

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 645**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 7/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2017 PCT/US2017/016343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17139186**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2017 E 17705269 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.06.2021 EP 3414249**

54 Título: **Inhibidor de PDE1**

30 Prioridad:

12.02.2016 US 201662294329 P

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

22.11.2021

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)

Lilly Corporate Center

Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

JESUDASON, CYNTHIA DARSHINI y

REKHTER, MARK DAVID

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 879 645 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

Inhibidor de PDE1

5 La presente invención se refiere a un determinado inhibidor de PDE1, a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto y al compuesto para su uso en el tratamiento de trastornos fisiológicos.

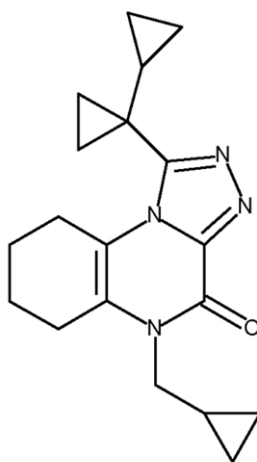
10 Las fosfodiesterasas (PDE) son enzimas que regulan los niveles celulares de AMPc y GMPc controlando la velocidad a la que se hidrolizan estos nucleótidos cíclicos. PDE1, una PDE dependiente de calcio y calmodulina, es una de al menos 11 familias de PDE conocidas. La PDE1 se expresa en muchos tejidos, incluyendo el cerebro, corazón, pulmón, riñón y músculo liso. Además, la PDE1 comprende una familia de tres isoformas conocidas, PDE1A, PDE1B y PDE1C.

15 Los pacientes que padecen diabetes a menudo desarrollan una forma de enfermedad renal crónica conocida como enfermedad renal diabética (o nefropatía diabética). Se ha estimado que la enfermedad renal diabética puede afectar hasta al 40 por ciento de los pacientes diabéticos. Las opciones de tratamiento para la enfermedad renal diabética son limitadas e incluyen el uso de medicamentos que reducen la presión arterial, el control de los niveles de glucosa en sangre, la dieta y el peso, e implementación de actividad física regular. Por tanto, existe la necesidad de opciones de tratamiento adicionales para los pacientes que padecen enfermedad renal crónica, en particular, enfermedad renal diabética.

20 El documento EP 2103613 A1 desvela derivados de quinoxalina o sales de los mismos que tienen actividad inhibidora de PDE9. El documento EP 2615096 A1 desvela un compuesto de quinoxalina que tiene una acción inhibidora de PDE9. El documento US 9.175.010 desvela determinadas azolopirimidin-5-(6H)-onas fusionadas con tiofeno, furano y piridina que son inhibidoras de PDE1 y, más particularmente, PDE1B, como útiles para el tratamiento de diversos trastornos fisiológicos, incluyendo trastornos neurológicos, cardiovasculares y renales. Además, el documento EP 25 0040401 B1 desvela determinadas triazolquinoxalin-4-onas sustituidas que poseen actividad antihipertensiva.

30 La presente invención proporciona un determinado compuesto novedoso que es un inhibidor de PDE1. Además, la presente invención proporciona un determinado compuesto novedoso que es un inhibidor selectivo de PDE1B en relación con otras PDE, tales como PDE2A, PDE3A, PDE4D, PDE5A, PDE6AB, PDE7B, PDE8A, PDE9A, PDE10A y PDE11A. Asimismo, la presente invención proporciona un determinado compuesto novedoso que puede tener efectos antihipertensivos y también puede mejorar el flujo sanguíneo renal. Además, el compuesto de la presente invención puede reducir la fibrosis renal.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



Fórmula I

40 La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en terapia. La invención proporciona además un compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal crónica. Además, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética. Además, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de la hipertensión. Asimismo, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica. Asimismo, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para la 45 fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal diabética. La invención proporciona además el uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipertensión.

La invención proporciona además una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de fórmula I con uno

o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La invención proporciona además un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar un compuesto de fórmula I con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En el presente documento se desvelan productos intermedios y procesos novedosos para la síntesis del compuesto de fórmula I.

5 Como se usan en el presente documento, los términos "tratando", "tratamiento" o "tratar" incluyen prohibir, restringir, ralentizar, detener o invertir el avance o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

10 Como se usan en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero, tal como un ratón, cobaya, rata, perro o ser humano. Se entiende que el paciente preferido es un ser humano.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la invención, que, tras la administración de una dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente en diagnóstico o tratamiento.

20 Una cantidad eficaz puede ser determinada fácilmente por el especialista en diagnóstico a cargo, como un experto en la materia, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un paciente, el especialista en diagnóstico a cargo considera numerosos factores, incluyendo, pero sin limitación: la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico implicado; el grado de o la afectación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente en cuestión; el compuesto administrado en particular; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; la posología seleccionada; el uso de medicación simultánea; y otras circunstancias relevantes.

25 El compuesto de fórmula I es eficaz en general en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente quedan dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo antes mencionado pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis aún mayores con efectos secundarios aceptables.

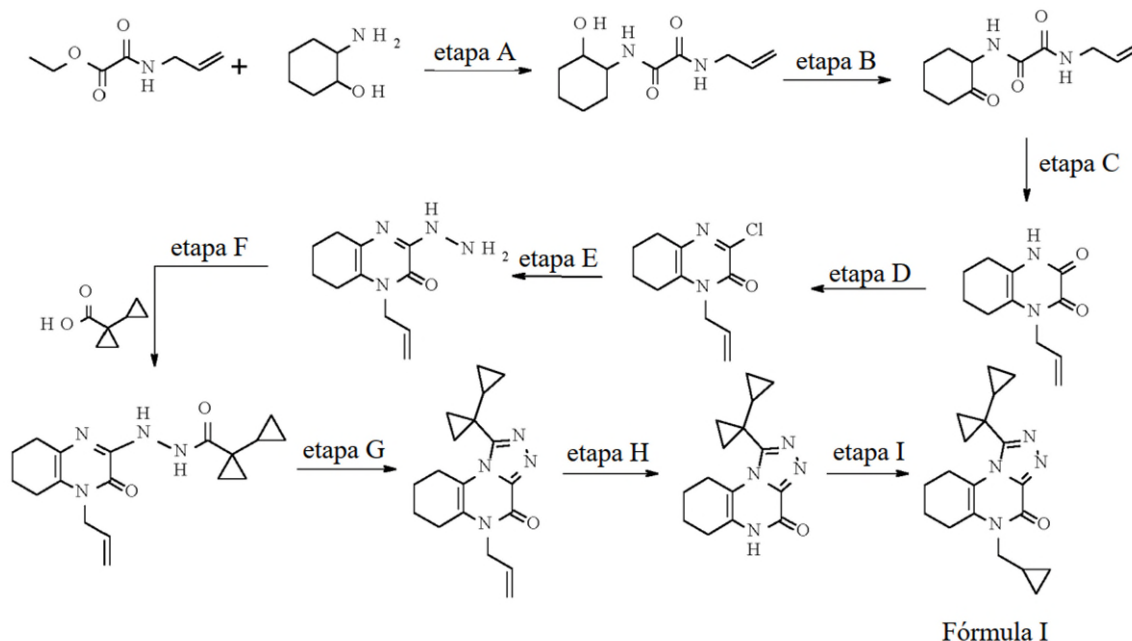
30 Los compuestos de la invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que haga que el compuesto esté biodisponible, incluyendo las vías oral y parenteral. Lo más preferentemente, dichas composiciones son para su administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procesos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. (Véase, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21^a Edición, Lippincott, Williams y Wilkins, 2006).

35 Determinadas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "AcOH" se refiere a ácido acético glacial; "DBU" se refiere a 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno; "DCE" se refiere a 1,2-dicloroetano; "DCM" se refiere a diclorometano o cloruro de metileno; "DIPEA" se refiere a N,N-diisopropiletilamina; "DMF" se refiere a N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EDCl" se refiere a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "Et₂O" se refiere a éter dietílico; "EtOH" se refiere a etanol; "HATU" se refiere a N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-ilmetil]-N-metilmetanaminio; "HMDS" se refiere a hezametildisilazano; "HOAT" se refiere a 1-hidroxi-7-azabenzotriazol; "HOBt" se refiere a hidroxibenzotriazol; "h" se refiere a hora u horas; "Cl₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; "LC-ES/MS" se refiere a espectrometría de masas por electropulverización de cromatografía líquida; "LHMDS" se refiere a bis(trimetilsilil)amida de litio; "μmol" se refiere a micromol o micromoles; "min" se refiere a minutos o minutos; "MeOH" se refiere a metanol o alcohol metílico; "MTBE" se refiere a éter *tert*-butil metílico; "NiNTA" se refiere a cromatografía con una fase estacionaria de agarosa funcionalizada con ácido nitrilotriacético como quelante; "POCl₃" se refiere a oxiclورو de fósforo; "TA" se refiere a temperatura ambiente; "TEA" se refiere a trietilamina; "TMA" se refiere a trimetilamina; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "TFAA" se refiere a anhídrido trifluoroacético; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "U/ml" se refiere a unidades por mililitro.

40 45 50 55 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante diversos procedimientos conocidos por un experto en la materia, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas, preparaciones y ejemplos a continuación. Un experto habitual en la materia reconoce que las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas pueden combinarse de diferentes formas, o junto con etapas de diferentes esquemas, para preparar compuestos de la invención. Los productos de cada etapa en los esquemas siguientes pueden recuperarse mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, triturado y cristalización. En los esquemas siguientes, todos los sustituyentes, salvo que se indique lo contrario, son como se ha definido anteriormente. Los reactivos y materiales de partida están disponibles con facilidad para un experto en la materia. Los siguientes esquemas, preparaciones y ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención.

65

Esquema 1



Fórmula I

El esquema 1 representa la síntesis del compuesto de fórmula I. En el esquema 1, etapa A, aproximadamente 1 equivalente de etil-2-(alilamino)-2-oxo-acetato se condensa con aproximadamente 1,05 equivalentes de 2-aminociclohexanol en presencia de aproximadamente 1,1 equivalentes de una base orgánica no nucleófila adecuada tal como TEA en un disolvente orgánico polar tal como EtOAc con calentamiento. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como filtración. Por ejemplo, la mezcla de reacción se enfría y el precipitado resultante se recoge por filtración, con lavado posterior con un disolvente orgánico adecuado tal como EtOAc o Et₂O y secado al vacío para proporcionar N-alil-N'-(2-hidroxiciclohexil)oxamida, el producto del esquema 1, etapa A, como una mezcla de isómeros en *cis* y *trans* de pureza suficiente para uso posterior sin purificación adicional.

En el esquema 1, etapa B, N-alil-N'-(2-hidroxiciclohexil)oxamida, el producto del esquema 1, etapa A, puede oxidarse en condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de N-alil-N'-(2-hidroxiciclohexil)oxamida se disuelve en una mezcla de disolventes orgánicos adecuada, tal como THF y DCM, y se trata con aproximadamente 1,1 equivalentes de peryodinano de Dess-Martin en presencia de un exceso de una base inorgánica adecuada tal como NaHCO₃ a 0 °C. Después de calentar a temperatura ambiente, el producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como extracción y purificación por métodos cromatográficos. De manera más específica, la mezcla de reacción se inactiva con tiosulfato de sodio acuoso y NaHCO₃ acuoso saturado. La mezcla de reacción se extrae con un disolvente orgánico adecuado tal como DCM, los extractos orgánicos combinados se secan sobre un agente secante adecuado tal como Na₂SO₄, se filtran y se concentran hasta su sequedad. El producto en bruto se somete a purificación sobre sílice usando una mezcla adecuada de disolventes orgánicos, tales como hexanos/EtOAc, para proporcionar el producto del esquema 1, etapa B, N-alil-N'-(2-oxociclohexil)oxamida.

En el esquema 1, etapa C, aproximadamente 1 equivalente de N-alil-N'-(2-oxociclohexil)oxamida, el producto del esquema 1, etapa B, se cicla en condiciones de deshidratación térmica en presencia de una mezcla de aproximadamente 1,1 equivalentes de TFA y 1,1 equivalentes de anhídrido trifluoroacético en un disolvente ácido adecuado tal como ácido acético glacial. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como evaporación y purificación por métodos cromatográficos. De manera más específica, la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se evapora a presión reducida. El producto en bruto se somete a purificación sobre sílice usando una mezcla adecuada de disolventes orgánicos, tal como MeOH/EtOAc, para proporcionar el producto del esquema 1, etapa C, 4-alil-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalin-2,3-diona.

En el esquema 1, etapa D, aproximadamente 1 equivalente del producto del esquema 1, etapa C, 4-alil-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalina-2,3-diona, se trata con un agente de cloración adecuado, tal como POCl₃, y se somete a calentamiento en un disolvente orgánico adecuado, tal como DCE. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida después de enfriar a temperatura ambiente para proporcionar el producto del esquema 1, etapa D, 1-alil-3-cloro-3,4,5,6,7,8-hexahidroquinoxalin-2-ona, adecuado para su uso posterior sin purificación adicional.

En el esquema 1, etapa E, aproximadamente 1 equivalente de 1-alil-3-cloro-3,4,5,6,7,8-hexahidroquinoxalin-2-ona, el

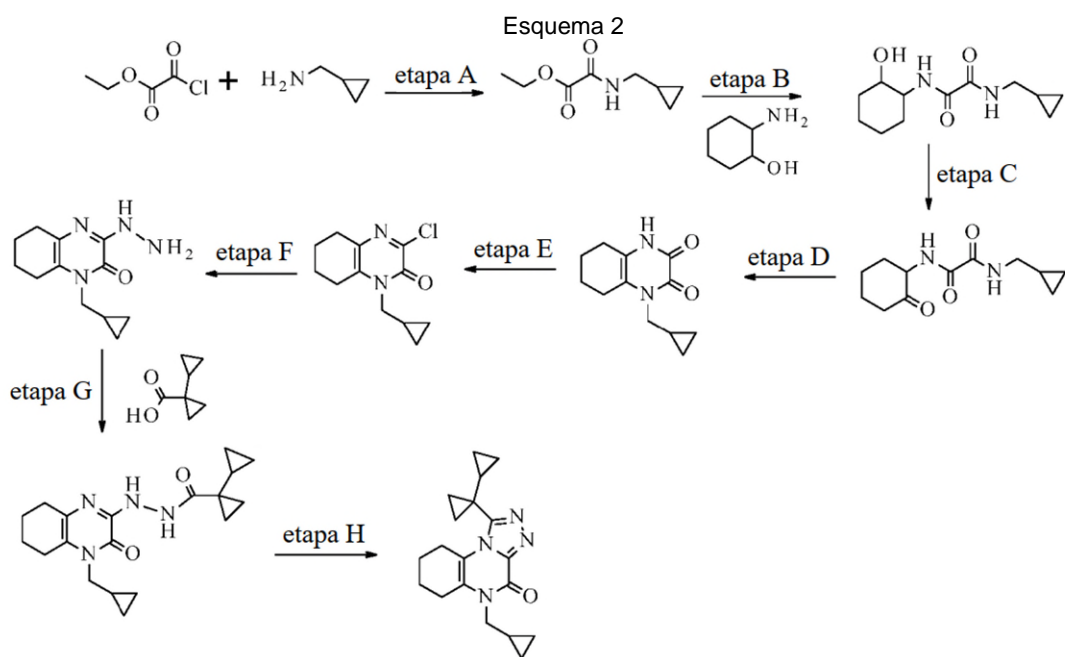
producto del esquema 1, etapa D, se calienta con aproximadamente 5 equivalentes de hidracina en un disolvente orgánico polar adecuado tal como EtOH. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como extracción. De manera más específica, la mezcla de reacción se enfría y se concentra a presión reducida, se divide entre agua y un disolvente orgánico adecuado, tal como DCM, y se separan las fases. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra a presión reducida para obtener 1-alil-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-ona, el producto del esquema 1, etapa E, adecuado para su uso posterior sin purificación adicional.

En el esquema 1, etapa F, el producto del esquema 1, etapa E puede acoplarse a un ácido usando diversas técnicas de acoplamiento de amidas bien conocidas en este campo. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-alil-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-ona, el producto de la etapa E, se disuelve en un disolvente orgánico adecuado, tal como DMF, y se trata con aproximadamente 1,7 equivalentes de un reactivo de acoplamiento de amida adecuado, tal como HATU o TBTU, y 1,7 equivalentes de un ácido carboxílico adecuado, tal como ácido 1-ciclopropilciclopropanocarboxílico (véase Eur. J. Org. Chem., 2010, págs. 3295-3301), en presencia de 3,5-5 equivalentes de una base orgánica no nucleófila adecuada tal como TEA o DIPEA. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como extracción. De manera más específica, la mezcla de reacción se diluye con EtOAc, se lava secuencialmente con NaHCO₃ acuoso saturado y NaCl acuoso saturado, se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra a presión reducida para obtener N'-(4-alil-3-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-il)-1-ciclopropil-ciclopropanocarbohidracida, el producto del esquema 1, etapa F, que se puede llevar adelante para su uso en la siguiente etapa sin purificación adicional.

En el esquema 1, etapa G, N'-(4-alil-3-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-il)-1-ciclopropil-ciclopropanocarbohidracida, el producto del esquema 1, etapa F, puede ciclarse en condiciones térmicas o de microondas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, N'-(4-alil-3-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-il)-1-ciclopropil-ciclopropanocarbohidracida se disuelve en un ácido orgánico adecuado, tal como AcOH, y se calienta en un reactor de microondas. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como métodos cromatográficos. De manera más específica, la mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el producto en bruto se somete a cromatografía sobre sílice, usando una mezcla de disolventes orgánicos adecuada, tal como hexanos/EtOAc, para obtener 5-alil-1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona, el producto del esquema 1, etapa G.

En el esquema 1, etapa H, 5-alil-1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona, el producto del esquema 1, etapa G, se puede desalilar en diversas condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 5-alil-1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona se disuelve en un disolvente orgánico desgasificado adecuado tal como DCM. La solución se trata con aproximadamente 3 equivalentes de ácido N,N-dimetilbarbitúrico y aproximadamente 0,2 equivalentes de tetraquis(trifenilfosfina)paladio con calentamiento. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como métodos cromatográficos. De manera más específica, la mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el resto resultante se somete a cromatografía en columna de fase inversa, usando una mezcla adecuada de agua tamponada y fases móviles orgánicas, tal como ACN que contiene aproximadamente 0,1 % de TFA y agua que contiene aproximadamente 0,1 % de TFA, para obtener 1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona, el producto del esquema 1, etapa H.

En el esquema 1, etapa I, el producto del esquema 1, la etapa H puede alquilarse en diversas condiciones de alquilación convencionales bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona, el producto de la etapa H, se disuelve en un disolvente orgánico adecuado, tal como DMF, y se trata con aproximadamente 3 equivalentes de una base orgánica fuerte adecuada, tal como LHMSDS, a temperatura ambiente o por debajo de ella. La siguiente mezcla de reacción se trata con una mezcla de aproximadamente 1 equivalente de un agente alquilante adecuado, tal como bromometilciclopropano, y una cantidad catalítica de un agente de transferencia de halógeno, tal como KI. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como dilución seguida de métodos cromatográficos. De manera más específica, la mezcla de reacción se diluye con un disolvente orgánico adecuado tal como EtOAc, se lava con NaCl acuoso saturado, se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra a presión reducida. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía sobre sílice, usando un disolvente orgánico polar adecuado tal como EtOAc, para obtener el compuesto de fórmula I, 1-(1-ciclopropilciclopropil)-5-(ciclopropilmetil)-6,7,8,9-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona, el producto del esquema 1, etapa I.



Fórmula I

5 El esquema 2 representa una síntesis alternativa para el compuesto de fórmula I. En el esquema 2, etapa A, se acila aproximadamente 1 equivalente de ciclopropilmetanamina en un disolvente orgánico típico tal como DCM con aproximadamente 1 equivalente de 2-cloro-2-oxoacetato de etilo en presencia de aproximadamente 1,1 equivalentes de una base orgánica no nucleófila tal como trimetilamina a aproximadamente -20 a 0 °C. El producto puede aislarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tales como extracción. De manera más específica, la mezcla de reacción se vierte en agua, el pH se ajusta a ~6-7 con un ácido mineral acuoso adecuado tal como HCl 1 M y la mezcla acuosa acidificada se extrae con un disolvente orgánico adecuado tal como DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavan secuencialmente con NaHCO₃ saturado seguido de NaCl acuoso saturado, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran a presión reducida para obtener 2-(ciclopropilmetilamino)-2-oxo-acetato de etilo, el producto del esquema 2, etapa A, adecuado para su uso posterior sin purificación adicional.

15 En el esquema 2, etapa B, se puede realizar amidación de 2-(ciclopropilmetilamino)-2-oxo-acetato de etilo en diversas condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 2-(ciclopropilmetilamino)-2-oxoacetato de etilo, producto del esquema 2, etapa A, se disuelve en un disolvente orgánico adecuado, tal como DCM, y se trata secuencialmente con aproximadamente 1 equivalente de aminociclohexanol y aproximadamente 1 equivalente de una base orgánica no nucleófila adecuada, tal como TEA. Después de agitar a temperatura ambiente durante 16-24 h, el producto puede aislarse utilizando técnicas bien conocidas en este campo, tales como filtración. Por ejemplo, el precipitado resultante en la mezcla de reacción se recoge por filtración, se lava con una cantidad mínima de DCM y se seca al aire para obtener N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-hidroxíciclohexil)oxamida, el producto del esquema 2, etapa B, como una mezcla de isómeros en *cis* y *trans* de pureza suficiente para uso posterior sin purificación adicional.

25 En el esquema 2, etapa C, N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-hidroxíciclohexil)oxamida, el producto del esquema 2, etapa B, puede oxidarse en condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-hidroxíciclohexil)oxamida se disuelve en un disolvente orgánico adecuado tal como DCM, se enfría a 0 °C y se trata lentamente con aproximadamente 2,5 equivalentes de complejo de trióxido de azufre-piridina. Después de calentar a temperatura ambiente, el producto puede aislarse utilizando técnicas bien conocidas en este campo, tales como extracción. Por ejemplo, la mezcla de reacción se vierte en agua, se neutraliza a pH ~7 con un ácido mineral acuoso adecuado como HCl acuoso 1 M y se extrae con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavan secuencialmente con H₂O seguido de NaCl acuoso saturado, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran a presión reducida para obtener N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-oxociclohexil)oxamida, el producto del esquema 2, etapa C, adecuado para su uso posterior sin purificación adicional.

40 En el esquema 2, etapa D, la ciclación de N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-oxociclohexil)oxamida, el producto del esquema 2, etapa C, puede realizarse de una manera similar a la descrita en el esquema 1, etapa C para obtener 4-(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalina-2,3-diona, el producto de la etapa D del esquema 2.

En el esquema 2, etapa E, la cloración de 4-(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalina-2,3-diona, el producto del esquema 2, etapa D, puede realizarse como se describe en el esquema 1, etapa D, para obtener 3-cloro-1-

(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona, el producto del esquema 2, etapa E.

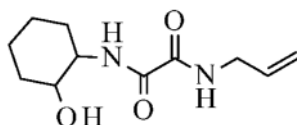
En el esquema 2, etapa F, 3-cloro-1-(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona, el producto del esquema 2, etapa E, puede tratarse con hidracina en las condiciones descritas de manera similar en el esquema 1, etapa E, para obtener 1-(ciclopropilmetil)-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona, el producto del esquema 2, etapa F.

En el esquema 2, etapa G, 1-(ciclopropilmetil)-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona, el producto del esquema 2, etapa F, puede acoplarse a un ácido usando diversas técnicas de acoplamiento de amidas bien conocidas en este campo. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-(ciclopropilmetil)-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona se disuelve en un disolvente orgánico adecuado tal como DMF y se trata secuencialmente con aproximadamente 1,5 equivalentes de ácido 1-ciclopropil ciclopropanocarboxílico (véase Eur. J. Org Chem., 2010, págs. 3295-3301), 1,6 equivalentes de EDCI, aproximadamente 1,7 equivalentes de HOAT y aproximadamente 3 equivalentes de una base orgánica no nucleófila adecuada tal como TEA. Después de agitar durante aproximadamente 16 h a temperatura ambiente, el producto puede aislarse utilizando técnicas bien conocidas en este campo, tales como extracción. Por ejemplo, la mezcla de reacción se divide entre H₂O y MTBE, las fases se separan y la fase acuosa se acidifica con un ácido mineral acuoso adecuado tal como HCl 0,5 M. La solución acuosa acidificada se extrae con un disolvente orgánico adecuado tal como DCM, las capas se separan y la capa orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra a presión reducida para obtener 1-ciclopropil-N'-[4-(ciclopropilmetil)-3-oxo-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-il]ciclopropanocarbohidracida, el producto del esquema 2, etapa G, adecuado para su uso posterior sin purificación adicional.

En el esquema 2, etapa H, aproximadamente 1 equivalente de 1-ciclopropil-N'-[4-(ciclopropilmetil)-3-oxo-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-il]ciclopropanocarbohidracida, el producto del esquema 2, etapa G, se cicla en condiciones térmicas en un disolvente orgánico tal como HMDS que contiene 0,2 equivalentes de una base orgánica no nucleófila adecuada tal como DBU. Después de calentar durante aproximadamente 16 h, el producto puede aislarse utilizando técnicas bien conocidas en este campo, tales como filtración, extracción y trituración. Por ejemplo, la mezcla de reacción enfriada se filtra y los sólidos recogidos se disuelven en un disolvente orgánico adecuado tal como DCM. La solución orgánica se lava con NaCl acuoso saturado, se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra a presión reducida. El producto en bruto se tritura con una cantidad mínima de ACN y el sólido se recoge mediante filtración, se redissuelve en una cantidad mínima de EtOAc y se concentra a presión reducida para obtener 1-(1-ciclopropilciclopropil)-5-(ciclopropilmetil)-6,7,8,9-tetrahidro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona, el producto del esquema 2, etapa H, de pureza suficiente sin purificación adicional.

Preparación 1

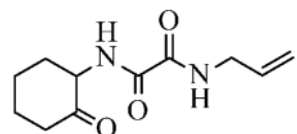
N-alil-N'-(2-hidroxiciclohexil)oxamida



Esquema 1, etapa A: Combinar 2-aminociclohexanol (7,7 g, 66,8 mmol), etil-2-(alilamino)-2-oxoacetato (10,0 g, 63,6 mmol) y trietilamina (9,8 ml, 70,0 mmol) en EtOAc (127,3 ml) y calentar la mezcla a 80 °C durante 4 h. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y agitar durante una noche. Aislar el precipitado resultante mediante filtración al vacío, lavar la torta de filtración con EtOAc y secar durante 4 h para proporcionar el compuesto del título (7,2 g, 50 %) como un sólido cristalino, blanco. Concentrar el filtrado a presión reducida y someter a ultrasonidos el sólido resultante en Et₂O. Aislar el sólido mediante filtración al vacío, lavar la torta de filtración con Et₂O y secar durante 1,5 h para proporcionar un lote adicional del compuesto del título (2,8 g, 19 %) como un sólido cristalino, blanco. El producto es una mezcla de isómeros *cis* y *trans*. LC-ES/MS (m/z): 227,0 (M+H).

Preparación 2

N-alil-N'-(2-oxociclohexil)oxamida

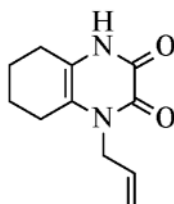


Esquema 1, etapa B: Combinar N'-alil-N-(2-hidroxiciclohexil)oxamida (5,0 g, 22,1 mmol) y NaHCO₃ (25,0 g, 297,6 mmol) en una mezcla de DCM (110,5 ml) y THF (36,8 ml) y enfriar la suspensión resultante a 0 °C. Añadir 3,3,3-triacetoxi-3-yodoftalida (10,3 g, 24,3 mmol) a la suspensión y dejar que la mezcla se caliente lentamente a temperatura ambiente. Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, inactivar la mezcla mediante la adición de

5 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturado (7,0 g en 50 ml de H_2O) y NaHCO_3 saturado. Agitar la mezcla bifásica a temperatura ambiente durante 2 h y separar las capas. Extraer la capa acuosa con DCM. Combinar los extractos orgánicos, secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar a presión reducida para proporcionar un resto. Purificar el resto mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice, eluyendo con EtOAc:hexanos (1:1), para proporcionar el compuesto del título (3,4 g, 69 %) como un sólido blanquecino. LC-ES/MS (m/z): 225,0 (M+H).

Preparación 3

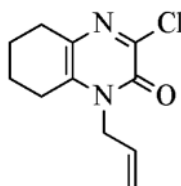
10 4-alil-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalina-2,3-diona



15 Esquema 1, etapa C: Añadir N-alil-N'-(2-oxociclohexil)oxamida (3,4 g, 15,2 mmol) a una mezcla de AcOH (15,2 ml, 264,6 mmol), TFA (1,3 ml, 16,7 mmol) y TFAA (3,5 g, 16,7 mmol) y calentar la mezcla a 100 °C durante una noche. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y eliminar el disolvente a presión reducida para proporcionar un aceite negro. Purificar el resto mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice, eluyendo con MeOH:EtOAc (gradiente de 0:1 a 1:4), para dar el compuesto del título (2,6 g, 83 %) como un sólido de color tostado. LC-ES/MS (m/z): 207,0 (M+H).

Preparación 4

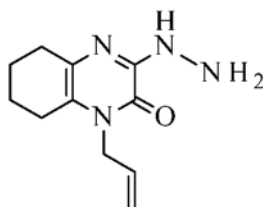
20 1-alil-3-cloro-3,4,5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona



25 Esquema 1, etapa D: Añadir POCl_3 (2,0 g, 13,1 mmol) a una solución de 4-alil-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalin-2,3-diona (2,6 g, 12,5 mmol) disuelta en DCE (62,6 ml) y calentar la mezcla a 75 °C durante 4,5 h. Añadir POCl_3 adicional (1,0 g, 6,3 mmol) a la mezcla y continuar calentando a 75 °C durante 3,5 h. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y agitar durante una noche. Eliminar el disolvente a presión reducida y disolver el resto resultante en tolueno. Eliminar el tolueno a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (2,81 g, 100 %) como un aceite rojo oscuro. LC-ES/MS (m/z): 225,0 (M+H).

Preparación 5

35 1-alil-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona

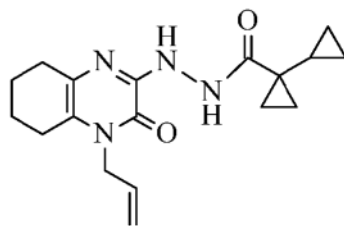


40 Esquema 1, etapa E: Añadir hidracina (2,0 g, 62,5 mmol) a una suspensión de 1-alil-3-cloro-3,4,5,6,7,8-hexahidroquinoxalin-2-ona (2,8 g, 12,5 mmol) en EtOH (50 ml) y calentar la mezcla durante una noche a reflujo. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y eliminar el disolvente a presión reducida. Dividir el resto resultante entre H_2O y DCM. Separar la capa orgánica y extraer la acuosa con DCM. Combinar los extractos orgánicos, secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (2,6 g, 95 %) como un aceite naranja. LC-ES/MS (m/z): 221,0 (M+H).

45

Preparación 6

N'-(4-alil-3-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-il)-1-ciclopropil-ciclopropanocarbohidracida



5

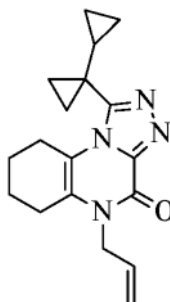
Esquema 1, etapa F: Añadir ácido 1-ciclopropilciclopropanocarboxílico (2,3 g, 18,3 mmol, véase Eur. J. Org Chem., 2010, págs. 3295-3301), HATU (7,0 g, 18,3 mmol) y DIPEA (6,6 ml, 37,7 mmol) a una solución de 1-alil-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-ona (2,4 g, 10,8 mmol) en DMF (40 ml) y agitar la mezcla durante una noche a temperatura ambiente. Diluir la mezcla con EtOAc y lavar la mezcla secuencialmente con NaHCO₃ saturado y NaCl acuoso saturado. Secar la mezcla orgánica sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (3,5 g, 100 %) como un aceite marrón. LC-ES/MS (m/z): 329,2 (M+H).

10

Preparación 7

15

5-alil-1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona



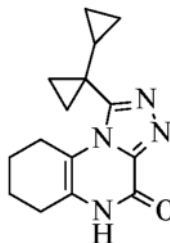
20

Esquema 1, etapa G: Disolver N'-(4-alil-3-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoxalin-2-il)-1-ciclopropil-ciclopropanocarbohidracida (3,5 g, 10,8 mmol) en AcOH (10,0 ml, 174,5 mmol) y calentar la solución en un microondas a 130 °C durante 3,5 h. Eliminar el AcOH a presión reducida y purificar el resto resultante mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice, eluyendo con EtOAc:hexanos (gradiente de 4:1 a 1:0), para proporcionar el compuesto del título (1,2 g, 35 %) como un aceite marrón. LC-ES/MS (m/z): 311,2 (M+H).

25

Preparación 8

1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona



30

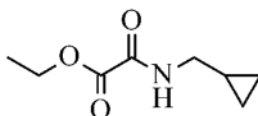
Esquema 1, etapa H: Añadir ácido N,N-dimetilbarbitúrico (1,3 g, 8,5 mmol) a una solución de 5-alil-1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona (877,4 mg, 2,8 mmol) en DCM (30 ml) y purgar con nitrógeno durante 10 minutos. Añadir tetraquis(trifenilfosfina)paladio (653,3 mg, 565,3 μmol) y calentar la mezcla a 35 °C durante una noche. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y eliminar el disolvente a presión reducida para proporcionar un resto. Purificar el resto mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (REDISEP™ Gold C-18, 415 g; gradiente: 20-48 % de una mezcla de TFA al 0,1 % en ACN en una mezcla de TFA al 0,1 % en H₂O durante 22,9 min) para proporcionar el compuesto del título (392,7 mg, 51 %) como un sólido de color tostado. LC-ES/MS (m/z): 271,0 (M+H).

35

40

Preparación 9

2-(ciclopropilmetilamino)-2-oxo-acetato de etilo



5

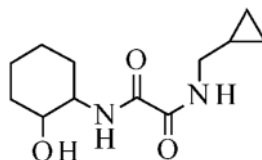
Esquema 2, etapa A: Añadir TMA (90 g, 0,9 mol) a una solución a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 2-cloro-2-oxoacetato de etilo (109 g, 0,8 mol) en DCM (1,5 l). Añadir ciclopropilmetanamina (60 g, 0,8 mol) a la solución gota a gota durante 20 minutos a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitar la mezcla durante 3 h a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Verter la mezcla en H_2O (1,5 l) y ajustar a pH $\sim 5-6$ con HCl 1 M. Separar las capas y lavar la capa orgánica secuencialmente con NaHCO_3 saturado (500 ml) y NaCl acuoso saturado (500 ml). Secar la capa orgánica sobre Na_2SO_4 y se concentra a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (129 g, 94 %) como un aceite amarillo. LC-ES/MS (m/z): 172,2 (M+H).

10

Preparación 10

15

N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-hidroxiciclohexil)oxamida



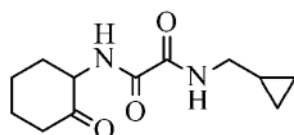
20

Esquema 2, etapa B: Añadir TEA (115 ml, 0,8 mol) a una solución de 2-(ciclopropilmetilamino)-2-oxoacetato de etilo (128,5 g, 0,75 mol) en DCM (1,6 l) a temperatura ambiente. Añadir 2-aminociclohexanol (91 g, 0,8 mol) a la mezcla y agitar durante 16 h a temperatura ambiente. Filtrar el precipitado resultante y secar al aire para proporcionar el compuesto del título (147 g, 80 %) como una mezcla sólida blanca de isómeros *cis* y *trans*. LC-ES/MS (m/z) 241,1 (M+H).

25

Preparación 11

N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-oxociclohexil)oxamida



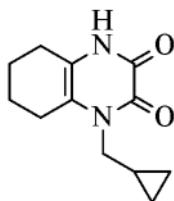
30

Esquema 2, etapa C: Añadir TEA (320 ml, 2,3 mol) durante 1 h a una suspensión de N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-hidroxiciclohexil)oxamida (137 g, 0,6 mol) en DCM (1,4 l) a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Disolver el complejo de trióxido de azufre-piridina (365 g, 2,3 mol) en DMSO (730 ml) y añadir la solución gota a gota a la mezcla de reacción a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dejar que la mezcla se caliente a temperatura ambiente y agitar durante 16 h. Verter la mezcla de reacción en H_2O (800 ml) y ajustar a pH ~ 7 usando HCl 1 M. Separar las capas y lavar la capa orgánica secuencialmente con H_2O (300 ml) y NaCl acuoso saturado (200 ml). Secar el extracto orgánico sobre Na_2SO_4 y concentrar a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (114 g, 83 %) como un sólido blanco. LC-ES/MS (m/z) 239,1 (M+H).

35

Preparación 12

4-(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalina-2,3-diona



45

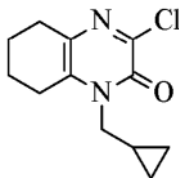
Esquema 2, etapa D: Añadir TFA (60 g, 0,5 mol) y TFAA (111 g, 0,5 mol) a una solución de N-(ciclopropilmetil)-N'-(2-oxociclohexil)oxamida (114 g, 0,5 mol) en AcOH (574 ml) y calentar la mezcla a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 h. Retirar el AcOH a presión reducida y añadir H_2O (500 ml) y DCM (400 ml) al resto resultante. Ajustar el pH a ~ 7 usando NaHCO_3

acuoso y separar las capas. Lavar la capa orgánica secuencialmente con H₂O (200 ml) y NaCl acuoso saturado (200 ml). Secar el extracto orgánico sobre Na₂SO₄ y concentrar a presión reducida para proporcionar el producto en bruto como un sólido. Triturar el sólido con ACN (3 ml/g) y aislar mediante filtración al vacío para proporcionar el compuesto del título (42 g, 38 %) como un sólido blanco. LC-ES/MS (m/z) 221,1 (M+H).

5

Preparación 13

3-cloro-1-(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona



10

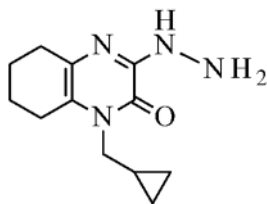
Esquema 2, etapa E: Combinar 4-(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinoxalina-2,3-diona (41,5 g, 0,19 mol) y POCl₃ (37,7 g, 0,3 mol) en DCE (415 ml) y calentar la mezcla a 75 °C durante 5 h. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y verter en solución de KH₂PO₄ saturada (1 l). Separar las capas y lavar la capa orgánica secuencialmente con H₂O (300 ml) y NaCl acuoso saturado (300 ml). Secar el extracto orgánico sobre Na₂SO₄ y concentrar a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (38,3 g, 85 %) como un sólido marrón. LC-ES/MS (m/z): 239,1 (M+H).

15

Preparación 14

20

1-(ciclopropilmetil)-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona



25

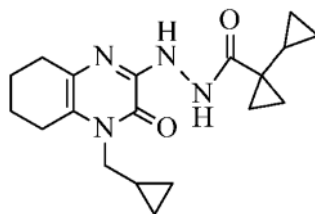
Esquema 2, etapa F: Añadir hidracina (80,6 g, 1,6 mol) a una solución de 3-cloro-1-(ciclopropilmetil)-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona (38,3 g, 0,16 mol) en EtOH (153 ml) y calentar la mezcla a 75 °C durante 4 h. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y verter en H₂O (300 ml). Aislar el precipitado amarillo resultante mediante filtración al vacío. Disolver la torta de filtración en DCM (200 ml). Secar la solución orgánica sobre Na₂SO₄ y concentrar a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (28,7 g, 76 %) como un sólido blanquecino. LC-ES/MS (m/z): 235,2 (M+H).

30

Preparación 15

35

1-ciclopropil-N'-[4-(ciclopropilmetil)-3-oxo-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-il]ciclopropanocarboxidracida SP-0010427-181-A



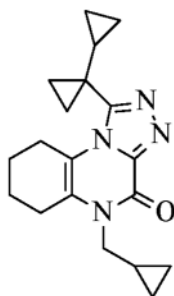
40

Esquema 2, etapa G: Añadir EDCI (36,4 g, 0,19 mol), HOAT (26,9 g, 0,2 mol), TEA (38,5 g, 0,4 mol) y 1-(ciclopropilmetil)-3-hidracino-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-ona (28,7 g, 0,12 mol) en una solución de ácido 1-ciclopropilciclopropanocarboxílico (23,2 g, 0,18 mol, véase Eur. J. Org Chem., 2010, págs. 3295-3301) en DMF (430 ml) a 0 °C. Calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, agitar durante 16 h y después verter en una mezcla de H₂O (800 ml) y MTBE (700 ml). Separar las capas y extraer la capa orgánica con HCl 0,5 M (300 ml). Desechar la capa orgánica y ajustar la capa acuosa a pH ~8 con NaHCO₃ saturado. Extraer la capa acuosa con DCM, separar las capas y concentrar el extracto orgánico a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (38 g, 91 %) como un sólido blanquecino. LC-ES/MS (m/z): 343,2 (M+H).

45

Ejemplo 1

1-(1-ciclopropilciclopropil)-5-(ciclopropilmetil)-6,7,8,9-tetrahidro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona



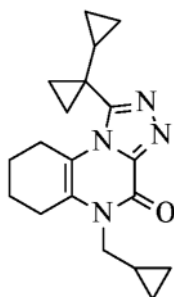
5

Esquema 1, etapa I: Añadir LHMDs (1,6 g, 1,8 mmol) a una solución de 1-(1-ciclopropilciclopropil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona (164,2 mg, 607,4 μ mol) en DMF (5 ml). Después de agitar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente, añadir KI (10 mg, 60,7 μ mol) y bromometilciclopropano (246,0 mg, 1,8 mmol) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 días. Diluir la mezcla con EtOAc y lavar con NaCl acuoso saturado. Secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar a presión reducida para proporcionar un aceite. Purificar mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice, eluyendo con EtOAc (100 %), para proporcionar el compuesto del título (108,2 mg, 55 %) como un sólido de color tostado. LC-ES/MS (m/z): 325,2 (M+H).

10

15 Procedimiento alternativo para el ejemplo 1

1-(1-ciclopropilciclopropil)-5-(ciclopropilmetil)-6,7,8,9-tetrahidro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-ona



20

Esquema 2, etapa H: Combinar 1-ciclopropil-N'-[4-(ciclopropilmetil)-3-oxo-5,6,7,8-tetrahidroquinoxalin-2-il]ciclopropanocarbohidracida (35,7 g, 0,1 mol), HMDS (357 ml) y DBU (2,9 g, 0,02 mol) y calentar la mezcla a 125 °C durante 16 h. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y verter en H_2O (260 ml). Recoger el precipitado por filtración al vacío y disolver el sólido en DCM (200 ml). Lavar la solución orgánica con NaCl acuoso saturado, separar las capas, secar la capa orgánica sobre Na_2SO_4 y concentrar a presión reducida para proporcionar un sólido. Triturar el sólido con ACN (2 ml/g) y recoger por filtración al vacío. Disolver el sólido recogido en EtOAc y concentrar a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (20 g, 59 %) como un sólido amarillo pálido. LC-ES/MS (m/z): 325,2 (M+H).

25

30 Generación de proteínas PDE

Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE1A humana de longitud completa (NP_001003683.1), PDE1C (NP_005011.1), PDE5A (NP_001074.2), PDE7B (NP_061818.1) y PDE9A (NP_002597.1) se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con un marcador HIS N-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE4D humana de longitud completa (NP_006194.2) y el dominio catalítico (resto 641-1141) de PDE3A (NP_000912.3) se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con un marcador HIS C-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican PDE8A (NP_002596.1) y PDE11A (AAI12394.1) humanas de longitud completa se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con un marcador Flag N-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE10A humana de longitud completa (AAD32595.1) se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con un marcador Flag-His C-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE6A humana de longitud completa (NP_000431.2) y PDE6B (AAH00249.1) se insertan en el vector pFastBacDual (Invitrogen) con un marcador HIS N-terminal y marcador Flag N-terminal, respectivamente, para la producción del dímero PDE6A/6B. La generación de baculovirus y la expresión de proteínas en células Sf9 se llevan a cabo según el protocolo del sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen). Las secuencias de nucleótidos que codifican PDE1B (NP_000915.1) y PDE2A (NP_002590.1) humanas de longitud completa se insertan en pLEX4 (Novagen) con un marcador HIS C-terminal, y ambas producciones de proteínas en células Sf9 se llevan a cabo según el protocolo del proveedor (Novagen). Las proteínas PDE marcadas con His se purifican usando agarosa Ni-NTA (Qiagen) seguido de cromatografía de exclusión por

45

tamaño en una columna SUPERDEX® 200 (GE Healthcare) en tampón de almacenamiento (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol al 10 %). Las proteínas PDE marcadas con Flag incluyendo PDE6A/6B se purifican usando agarosa anti-Flag M2 (Sigma), después de la purificación mediante cromatografía en columna de NiNTA y se eluyen en tampón de almacenamiento (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol al 10 %, 0,1 mg/ml de péptido Flag).

5 Todas las proteínas purificadas se almacenan a -80 °C en pequeñas alícuotas.

Ensayos de enzimas fosfodiesterasas

10 Todas las actividades de la enzima fosfodiesterasa de nucleótido cíclico 3', 5' (PDE) se miden con un ensayo enzimático radiométrico basado en el sistema de detección de SPA (ensayo de centelleo de proximidad). Los compuestos que se van a ensayar se diluyen en dimetilsulfóxido puro (DMSO) usando curvas de respuesta de concentración de diez puntos. La concentración máxima de compuesto en la mezcla de reacción es 10 o 100 µM. Los compuestos a la concentración adecuada se preincuban con cualquiera de las enzimas PDE durante 30 minutos antes de que comience la reacción mediante la adición de sustrato. Se deja que las reacciones se produzcan durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las reacciones se detienen mediante la adición de perlas de SPA. Las muestras se leen 12 horas después en un contador MICROBETA™ TRILUX®. "CI₅₀" se refiere a la concentración del compuesto que produce el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese compuesto. Los valores de CI₅₀ se calculan trazando los datos normalizados frente a log [compuesto] y ajustando los datos usando una ecuación logística de cuatro parámetros.

Ensayos de enzimas PDE dependientes de Ca²⁺-calmodulina

25 PDE1B, PDE1A y PDE1C se clonan y purifican internamente siguiendo procedimientos convencionales de generación de proteínas. El tampón de ensayo se prepara para proporcionar una concentración final en el ensayo de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 50 mM, CaCl₂ 4 mM, seroalbúmina bovina al 0,1 % y calmodulina en agua 6 U/ml, a pH 7,5. La concentración final de enzima es 0,25, 0,074 y 0,0012 nM, para PDE1A, PDE1B y PDE1C, respectivamente. Las reacciones se inician mediante la adición del sustrato, [³H]AMPc, para proporcionar una concentración final de 47 nM.

Tabla 1: Potencia *in vitro* del ejemplo 1 contra PDE1A, PDE1B y PDE1C.

Enzimas PDE	CI ₅₀ (nM) del ejemplo 1
PDE 1A	3,41
PDE 1B	4,91
PDE 1C	3,05

30 Los datos de la tabla 1 demuestran que el compuesto del ejemplo 1 inhibe la actividad de las enzimas PDE1A, PDE1B y PDE1C *in vitro*.

Ensayos de enzimas PDE usando [³H]AMPc como sustrato

35 Las siguientes actividades de fosfodiesterasa se miden usando [³H]AMPc como sustrato de reacción: PDE3A (dominio catalítico), PDE4D, PDE7B y PDE8A. Todas estas enzimas se clonan y purifican internamente siguiendo procedimientos convencionales. El tampón de ensayo se prepara para proporcionar una concentración final en el ensayo de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 8,3 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1,7 mM y seroalbúmina bovina al 0,1 % a pH 7,5. Las concentraciones finales de enzima son 0,008, 0,021, 0,5 y 0,06 nM para PDE3A, PDE4D, PDE7B y PDE8A, respectivamente. Las reacciones también se inician mediante la adición del sustrato, [³H]AMPc, para proporcionar una concentración final de 47 nM.

Tabla 2: Potencia *in vitro* del ejemplo 1 contra PDE3A (dominio catalítico), PDE4D, PDE7B y PDE8A.

Enzimas PDE	CI ₅₀ (nM) del ejemplo 1
PDE3A	>100 000
PDE4D	7060
PDE7B	2180
PDE8A	>10 000

Ensayos de enzimas PDE usando [³H]GMPc como sustrato

45 Las siguientes actividades fosfodiesterasa se miden usando [³H]GMPc como sustrato de reacción: PDE2A, PDE5A, PDE6A/6B, PDE9A, PDE10A y PDE11A. La forma catalítica activa de PDE6 es un dímero compuesto por subunidades α (PDE6A) y β (PDE6B). El dímero de PDE6A/6B se produce mediante la estrategia de expresión y purificación, usando dos etapas de purificación, es decir, cromatografía NiNTA y anti-FLAG Sepharose. El resto de las enzimas se clonan y purifican internamente siguiendo procedimientos convencionales. El tampón de ensayo se prepara para proporcionar una concentración final en el ensayo de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 8,3 mM, EDTA 1,7 mM y seroalbúmina bovina al 0,1 % a pH 7,5. Las concentraciones finales de enzima son 0,2, 0,002, 5, 1, 0,03 y 0,03 nM para PDE2A, PDE5A, PDE6AB, PDE9A, PDE10A y PDE11A, respectivamente. Las reacciones se inician mediante la adición del sustrato, [³H]GMPc, para proporcionar una concentración final de 80 nM en el caso de ensayos de PDE2A, PDE10A,

PDE5A, PDE6AB y PDE11A, mientras que para PDE9A se usa 20 nM de [³H]GMPc.

Tabla 3: Potencia *in vitro* del ejemplo 1 contra PDE2A, PDE5A, PDE6AB, PDE9A, PDE10A y PDE11A.

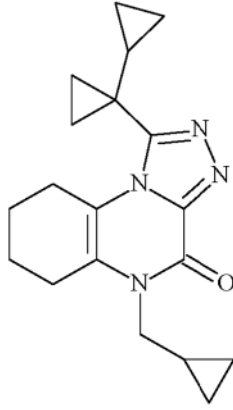
Enzimas PDE	CI ₅₀ (nM) del ejemplo 1
PDE2A	>10 000
PDE5A	>10 000
PDE 6AB	>10 000
PDE9A	>10 000
PDE10A	>10 000
PDE11A	2970

5

Los datos de las tablas 2 y 3 demuestran que el compuesto del ejemplo 1 es un inhibidor selectivo de PDE1A, PDE1B y PDE1C en relación con PDE2A, PDE3A, PDE4D, PDE5A, PDE6AB, PDE7B, PDE8A, PDE9A, PDE10A y PDE11A *in vitro*.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



5

2. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en terapia.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

10

4. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética.

5. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto según la reivindicación 1, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15

6. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar un compuesto según la reivindicación 1, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.