+1) 333.

Ejemplo 84

3-(ciclopropilmetoxi)bencilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Se sometió a reflujo durante 18 h una mezcla que contenía ácido 2-(3-hidroxifenil)acético (1,0 g, 6,6 mmoles), (bromometil)ciclopropano (0,97 g, 7,2 mmoles), hidróxido potásico (0,920 g, 16,4 mmoles), KI (22 mg, 0,13 mmoles) en EtOH (20 mL). Se retiró el disolvente a vacío, y el residuo se disolvió en 50 mL de agua y se extrajo con éter. Se acidificó la fase acuosa con HCl 1 N acuoso y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas (Na₂SO₄) y se concentraron proporcionando un residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc 4:1) obteniéndose ácido 2-(3-(ciclopropilmetoxi)fenil)acético como un sólido blanco (0,80 g, 59 %).

Usando el procedimiento general H, ácido 2-(3-(ciclopropilmetoxi)fenil)acético (300 mg, 1,50 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un aceite viscoso (90 mg, 19 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,24 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 6,88-6,78 (m, 3H), 5,13-4,95 (m, 1H), 4,74 (m, 1H), 4,33 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 3,79 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 3,23 (m, 1H), 2,93-2,63 (m, 5H), 2,04-1,98 (m, 1H), 1,85-1,76 (m, 1H), 1,72-1,60 (m, 1H), 1,58-1,50 (m, 1H), 1,41-1,22 (m, 2H), 0,68-0,62 (m, 2H), 0,37-0,32 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 158,2, 155,5, 139,3, 128,6, 118,6, 112,8, 112,3, 71,7, 70,4, 54,5, 46,2, 45,3, 43,9, 24,4, 23,5, 18,5, 9,3, 2,2 ppm. Pureza: > 95 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,44 min; (M+1) 331.

Preparación X**Ejemplo 85****N-(2-(bifenil-4-il)propan-2-il)-2-(quinuclidin-3-il)acetamida**

A una disolución de clorhidrato de ácido 2-(quinuclidin-3-il)acético (0,97 g, 4,7 mmoles) en DMF (30 mL) se añadió HATU (1,79 g, 4,72 mmoles), 2-(4-bromofenil)propan-2-amina (1,0 g, 4,7 mmoles) y trietilamina (3,9 mL, 28 mmoles). Se agitó la mezcla resultante a 60 °C durante 16 h. Se concentró la mezcla a vacío, se diluyó con EtOAc y se lavó con salmuera. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y se evaporó proporcionando el producto en bruto, que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc/metanol 50/1 a 3/1) obteniéndose N-(2-(4-bromofenil)propan-2-il)-2-(quinuclidin-3-il)acetamida como un sólido amarillo (1,3 g, 76 %).

Usando el procedimiento general E, N-(2-(4-bromofenil)propan-2-il)-2-(quinuclidin-3-il)acetamida (200 mg, 0,550 mmoles), ácido fenilborónico (134 mg, 1,00 mmol) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un aceite marrón viscoso (58 mg, 32 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,58-7,50 (m, 4H), 7,44-7,37 (m, 4H), 7,31 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 6,50 (s, 1H), 3,16 (m, 1H), 3,02 (m, 1H), 2,92-2,78 (m, 3H), 2,60 (m, 1H), 2,40-2,20 (m, 3H), 1,47-1,90 (m, 11H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 170,5, 146,1, 140,7, 139,2, 128,8, 127,2, 127,0, 125,2, 55,6, 53,1, 46,8, 46,2, 40,3, 31,7, 29,3, 29,2, 26,0, 24,4, 19,7 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,55 min; (M+1) 363.

Ejemplo 86**bifenil-3-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

A una disolución de quinuclidin-3-ol (635 mg, 5,00 mmoles) en THF (15 mL) se añadió NaH [dispersión al 60 % en aceite mineral] (260 mg, 6,50 mmoles) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante 15 min y se añadió 3-bromofenilisocianato (990 mg, 5,00 mmoles) con agitación. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 18 h, se extinguió con salmuera y se extrajo con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyendo con EtOAc/metanol 3:1) dando 3-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo como un sólido blanco (0,70 g, 43 %).

Usando el procedimiento general E, el producto intermedio de carbamato anterior (130 mg, 0,402 mmoles), ácido fenilborónico (72 mg, 0,6 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (75 mg, 58 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (s a, 1H), 7,59 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,43 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,41-7,28 (m, 4H), 6,77 (s a, 1H), 4,85 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 2,98-2,75 (m, 5H), 2,12 (m, 1H), 1,93-1,68 (m, 2H), 1,64-1,55 (m, 1H), 1,47-1,40 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 153,3, 142,3, 140,7, 138,3, 129,5, 128,8, 127,5, 127,2, 122,3, 117,4, 72,1, 55,4, 47,4, 46,5, 30,9, 25,4, 24,5, 19,5 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,53 min; (M+1) 323.

Ejemplo 87**2'-metoxibifenil-3-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

Usando el procedimiento general E, 3-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, ácido 2-metoxi-fenilborónico y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (75 mg, 58 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,49 (s a, 1H), 7,41 (s a, 1H), 7,37-7,28 (m, 3H), 7,23 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,04-6,94 (m, 3H), 4,83 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,29 (m, 1H), 2,97-2,70 (m, 5H), 2,10 (m, 1H), 1,91-1,82 (m, 1H), 1,74-1,65 (m, 1H), 1,62-1,53 (m, 1H), 1,46-1,37 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 156,4, 153,4, 139,4, 137,6, 130,9, 130,2, 128,8, 128,6, 124,8,

120,8, 119,9, 117,3, 111,2, 72,0, 55,6, 55,4, 47,4, 46,5, 25,4, 24,5, 19,5 ppm. Pureza: > 95 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,52 min; (M+1) 353.

Ejemplo 88

2'-etilbifenil-3-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

5 Usando el procedimiento general E, 3-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, ácido 2-etilfenilborónico y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (110 mg, 78 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,42-7,28 (m, 5H), 7,25-7,16 (m, 2H), 7,03-7,00 (m, 1H), 6,88 (s a, 1H), 4,83 (m, 1H), 3,27 (m, 1H), 2,98-2,70 (m, 5H), 2,61 (c, J = 7,6 Hz, 2H), 2,08 (m, 1H), 1,92-1,80 (m, 1H), 1,75-1,65 (m, 1H), 1,63-1,55 (m, 1H), 1,46-1,37 (m, 1H), 1,10 (t, J = 7,6 Hz, 3H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 152,1, 141,7, 140,4, 139,9, 136,4, 128,6,
10 127,5, 127,4, 126,4, 124,3, 123,2, 118,4, 115,9, 71,0, 54,3, 46,2, 45,3, 25,0, 24,2, 23,4, 18,3, 14,5 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,61 min; (M+1) 351.

Ejemplo 89

3'-metoxibifenil-3-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

15 Usando el procedimiento general E, 3-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, ácido 3-metoxifenilborónico y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (100 mg, 71 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,63 (s a, 1H), 7,40-7,27 (m, 4H), 7,17 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,11 (m, 1H), 7,07 (s a, 1H), 6,89 (dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 4,85 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,30 (m, 1H), 2,99-2,70 (m, 5H), 2,12 (m, 1H), 1,92-1,84 (m, 1H), 1,75-1,68 (m, 1H), 1,62-1,55 (m, 1H), 1,48-1,40 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 159,9, 153,4, 142,3, 142,1, 138,4, 129,8, 129,4, 122,3, 119,7, 117,7, 112,9, 112,8, 72,0, 55,4, 55,3, 47,4, 46,5, 25,4, 24,5, 19,5 ppm. Pureza: > 97 %
20 LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,52 min; (M+1) 353

Ejemplo 90

3'-etilbifenil-3-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

A una disolución de 1-bromo-3-etilbenceno (370 mg, 2,00 mmoles) en 5 mL de 1,4-dioxano, se añadió bis(pinacolato)diboro (609 mg, 2,40 mmoles), CH₃COOK (589 mg, 6,02 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ (75 mg, 0,09 mmoles). Se agitó la mezcla a 80 °C durante 5 h. Se enfrió la mezcla, se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. Se secaron los extractos combinados (Na₂SO₄) y se concentraron proporcionando el boronato en bruto (410 mg, > 100 %), que se usó sin purificación en la siguiente etapa.

30 Usando el procedimiento general E, 3-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, ácido 3-etilfenilborónico y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (78 mg, 56 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,64 (s a, 1H), 7,43-7,27 (m, 6H), 7,24 (s a, 1H), 7,18 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,85 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 2,99-2,73 (m, 5H), 2,70 (c, J = 7,5 Hz, 2H), 2,12 (m, 1H), 1,92-1,84 (m, 1H), 1,75-1,67 (m, 1H), 1,62-1,55 (m, 1H), 1,48-1,38 (m, 1H), 1,27 (t, J = 7,5 Hz, 3H) ppm. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 153,5, 144,8, 142,4, 140,8, 138,4, 129,4, 128,8, 127,1, 126,8, 124,6, 122,3, 117,4, 72,1, 55,4, 47,4, 46,5, 29,0, 25,4, 24,5, 19,5, 15,7 ppm. Pureza: > 98 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,66 min; (M+1) 351.

Ejemplo 91

bifenil-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

A una disolución de quinuclidin-3-ol (382 mg, 3,00 mmoles) en THF (15 mL) se añadió NaH [dispersión al 60 % en aceite mineral] (156 mg, 3,90 mmoles) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante 15 min y se añadió 2-bromofenilisocianato (594 mg, 3,00 mmoles) con agitación. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente
40 durante 18 h, se extinguió con salmuera y se extrajo con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. Se purificó el producto en bruto resultante por cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc/metanol 3:1) dando el producto 2-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo como un aceite viscoso (0,80 g, 82 %).

45 Usando el procedimiento general E, 2-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo (130 mg, 0,400 mmoles), ácido fenilborónico (96 mg, 0,8 mmoles) y [PdCl₂(pddf)]CH₂Cl₂ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (112 mg, 87 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,07 (s a, 1H), 7,55-7,33 (m, 6H), 7,25-7,21 (dd, J = 7,6 & 1,6 Hz, 1H), 7,43 (td, J = 8,0, 1,2 Hz, 1H), 6,65 (s a, 1H), 4,78 (m, 1H), 3,24 (m, 1H), 2,90-2,68 (m, 5H), 2,04 (m, 1H), 1,80-1,62 (m, 2H), 1,61-1,50 (m, 1H), 1,41-1,30 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 151,2, 135,9, 132,5, 129,5, 128,0, 127,0, 126,9, 126,2, 125,7, 121,4, 117,9, 69,9, 53,1, 45,1, 44,3, 23,1, 22,3, 17,2 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm
50 & 254 nm); tiempo de retención 1,47 min; (M+1) 323.

Ejemplo 92

2'-metoxibifenil-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 2-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, ácido 2-metoxifenilborónico y $[\text{PdCl}_2(\text{pddf})]\text{CH}_2\text{Cl}_2$ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (102 mg, 72 %). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,95 (s a, 1H), 7,42 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,37 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,25 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,15 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,09 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,72 (s a, 1H), 4,76 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,23 (m, 1H), 2,90-2,64 (m, 5H), 1,98-2,08 (m, 1H), 1,81-1,63 (m, 2H), 1,60-1,50 (m, 1H), 1,42-1,30 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 156,2, 153,8, 135,6, 132,1, 130,9, 129,7, 128,3, 127,1, 123,8, 121,5, 111,3, 71,8, 55,7, 55,5, 47,3, 46,5, 25,3, 24,5, 19,4 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,48 min; (M+1) 353.

Ejemplo 93

2'-etilbifenil-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 2-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, 2-etilfenilborónico y $[\text{PdCl}_2(\text{pddf})]\text{CH}_2\text{Cl}_2$ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (71 mg, 51 %). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,11 (s a, 1H), 7,43-7,34 (m, 3H), 7,33-7,28 (m, 1H), 7,18-7,08 (m, 3H), 6,24 (s a, 1H), 4,75 (m, 1H), 3,23 (m, 1H), 2,85-2,65 (m, 5H), 2,40 (m, 2H), 2,02 (m, 1H), 1,73-1,62 (m, 2H), 1,61-1,50 (m, 1H), 1,40-1,30 (m, 1H), 1,05 (m, 3H) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 153,3, 142,9, 136,4, 135,3, 130,6, 130,3, 130,1, 129,0, 128,7, 128,4, 126,4, 123,0, 119,1, 72,1, 55,2, 47,3, 46,4, 26,0, 25,3, 24,5, 19,3, 15,2 ppm. Pureza: > 98 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,55 min; (M+1) 351.

Ejemplo 94

3'-metoxibifenil-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 2-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, ácido 3-metoxifenilborónico y $[\text{PdCl}_2(\text{pddf})]\text{CH}_2\text{Cl}_2$ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (120 mg, 85 %). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,08 (s a, 1H), 7,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,36 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,23 (dd, $J = 7,5, 1,5$ Hz, 1H), 7,13 (td, $J = 7,5, 1,5$ Hz, 1H), 6,96 (dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, 2H), 6,91 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H), 6,73 (s a, 1H), 4,79 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,24 (m, 1H), 2,90-2,70 (m, 5H), 2,05 (m, 1H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,62-1,52 (m, 1H), 1,41-1,32 (m, 1H) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 160,1, 153,4, 139,5, 134,7, 131,5, 130,1, 130,1, 128,5, 123,5, 121,4, 119,9, 114,7, 113,6, 72,1, 55,3, 55,3, 47,3, 46,5, 25,3, 24,5, 19,4 ppm. Pureza: > 98 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,48 min; (M+1) 353

Ejemplo 95

3'-etilbifenil-2-ilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

Usando el procedimiento general E, 2-bromofenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo, ácido 3-etilfenilborónico y $[\text{PdCl}_2(\text{pddf})]\text{CH}_2\text{Cl}_2$ dieron el compuesto del título como un sólido blanco (120 mg, 86 %). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,09 (s a, 1H), 7,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,36 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,26-7,18 (m, 4H), 7,14 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,71 (s a, 1H), 4,79 (m, 1H), 3,25 (m, 1H), 2,90-2,65 (m, 7H), 2,05 (m, 1H), 1,80-1,64 (m, 2H), 1,62-1,52 (m, 1H), 1,40-1,32 (m, 1H), 1,28 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 153,4, 145,2, 138,1, 134,7, 131,8, 130,2, 129,1, 128,8, 128,4, 127,5, 126,6, 123,5, 120,1, 72,0, 55,3, 47,3, 46,4, 28,9, 25,3, 24,5, 19,4, 15,7 ppm. Pureza: > 95 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,55 min; (M+1) 351.

Preparación Y

Ejemplo 96

2-isopropoxifenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

A una mezcla de 3-aminofenol (1,50 g, 13,8 mmoles), isopropanol (3,3 g, 55 mmoles) y trifetilfosfina (14,4 g, 54,9 mmoles) en THF (15 mL), se añadió gota a gota dietilazodicarboxilato (9,60 g, 55,0 mmoles) durante un periodo de 30 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h y se concentró. Se diluyó el residuo con agua, se acidificó con HCl 2 N acuoso y se extrajo con éter. Se basificó la fase acuosa con NaOH 2 N acuoso y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas (Na_2SO_4) y se concentraron. Se purificó el producto en bruto resultante por columna de gel de sílice cromatográfico (éter de petróleo/EtOAc 10:1 a 5:1) proporcionando 3-isopropoxibencenamina como un aceite amarillo (1,3 g, 64 %).

Usando el procedimiento general A, 3-isopropoxibencenamina (300 mg, 2,00 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un aceite viscoso (130 mg, 22 %). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,20 (s a, 1H), 7,09 (t, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,05 (s a, 1H), 6,77 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,51 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,75 (m, 1H), 4,46 (m, 1H), 3,26-3,18 (m, 1H), 2,92-2,65 (m, 5H), 2,04 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,52 (m, 1H), 1,35 (m, 1H), 1,28 (d, $J = 5,5$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 157,5, 152,2, 138,2, 128,7, 110,1, 109,6, 105,1, 70,7, 68,9, 54,3, 46,3, 45,4, 28,7, 24,3, 23,3, 21,0, 18,3 ppm. Pureza: > 90 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,43 min; (M+1) 305.

Ejemplo 97

2-isobutoxifenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo

A una mezcla de 3-aminofenol (500 mg, 4,60 mmoles), 2-metilpropan-1-ol (1,40 g, 18,9 mmoles) y trifenilfosfina (4,80 g, 16,2 mmoles) en THF (10 mL) se añadió gota a gota dietilazodicarboxilato (3,20 g, 18,3 mmoles) durante un periodo de 30 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Se evaporó el disolvente y se diluyó el residuo con agua, se acidificó con HCl 2 N acuoso y se extrajo con éter. Se basificó la fase acuosa con NaOH 2 N acuoso y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas (Na₂SO₄) y se concentraron. Se purificó el producto en bruto resultante por columna de gel de sílice cromatográfico (éter de petróleo/EtOAc 15:1) proporcionando 3-isobutoxibencenammina como un aceite amarillo (330 mg, 45 %).

Usando el procedimiento general A, 3-isobutoxibencenammina (330 mg, 2,00 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un aceite viscoso (140 mg, 22 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,17 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,15 (s a, 1H), 6,81 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,80 (s a, 1H), 6,61 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,83 (m, 1H), 3,71 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,34-3,21 (m, 1H), 2,97-2,72 (m, 5H), 2,12-2,04 (m, 2H), 1,90-1,84 (m, 1H), 1,75-1,67 (m, 1H), 1,55-1,63 (m, 1H), 1,46-1,38 (m, 1H), 1,01 (d, *J* = 6,5 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 159,9, 153,4, 139,3, 129,6, 110,6, 109,7, 105,0, 74,4, 72,0, 55,4, 47,3, 46,5, 28,3, 25,4, 24,5, 19,5, 19,3 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,56 min; (M+1) 319.

Ejemplo 98**2-(ciclopropilmetoxi)fenilcarbamato de quinuclidin-3-ilo**

A una mezcla de 3-aminofenol (300 mg, 2,70 mmoles), ciclopropilmetanol (793 mg, 11,0 mmoles) y trifenilfosfina (2,90 g, 11,0 mmoles) en THF (6 mL) se añadió gota a gota dietilazodicarboxilato (1,90 g, 11,0 mmoles) durante un periodo de 30 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Se evaporó el disolvente y se diluyó el residuo con agua, se acidificó con HCl 2 N acuoso y se extrajo con éter. Se basificó la fase acuosa con NaOH 2 N acuoso y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas (Na₂SO₄) y se concentraron. Se purificó el producto en bruto resultante por columna de gel de sílice cromatográfico (éter de petróleo/EtOAc 15:1) proporcionando 3-(ciclopropilmetoxi)bencenammina como un aceite marrón (260 mg, 58 %).

Usando el procedimiento general A, 3-(ciclopropilmetoxi)bencenammina (260 mg, 1,60 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un aceite viscoso (80 mg, 16 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,72 (s a, 1H), 7,14 (s a, 1H), 7,13 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,57 (dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 4,85 (m, 1H), 3,75 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,35-3,26 (m, 1H), 3,05-2,78 (m, 5H), 2,18-2,12 (m, 1H), 1,97-1,86 (m, 1H), 1,80-1,67 (m, 1H), 1,66-1,55 (m, 1H), 1,52-1,42 (m, 1H), 1,26-1,15 (m, 1H), 0,61-0,55 (m, 2H), 0,31-0,26 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 158,6, 152,1, 138,3, 128,6, 109,9, 108,9, 104,0, 71,7, 69,7, 53,8, 46,0, 45,2, 28,7, 24,1, 22,4, 17,8, 9,2, 2,2 ppm. Pureza: 100 % LCMS (214 nm & 254 nm); tiempo de retención 1,46 min; (M+1) 317.

Ejemplo 99**1-bencil-3-(quinuclidin-3-il)imidazolidin-2-ona**

A una disolución con agitación de clorhidrato de quinuclidin-3-amina (324 mg, 0,199 mmoles) en DMF (30 mL) se añadió trietilamina (3 gotas) seguido por (isocianatometil)benceno (275 mg, 2,10 mmoles) cuidadosamente. Se agitó la mezcla resultante a 25 °C durante 18 h. Después de separación por HPLC, se obtuvo 1-bencil-3-(quinuclidin-3-il)urea (283 mg, 55 %).

A una disolución de 1-bencil-3-(quinuclidin-3-il)urea (260 mg, 1,00 mmol) en DMF (30 mL) se añadió NaH [dispersión al 60 % en aceite mineral] (96 mg, 2,4 mmoles) con enfriamiento con baño de hielo. Se agitó la mezcla resultante durante 2 h antes de añadir cuidadosamente BrCH₂CH₂Br (0,75 g, 4,0 mmoles). Se agitó la reacción durante 18 h adicionales a aproximadamente 25 °C. Después de la separación por HPLC, se liofilizó la fase acuosa y se purificó por CCF prep (CHCl₃ a 5 % de MeOH en CHCl₃ a 5 % NH₃ 2 N (MeOH) en CHCl₃) dando el compuesto del título (81 mg, 28 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,19-7,22 (m, 4H), 7,11-7,14 (m, 1H), 6,09 (dd, *J* = 15,2, 8,4 Hz, 1H), 5,45 (dd, *J* = 15,6, 4,0 Hz, 1H), 5,30 (dd, *J* = 8,0, 3,6 Hz, 1H), 4,17-4,29 (m, 4H), 3,66-3,75 (m, 2H), 3,47 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 3,19-3,27 (m, 3H), 2,34 (s a, 1H), 2,22 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 1,92 (s a, 2H), 1,75 (s a, 1H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 158,9, 141,1, 140,4, 128,7, 127,4, 127,3, 113,6, 63,6, 57,1, 56,0, 45,6, 43,9, 25,2, 23,0, 18,8 ppm. Pureza: 93,8% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,84 min; (M+1) 286.

Ejemplo 100**N-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-4-p-tolil-butiramida**

Usando el procedimiento general I, 1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ilamina (200 mg, 1,00 mmol) y ácido p-tolil-butírico (220 mg, 1,2 mmoles) dieron N-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-4-p-tolil-butiramida (114 mg, 40 %) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,06 (s, 4H), 4,19 (m, 1H), 3,66-3,73 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 3,29-3,33 (m, 4H), 2,91 (dd, *J* = 8,0, *J* = 3,6 Hz, 1H), 2,59 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,24 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,15-2,16 (m, 1H), 2,02-2,14 (m, 1H), 1,92-2,01 (m, 2H), 1,81-1,91 (m, 3H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 175,1, 138,6, 135,1, 128,8,

128,2, 52,7, 47,4, 47,3, 44,5, 34,8, 27,3, 24,3, 21,6, 19,8, 17,1 ppm. Pureza: 99,7% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,76 min; (M+1) 287.

Ejemplo 101

5 N-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-4-(4-metoxi-fenil)-butiramida

Usando el procedimiento general I, 1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ilamina (200 mg, 1,00 mmol) y ácido 4-(4-metoxi-fenil)-butírico dieron el compuesto del título como un sólido blanco (85 mg, 28 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,08 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,81 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,18 (s a, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,68 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 3,24-3,33 (m, 4H), 2,98-3,03 (m, 1H), 2,57 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,24 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,03-2,16 (m, 2H), 2,02 (s a, 2H), 1,85-1,91 (m, 3H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 175,2, 158,3, 133,6, 129,2, 113,6, 54,5, 52,6, 47,2, 46,4, 44,5, 34,9, 34,2, 27,5, 24,4, 21,5, 17,1 ppm. Pureza: 96,4% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,76 min; (M+1) 303.

Ejemplo 102

(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-amida de ácido bifenil-3-carboxílico

Usando el procedimiento general I, 1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ilamina (200 mg, 1,00 mmol) y ácido bifenil-3-carboxílico dieron el compuesto del título como un sólido blanco (211 mg, 68 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,59 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,28 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,19 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,11 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 4,21 (s a, 1H), 3,56 (t, J = 11,6 Hz, 1H), 3,11-3,22 (m, 1H), 3,05-3,10 (m, 4H), 2,10 (c, J = 3,2 Hz, 1H), 1,95 (s a, 1H), 1,79-1,83 (m, 2H), 1,59-1,20 (m, 1H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 169,6, 141,6, 140,2, 134,5, 130,3, 129,0, 127,7, 126,9, 126,3, 125,9, 51,9, 46,4, 46,0, 45,6, 24,6, 21,6, 17,3 ppm. Pureza: 99,8% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,60 min; (M+1) 307.

Ejemplo 103

N-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-2-bifenil-4-il-acetamida

Usando el procedimiento general I, 1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ilamina (200 mg, 1,00 mmol) y ácido bifenil-4-il-acético dieron el compuesto del título como un sólido blanco (140 mg, 44 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,56 (t, J = 8,0 Hz, 4H), 7,29-7,41 (m, 5H), 4,19 (s a, 1H), 3,70 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 3,58 (s, 2H), 3,24-3,31 (m, 5H), 3,12-3,19 (m, 1H), 2,16-2,17 (m, 2H), 1,95-1,98 (m, 2H), 1,82 (s a, 1H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 173,1, 140,8, 140,0, 134,7, 129,4, 128,7, 126,9, 52,3, 46,4, 45,9, 44,3, 41,9, 24,4, 21,5, 17,1 ppm. Pureza: 93,9% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 2,87 min; (M+1) 321.

Preparación Z

30 Ejemplo 104

2-(quinuclidin-3-il)-N-(1-*p*-tolilciclopropil)acetamida

A una disolución de 2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (2,70 g, 14,8 mmoles) en THF (200 mL) a 0 °C se añadió NaH [dispersión al 60 % en aceite mineral] (600 mg, 15,0 mmoles). Después de 1 h de agitación, se añadió quinuclidin-3-ona (2,00 g, 12,4 mmoles) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 18 h. Se inactivó la reacción con 50 mL de agua a 0 °C y la mezcla se extrajo con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas y se concentraron a presión reducida proporcionando 2-(quinuclidin-3-ilidene)acetato de metilo en bruto, que se usó en la siguiente etapa sin purificación (1,2 g, 70 %).

Se agitó una mezcla de 2-(quinuclidin-3-ilidene)acetato de metilo (70 mg, 0,38 mmoles) y Pd/C (100 mg, 20 % p/p) en EtOH (10 mL) bajo H₂ (20 psi) a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtró la disolución de reacción a través de Celite y se concentró el filtrado bajo presión reducida proporcionando 2-(quinuclidin-3-il)acetato de metilo en bruto (60 mg, 85 %), que se usó con purificación en la siguiente etapa.

Se agitó una mezcla de 2-(quinuclidin-3-il)acetato de metilo (1,1 g, 6,0 mmoles) y 50 mL de HCl conc. [12 M] a 70 °C durante 18 h. Se concentró la mezcla de reacción bajo presión reducida proporcionando ácido 2-(quinuclidin-3-il)acético en bruto, que se usó sin purificación en la siguiente etapa (900 mg, 86 %).

Usando el procedimiento general I, ácido 2-(quinuclidin-3-il)acético (169 mg, 1,00 mmol) y 1-*p*-tolilciclopropanamina (149 mg, 1,10 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (60 mg, 18 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,86 (s, 1H), 6,96-7,07 (m, 4H), 3,22-3,37 (m, 2H), 2,85-3,05 (m, 4H), 2,39-2,45 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 1,45-1,92 (m, 5H), 1,07-1,23 (m, 5H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 171,6, 139,8, 136,1, 129,2, 125,6, 52,1, 50,9, 46,5, 46,0, 39,2, 34,9, 30,8, 24,5, 21,1, 18,7, 17,6 ppm. Pureza: 96,2% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,21 min; (M+1) 299.

Ejemplo 105

N-(2-(3-metoxifenil)propan-2-il)-2-(quinuclidin-3-il)acetamida

Usando el procedimiento general I, ácido 2-(quinuclidin-3-il)acético (169 mg, 1,00 mmol) y 2-(3-metoxifenil)propan-2-amina (182 mg, 1,10 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (126 mg, 40 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,39 (s, 1H), 7,20 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 6,71 (dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,31-3,42 (m, 2H), 3,00-3,19 (m, 4H), 2,47-2,60 (m, 2H), 2,27 (dd, *J* = 14,0, 6,0 Hz, 1H), 1,83-2,06 (m, 4H), 1,64-1,74 (m, 1H), 1,61 (d, *J* = 12,4 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 170,0, 159,7, 149,3, 129,5, 117,5, 111,8, 111,0, 55,9, 55,4, 52,0, 50,6, 46,6, 46,0, 39,7, 30,9, 29,7, 29,1, 24,3, 18,8 ppm. Pureza: 93,7% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 0,76 min; (M+1) 317.

Ejemplo 106**2-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-N-[1-(3-isopropil-fenil)-1-metil-etil]-acetamida**

A una disolución de 1-(1-isocianato-1-metil-etil)-3-isopropenil-benceno (10 g, 50 mmoles) en *t*-BuOH (1000 mL) se añadió KOH (40,0 g, 71,6 mmoles). Se agitó la mezcla a reflujo durante 3 h. Se enfrió la mezcla resultante hasta temperatura ambiente, se concentró y se disolvió en CH₂Cl₂. Se separó por filtración el residuo sólido y se ajustó la fase orgánica a pH<7 usando HCl conc. Se extrajo la sal de amonio con agua. Se basificó la fase acuosa usando una disolución acuosa de NaOH [5 % p/p, 200 mL] y entonces se extrajo la amina de base libre con CH₂Cl₂. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida dando 1-(3-isopropenil-fenil)-1-metil-etilamina (3,3 g, 63 %).

Se agitó una disolución del compuesto anterior (8,5 g, 48 mmoles) y PtO₂ (1,8 g, 8,0 mmoles) en EtOH (600 mL) a temperatura ambiente bajo 1 atm de H₂ durante 18 h. Se filtró la reacción a través de Celite y se concentró a presión reducida dando 1-(3-isopropil-fenil)-1-metil-etilamina (5,0 g, 58 %).

Usando el procedimiento general I, ácido (1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-acético (200 mg, 1,20 mmoles) y 1-(3-isopropil-fenil)-1-metil-etilamina dieron el compuesto del título como un sólido blanco (42 mg, 10 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,15-1,20 (m, 3H), 7,05 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 3,41-3,45 (m, 1H), 3,26 (s, 2H), 3,15-3,22 (m, 2H), 2,71-2,82 (m, 2H), 2,41-2,47 (m, 3H), 2,05-2,12 (m, 1H), 1,79-1,90 (m, 4H), 1,61 (d, *J* = 8,0 Hz, 6H), 1,21 (d, *J* = 6,4 Hz, 6H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171,1, 148,7, 147,3, 128,1, 123,9, 122,8, 122,2, 55,6, 52,1, 46,5, 45,9, 38,8, 34,5, 30,7, 28,9, 28,5, 23,8, 23,4, 18,0 ppm. Pureza: 96,8% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,93 min; (M+1) 329.

Ejemplo 107**2-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-N-[2-(2-metoxi-fenil)-etil]-acetamida**

Usando el procedimiento general I, ácido (1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-acético (200 mg, 1,20 mmoles) y 2-(2-metoxi-fenil)-etilamina dieron el compuesto del título como un sólido blanco (60 mg, 15 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,08 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,89 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,84 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,35-3,45 (m, 3H), 3,21-3,31 (m, 3H), 2,76-2,83 (m, 3H), 2,29-2,45 (m, 3H), 1,82-2,01 (m, 3H), 1,72-1,81 (m, 2H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 172,0, 158,0, 130,4, 127,8, 127,2, 120,2, 110,4, 54,6, 52,0, 46,4, 45,9, 39,1, 38,3, 30,7, 30,2, 23,8, 17,9 ppm. Pureza: 92,4% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,59 min; (M+1) 303.

Ejemplo 108**1-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-3-[1-(3-isopropil-fenil)-ciclopropil]-urea**

Se agitó una mezcla de ácido 3-isopropil-benzoico (5,00 g, 30,4 mmoles) en SOCl₂ (50 mL) a 100 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró dando cloruro de 3-isopropil-benzoylo (5,00 g, 91 %).

A una disolución del cloruro de ácido anterior (5,00 g, 27,0 mmoles) en CH₂Cl₂ (20 mL) a -70 °C se añadió, gota a gota, una disolución de NH₃/CH₂Cl₂ (200 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 h y luego se concentró dando 3-isopropil-benzamida (4,2 g, 93 %).

Se agitó una disolución de la amida anterior (4,20 g, 25,7 mmoles) en POCl₃ (36,0 g, 236 mmoles) a 80 °C durante 18 h. Se concentró la disolución y el residuo se vertió en agua (100 mL). Se extrajo la mezcla con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron por salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron dando 3-isopropil-benzonitrilo (3,00 g, 80 %).

Usando el procedimiento general G, se convirtió 3-isopropil-benzonitrilo (3,00 g, 20,6 mmoles) en la 1-(3-isopropil-fenil)-ciclopropilamina correspondiente (0,80 g, 22 %).

Usando el procedimiento general C, la amina anterior (300 mg, 1,71 mmoles), quinuclidin-3-amina (215 mg, 1,71 mmoles) y CDI (290 mg, 2,05 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (88 mg, 46 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,18 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,01 (dd, *J* = 19,2, 7,6 Hz, 2H), 3,74-3,77 (m, 1H), 3,18-3,24 (m, 1H), 2,71-2,87 (m, 5H), 2,42-2,47 (m, 1H), 1,63-1,82 (m, 4H), 1,45 (s a, 1H), 1,21-1,26 (m, 10H) ppm.

¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 193,0, 168,7, 160,1, 128,2, 122,7, 121,9, 55,3, 46,8, 46,1, 34,1, 25,9, 25,0, 23,5, 19,6, 18,2 ppm. Pureza: 92,4% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 2,53 min; (M+1) 328.

Ejemplo 109

2-(1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-N-[1-(3-isopropil-fenil)-ciclopropil]-acetamida

5 Usando el procedimiento general I, 1-(3-isopropil-fenil)-ciclopropilamina (278 mg, 1,58 mmoles) y ácido (1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-acético (267 mg, 1,58 mmoles) dieron el compuesto del título como un sólido blanco (70 mg, 14 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,16 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,97 (dd, J = 19,2, 7,6 Hz, 2H), 3,16-3,23 (m, 1H), 2,79-2,97 (m, 5H), 2,51-2,58 (m, 1H), 2,23-2,41 (m, 3H), 1,83-1,92 (m, 1H), 1,68-1,81 (m, 3H), 1,54-1,62 (m, 1H), 1,15-1,25 (m, 10H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 173,6, 148,5, 142,4, 127,8, 123,6, 123,1, 122,0, 73,0, 53,1, 46,6, 45,9, 39,3, 34,1, 32,3, 28,1, 26,4, 24,4, 19,7, 16,8 ppm. Pureza: 96,9% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 2,55 min; (M+1) 327.

Ejemplo 110

éster 1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ílico de ácido [1-(3-isopropil-fenil)-ciclopropil]-carbámico

15 Usando el procedimiento general A, 1-(3-isopropil-fenil)-ciclopropilamina (278 mg, 1,58 mmoles) y quinuclidin-3-ol dieron el compuesto del título como un sólido blanco (75 mg, 22 %). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,17 (m, 1H), 7,09 (s, 1H), 6,97-7,08 (m, 2H), 4,72-4,79 (m, 1H), 3,36-3,42 (m, 1H), 2,79-3,08 (m, 5H), 1,93-2,17 (m, 2H), 1,81-1,90 (m, 1H), 1,67-1,78 (m, 2H), 1,31-1,54 (m, 1H), 1,13-1,28 (m, 10H) ppm. ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 157,1, 148,4, 143,1, 128,1, 123,9, 123,0, 122,4, 69,2, 54,4, 46,7, 45,7, 34,7, 34,3, 24,9, 23,3, 22,0, 18,0, 17,3 ppm. Pureza: 99,2% HPLCMS (210 nm); tiempo de retención 1,83 min; (M+1) 329.

20 Ejemplo 111

Estudios de eficacia *in vivo* de terapia de moléculas pequeñas usando sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo en el modelo de ratón con Fabry

Aquí, se describen experimentos *in vivo* usando un inhibidor de GCS en un modelo de ratón con Fabry y demuestran que la terapia de reducción de sustrato (SRT) es igual de eficaz en la reducción de los niveles de tanto Gb3 como liso-Gb3 en plasma, riñón y orina de ratones con Fabry. El estudio se diseñó para evaluar si la inhibición de sustrato (es decir, "terapia de reducción de sustrato") usando tipos de compuestos de la divulgación podría reducir la acumulación del material de almacenamiento globotriaosilceramida (Gb3) y lisoglobotriaosilceramida (liso-Gb3). Recientemente se ha propuesto que la liso-Gb3 urinaria puede representar un biomarcador fiable de relevancia clínica para enfermedad de Fabry (Aerts et al., PNAS USA 105:2812-2817 (2008); y Auray-Blais et al., Clin Chim Acta 411:1906-1914 (2010)). El origen metabólico de la liso-Gb3 es desconocido y se puede obtener posiblemente a través de o desacilación de Gb3 o a través de la síntesis anabólica de glucosilesfingosina.

En la **Fig. 2**, las flechas negras indican vías demostradas, las flechas grises son vías sin documentar. ERT usando α-galactosidasa A se conoce por degradar tanto Gb3 como liso-Gb3. Por consiguiente, SRT usando un inhibidor de GCS sería más eficaz en limitar la acumulación de liso-Gb3 si la liso-Gb3 se genera principalmente a través de la desacilación de Gb3, una vía dependiente de GCS. Estos experimentos demuestran que SRT usando inhibidores de GCS en un modelo de ratón de enfermedad de Fabry redujeron tanto Gb3 como liso-Gb3, soportando así el uso de compuestos de la divulgación como opciones terapéuticas viables para pacientes con Fabry.

En los siguientes experimentos, se administraron ratones con inhibidores de GCS a o ~60 mg/kg/día de sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (en lo sucesivo "GZ 452") o ~300 mg/kg/día de sal de ácido L-tartárico de [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidin-1-ilmetil-etil]-amida de ácido (1R,2R)-octanoico (en lo sucesivo "GZ 638") como un componente de la dieta alimentaria en microgránulos proporcionada a voluntad. El análisis de lípidos fue por ESI/MS como se describe en Marshall et al., PLoS ONE 5:e15033 (2010). Como se trata con más detalle a continuación, el tratamiento empezó cuando los ratones tuvieron 3, 8 o 12 meses de edad para probar la eficacia a diferentes gravedades de enfermedad. Se recogió sangre y orina mensualmente y las recogidas periódicas de tejido proporcionaron materiales para evaluar la eficacia de la terapia (niveles de Gb3 y liso-Gb3). Los estudios previos demostraron que la generación temprana de inhibidores de la glucosilceramida sintasa (de la clase de tipo P4) podría retrasar la tasa de acumulación de Gb3, sin embargo, como se trata más adelante, el tratamiento con GZ-452 no solo podría prevenir o retrasar la acumulación adicional, sino que efectuó reducciones de los niveles absolutos de tanto Gb3 como liso-Gb3 en los tejidos probados (hígado, corazón, orina, plasma). Como se trata adicionalmente a continuación, la eficacia de SMT estuvo afectada por la edad de los ratones al comienzo del tratamiento. En general, cuanto más mayor era el ratón, más altos eran los niveles de Gb3 almacenada y así se requirió un periodo más largo de tratamiento para efectuar un beneficio terapéutico similar (véase la **Fig. 4**). Los experimentos y resultados se describen más adelante.

55 Inhibidor de GCS reduce los niveles de Gb3 en tejido visceral de ratón con Fabry

En este experimento, se trataron ratones con Fabry con inhibidores de GCS en su dieta durante 4 meses comenzado a partir de 8 meses de edad. Los presentes inventores han informado previamente que el tartrato de eliglustat (GZ 638) a 300 mg/kg/día (SRT GZ 638) es eficaz en inhibir la acumulación adicional de Gb3 en tejido (como se muestra aquí por los cambios no significativos en Gb3 con respecto a los niveles de partida UNT (inicio)). Como se muestra en la **Fig. 3**, también se evaluó un inhibidor de GCS más potente, GZ 452, (a 60 mg/kg/día) (SRT-Gz452) y se encontró que no solo prevenía la acumulación adicional, sino que también redujo significativamente la Gb3 almacenada con respecto a los niveles iniciales (UNT (inicio)). También se muestran los niveles de no mutante de la misma edad (WT). Estos resultados demuestran que GZ 638 es un potente inhibidor de GCS y reduce eficazmente los niveles de Gb3 en tejidos viscerales del ratón con Fabry.

SRT reduce Gb3 en orina y plasma en ratones con Fabry tanto más jóvenes como ancianos

En este experimento, se trataron ratones con Fabry con GZ 452 en su dieta (Rx:) durante 2 o 4 meses comenzando a o 3 u 8 meses de edad (Edad:) como se indica en las **Figs. 4A y 4B**. Los niveles de Gb3 en orina de ratones más jóvenes y ancianos fueron igual de sensibles al tratamiento SRT, alcanzando ~90 % de reducción con 2 meses de tratamiento. Los niveles en plasma de Gb3 fueron más lentos para responder al tratamiento, requiriendo los ratones ancianos dos veces el tratamiento tiempo de los ratones más jóvenes (4 frente a 2 meses) para lograr ~50 % de reducción. Estos resultados demuestran que GZ 638 reduce eficazmente los niveles de Gb3 en orina y plasma en ratones con Fabry más jóvenes y ancianos.

SRT reduce tanto Gb3 como liso-Gb3 en riñón de ratones con Fabry

En este experimento, se trataron ratones con Fabry con Genz-452 en su dieta durante 4 meses comenzando a los 8 meses de edad. Como se muestra en la **Fig. 5**, se analizó tejido renal para (A) Gb3 y (B) liso-Gb3 de ratones sin tratar de la misma edad con Fabry (UNT), ratones con Fabry tratados con GZ 452 (SRT) y ratones de control no mutantes (WT). SRT produjo reducciones relativas significativas similares en niveles (60-70 %) para tanto Gb3 como liso-Gb3. Estos resultados demuestran que GZ 638 reduce eficazmente tanto los niveles de Gb3 como de liso-Gb3 en tejidos de riñón de ratones con Fabry.

Ejemplo 112

Estudios de eficacia *in vivo* de la terapia de combinación en el modelo de ratón con Fabry usando GZ 452 y alfa-galactosidasa A

Se usaron ratones con Fabry para probar la eficacia *in vivo* de combinar la terapia de reemplazo enzimático con la terapia de moléculas pequeñas en un formato de tratamiento concurrente. El estudio se diseñó para evaluar si la inhibición de sustrato (es decir, "terapia de reducción de sustrato") usando el compuesto GZ 452 podría reducir la re-acumulación del material de almacenamiento Gb3 y liso-Gb3. El protocolo del estudio requirió tres grupos de tratamiento distintos de ratones con Fabry macho de 3 meses de edad (**Fig. 6A**). El primer grupo recibió inyecciones intravenosas de enzima alfa-galactosidasa A (ERT) a 1 mg/kg para reducir los niveles de Gb3 y se repitió cada 2 meses. El segundo grupo recibió las mismas inyecciones de enzima que el grupo 1, pero también fueron administrados con GZ 452 a ~60 mg/kg/día como un componente de la dieta de microgránulos. El tercer grupo solo recibió la dosis diaria de GZ 452 en su dieta. Un cuarto grupo no recibió tratamiento para servir de controles de vehículo y un quinto grupo de animales no mutantes proporcionó valores 'normales' de Gb3 y liso-Gb3. Los análisis de orina y sangre mensuales y tres recogidas mensuales de tejido proporcionan materiales para evaluar la eficacia relativa de las terapias (**Fig. 6A**).

Después de 2 meses (los ratones tenían 5 meses de edad), se analizaron plasma (**Fig. 6B**, paneles A y C) y orina (**Fig. 6B**, paneles B y D) para Gb3 (**Fig. 6B**, paneles A y B) y liso-Gb3 (**Fig. 6B**, paneles C y D). En plasma, ERT y SRT redujeron tanto los niveles de Gb3 (panel A) como de liso-Gb3 (panel C), y la combinación de ERT y SRT produjo mejoras significativas con respecto a cualquier terapéutico solo. Los niveles de Gb3 en orina no estuvieron afectados por ERT, pero se redujeron significativamente por SRT (panel B). La liso-Gb3 en orina fue similarmente reducida por todos los tratamientos (panel D), sugiriendo que Gb3 y liso-Gb3 en orina se pueden originar a partir de distintas fuentes. Los resultados de estos estudios muestran que SMT fue eficaz en la reducción de Gb3 en el riñón y orina. ERT fue más eficaz que SMT en reducir Gb3 en el plasma, sin embargo, la terapia más eficaz se obtuvo de la combinación de las dos terapias. La terapia SMT sola o en combinación con ERT también fue capaz de afectar (reducir la acumulación) de liso-Gb3.

Ejemplo 113

Perfil de isoformas de la cadena de acilo de Gb3. Se determinó la abundancia relativa de los grupos acilo unidos a amido de longitud de cadena de carbono diferente para Gb3 de plasma, orina y riñón de ratones con Fabry. Como se muestra en la **Fig. 7**, las principales isoformas del plasma fueron C16:0 y C24:1. Los perfiles de isoformas de la orina y el riñón fueron casi idénticos, siendo C24:0 y C22:0 las longitudes de cadena predominantes. Estos datos están de acuerdo con la Gb3 de orina que procede predominantemente del riñón - probablemente a través de la eliminación exosómica epidérmica. La correlación de estos resultados con aquellos en la Fig. 6, en los que ERT redujo liso-Gb3 en plasma y orina, pero no Gb3 en orina, sugiere que la liso-Gb3 en orina se obtiene de filtrado de plasma. Esta diferenciación de fuente para Gb3 y liso-Gb3 de orina, si también es cierta para pacientes, puede

explicar por qué se cree que liso-Gb3 es un factor pronóstico más preciso de gravedad de enfermedad y eficacia del tratamiento que Gb3 en orina.

Ejemplo 114

SRT pero no ERT retrasa significativamente la pérdida de respuesta nociceptiva térmica

- 5 Se trataron ratones con Fabry de tres meses de edad con GZ 452 en su dieta (SRT), α -Gal una vez cada 2 meses (ERT), o una combinación de los 2 tratamientos (E+S), como se ha descrito anteriormente. Después de 6 meses de terapia de combinación, se evaluó el tiempo de respuesta nociceptiva térmica (latencia) poniendo los ratones sobre una placa caliente a 55 °C y registrando el tiempo para responder (es decir, una sacudida distintiva de la pata trasera). Como se muestra en la **Fig. 8**, después de 7 meses de tratamiento (ratones de 10 meses de edad), el
- 10 grupo tratado únicamente con ERT no fue significativamente diferente al grupo sin tratar (UNT). Los grupos tratados con SRT y con la combinación tuvieron tiempos de respuesta significativamente más cortos al estímulo de calor. Estos resultados demuestran que SRT (pero no ERT) retrasó la pérdida de una respuesta nociceptiva térmica, un sustituto para la neuropatía periférica frecuentemente observada en pacientes con Fabry.

Ejemplo 115

Modelo de ratón nGD para estudios *in vivo* de SMT usando Gz161

- Se obtuvieron ratones K14 Inl/Inl (abreviado K14) de la Universidad de Lund (Enquist et al. (2007)) y se criaron según el protocolo autorizado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal. Se cortaron en la cola crías obtenidas de apareamientos heterocigotos y se genotipificaron en el plazo de un día desde el nacimiento (por PI). Se extrajo ADN usando un tampón de lisis de EDTA 5 mM, 0,2 % de SDS, NaCl 200 mM, Tris 100 mM a pH 8,0
- 20 complementado con 0,25 mg/mL de proteinasa K (Invitrogen, Carlsbad, California), se precipitó con 100 % de isopropanol y se redisolvió en 1X tampón Tris EDTA. Entonces se usó el ADN para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia del gen GC bajo el promotor de la queratina K14 (CRE) (Enquist et al. (2007)). Para determinar la alteración del sitio de resistencia a neomicina del gen de glucocerebrosidasa murina (NEO), los presentes inventores usaron un enfoque de tres cebadores: GC WT Fwd 5'-TGTTCCCCAACACAATGCTCTTT-3'; Rev 5'-TCTGTGACTCTGATGCCACCTTG-3' y Neo Rev 5'-AAGACAGAATAAAACGCACGGGTG-3' como se describe previamente en Cabrera-Salazar et al., Experimental
- 25 Neurology 225: 436-444 (2010).

- Ratones recién nacidos recibieron diariamente 5 mg/kg de inyecciones intraperitoneales de (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (en lo sucesivo "GZ 161") en un volumen de 10 μ L/gramo de peso corporal comenzando en el día postnatal 4. Se sacrificaron humanitariamente los ratones K14 y los compañeros de camada no mutantes en el día postnatal 10 (pre-sintomático) y en el día 14 (punto final humanitario) para evaluar los niveles de glucoesfingolípido (GSL). Los ratones recibieron una dosis de 150 mg/kg de pentobarbital (Euthasol, Virbac Inc, Forth Worth, TX) y se perfundieron transcárdicamente con disolución fría al 0,9 % de NaCl. Se diseccionaron los cerebros y se dividieron; se usó un hemisferio para análisis de GSL y el otro se fijó en 4 % de paraformaldehído durante 96 horas y se procesó para histología.
- 30
- 35

- Para determinar si se podrían lograr beneficios adicionales por exposición prenatal a GZ 161, un subconjunto de hembras K14 preñadas recibió GZ 161 en la comida usando una formulación calculada proporcionando 20 mg/kg/día durante los 5-7 días de gestación finales. Las hembras que recibieron GZ 161 se cambiaron a dieta estándar después de la administración y las crías recibieron diariamente inyecciones IP de GZ 161 a una dosis de 5 mg/kg (10 μ L por gramo de peso corporal) comenzando en P1. Se sacrificó inmediatamente después del nacimiento un conjunto de crías WT nacidas de hembras que recibieron el fármaco o la fórmula estándar para determinar si la exposición en el útero a GZ 161 podría reducir los niveles de GSL en cerebro.
- 40

Ejemplo 116

Cuantificación de glucoesfingolípidos

- Se realizó el análisis cuantitativo de esfingolípidos por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (EM/CL/MS) como se describe previamente en Merrill et al., Methods 36: 207-224 (2005). Brevemente, se extrajeron 10 μ L de homogeneizado de tejido cerebral (peso de tejido/agua: 100 mg/mL) con 1,00 mL de una mezcla de disolventes orgánicos (97 % de acetonitrilo, 2 % de metanol y 1 % de ácido acético, v/v) y se agitaron vigorosamente con vórtex durante 10 min. Los esfingolípidos extraídos (GluCer y GluEsf) fueron directamente
- 45
- 50
- separados por cromatografía de líquidos hidrófilos (columna Atlantis HILIC, Waters Corp.) y se analizaron por espectrometría de masas en tándem de cuadrupolo triple (API 4000, Applied Biosystems/MDS SCIEX) y se compararon con patrones de esfingolípidos (Matreya, LLC; Pleasant Gap, PA)

Ejemplo 117

Reformulación de glucocerebrosidasa humana recombinante

Se reformuló glucocerebrosidasa humana recombinante (rhGC) como se describió previamente en Cabrera-Salazar et al. (2010). Brevemente, se unió rhGC usando un intercambio catiónico (CM Sepharose) y se añadió albúmina de suero humano (HSA) al eluato como estabilizador. La formulación para administración ICV fue 2 mg/mL de rhGC en un tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 7,2 que contenía cloruro sódico 135 mM, 5 mg/mL de HSA y 0,01 % de polisorbato 80.

Ejemplo 118

Inyecciones intracerebroventriculares

Se crioanestesió un modelo animal de enfermedad de Gaucher neuropática (nGD) identificado como K14 y recibió 2 µl de inyecciones intracerebroventriculares (ICV) bilaterales de o rhGC a 2 mg/mL o vehículo como se describe previamente. (Cabrera-Salazar et al. (2010)) Las crías inyectadas se monitorizaron para recuperación y se devolvieron a la madre siguiendo el procedimiento.

Ejemplo 119

Histopatología

Después de la confirmación del genotipo, los animales fueron humanitariamente sacrificados a los 10 días de edad. A esta edad, los ratones K14 son asintomáticos. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 150 mg/kg de pentobarbital sódico ((Euthasol, Virbac Inc, Forth Worth, TX) y se perfundieron por una infusión intracárdica de cloruro sódico enfriado al 0,9 %. Se sacaron los cerebros y se fijaron posteriormente en 4 % de paraformaldehído durante 72 horas. Se transfirió el tejido a PBS y se incorporó en parafina. Se cortaron secciones sagitales de 5 µm de espesor y se tiñeron como se describe a continuación. Se evaluaron la gliosis y la presencia de células del linaje de macrófagos por medio de tinción de proteínas ácidas fibrilares de la glía y expresión de marcadores de pan-macrófagos CD68 y F4/80 usando el sistema Leica Bond Max Immunostainer (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Tinción de GFAP: Se colocaron secciones de parafina sobre portaobjetos de montaje y se procesaron usando el sistema Bond Polymer Refine IHC (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) bloqueado durante 10 minutos en bloque de proteína sin suero (Dako systems, Glostrup, Dinamarca), se incubaron durante 30 minutos en una dilución 1:1500 de anticuerpo anti-GFAP primario en diluyente de anticuerpos Dako (Dako, Glostrup, Dinamarca), y se tiñeron usando el kit de detección Bond Polymer Refine (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Tinción de F4/80: Se colocaron secciones de parafina sobre portaobjetos de montaje y se procesaron usando el sistema Bond Polymer Refine IHC (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), se incubaron durante 30 minutos en una dilución 1:2500 de anticuerpo de rata anti-F4/80 de ratón (eBioscience, San Diego, CA) o IgG2a de rata (eBioscience, San Diego, CA) como un control de isotipo. Entonces se incubaron los portaobjetos con una dilución 1:250 de anticuerpo secundario de conejo anti-rata (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se tiñeron usando el kit de detección Bond Polymer Refine (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Tinción de CD 68: Se colocaron secciones de parafina sobre portaobjetos de montaje y se procesaron usando el sistema Bond Polymer Refine IHC (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), se incubaron durante 30 minutos en una dilución 1:2500 de anticuerpo FA-11 de rata anti-clon CD68 de ratón (AbD Serotec, Oxford, R.U.) o control de isotipo de IgG2a de rata (AbD Serotec, Oxford, R.U.). Entonces se incubaron los portaobjetos con una dilución 1:250 de anticuerpo secundario de conejo anti-rata (Vector laboratories, Burlingame, CA) y se tiñeron usando el kit de detección Bond polymer Refine (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Para cada técnica de tinción se obtuvieron imágenes digitales a la misma exposición de regiones similares del cerebro de cada grupo experimental usando el sistema Aperio ScanScope XT (Aperio Technologies, Vista, CA). Los portaobjetos teñidos se digitalizaron en alta resolución y se destacaron seis áreas de interés en cada portaobjetos y se analizaron independientemente mediante histomorfometría. Se determinaron áreas y núcleos teñidos positivamente y se analizaron los datos cuantitativos por un análisis de la varianza unilateral, seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey usando el gráfico Pad Prism V 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se consideraron significativas las diferencias entre medias de grupos con $p < 0,05$.

Ejemplo 119

Supervivencia

Ratones K14 recibieron inyecciones intraperitoneales diarias de GZ 161 a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal como se ha descrito anteriormente. Una cohorte separada de animales también recibió inyecciones ICV de GC en los días postnatales 1, 2 y 3, seguido por inyecciones diarias IP de GZ 161. Los animales que alcanzaron la edad del destete recibieron GZ 161 en un pienso especial diseñado para proporcionar una dosis de 60 mg/kg/día. Todos los animales se monitorizaron diariamente para el desarrollo de complicaciones neurológicas. Los ratones se

sacrificaron cuando alcanzaron un punto final humanitario (incapacidad para enderezarse en el plazo de 10 segundos después de haberse colocado en posición recostada lateral) por una inyección de 150 mg/kg de pentobarbital sódico (Euthasol, Virbac Inc, Forth Worth, TX). Este momento temporal se registró como el fin de la vida y se analizó usando gráficos de Kaplan-Meier.

5 Ejemplo 120

Análisis estadístico

Los valores mostrados corresponden a medias y las barras de error representan el error estándar de la media. Se analizaron comparaciones entre grupo por un análisis de la varianza unilateral, seguido por el ensayo de múltiples comparaciones de Tukey. Se analizó la comparación de la reducción de sustrato en el útero por la prueba de la t para muestras no relacionadas con corrección de Welch. Se analizaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier usando la prueba del orden logarítmico equivalente a la prueba de Mantel-Haenszel. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se consideraron significativas las diferencias entre medias de grupo con $p < 0,05$.

Ejemplo 121

15 Acumulación de sustrato en cerebro de ratones K14

Antes de evaluar los efectos de los fármacos en lípidos cerebrales, los presentes inventores compararon los cambios dependientes del tiempo en GluCer, GalCer y GluEsf en el cerebro de ratones K14 con los de un control de ratón no mutante (WT). La **Fig. 9**, paneles A y B, muestran que en el cerebro de ratones WT, el isómero de GL-1 predominante en los primeros días de vida fue GluCer; por el día postnatal 14 (P14) el isómero predominante fue GalCer. Estos resultados están de acuerdo con los de un estudio en cerebro de rata, que encontró que GluCer se sintetiza a una tasa más alta durante la primera semana de vida y va seguido por un aumento de la síntesis de GalCer comenzando en P8 (Brenkert et al., Brain Research 36: 183-193 (1972)). La **Fig. 9**, panel A, también muestra que en ratones K14 GluCer estaba elevado 10 veces con respecto a ratones WT y que este aumento se mantuvo a través de las primeras 2 semanas de vida hasta que los ratones murieron aproximadamente en P14.

De acuerdo con modelos de ratón previos de enfermedad de Gaucher neuropática (Liu et al., PNAS 95: 2503-2508 (1998)), la **Fig. 9**, panel C, muestra que al nacer el lisoglucoesfingolípido GluEsf estaba elevado >20 veces en los cerebros del modelo de ratón K14 con respecto a ratones WT. Este aumento se mantuvo a través de las primeras 2 semanas de vida y fue incluso más alto en animales sacrificados en la fase terminal (**Fig. 9**, panel C). En compañeros de camada WT de los ratones K14, la GluEsf estuvo por debajo del umbral de detección (0,3 ng/mg de tejido). La **Fig. 9**, panel D, muestra que no pareció que estos glucoesfingolípidos y lisoglucoesfingolípidos elevados en el ratón K14 tuvieran un impacto sobre el peso del cerebro (con respecto a aquél de ratones WT). Dada la conocida toxicidad de GluEsf, se podría esperar que las estrategias terapéuticas dirigidas a reducir la acumulación de estos sustratos en el cerebro del ratón K14 tuvieran un impacto sobre las características patológicas de la enfermedad y la esperanza de vida de los animales.

35 Ejemplo 122

La administración intraperitoneal de GZ 161 reduce GluCer y GluEsf en los cerebros de ratones K14

La **Fig. 10** muestra que en comparación con los ratones K14 tratados con vehículo en el punto final humanitario (14-15 días de edad), la administración intraperitoneal (IP) diaria de GZ 161 redujo los niveles en el cerebro tanto de GluCer como GluEsf en >60 %. Los ratones K14 tratados con GZ 161 eran asintomáticos en este punto temporal. Aún cuando la administración de GZ 161 redujo significativamente los niveles de estos glucoesfingolípidos, la **Fig. 10** muestra que sin embargo se mantuvieron elevados varias veces por encima de los ratones no mutantes de la misma edad; GluEsf no se detectó en muestras analizadas de WT o compañeros de camada heterocigotos. La reducción de glucoesfingolípidos de cerebro como consecuencia de la administración de fármaco sistémico sugiere fuertemente que GZ 161 es tanto capaz de atravesar la barrera hematoencefálica como de inhibir su enzima diana, GCS.

45 Ejemplo 123

La administración intraperitoneal de Gz 161 reduce la tinción de la microglía/de macrófagos en todo el cerebro de ratones K14

Se pueden detectar células del linaje mielóide en el cerebro murino usando anticuerpos para antígenos tales como F4/80 y CD68. F4/80 es una glucoproteína transmembranaria encontrada en la microglía y macrófagos ramificados (quiescentes), mientras que CD68 es una proteína lisosómica expresada a niveles relativamente altos en macrófagos y microglía activada (reactiva), y a niveles más bajos en microglía ramificada. La elevada tinción de F4/80 y CD68 en el cerebro puede ocurrir a través del reclutamiento de monocitos o la proliferación de microglia, y es una respuesta normal a lesión e inflamación. La **Fig. 11** muestra cualitativa y cuantitativamente que en comparación con ratones no mutantes a los 10 días de edad (P10), el cerebro de ratón K14 tiene números elevados de células CD68+ en múltiples localizaciones (hipocampo, tálamo, tronco encefálico, cerebelo). La mayor

concentración de células CD68+ se observó en el tálamo y el tronco encefálico, dos sitios que también muestran patología en pacientes de Gaucher tipo 2 (Conradi et al., *Acta Neuropathologica* 65: 99-109(1984); Conradi et al., *Acta Neuropathologica* 82: 152-157 (1991); y Wong et al., *Molecular Genetics and Metabolism* 82: 192-207 (2004)). La **Fig. 11** también muestra que la administración sistémica de GZ 161 reduce los números de células CD68+ en todas estas localizaciones; el tratamiento también redujo las células CD68+ en el bulbo olfativo y la corteza frontal (datos no mostrados). De acuerdo con la histopatología de CD68, la **Fig. 12** muestra elevada tinción de F4/80 con respecto a animales WT en ratones K14 tratados con vehículo en P10. Las inyecciones IP diarias de GZ 161 redujeron los números de células F4/80+ en el tálamo y el tronco encefálico, pero tuvieron efectos marginales en otras regiones del cerebro. Tomados junto con los datos de CD68, estos resultados sugieren que el tratamiento sistémico del ratón K14 con GZ 161 da como resultado números reducidos de macrófagos/microglía en múltiples regiones del cerebro.

Ejemplo 124

La administración intraperitoneal de GZ 161 reduce la gliosis en varias regiones del cerebro de ratones K14

Los astrocitos pueden experimentar hipertrofia o proliferar en respuesta a inflamación y daño o muerte neuronal, un proceso conocido como astrogliosis. La proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) es una proteína de filamento intermedia que se expresa en gran medida en astrocitos activados (reactivos) y, por tanto, se puede usar para monitorizar la astrogliosis. La **Fig. 13** muestra que en P10 la tinción de GFAP aumentó en comparación con niveles de WT en varias regiones del cerebro (hipocampo, tálamo, tronco encefálico, cerebelo) del ratón K14, que indica la presencia de astrocitos reactivos. La **Fig. 13** también muestra que el tratamiento sistémico de ratones K14 con GZ 161 condujo a tinción reducida de GFAP en el hipocampo y el cerebelo en P10; la tinción se redujo en el bulbo olfativo y la corteza frontal (datos no mostrados). Así, estos resultados de GFAP están de acuerdo con los anteriores datos de macrófago/microglía que demuestran que el ratón K14 tiene probablemente un proceso inflamatorio en curso que se puede atenuar hasta cierto grado por la administración sistémica de GZ 161.

Ejemplo 125

La administración intraperitoneal de GZ 161 aumenta la supervivencia de ratones K14

Dados los efectos positivos del tratamiento con GZ 161 en glucoesfingolípidos de cerebro e histopatología, los presentes inventores se preguntaron si estos efectos se traducían en un aumento de la supervivencia del ratón K14. La **Fig. 14** demuestra que los ratones K14 tratados con vehículo tienen una mediana de la esperanza de vida de 15 días, de acuerdo con nuevos hallazgos previos en este modelo de ratón (Cabrera-Salazar et al. (2010)). El tratamiento sistémico (IP) de ratones K14 con GZ 161 produjo una extensión en la mediana de la esperanza de vida hasta 18 días ($p < 0,0001$), de acuerdo con un beneficio de los efectos moleculares y celulares del fármaco en el cerebro mostrados anteriormente.

En experimentos previos, se mostró en el ratón K14 que las inyecciones intracerebroventriculares neonatales (P1-P3) de GC podrían prolongar la mediana de la supervivencia aún más, concretamente, a 23 días (Cabrera-Salazar et al. (2010)). Debido a que GC y GZ 161 tienen ambos el potencial para reducir los niveles del mismo glucoesfingolípido, concretamente GluCer (GC degradando GluCer; GZ 161 inhibiendo su síntesis), los presentes inventores también se preguntaron si la combinación de Gz161 y la administración intracerebroventricular (ICV) de GC proporcionaría el beneficio de supervivencia superior al resultante de cada agente individual. La **Fig. 14** demuestra que la combinación de GC ICV (en P1, 2, 3) y Gz161 IP diario condujeron a una mediana de la supervivencia de 26 días, significativamente superior a GZ 161 solo o GC ICV ($p = 0,0007$). Así, la administración sistémica de GZ 161 parece ser aditiva a GC ICV, y proporciona beneficio de supervivencia adicional.

Ejemplo 126

La administración prenatal de GZ 161 no consigue aumentar la supervivencia de ratones K14

Debido a que se encontró que la GluEsf en el cerebro de ratón K14 era elevada al menos 10 veces con respecto a lo normal en P1, y se ha documentado que GluEsf es elevada en los cerebros de ratones y seres humanos afectados por nGD incluso prenatalmente (Orvisky et al., *Pediatric Research* 48: 233-237 (2000)), se investigó si se podría obtener una ventaja de supervivencia tratando ratones K14 con GZ 161 en el útero. La **Fig. 15** muestra que tratar madres de ratones WT con GZ 161 condujo a una reducción de ~5 veces en los niveles de GluCer en el cerebro del ratón recién nacido (P0), sugiriendo que GZ 161 podría atravesar la barrera hemato-placentaria. Sin embargo, el administrar a las madres K14 GZ 161 y luego tratar las crías resultantes IP con GZ 161 no consiguió prolongar la supervivencia más allá de la de los ratones administrados con GZ 161 sistémico postnatalmente solo (18 días) (**Figs. 14 y 16**). Estos datos están así de acuerdo con los resultados descritos en la **Fig. 14**, e implican que aunque GZ 161 puede efectuar reducciones en los glucoesfingolípidos y la neuropatología, la pauta de tratamiento actual es insuficiente para rescatar el SNC. Estos resultados están de acuerdo con los resultados previos de los presentes inventores en este modelo que usan inyecciones intracerebroventriculares de glucocerebrosidasa humana recombinante (Cabrera-Salazar et al. (2010)), y juntos sugieren que será necesario un empobrecimiento más robusto y continuo de los glucoesfingolípidos tales como GluCer para mejorar la supervivencia adicional.

Estos datos muestran tanto cualitativa como cuantitativamente que la administración sistémica (IP) de GZ 161 a ratones K14 neonatos reduce significativamente la carga de sustrato, mejora las características patológicas de la enfermedad y aumenta la mediana de la esperanza de vida. Cuando se combina con rhGC suministrado ICV, la administración sistémica de GZ 161 produjo un aumento aditivo en la esperanza de vida, que implica que dicha combinación podría ser más eficaz que cualquier monoterapia sola en pacientes con nGD. Dadas las implicaciones de estos estudios de que GZ 161 puede aparentemente atravesar la BBB e inhibir su enzima diana, la glucosilceramida sintasa, es razonable asumir que esta molécula también se podría usar para tratar otras LSDs resultantes de una acumulación de sustratos aguas abajo de GluCer.

Es importante observar que en los estudios actuales, GZ 161 se administró a ratones K14 en un marco temporal en el que GluCer y GluEsf estaban siendo producidos en el cerebro de ratones en desarrollo a niveles relativamente altos en comparación con ratones WT (Fig. 9); Brenkert et al., 1972). El tratamiento IP diario con GZ 161 redujo satisfactoriamente, pero no normalizó GluCer y GluEsf en el cerebro de K14 (Fig. 10). Existen varias líneas de evidencia que sugieren que GluEsf y otros lisoesfingolípidos tales como galactosilesfingosina pueden contribuir a la patología del SNC iniciando la producción de mediadores inflamatorios Giri et al., Journal of lipid research 47: 1478-1492 (2006) y Gräler et al., Molecular and Cell Biology of Lipids 1582: 168-174 (2002). La capacidad de GZ 161 para reducir GluEsf y dar como resultado simultáneamente una tinción reducida de macrófagos/microglía y astrocitos (Figs. 11-13) está de acuerdo con esta hipótesis. Debido a que GluEsf también tiene propiedades neurotóxicas conocidas (Schueler et al., Neurobiology of Disease 14: 595-601 (2003); Orvisky et al., Molecular Genetics and Metabolism 76: 262-270 (2002); Sun et al., Hum Mol Genet 19: 1088-1097 (2010); y Pelled et al., Journal of Inherited Metabolic Disease 23: 175-184 (2000)), la incapacidad del tratamiento con GZ 161 para normalizar GluEsf está de acuerdo con GluEsf como posible contribuyente a la muerte temprana observada en este modelo.

Tomados juntos, los resultados preclínicos en el modelo de ratón K14 mostrado aquí sugieren que la administración de GZ 161 puede mitigar la progresión de enfermedad y los síntomas neurológicos en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 2 y tipo 3. Sin embargo, es difícil predecir los posibles beneficios de dicho enfoque terapéutico en los pacientes sintomáticos de tipo 2 puesto que se conoce que sus cerebros contienen niveles muy altos de GluEsf que datan de la vida prenatal. Goker-Alpan et al., The Journal of Pediatrics 143: 273-276 (2003). La enfermedad de Gaucher tipo 3 puede ser más susceptible al tratamiento puesto que los niveles de GluEsf en el cerebro son más bajos (Nilsson, J Neurochem 39: 709-718 (1982)), la progresión de la enfermedad es más lenta a pesar de ser parte de un continuo fenotípico (Goker-Alpan et al. (2003)), y en algunos casos los pacientes se pueden identificar por análisis mutacional antes de la aparición del fenotipo neuropático (Ida et al., Human Genetics 105: 120-126 (1999)). Basándose en los resultados actuales, parecería que será necesario un enfoque temprano, agresivo, para tratar estos pacientes. Los inhibidores de molécula pequeña de glucosilceramida sintasa pueden representar un brazo de un enfoque exhaustivo.

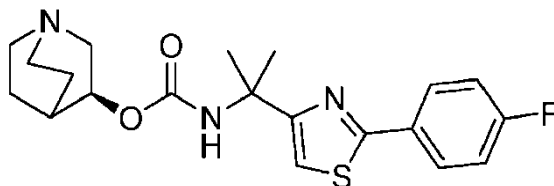
Ejemplo 127

SMT de ratones con Fabry macho y hembra tratados con GZ 452, GZ 161 y GZ 638.

Los ratones con Fabry comenzaron su tratamiento a ~8 meses de edad y se trataron durante 4 meses con: 60 mg/kg/día de GZ 452 (Fab 452@ 60mkd), 120 mg/kg/día de GZ 452 (Fab 452 @120mkd), 20 mg/kg/día de GZ 161 (Fab 161 @20mkd), 300 mg/kg/día de GZ 638 (Fab 638 @300 mkd). Se probaron tejido renal de ratones con Fabry macho y hembra de 12 meses de edad para niveles de Gb3. Como se muestra en la FIG. 17, GZ 161 y GZ 452 redujeron significativamente la cantidad de Gb3 presente en tejido renal con respecto a los controles no tratados (Fab UNT 12mo). GZ 161 y GZ 638 son compuestos de la divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural,



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.
3. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico resulta de un defecto en la vía de glucoesfingolípido.
- 10 4. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en Gaucher, Fabry, gangliosidosis de G_{M1} , deficiencia del activador de G_{M2} , Tay-Sachs y Sandhoff.
5. El compuesto para su uso según la reivindicación 4, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Fabry.
- 15 6. El compuesto para su uso según la reivindicación 4, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Gaucher tipo 2 o tipo 3.
7. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde dicho uso comprende además la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima lisosómica.
8. El compuesto para su uso según la reivindicación 7, en donde la enzima lisosómica se selecciona del grupo que consiste en glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, hexosaminidasa A, hexosaminidasa B y gangliósido G_{M1} - β -galactosidasa.
- 20 9. El compuesto para su uso según la reivindicación 8, en donde la enzima lisosómica es alfa-galactosidasa A.
10. El compuesto para su uso según la reivindicación 8, en donde la enzima lisosómica es glucocerebrosidasa.
11. El compuesto para su uso según la reivindicación 7, en donde antes del tratamiento el sujeto tiene niveles elevados de un sustrato lisosomal.
- 25 12. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por glucosilceramida sintasa (GCS) o una enfermedad o trastorno en el que participa GCS, en donde dicha enfermedad o trastorno es cáncer, o un trastorno metabólico.
13. Un método de inducción de actividad catalítica reducida de glucosilceramida sintasa en una célula, *in vitro*, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.
- 30 14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. El compuesto de la reivindicación 1, para su uso en terapia.

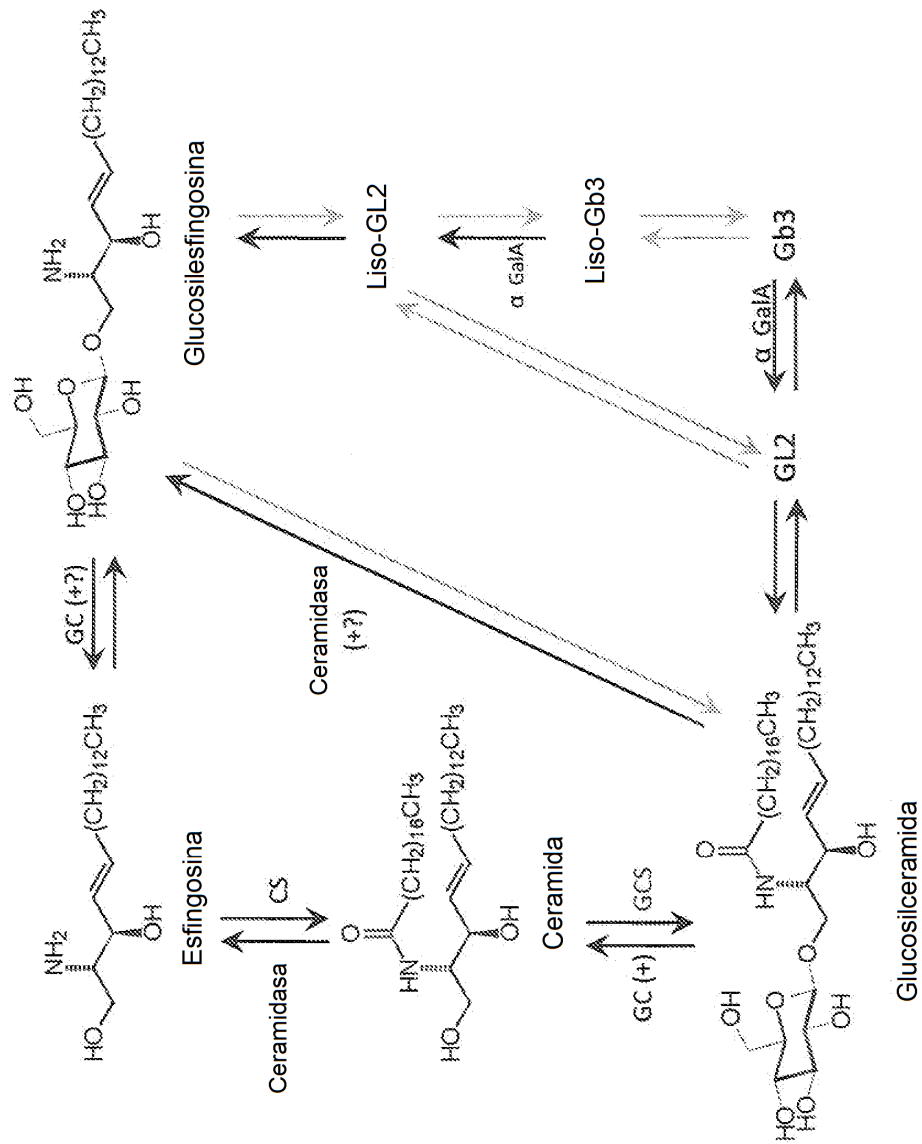


Figura 1

Estructura química de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

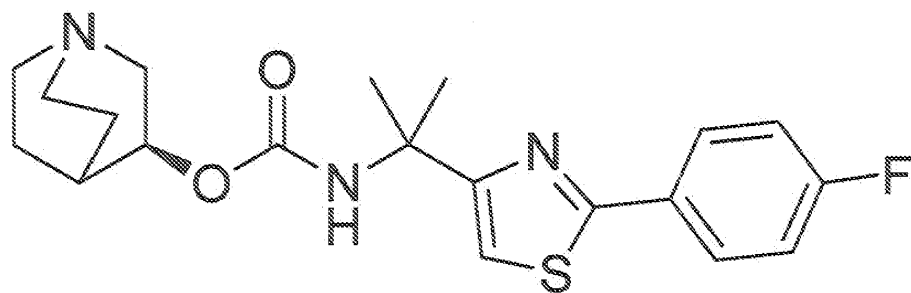


Fig. 2A

Estructura química de (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo

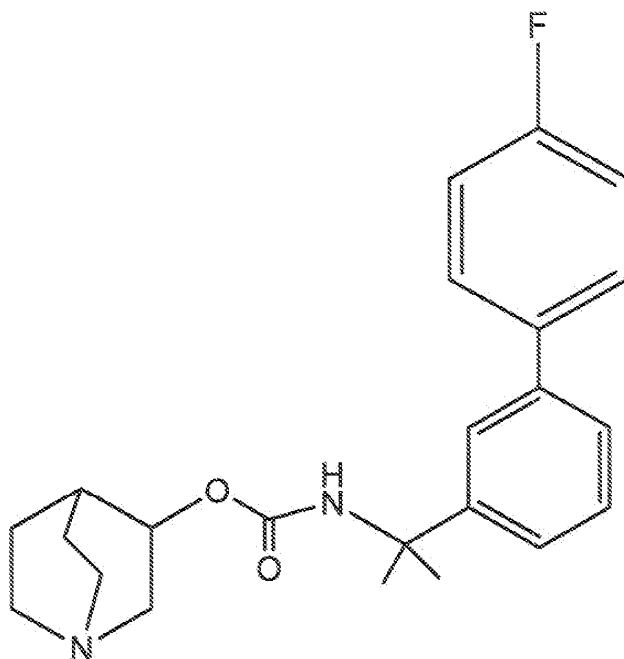
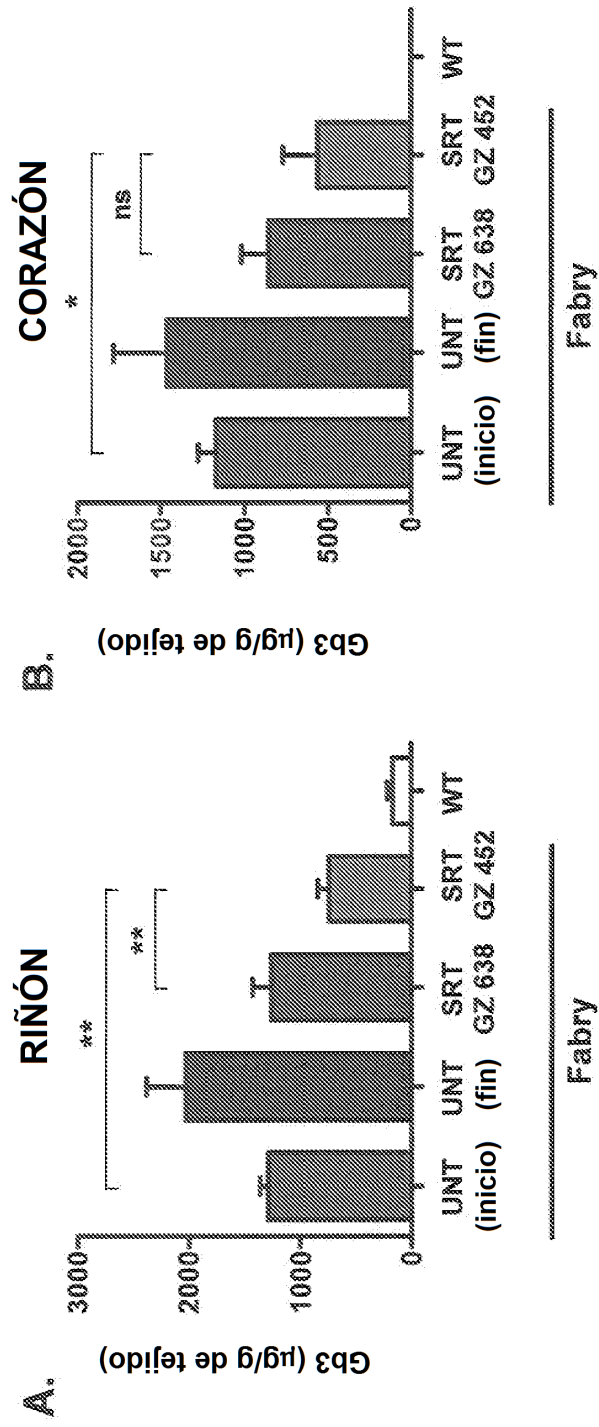


Fig. 2B



Barras de error = DE; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns = no significativo

Figura 3

SRT a largo plazo en ratones con Fabry de diferente edad

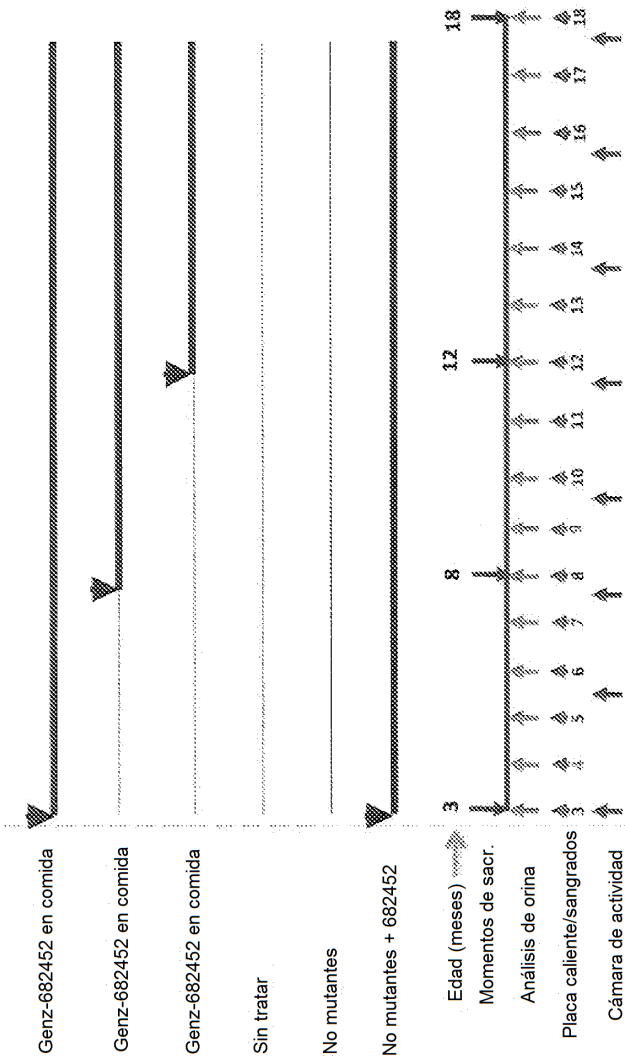
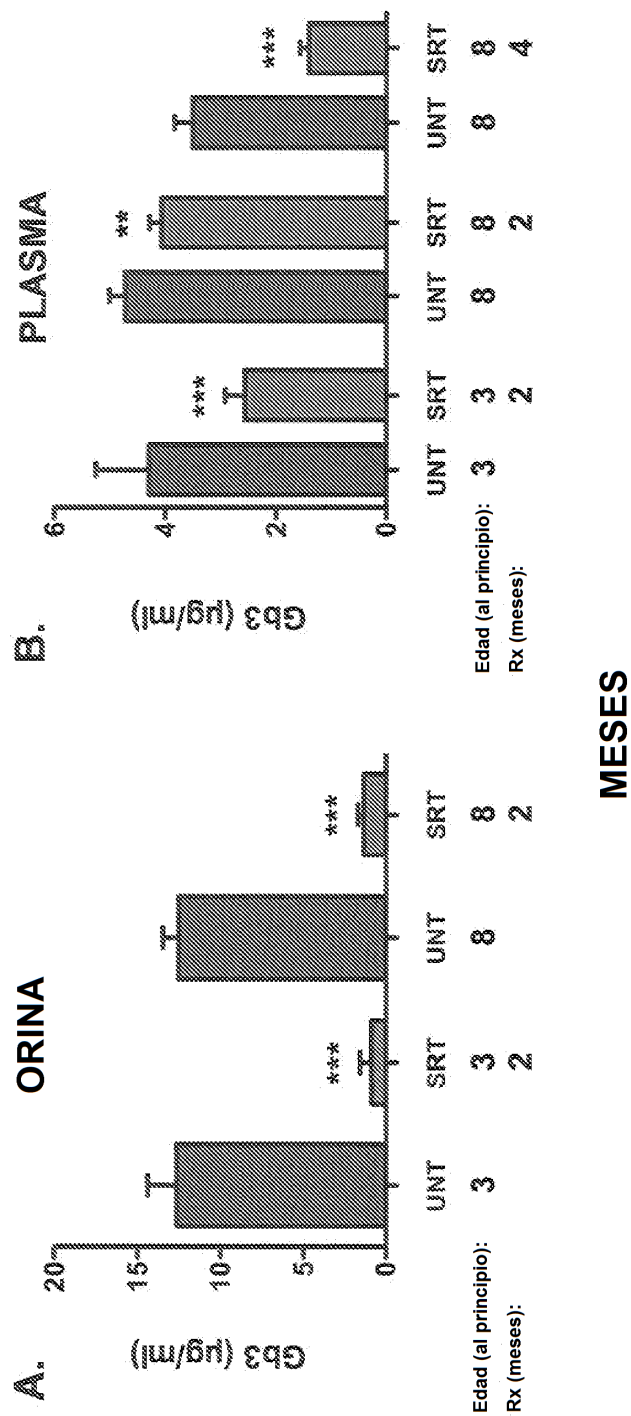
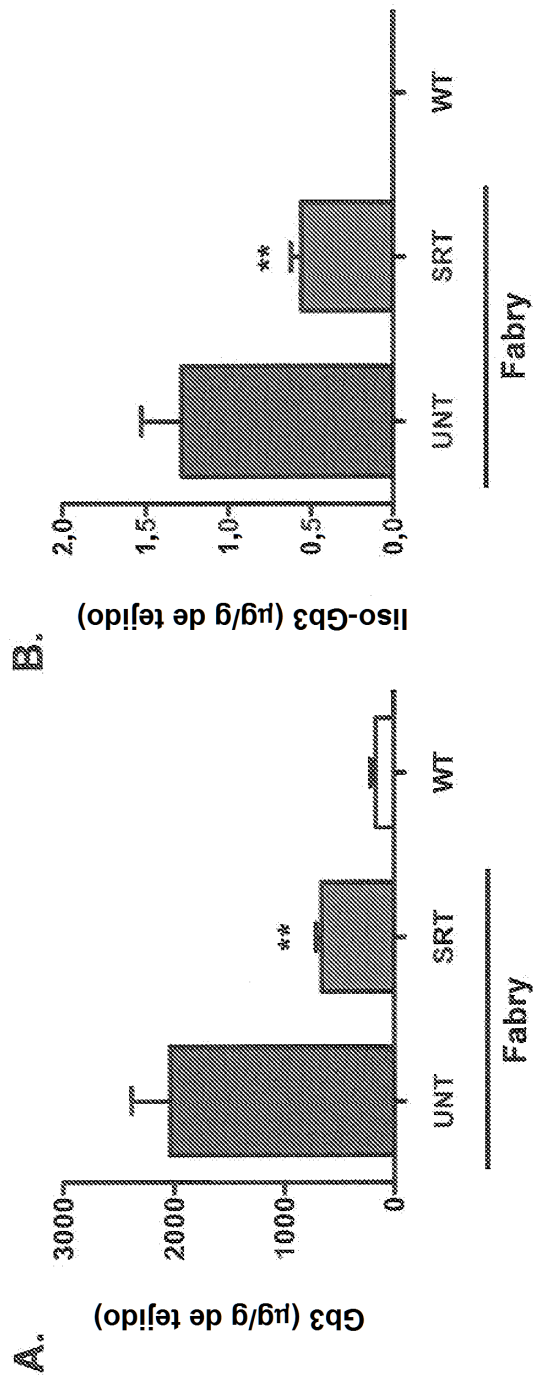


Figura 4A



Barras de error = DE; P (relativo a UNT de la misma edad) < ** = 0,01, *** = 0,001.

Figura 4B



Barras de error = DE; P (relativo a UNT) < ** = 0,01.

Figura 5

Cronología para ERT ± en ratón con Fabry

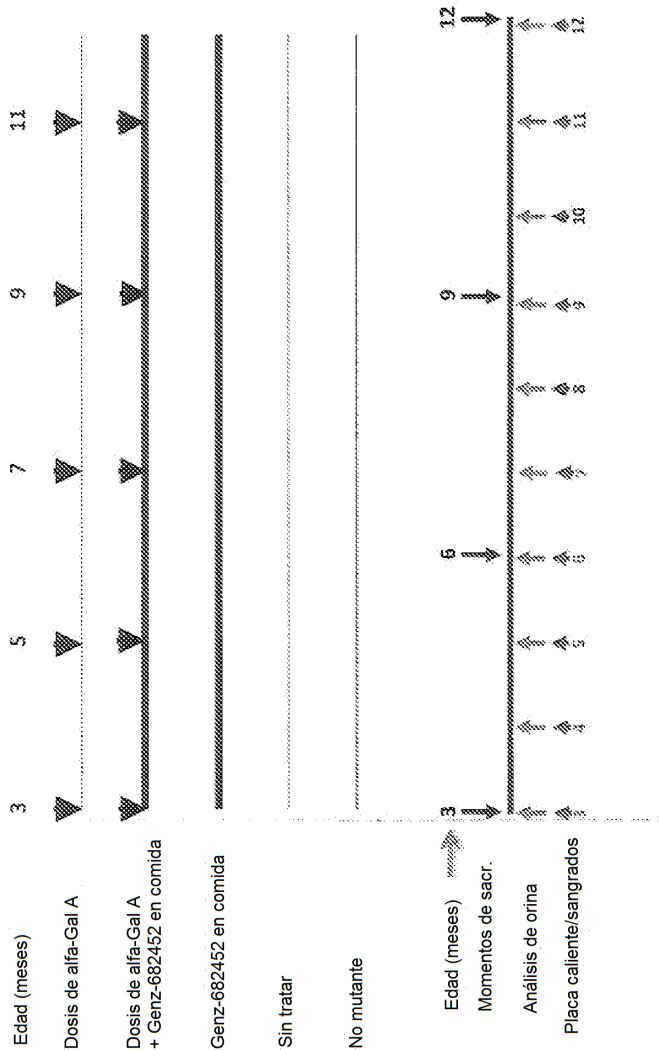
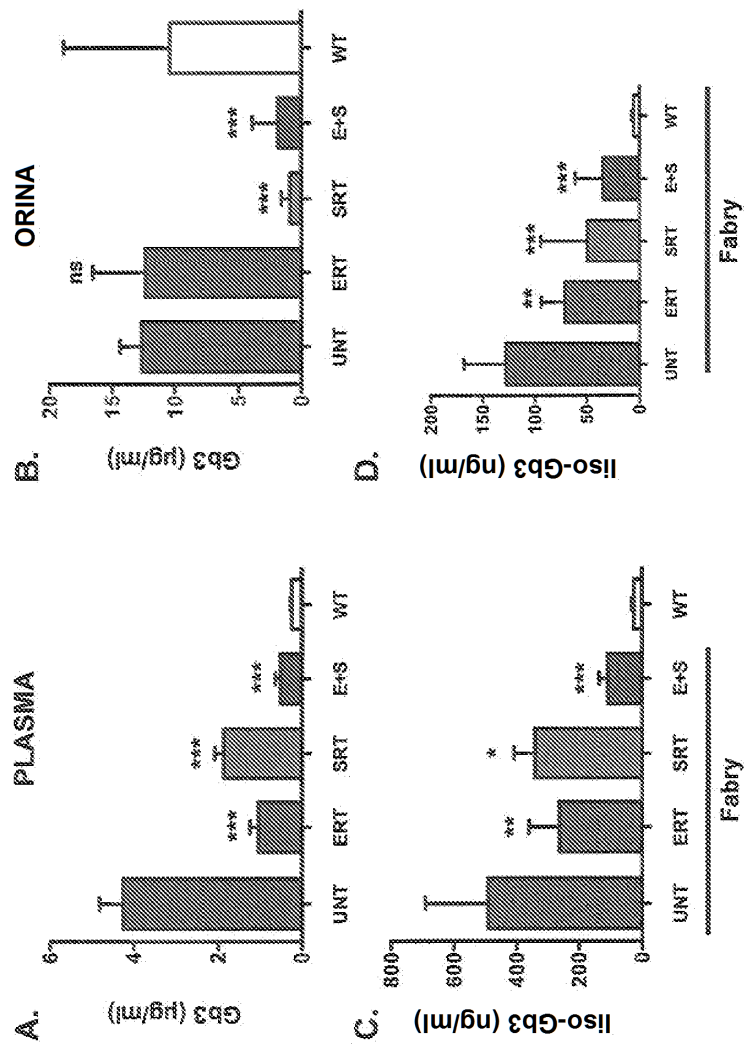


Figura 6A



Barras de error = DE; P (relativo a UNT) < * = 0,05, ** = 0,01, *** = 0,001, ns = no significativo.

Figura 6B

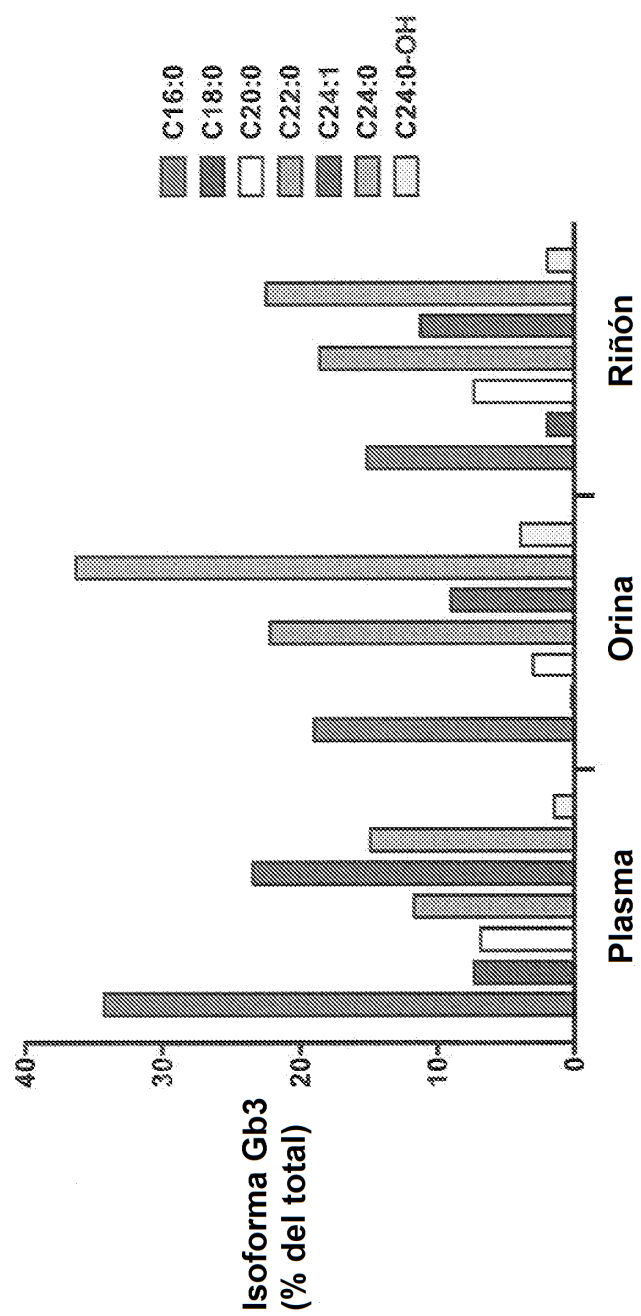
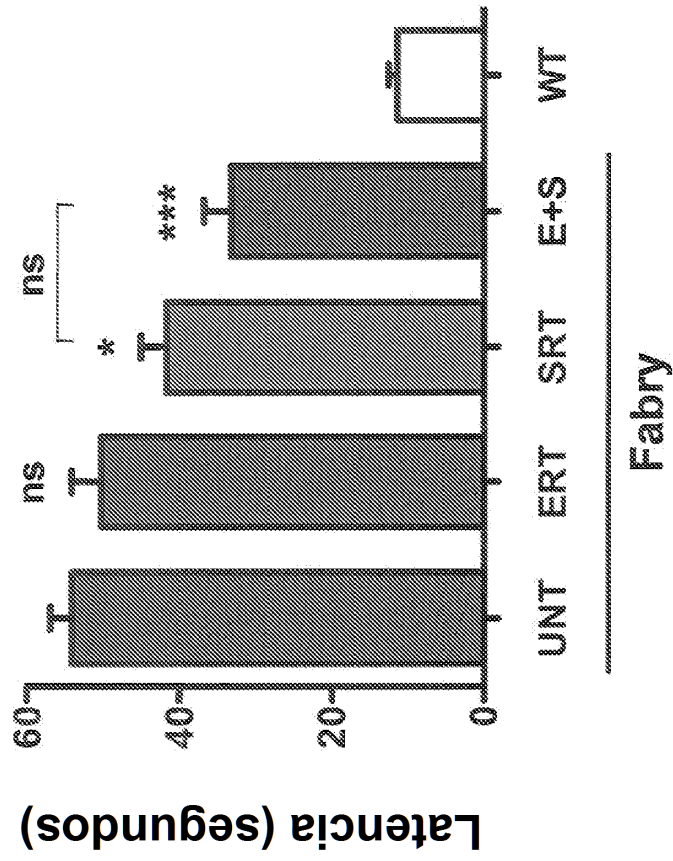


Figura 7



Barras de error = EEM; N = 12 ratones/grupo; P (relativo a UNT a menos que se indique lo contrario) < * = 0,05, *** = 0,001, ns = no significativo.

Figura 8

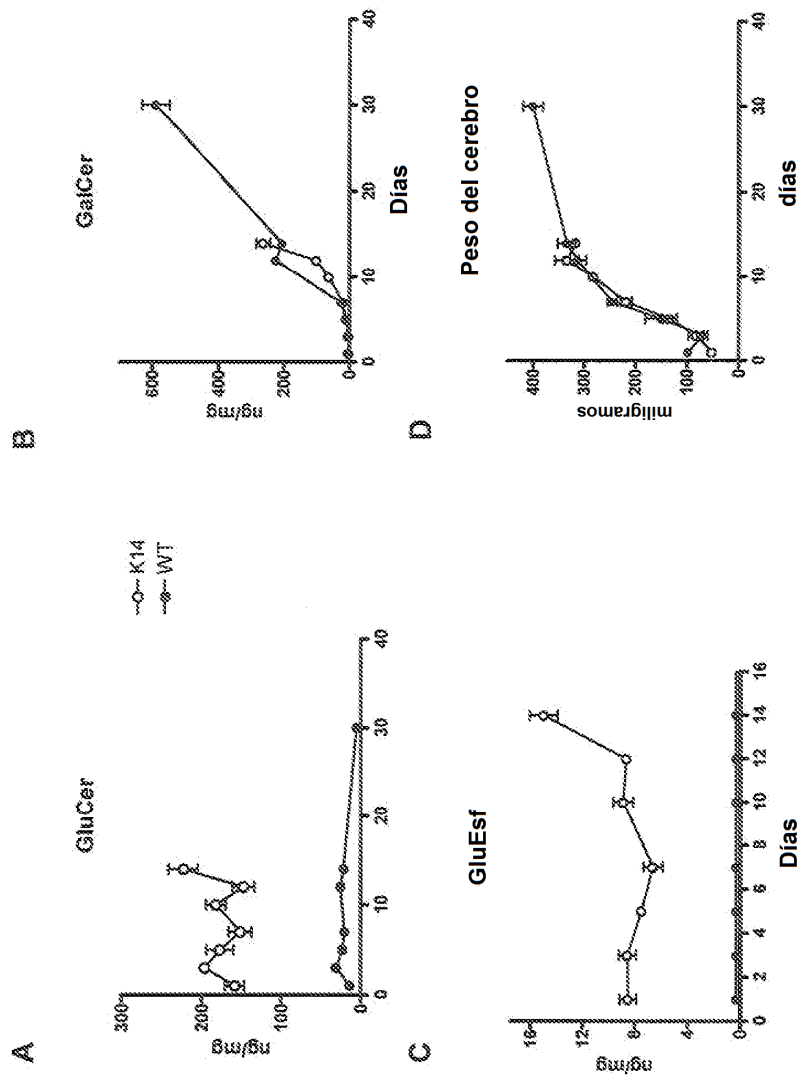


Figura 9

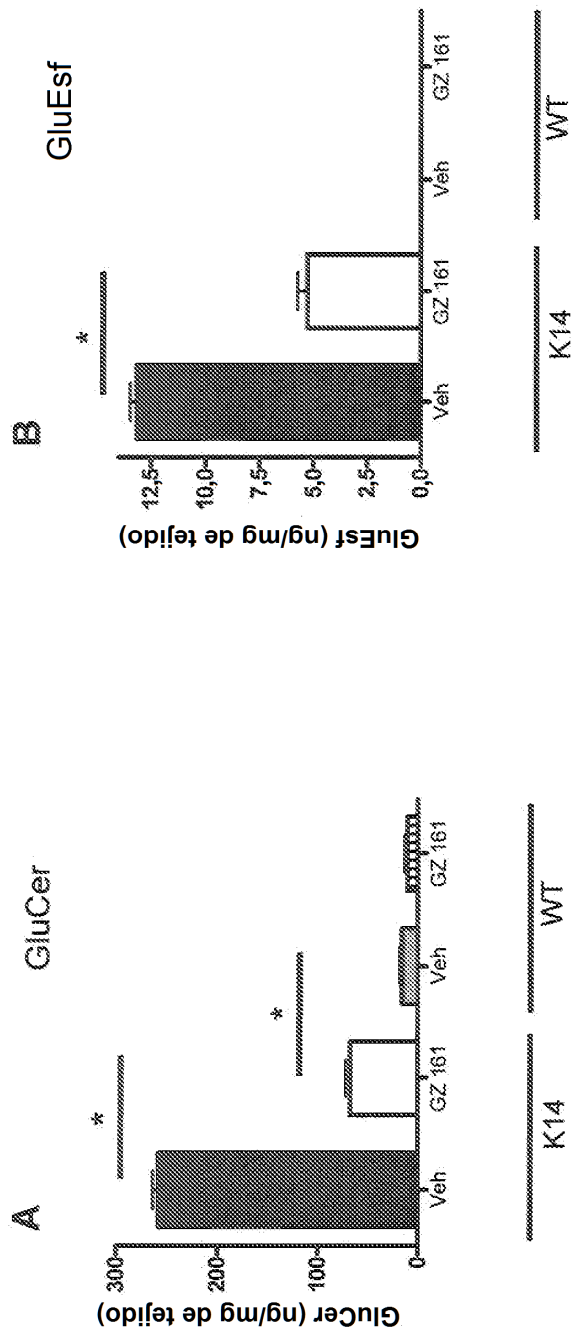


Figura 10

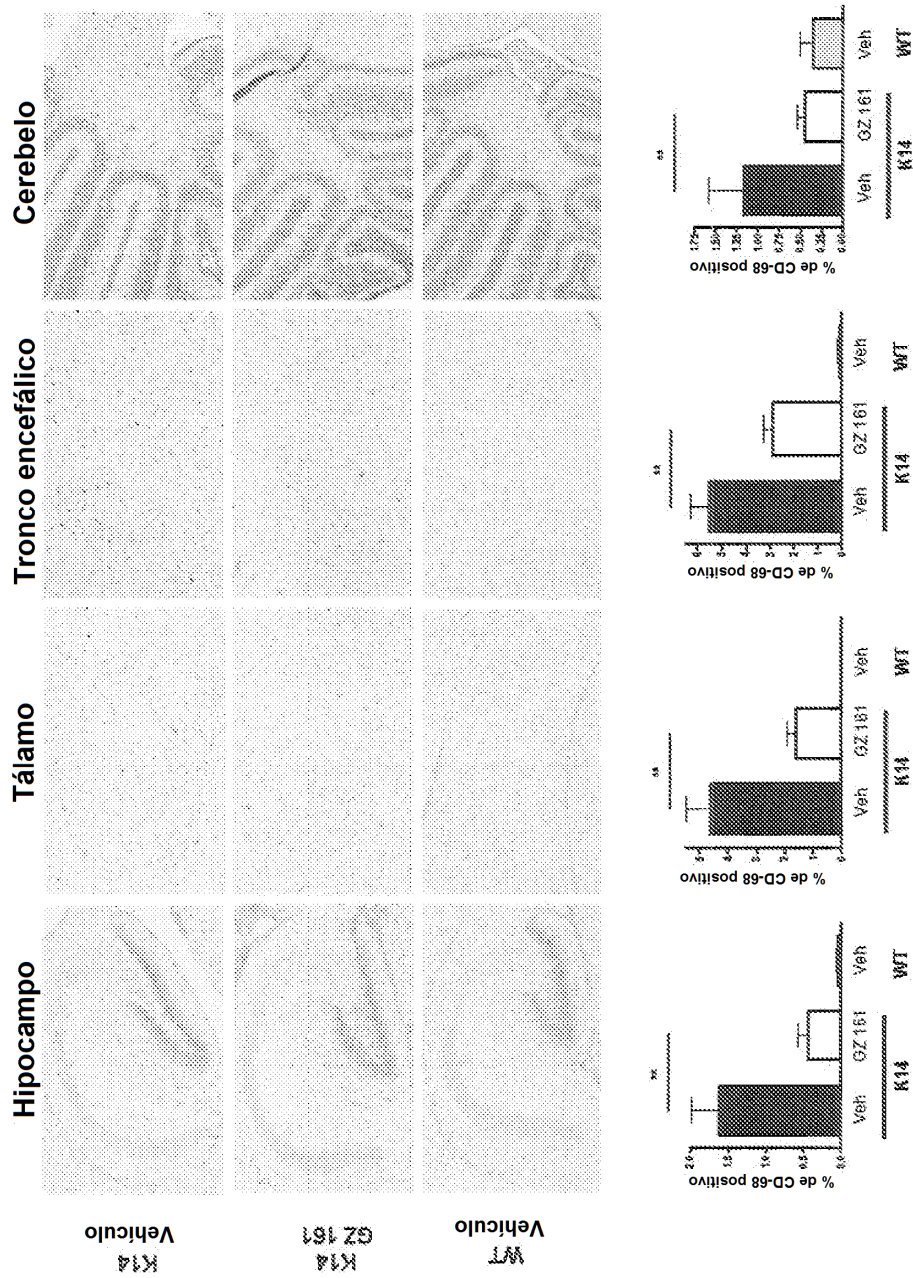


Figura 11

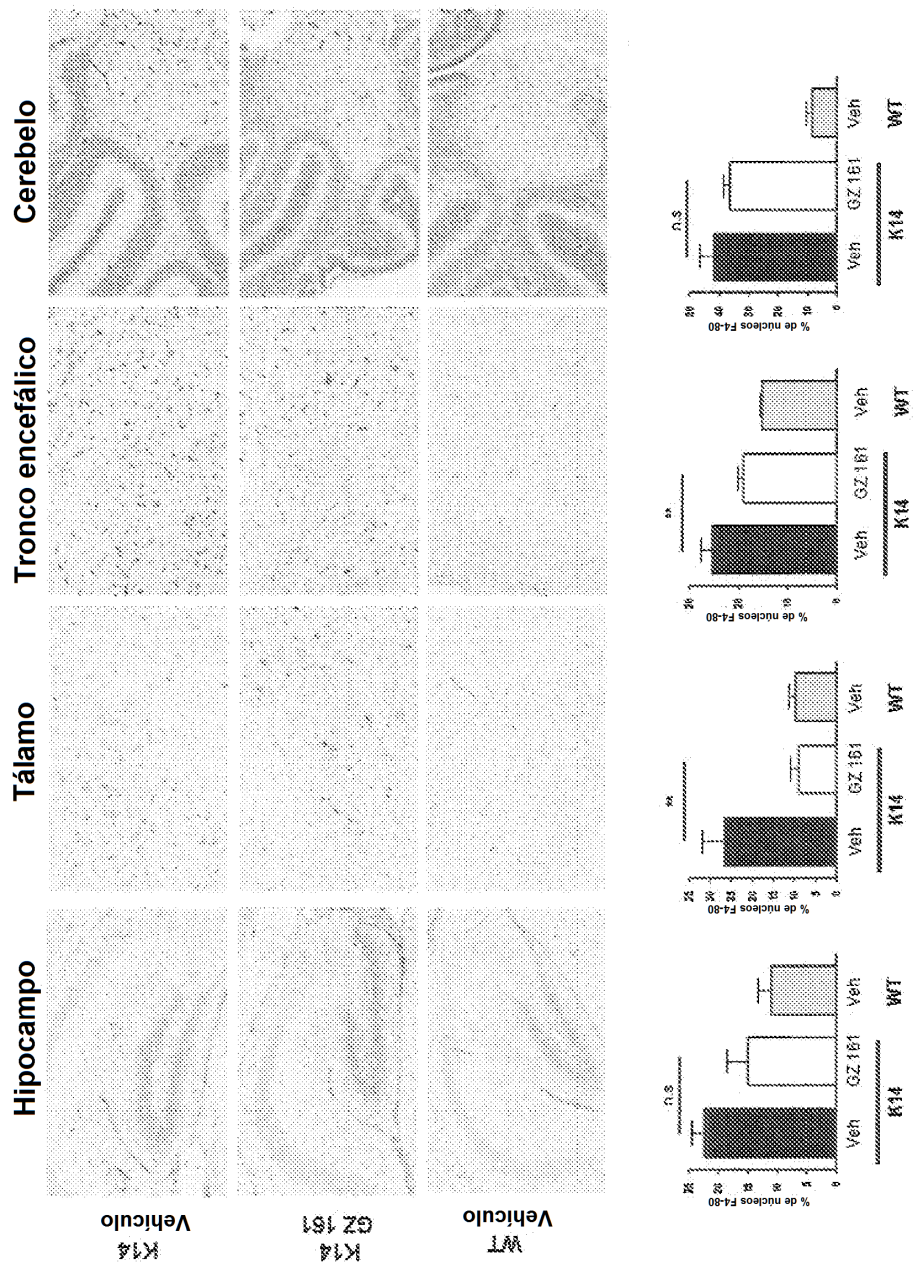


Figura 12

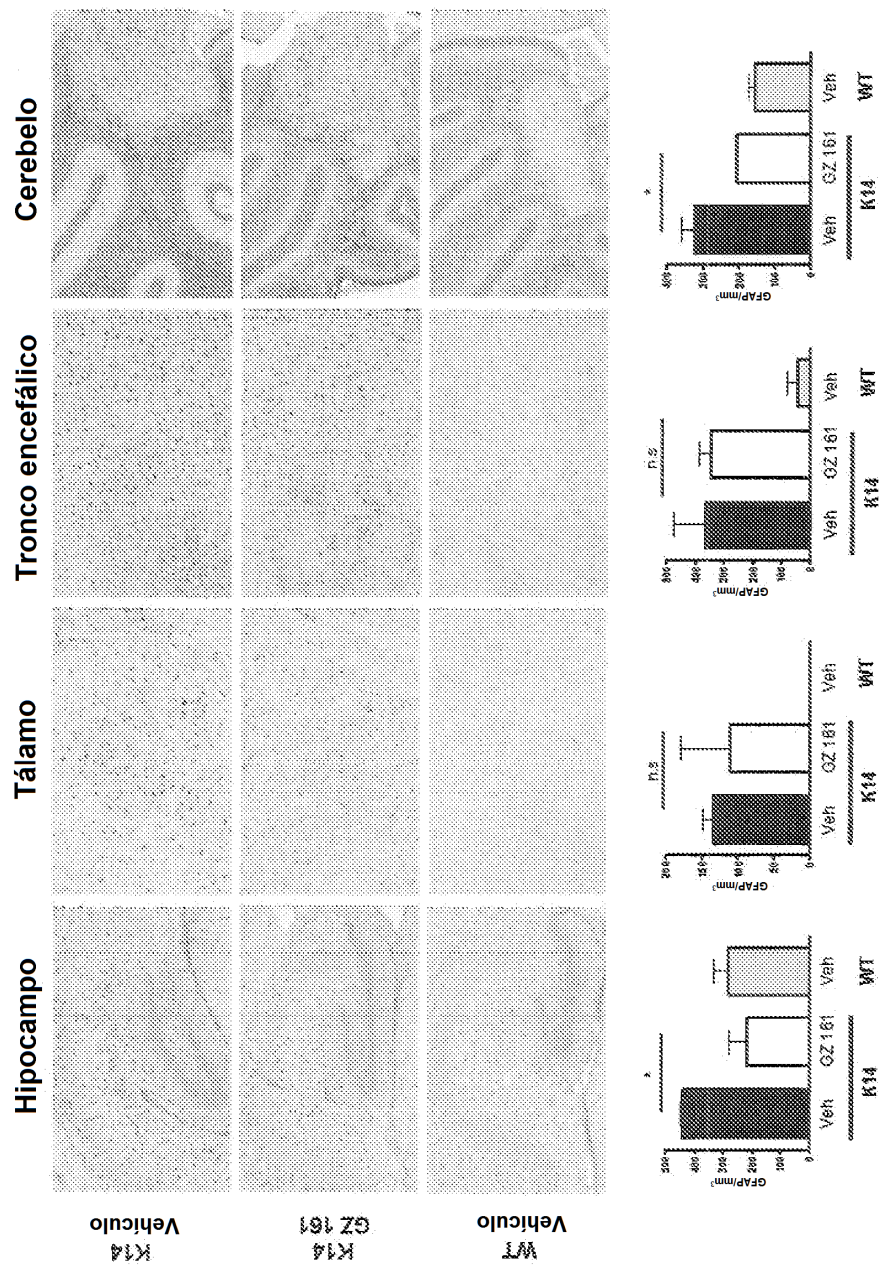


Figura 13

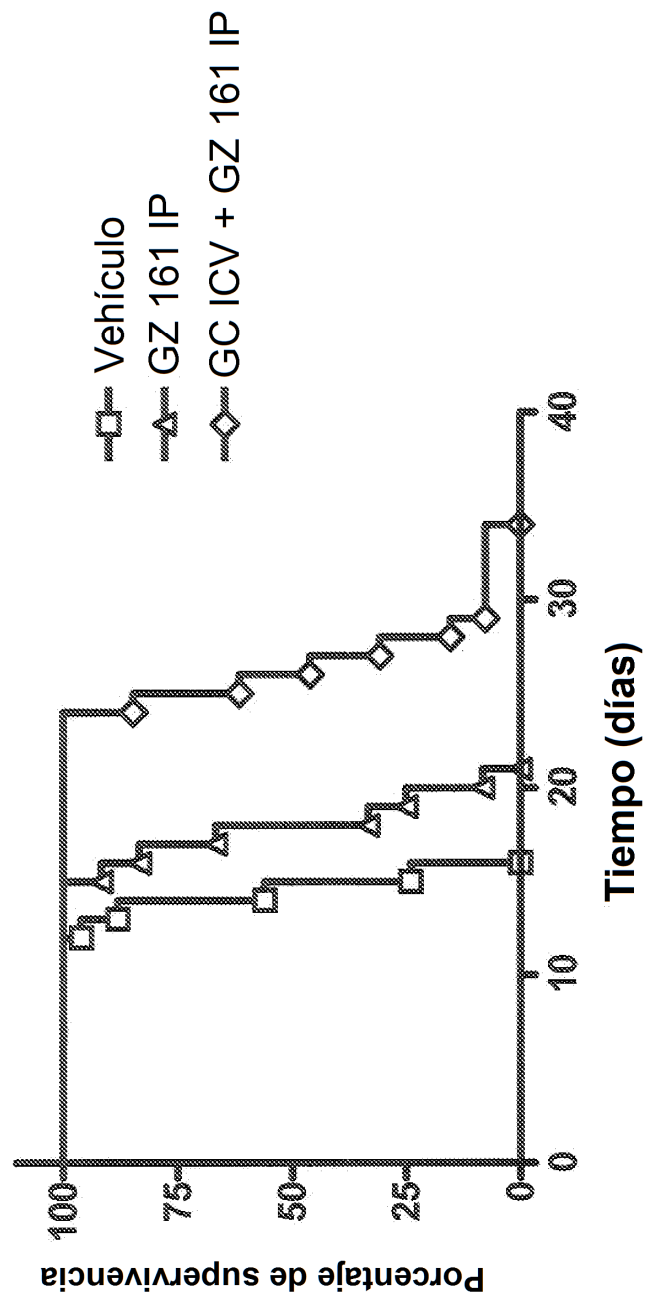


Figura 14

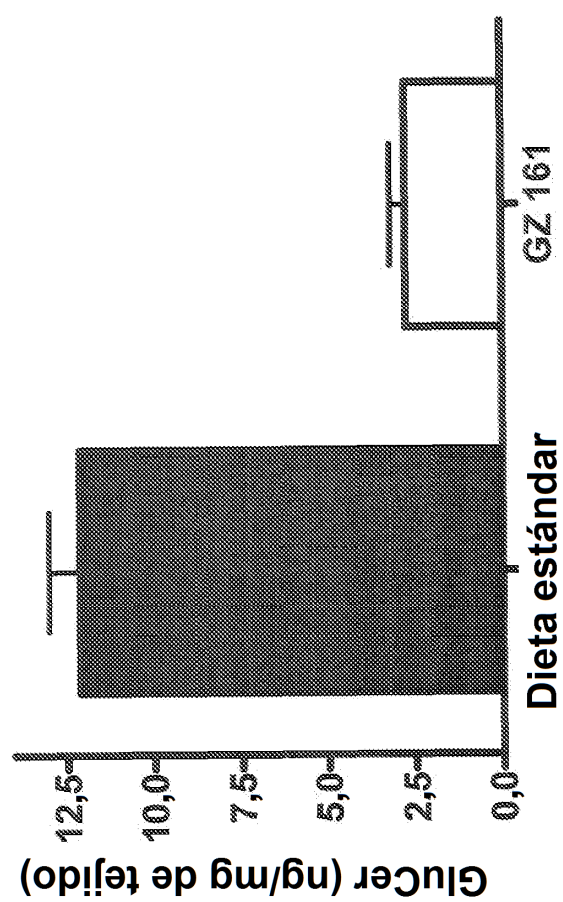


Figura 15

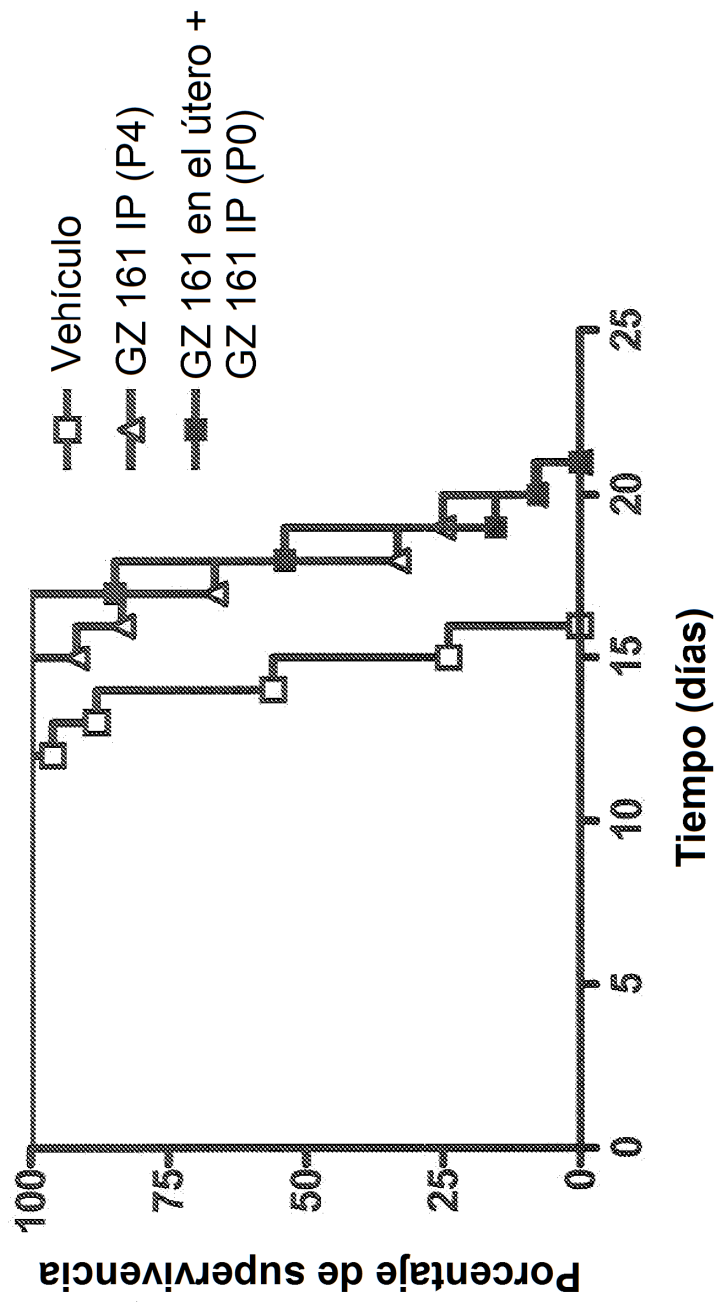


Figura 16

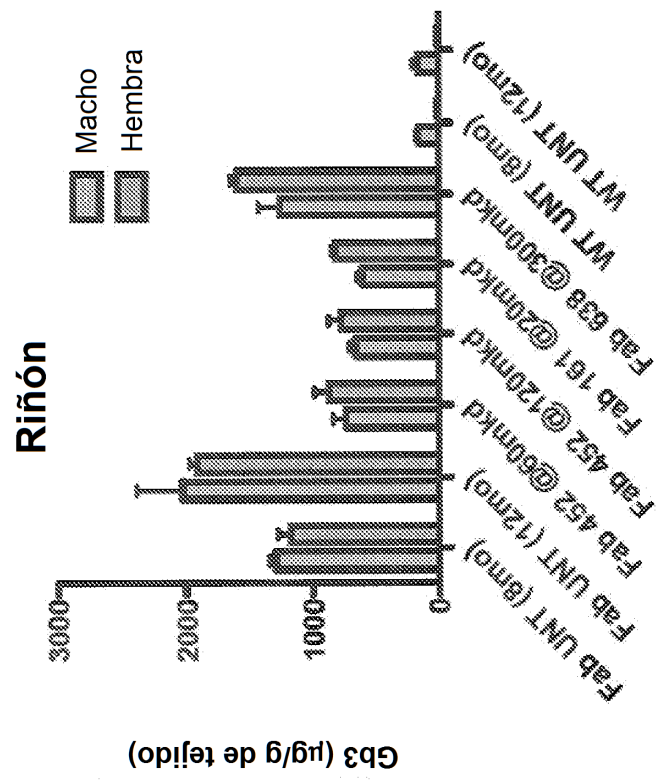


Figura 17