



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012004161-4 B1



(22) Data do Depósito: 24/08/2010

(45) Data de Concessão: 07/04/2020

(54) Título: MÉTODO PARA SINTETIZAR UMA PIPERAZINA NEUROESTIMULATIVA

(51) Int.Cl.: A61K 31/4965.

(30) Prioridade Unionista: 24/08/2009 US 61/236,477.

(73) Titular(es): NEURALSTEM, INC..

(72) Inventor(es): SRIPATHY VENKATRAMAN; SYED MAHMOOD; BINGIDIMI I. MOBELE; OLGA LAPINA; KELLIE VERCONE; YING LI; JONATHAN SALSBURY; MARK MCLAWS.

(86) Pedido PCT: PCT US2010046537 de 24/08/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/028548 de 10/03/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/02/2012

(57) Resumo: MÉTODO PARA SINTETIZAR UMA PIPERAZINA NEUROESTIMULATIVA A presente invenção refere-se a uma síntese melhorada para a piperazina derivada de ácido nicotínico e um componente de benzila. Os compostos do produto são úteis para o tratamento de condições neurológicas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA SINTETIZAR UMA PIPERAZINA NEUROESTIMULATIVA".

Referência Cruzada com os Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica a prioridade do pedido provisório U.S. 61/236.477 depositado em 24 de agosto de 2009. Os conteúdos deste pedido são aqui incorporados por referência.

Campo Técnico

[002] A presente invenção refere-se a um método de síntese para os compostos e seus sais úteis como agentes da neurogênese. Mais especificamente, a invenção é direcionada a um método para preparar piperazinas dissubstituídas acopladas com componentes de benzila e ácido nicotínico.

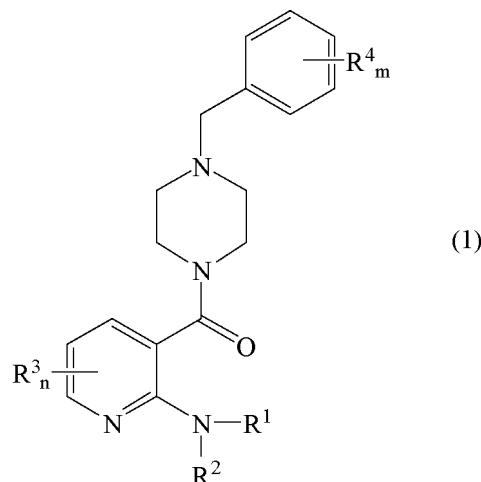
Antecedentes da Técnica

[003] A patente U.S. 7.560.553, aqui incorporada por referência, descreve vários compostos, incluindo a classe de compostos cuja síntese é aqui descrita, como agentes da neurogênese. Assim, os compostos preparados de acordo com o método da invenção são úteis no tratamento de várias condições que se beneficiam a partir da promoção da neurogênese mediante a proliferação/diferenciação de células tronco/progenitoras multipotentes do hipocampo humanas e progenitores neurais. Tais condições incluem a doença de Alzheimer, transtorno cognitivo leve, demência, acidente vascular cerebral, traumatismo crânio-encefálico, lesão medular, esquizofrenia e outras mais. O método de síntese fornecido pela invenção evita a utilização de substâncias controladas tais como benzil piperazina.

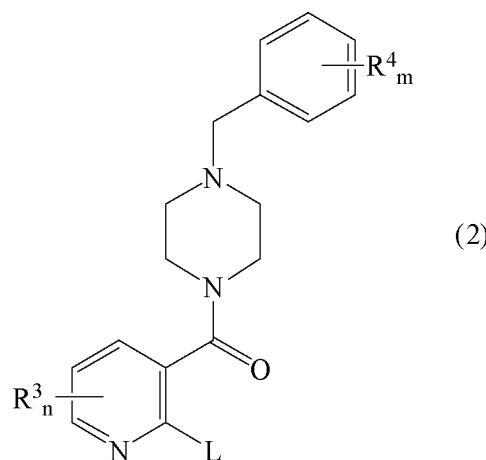
Descrição da Invenção

[004] O método da invenção emprega piperazina protegida em um dos nitrogênios do anel ou pela reação seletiva de apenas um nitrogênio do anel, e um ácido nicotínico substituído como materiais de

partida e culmina em fornecer piperazina dissubstituída compreendendo uma substituição de benzila em um dos nitrogênios do anel. A síntese pode ainda incluir a conversão desta piperazina dissubstituída em um sal adequado. Assim, em um aspecto, a invenção é direcionada a um método para sintetizar um composto da fórmula:

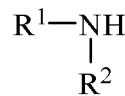


- [005] em que
- [006] R^1 é alquila;
- [007] R^2 é H ou alquila;
- [008] cada R^3 e R^4 é independentemente alquila, alquenila, halo, arila, heteroarila, arilalquila, heteroarilalquila, NR_2 , SR , ou OR onde R é alquila ou arila;
- [009] n é 0, 1 ou 2;
- [0010] m é 0, 1, 2 ou 3;
- [0011] cujo método compreende a reação de um composto da fórmula



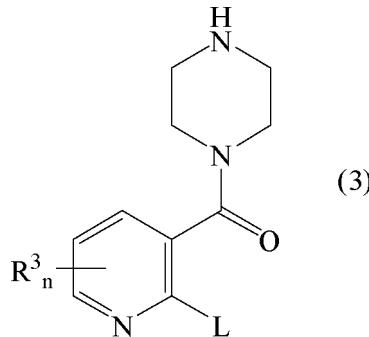
[0012] onde R^3 , R^4 , m e n são como definidos na fórmula (1) e L é um grupo de partida,

[0013] com um composto da fórmula



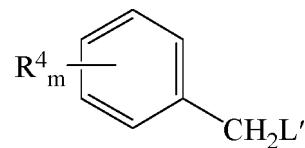
[0014] em que R^1 e R^2 são como definidos na fórmula (1).

[0015] O composto de fórmula (2) pode ser preparado pela reação de um composto de fórmula

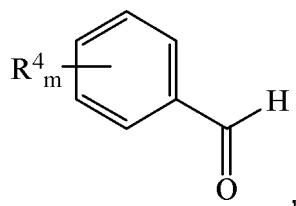


[0016] em que R^3 e n são como definidos na fórmula (1) e L é um grupo de partida,

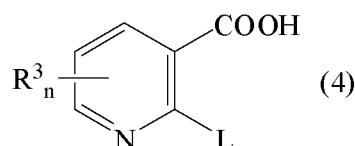
[0017] com um composto da fórmula



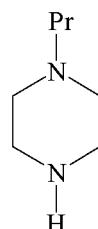
[0018] em que R^4 e m são como definidos na fórmula (1), e L' é um grupo de partida, ou com um composto da fórmula



- [0019] para formar uma imina seguido pela redução de dita imina.
 [0020] Por sua vez, o composto de fórmula (3) pode ser obtido pela reação de um composto da fórmula



- [0021] em que R³ e n são como definidos na fórmula (1) e L é um grupo de partida, com um composto da fórmula



- [0022] em que Pr é um grupo de proteção,
 [0023] seguido pela remoção do grupo de proteção ou acoplamento seletivo com um nitrogênio utilizando piperazina desprotegida. A reação que emprega um grupo de proteção pode ser feita mediante a contração do composto de fórmula (4) com a piperazina protegida na presença de um agente de acoplamento de peptídeo ou através da conversão do composto de fórmula (4) no haleto de benzoíla correspondente e adição da piperazina protegida na presença de uma base suave.
 [0024] O composto de fórmula (1) também pode ser convertido em um sal de adição de ácido adequado tal como o sal de sulfato, fosfato, hidroaleto, citrato, fumarato, tosilato ou besilato. Os sais tanto mono quanto bis podem ser formados.

Breve Descrição dos Desenhos

- [0025] A figura 1 mostra um processo ideal para a etapa 1B do

Esquema 1.

[0026] A figura 2 mostra um processo ideal para a etapa 2 do Esquema 1.

[0027] A figura 3 mostra um processo ideal para as etapas 3 e 4 do Esquema 1.

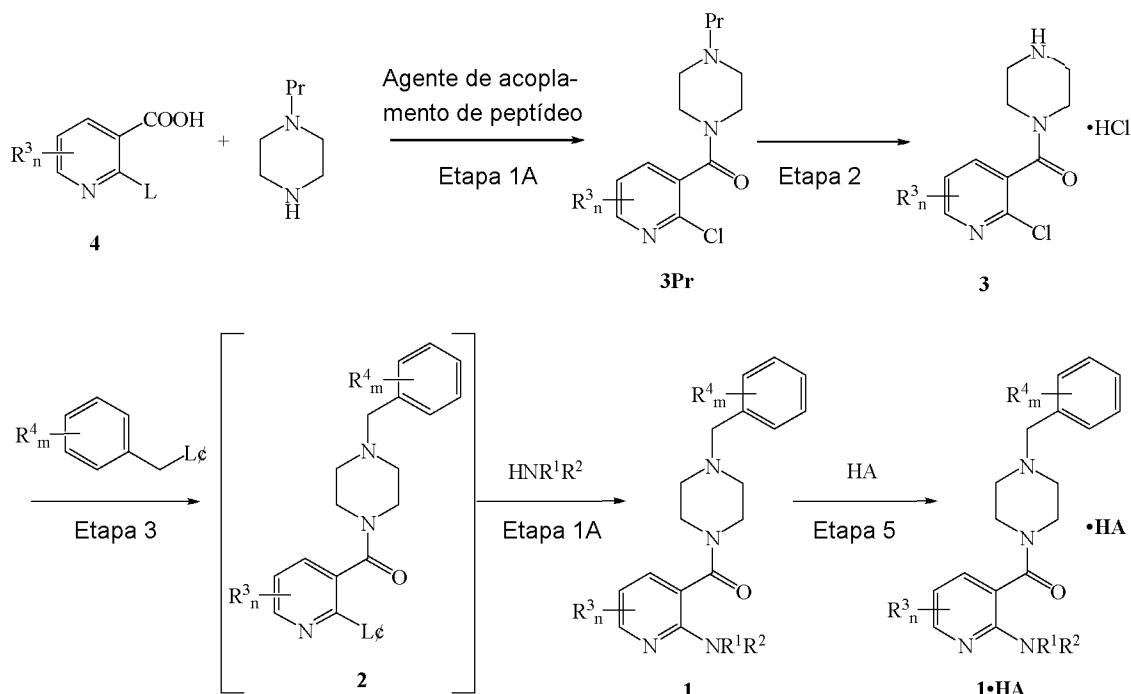
[0028] A figura 4 mostra um processo ideal para a etapa 5 do Esquema 1.

Métodos de Realização da Invenção

[0029] O composto de fórmula (1) e seus sais, e em particular o composto de fórmula 1E e seus sais foram demonstrados de terem atividade neurogênese como descrito na patente U.S. 7.560.553 acima referida. A presente invenção é direcionada a um método melhorado para a síntese destes compostos como ilustrado abaixo nos Exemplos de 1 a 5.

[0030] De uma forma mais geral, a síntese destes compostos compreende as seguintes etapas.

Esquema 1



[0031] Como mostrado no Esquema 1, o ácido nicotínico opcionalmente substituído contendo um grupo de partida na posição 2 é re-

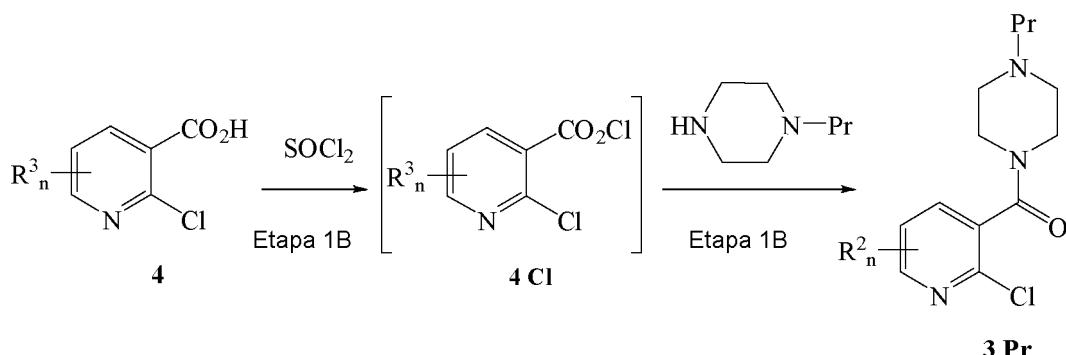
agido com a piperazina semiprotegida na presença de um agente de acoplamento de peptídeo na presença de uma base suave e um solvente apropriado. Tipicamente, a reação prossegue em condições ambientes para fornecer uma forma protegida do composto de fórmula (3), que é então desprotegido com ácido em um solvente hidrófilo em temperaturas ligeiramente elevadas. O produto resultante de fórmula (3) é reagido com benzila opcionalmente substituída contendo um grupo de partida na porção de metileno na presença de uma base suave e um solvente adequado, também em temperaturas elevadas para fornecer o composto de fórmula (2) que não necessita ser isolado, mas reagido com uma amina primária ou secundária em temperaturas elevadas e um solvente apropriado para se obter o composto de fórmula (1). O composto de fórmula (1) pode então ser reagido com 1 ou 2 molas de ácido para obter um sal de adição de ácido. Se a etapa 3 for conduzida pela substituição de um benzaldeído para benzil-L', uma imina é formada a qual é depois reduzida na amina usando boroidreto de sódio, cianoboroidreto de sódio, triacetoxiboroidreto de sódio ou boroidreto de lítio em quase todos os solventes orgânicos.

[0032] Tipicamente, a temperatura em que a etapa 1A é conduzida está entre 20 °C e 30 °C; as bases típicas incluem trietilamina ou outras aminas terciárias e um excesso de um solvente semi-polar não protíco tal como acetato de butila ou acetato de isopropila. A etapa 2 é tipicamente conduzida entre 50 °C e 60 °C usando um ácido forte tal como HCl ou ácido sulfúrico na presença de um solvente de álcool. As etapas 3 e 4 são realizadas entre 45 °C e 60 °C para a etapa 3 e entre 80 °C e 90 °C para a etapa 4. A etapa 3 é conduzida usando uma base suave tal como trietilamina e um solvente aprótico tal como acetonitrila ou DMSO. A etapa 4 também é conduzida na presença de um solvente aprótico.

[0033] A etapa 5 é realizada sob condições dependentes da natu-

reza do ácido; um ou dois equivalentes do ácido podem ser usados para obter um sal adequado.

[0034] Em uma alternativa para a etapa 1A, o composto de fórmula (3 Pr) pode ser preparado utilizando etapa 1B que evita o uso de um agente de acoplamento peptídico dispendioso:



[0035] A etapa 1B é conduzida entre 60°C e 70° C na presença de uma base, tal como uma amina terciária, em um excesso de um solvente semi-polar não prótico tal como acetato de butila ou acetato de isopropila. Assim, a etapa 1B é conduzida sob condições similares àquelas da etapa 1A, exceto que o ácido nicotínico é convertido no haleto de acila na presença de SOCl₂.

[0036] O resto do esquema pode permanecer o mesmo embora o rendimento possa ser melhorado por ligeiramente diminuir a temperatura em que a etapa 3 é conduzida.

[0037] Como observado acima, tanto R¹ quanto R² podem ser alquila e também os substituintes de alquila são incluídos entre aqueles opcionalmente presentes nos componentes de ácido nicotínico e benzila; além disso, NR₂ SR OR podem ser substituintes onde R é alquila. Os substituintes R³ e R⁴ também podem ser alquenila.

[0038] Tal como aqui usado, os termos "alquila" e "alquenila" incluem radicais de hidrocarbila monovalentes de cadeia reta, cadeia ramificada e cílicos, e combinações destes, que contêm apenas C e H quando eles forem não substituídos. Exemplos incluem metila, etila, isopropila, isobutila, cicloexila, ciclopentiletila, 2-propenila, 3-butenila, e

outros mais. O número total de átomos de carbono em cada tal grupo é às vezes descrito, por exemplo, quando o grupo pode conter até 10 átomos de carbono, ele pode ser representado como 1-10C ou como C1-C10 ou C1-10. Em geral, prefere-se que um de R¹ e R² seja H e o outro alquila com um máximo de 10 ou 8 átomos de carbono, e R³ e R⁴ quando incorporados como alquila ou alquenila tipicamente contêm um máximo de 8 ou 6 átomos de carbono.

[0039] Tipicamente, os substituintes de alquila e alquenila da invenção contêm 1-10C (alquila) ou 2-10C (alquenila). De preferência, eles contêm 1-8C (alquila) ou 2-8C (alquenila). Às vezes eles contêm 1-4C (alquila) ou 2-4C (alquenila). Um único grupo pode incluir mais do que uma ligação dupla; tais grupos são incluídos dentro da definição do termo "alquenila".

[0040] Os grupos de alquila e alquenila podem ser não substituídos ou substituídos na medida em que tal substituição faz sentido quimicamente a partir do ponto de vista do processo de síntese e das propriedades do produto final. As formas não substituídas são preferidas.

[0041] Como ainda observado acima, R³ e R⁴ também podem ser arila ou heteroarila.

[0042] Como aqui utilizado, "arila" refere-se a um componente monocíclico ou bicíclico fundido tendo as características de aromaticidade; exemplos incluem fenila e naftila. Similarmente, "heteroarila" refere-se a tais sistemas de anel monocíclicos ou bicíclicos fundidos que contêm como membros de anel um ou mais heteroátomos selecionados de O, S e N. A inclusão de um heteroátomo permite a aromaticidade nos anéis de 5 membros assim como nos anéis de 6 membros. Os sistemas heteroaromáticos típicos incluem grupos aromáticos C5-C6 monocíclicos tais como piridila, pirimidila, pirazinila, piridazinila, tienila, furanila, pirrolilo, pirazolila, tiazolila, isotiazolila, oxazolila, isoxazolila e

imidazolila e os componentes bicíclicos fundidos formados pela fusão de um destes grupos monocíclicos com um anel de fenila ou com qualquer um dos grupos monocíclicos heteroaromáticos para formar um grupo bicíclico C8-C10 tal como indolila, benzimidazolila, indazolila, benzotriazolila, isoquinolila, quinolila, benzotiazolila, benzofuranila, pirazolopiridila, quinazolinila, quinoxalinila, cinolinilo, e outros mais. Qualquer sistema monocíclico ou bicíclico de anel fundida que possuir as características de aromaticidade em termos de distribuição de elétrons ao longo do sistema de anel está incluído nesta definição. Também se inclui grupos bicíclicos onde pelo menos o anel que está diretamente ligado ao restante da molécula possui as características de aromaticidade. Tipicamente, os sistemas de anéis contêm de 5 a 12 átomos de membros de anel. De preferência, as heteroarilas monocíclicas contêm de 5 a 6 membros de anel, e as heteroarilas bicíclicas contêm de 8 a 10 membros de anel.

[0043] Similarmente, "arilalquila" e "heteroarilalquila" referem-se aos sistemas de anéis aromáticos e heteroaromáticos que são ligados ao seu ponto de fixação através de um grupo de ligação tal como um alquíleno, incluindo ligantes saturados ou insaturados, cíclicos ou acíclicos que opcionalmente contêm um ou mais heteroátomos selecionados de O e S. Tipicamente, o ligante é alquila C1-C8 ou um ligante de heteroalquila C1-C8. Um grupo de arilalquila pode ser, por exemplo, um anel de fenila e um alquíleno C1-C4 onde os grupos de alquila ou heteroalquila podem opcionalmente ciclizar para formar um anel tal como ciclopropano, dioxolano, ou oxaciclopentano.

[0044] "Alquíleno" como aqui utilizado refere-se a um grupo de hidrocarbila divalente; visto que é divalente, pode se ligar a dois outros grupos em conjunto. Tipicamente refere-se a $-(CH_2)_n-$, onde n é de 1 a 8 e de preferência n é de 1 a 4, embora onde especificado, um alquíleno também possa ser substituído por outros grupos, e pode ser de ou-

etros comprimentos, e as valências abertas não necessitam estar em extremidades opostas de uma cadeia. Assim -CH(Me)- e -C(Me)2- também podem ser referidos como alquilenos, como pode um grupo cíclico tal como cyclopropan-1,1-diila.

[0045] Grupos de arila, heteroarila, arilalquila e heteroarilalquila podem ser não substituídos ou substituídos na medida em que tal substituição faz sentido quimicamente a partir do ponto de vista do procedimento de síntese e das propriedades do produto final. As formas não substituídas são as preferidas.

[0046] "Halo", como aqui utilizado, inclui flúor, cloro, bromo e iodo. Cloro e bromo são frequentemente preferidos.

[0047] Os grupos de partida adequados para L e L' incluem halo, tal como cloro, iodo ou bromo, tosilatos (OTs), e triflatos OTf). Outros grupos de partida adequados incluem mesilatos (OMs), e brosilatos (OBr).

[0048] Os agentes de acoplamento peptídicos incluem tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (TBTU) assim como cloridreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodi-imida (EDC), N-hidroxibenzo-triazol (HOBt), carbonildi-imidazol (CDI), hexafluorofosfato de 2-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (HATU), N,N' diciclohexil carbodi-imida (DCC), e N-hidróxi succinamida (NHS).

[0049] Os agentes de proteção adequados incluem metil carbamato de 9-fluoroenila (Fmoc), e carbamato de t-butila (Boc), assim como TBDMS, TMS, TES, TIPS, TBDPS, benzoíla e carbamatos ou amidas em geral.

[0050] Estas listas não são exaustivas e muitos grupos de partida, grupos de proteção e agentes de acoplamento peptídicos adequados são conhecidos na técnica e muitos estão comercialmente disponíveis.

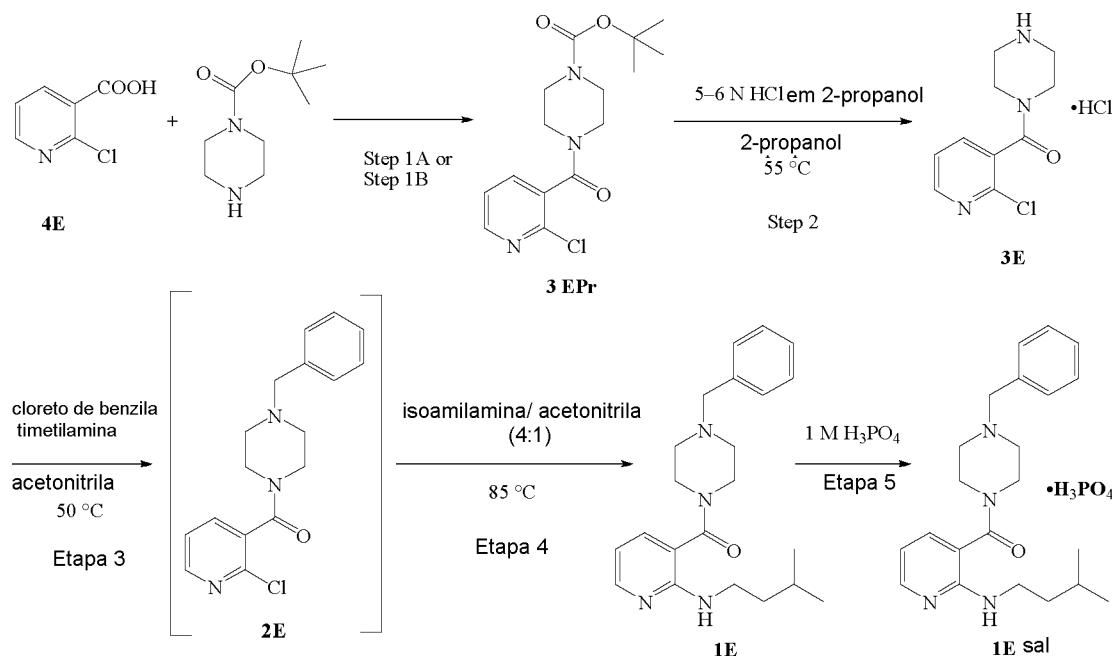
[0051] Todas estas reações podem ser feitas em solventes orgânicos ou solventes orgânicos aquosos tais como tetraidrofurano (THF),

dimetil formamida (DMF), cloreto de metileno, MTBE, todos os alcanos, NMP, DMA, EtOAc, e em que não seja para a etapa (2), exceto solventes alcoólicos).

[0052] As formas de realização preferidas incluem aquelas em que R² é H e R¹ é etila, propila, butila ou amila incluindo as suas formas iso. Outras formas preferidas são aquelas em que m e/ou n são 0 ou 1, de preferência 0. Os grupos de partida preferidos são halo, preferivelmente cloro.

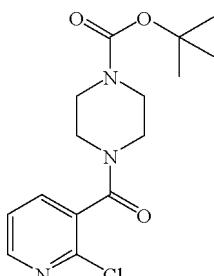
[0053] Os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar, mas não para limitar a invenção.

[0054] Os Exemplos de 1 a 5 detalham a seguinte série de reações.



Exemplo 1

Preparação de 3E protegido (Etapa 1A)



3EPr

[0055] A. Ácido cloronicotínico (5,0 g) (4E) foi carregado em um frasco de fundo redondo seguido por acetonitrila (anidra, 40 ml) e TBTU (1,4 equiv). À solução resultante adicionou-se trietilamina (2,0 equiv) e a mistura foi agitada na temperatura ambiente durante 30 minutos. Boc-piperazina (1,4 equiv) foi adicionada em parcelas mantendo a temperatura dentro do frasco em < 20°C. A reação foi lentamente aquecida para 40°C e foi considerada completa pela análise de HPLC após quatro horas.

[0056] A mistura de reação foi temperada com uma solução saturada de NaHCO₃ (40 ml) e foi extraída com acetato de isopropila (IPAc) (2 × 40 ml). As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com uma solução de salmoura a 50% (40 ml). A camada orgânica foi secada por Na₂SO₄, filtrada e concentrada para um quarto do volume original. O óleo resultante transformado em uma suspensão espessa após agitação.

[0057] Éter metil terc-butílico (MTBE, 100 ml) foi adicionado e a suspensão resultante foi esfriada em um banho de água gelada e agitada durante uma hora. Os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1 e o bolo do filtro foi lavado com MTBE frio (20 ml). O sólido foi secado em um forno a vácuo na temperatura ambiente para fornecer 6,7 g (65% de rendimento) de 3EPr como um sólido castanho claro.

[0058] A reação acima foi repetida sob condições idênticas e na

mesma escala resultando em 6,5 g (65% de rendimento) de 3EPr.

[0059] B. O procedimento do parágrafo A foi repetido utilizando 1 g em vez de 5 g de ácido cloronicotínico e quantidades correspondentes de outros reagentes, e utilizando acetato de etilo ou acetato de isopropila como solventes. Os rendimentos foram:

- acetato de etilo: 50% com uma pureza de HPLC de 95,5% (AUC @ 226 nm).
- acetato de isopropila: 80% com uma pureza de HPLC de 97,8% (AUC @ 226 nm).

[0060] C. Em um procedimento modificado do parágrafo A, o ácido cloronicotínico (5,0 g) foi carregado em um frasco de fundo redondo seguido por IPAc (grau de reagente, 40 ml) e trietilamina (2,0 equiv). À solução resultante adicionou-se TBTU (1,4 equiv) e a mistura foi agitada na temperatura ambiente durante 30 minutos. Boc-piperazina (1,4 equiv) foi adicionada em parcelas mantendo a temperatura dentro do frasco em < 20°C. A reação foi agitada na temperatura ambiente durante o fim de semana e foi considerada completa pela análise de HPLC após 50 horas. A mistura de reação foi temperada com solução saturada de NaHCO₃ (40 ml) e foi extraída com IPAc (2 × 40 ml). As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com uma solução de salmoura a 50% (40 ml).

[0061] A camada orgânica foi secada por Na₂SO₄, filtrada e concentrada para um quarto do volume original.

[0062] Ao óleo resultante foi adicionado MTBE (100 ml) e a suspensão resultante foi agitada na temperatura ambiente durante 5,5 horas e durante mais duas horas em um banho de água gelada. Os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1 e o bolo do filtro foi lavado com MTBE frio (20 ml). O produto foi seco em um forno a vácuo na temperatura ambiente para fornecer 6,3 g (61% de rendimento) de 4EPr como um sólido castanho claro. A pure-

za por HPLC foi > 99,9% (AUC @ 226 nm).

[0063] D. A reação do parágrafo C foi ampliada para 10 g e avançou para a conclusão após 16 horas. O extrato de IPAc obtido após a preparação aquosa da mesma maneira como acima foi dividido em duas partes iguais. Cada parte foi reduzida para 20 g (\approx 1:1 IPAc/produto em peso) sob pressão reduzida.

[0064] Parte 1: À pasta fluida resultante foi adicionado MTBE (100 ml). A suspensão resultante foi agitada na temperatura ambiente durante 16 horas e durante mais duas horas em um banho de água gelada. Os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1 e o bolo do filtro foi lavado com MTBE frio (20 ml). O produto foi secado em um forno a vácuo na temperatura ambiente para fornecer 6,8 g (66% de rendimento) de 4EPr como um sólido castanho claro. A pureza por HPLC foi > 99,9% (AUC @ 226 nm).

[0065] Parte 2: O processo para a Parte 2 foi o mesmo como a Parte 1, mas usou-se heptano como o anti-solvente, resultando em 8,2 g (80% de rendimento) de 4EPr como um sólido castanho claro. A pureza de HPLC foi > 99,9% (AUC @ 226 nm).

Exemplo 2

Preparação de 3EPr pela Etapa 1B

[0066] A. Ácido cloronicotínico (5,0 g, 31,7 mmol) foi carregado em um frasco de fundo redondo seguido por tolueno (anidro, 40 ml) e DMF (120 μ l, 0,05 equiv). A pasta fluida resultante foi aquecida para 55°C e depois cloreto de tionila (4,6 ml, 2,0 equiv) foi adicionado por gotejamento durante cinco minutos. A pasta fluida foi agitada em 55°C durante três horas, durante as quais a evolução de gás foi observada tempo e a mistura tornou-se homogênea. Uma amostra foi tirada e temperada em metanol contendo trietilamina para fornecer o éster metílico para análise por HPLC. A análise por HPLC mostrou que a conversão para o cloreto de ácido estava completa. O frasco foi adaptado

para destilação e aquecido em refluxo. Aproximadamente 20 ml de solvente foram removidos, depois a solução foi esfriada para a temperatura ambiente. Um frasco separado foi carregado com N-Boc-piperazina (7,1 g, 1,2 equiv), acetonitrila (30 ml, 6 vol), e trietilamina (13,3 ml, 3,0 equiv). Uma leve endotermia foi observada. A solução preparada de cloreto de ácido foi então adicionada em uma taxa que manteve a temperatura interna abaixo de 35°C. A pasta fluida resultante foi agitada durante uma hora na temperatura ambiente. A análise por HPLC mostrou que a reação estava completa. A mistura de reação foi temperada com solução saturada de NaHCO₃ (20 ml) e a camada aquosa foi extraída com acetato de isopropila (20 ml). As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (10 ml). A análise por HPLC da lavagem com água mostrou alguma perda de produto para a camada aquosa. A camada orgânica foi concentrada em aproximadamente dois volumes e em seguida heptanos foram adicionados (50 ml) para induzir a precipitação. A pasta fluida resultante foi agitada na temperatura ambiente durante 30 minutos, esfriada para 0 a 5°C durante uma hora, filtrada, e lavada com heptanos. O bolo úmido foi então secado durante a noite sob vácuo para dar 9,85 g de 3EPr [MDM W-1(14), 95% de rendimento, 99,8% de área por HPLC] como um sólido amarelo claro.

[0067] B. O procedimento do parágrafo A deste Exemplo foi conduzido usando 1,2 equivalente de cloreto de tionila e 1,1 equivalente de N-Boc-piperazina. A reação de ácido 2-cloronicotínico com cloreto de tionila foi feita a 65°C para melhor controlo a evolução de gás. A reação do intermediário de cloreto de ácido e N-Boc-piperazina foi feita com IPAc em vez de acetonitrila para ajudar a prevenir a precipitação de bicarbonato de sódio durante o temperamento. A reação produziu 3EPr como um sólido esbranquiçado [MDM-W-5(8), 9,83 g, 95% de rendimento, > 99,9% de área por HPLC].

[0068] C. O temperamento e a preparação da reação com a solução aquosa de bicarbonato de sódio pode levar a uma emulsão que requer um tempo para se separar. A mudança para um temperamento com água aliviou este problema em pequena escala; no entanto como a escala aumentada, uma camada de pano significativa persistiu. A camada de pano pode ser dissolvida por ligeiramente aquecer a mistura bifásica para 30 a 35°C.

Exemplo 3

Desproteção (Etapa 2)

[0069] A. 1 g de 3EPr preparado no Exemplo 1 ou Exemplo 2 foi tratado com 2 equivalentes de HCl e 5 a 6N TF 2 propanol a 50°C. A reação foi observada de ter ido para a conclusão em 6 horas.

[0070] B. O método do parágrafo A foi repetido com 6,7 g de 3EPr. À uma solução de 3EPr (6,65 g) em 2-propanol (5 vol) foi adicionado 5 a 6 N HCl em 2-propanol (2 equiv). A reação foi aquecida para 40°C e foi considerada completa pela análise de HPLC após quatro horas. Uma suspensão branca formou-se durante este tempo.

[0071] A reação foi esfriada para a temperatura ambiente e os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1. O bolo do filtro foi lavado com 2-propanol (20 ml). O sólido foi seco sob vácuo elevado para fornecer 4,63 g (86% de rendimento) de 3E•HCl como um sólido branco. A ¹H RMN foi coerente com a estrutura atribuída e a pureza por HPLC foi > 99,9% (AUC @ 226 nm).

[0072] C. O processo do parágrafo A foi repetido utilizando 11,5 g de 3EPr. A uma solução de 3EPr (11,5 g) em IPA (70 ml, 6 vol) foi adicionado de 5 a 6 N HCl em IPA (2 equiv). A reação foi aquecida para 50°C e foi considerada completa pela análise de HPLC após nove horas. Uma suspensão branca formou-se durante este tempo.

[0073] A reação foi esfriada para a temperatura ambiente e os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® #

1. O bolo do filtro foi lavado com IPA (2 x 15 ml). O sólido foi secado sob vácuo elevado para obter 9,01 g (97% de rendimento) de 3E•HCl como um sólido branco. A ^1H RMN foi coerente com a estrutura atribuída e a pureza por HPLC Foi > 99,9% (AUC @ 226 nm).

[0074] Em cada um dos casos anteriores, a adição do ácido em 2-propanol pode ser efetuada em temperaturas mais elevadas, por exemplo, 55°C ou 60°C. Isso melhora o controle da evolução de gás.

[0075] D. O composto 3EPr (9,0 g, 27,6 mmol) foi carregado em um frasco de fundo redondo seguido de 2-propanol (5 vol). A pasta fluida foi aquecida para 55°C durante cujo tempo a mistura se tornou homogênea e 5 a 6 N HCl em 2-propanol (2 equiv) foi adicionado por gotejamento. A mistura de reação foi agitada em 55°C por quatro horas durante cujo tempo uma suspensão espessa se formou. A análise de HPLC indicou que a reação estava completa. A pasta fluida resultante foi esfriada para a temperatura ambiente e filtrada lavando com 2-propanol (2 vol). O bolo úmido foi secado sob vácuo na temperatura ambiente para fornecer 3E [MDM-W-11(3), 6,9 g, 96% de rendimento, > 99,9% de área por HPLC].

[0076] E. A reação no parágrafo D foi graduada seis vezes e avaliada por calorimetria de reação (RC1, Mettler-Toledo). Um medidor de fluxo de gás foi configurado e calibrado para garantir uma medição precisa da evolução de gás. O composto 3EPr (56,6 g, 174 mmol) foi colocado em suspensão em 2 propanol (300 ml) e a pasta fluida foi aquecida para 55 ° C durante cujo tempo a mistura se tornou homogênea. Ácido clorídrico (1 equiv) em 2-propanol (3,8 M) foi adicionado por meio de uma bomba de adição em uma taxa linear por 30 minutos durante cujo tempo um desprendimento de gás foi observado e a precipitação começou. A reação foi então deixada agitar durante 30 minutos antes da adição de ácido clorídrico (1 equiv) na mesma taxa. A pasta fluida resultante foi agitada durante quatro horas a 55°C. A pasta fluida

foi esfriada para a temperatura ambiente e filtrada lavando com 2-propanol para fornecer 44,0 g de um sólido amarelo claro após a seccagem ao longo do fim de semana na temperatura ambiente sob vácuo [MDM W 56(1), 97% de rendimento, > 99,9% de área por HPLC]. Um perfil térmico endotérmico muito suave foi observado fornecendo uma entalpia de reação de -57,8 kJ/mol e uma mudança de temperatura adiabática de -9,6 K. A taxa de evolução de gás foi amena. A integração da curva de fluxo de massa indicou 3,9 L de gás evoluído durante a experiência. A curva de fluxo de massa mostrou que a taxa de evolução de gás desacelerou quase imediatamente após a descontinuação da adição de HCl, o que sugere que a evolução de gás foi controlada pela dose razoavelmente.

Exemplo 4

Conversão para 1E (Etapas 3 e 4)

[0077] A. Uma amostra bruta de 3E preparada no Exemplo 3 tornou-se complexa com TFA e reagida com benzaldeído e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (2 a 6% de metanol/DCM). As frações contendo o produto foram coletadas e o solvente foi removido sob pressão reduzida para obter o composto 2 G como um óleo espesso. A ^1H RMN foi coerente com a estrutura atribuída. Visto 2E era um óleo, 3E foi convertido no composto 1E em um método condensando de duas etapas.

[0078] B. À uma amostra de 0,6 g de 3E•HCl em 2-propanol foi adicionada trietilamina (2 equiv) seguido por cloreto de benzila (1,2 equiv). A suspensão resultante foi aquecida para 50°C quando se transformou em uma solução límpida. A reação foi monitorada por HPLC e foi considerada completa após três horas.

[0079] A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e os sólidos (sal de TEA•HCl) foram filtrados. Ao filtrado foi adicionado isoamilamina (10 equiv), e a solução resultante foi aquecida pa-

ra 75°C. A reação foi monitorada por HPLC e observou-se ter sofrido apenas 36% de conversão após 48 horas.

[0080] C. O procedimento do parágrafo B foi realizado com 3,5 g de 3E•HCl em acetonitrila (20 ml). A reação foi realizada com 1,0 equivalente de cloreto de benzila na presença de trietilamina (3,0 equiv). A reação foi considerada completa pela análise de HPLC após agitação a 50°C durante 4,5 horas. A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e os sólidos foram filtrados. O filtrado foi bombeado para secura. O resíduo foi dissolvido em isoamilamina (20 ml) e foi aquecido para 90°C. A reação foi considerada completa por análise de HPLC após 24 horas. A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e o solvente foi reduzido para ajustar o peso do resíduo para 9,5 g. A isto foi adicionado heptano (30 ml), resultando na formação de uma suspensão castanha clara. Esta foi agitada na temperatura ambiente durante uma hora e durante mais uma hora em um banho de água gelada. Os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1 e o bolo do filtro foi lavado com água fria (2 x 20 ml). O produto foi secado em um forno a vácuo, resultando em 3,98 g (70% de rendimento) do composto 1E com uma pureza de HPLC de > 99,9% (AUC @ 226 nm).

[0081] D. Alternativamente, à uma amostra de 8,0 g de 3E•HCl em acetonitrila (48 ml, 6 vol) foi adicionada trietilamina (2,5 equiv) seguido por cloreto de benzila (1,05 equiv). A suspensão resultante foi aquecida para 50°C quando se transformou em uma solução límpida. A reação foi monitorada por HPLC e foi considerada completa após 3,5 horas (3,3% de 3E•HCl não reagido). A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e os sólidos (sal de TEA•HCl) foram filtrados.

[0082] O filtrado foi evaporado para ajustar o peso da solução para 18 g (\approx 1:1 acetonitrila/produto em peso). A isto foi adicionado isoami-

lamina (\approx 4:1 isoamilamina/acetonitrilo, 10 equiv de isoamilamina) e a solução resultante foi aquecida para 85°C. A reação foi considerada completa por análise de HPLC após 19 horas (3,0% de 2E não reagido). A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e o solvente foi removido sob pressão reduzida para ajustar o peso da solução para 22 g (1 g de solvente por grama de 1E). No esfriamento um sólido úmido foi obtido e este foi triturado com heptanos (6 g por grama de 1E). A suspensão foi agitada na temperatura ambiente durante 16 horas e os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1 e o bolo do filtro foi lavado com heptanos (20 ml), seguido por água (2×20 ml). O produto foi secado em um forno a vácuo na temperatura ambiente para fornecer 7,78 g (69% de rendimento em duas etapas) de 1E como um sólido castanho claro. Pureza por HPLC foi > 99,9% (AUC @ 226 nm).

[0083] E. As etapas 3 e 4 foram conduzidas em uma escala de 6 g seguindo o procedimento apresentado acima. O composto 3E (6,0 g, 22,9 mmol) foi colocado em suspensão em acetonitrila (30 ml) e trietilamina foi adicionada (9,6 ml, 3 equiv), seguido por cloreto de benzila (2,8 ml, 1,05 equiv). A reação foi aquecida para 50°C durante 24 horas. A análise de HPLC em 20 horas e novamente em 24 horas não indicou nenhuma progressão (10,4% do 3E remanescente) e a reação foi esfriada para a temperatura ambiente e filtrada para remover sais de amônio. A solução foi então concentrada sob vácuo para aproximadamente dois volumes para fornecer uma solução concentrada de 2E bruto (80% de área de pureza bruta). Isoamilamina (26 ml, 10 equiv) foi então adicionada e a reação foi aquecida em refluxo (81°C) durante 24 horas. A análise de HPLC, em 20 horas e novamente em 24 horas não indicou nenhuma outra progressão (73% de área de pureza bruta) e a reação esfriou-se para a temperatura ambiente e foi concentrada sob pressão reduzida para aproximadamente 4 volumes. Heptano (35

ml) foi então adicionado e a pasta fluida resultante agitada durante o fim de semana. A pasta fluida fina foi filtrada e lavada com água em cujo ponto os sólidos se dissolveram não deixando nada no funil de filtro. O filtrado bifásica foi extraído com IPAc e depois concentrado em um óleo. O óleo foi dissolvido em IPA (30 ml), água (36 ml) foi lentamente adicionada até que a solução se tornou ligeiramente opaca e depois uma pequena quantidade de Composto 1E [DSJ-F-20(15)] foi adicionada para induzir a cristalização. A pasta fluida resultante foi filtrada lavando com água e foi secada durante a noite sob vácuo fornecendo 5,46 g de Composto 1E [MDM-W-26(8), 65% de rendimento, 99,9% de área por HPLC, 98,6% em peso por ^1H RMN].

[0084] F. A N-benzilação foi avaliada nas temperaturas que variam de 25°C a 75°C para determinar a temperatura ideal para a reação e a sua tolerância térmica. A taxa de reação aumentou com a temperatura, mas a totalidade se aproximou de um objetivo comum de conversão de 95 a 96% após 20 horas independentemente da temperatura. A análise por HPLC mostrou pouca diferença na pureza bruta, mas uma mudança de cor notável ocorreu acima de 45°C tornando a solução de reação cor laranja clara. Uma temperatura de reação de 45°C foi considerada ideal em termos de taxa de reação e mudança de cor reduzida e descamação precipitada.

[0085] G. O processo foi melhorado pelo aumento da quantidade de cloreto de benzila em 1,1 a 1,15 equivalentes e por ligeiramente diminuir a temperatura da reação para 45°C para reduzir a descoloração. Uma preparação aquosa após a N-benzilação foi incorporada para remover as impurezas geradas durante a reação de N-benzilação antes da formação de 1E. O isolamento do produto foi executado mediante a cristalização direta da mistura de reação (isoamilamina) mediante a adição de água como um anti-solvente. A perda de produto para o filtrado era tipicamente menor do que 7%. 1E foi isolado como um

sólido branco em aproximadamente 80% de rendimento em pureza muito elevada.

Exemplo 5

Desempenho Completa do Esquema 1

[0086] A. Uma amostra de 50 g de ácido 2-cloronicotínico foi tratada com N-Boc piperazina (1,2 equiv) na presença de trietilamina (2 equiv) e TBTU (1,4 equiv). A reação foi realizada em IPAc (300 ml, 6 vol) e na temperatura ambiente. A reação foi considerada completa pela análise de HPLC após 12 horas. Após filtração e preparação aquosa, o extrato de IPAc foi reduzido para 180 g sob vácuo (\approx 1:1 IPAc/produto em peso).

[0087] À pasta fluida resultante foi adicionado heptano (\approx 1:1 IPAc/produto em peso). A suspensão resultante foi agitada na temperatura ambiente durante 16 horas e durante mais duas horas em um banho de água gelada. O produto foi coletado por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1 e o bolo do filtro foi lavado com heptano (2 x 25 ml). O produto foi secado em um forno a vácuo na temperatura ambiente para obter 78,53 g (76% de rendimento) de composto 3EPr como um sólido castanho. Pureza por HPLC foi de 98,9% (AUC @ 226 nm).

[0088] B. 73,53 g de composto 3EPr obtido no parágrafo A foram submetidos à reação de Boc-desproteção na presença de 2 equivalentes de 5 a 6 N HCl em IPA. A reação foi realizada a 50°C com IPA (6 vol). A reação foi considerada completa pela análise de HPLC após sete horas. A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e foi filtrada através de um papel de filtro Whatman® # 1. O bolo de filtro foi lavado com IPA (2 x 50 ml) e secado sob alto vácuo para obter 56,31 g (95% de rendimento) de 3E•HCl como um sólido castanho. Pureza por HPLC foi > 99,9%.

[0089] C. Uma amostra de 54,0 g de 3E•HCl foi então tratada com

cloreto de benzilo (1,05 equiv) na presença de trietilamina (3 equiv). A reação foi realizada a 50°C em acetonitrila (6 vol). A reação foi considerada completa por análise de HPLC após oito horas. A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e os sólidos foram filtrados em um papel de filtro Whatman® # 1. O bolo de filtro foi lavado com acetonitrila (2 x 25 ml). O solvente foi removido sob pressão reduzida para ajustar o peso da solução para 110 g (≈1:1 acetonitrila/produto em peso).

[0090] A isto foi adicionado isoamilamina (220 g) para produzir 4:1 isoamilamina/acetonitrila. A solução resultante foi aquecida para 85°C e a reação foi considerada completa pela análise de HPLC após 22 horas. A mistura de reação foi esfriada para a temperatura ambiente e o solvente foi removido sob pressão reduzida para ajustar o peso da solução para 150 g. À mistura resultante foi adicionada heptano (6 vol). A suspensão foi agitada na temperatura ambiente durante 16 horas e os sólidos foram coletados por filtração em um papel de filtro Whatman® # 1 e o bolo do filtro foi lavado com heptano (250 ml x 2), seguido por água (250 ml x 2). O produto foi secado em um forno de vácuo na temperatura ambiente para fornecer 60,66 g (80% de rendimento em duas etapas) de 1E como um sólido castanho claro. Pureza por HPLC foi > 99,9% (AUC @ 226 nm).

Exemplo 6

Preparação de Sal de Fosfato

[0091] A. Um frasco de fundo redondo de três gargalos de 22 L equipado com um funil de adição, um condensador de refluxo, um termopar, e um agitador suspenso foi colocado em uma manta de aquecimento. O frasco foi carregado com etanol (7,9 L, Pharmco lot # 0802062) seguido por água desionizada (420 ml). Depois 1E (700 g, 2,1 mol) foi carregado no reator e a mistura resultante foi aquecida para 75°C. Uma solução 1 M de H₃PO₄ em etanol (4,5 L, 4,5 mol, 2,1

equiv) foi carregada como uma corrente rápida durante um período de 30 min. A mistura resultante foi agitada durante 15 min e 1E•H₃PO₄ (0,5 g) foi adicionado como semente para a recristalização. A solução límpida resultante foi esfriada para a temperatura ambiente em uma taxa de 20°C/h.

[0092] A suspensão esfriada foi deixada agitar na temperatura ambiente durante 11 h e filtrada através de um papel de filtro Whatman® # 1. Etanol (2,8 L x 2) foi utilizado para auxiliar na transferência e também para lavar o bolo do filtro. O produto foi secado sob vácuo até um peso constante a 25°C para fornecer 1E•H₃PO₄ como um sólido branco (751 g, 62% de rendimento). A análise de HPLC indicou uma pureza de > 99,9% (AUC @ 226 nm) e a ¹H RMN foi consistente com a estrutura atribuída.

[0093] B. O composto 1E (4,9 g, 13,3 mmol) foi dissolvido em uma mistura de 5% de água em etanol a 75°C e em seguida 1 M ácido fosfórico em etanol (2,1 equiv) foi adicionado. A solução resultante foi esfriada para a temperatura ambiente em uma taxa de 20°C/h durante cujo tempo um precipitado pegajoso se formou. A mistura foi reaquecida para dissolver o precipitado, e depois o sistema foi semeado com 1E fosfato e esfriado como descrito acima. A pasta fluida resultante foi agitada durante a noite na temperatura ambiente e depois filtrada, lavando com etanol para fornecer 4,9 g de 1E fosfato (79% de rendimento, > 9,9% de área por HPLC) como um sólido branco. Os resultados indicaram que a semeadura foi essencial para o estabelecimento da forma de cristal apropriada.

[0094] C. Quatro reações de formação de fosfato foram conduzidas em uma escala de 10 g sob as seguintes condições:

MDM-W-126: 1,25 equivalente de H₃PO₄, 12 volumes de EtOH

MDM-W-128: 1,25 equivalente de H₃PO₄, 12 volumes de água a 5% em EtOH

MDM-W-130: 1,0 equivalente de H_3PO_4 , 12 volumes de EtOH

MDM-W-131: 1,0 equivalente de H_3PO_4 , 12 volumes de água a 5% em EtOH

[0095] Cada reação foi aquecida para 70°C, semeada com 1E fosfato [0,1% em peso, DAJ-F-40(2)], e esfriada para 20°C em uma taxa de 20°C/hora. A pasta fluida de espessa resultante foi agitada durante a noite, filtrada (lavagem com EtOH), e secada em um peso constante. Os resultados destas reações são mostrados na Tabela 1. Em geral, a pasta fluida obtida a partir de reações usando água a 5% em EtOH foi mais manejável.

Tabela 1

Tela de Formação do Sal de Fosfato

Reação	% de rendimento	Pureza (% de Área)	Potência (% em peso)*
MDM-W-126	97	> 99,9	105
MDM-W-128	95	> 99,9	105
MDM-W-130	96	> 99,9	102
MMD-W-131	94	> 99,9	103

* Potência em relação à batelada de NCSS DAJ-F-40(2).

Propriedades Físicas do Sal de Mono-Fosfato

[0096] A solubilidade em água foi > 36 mg/ml nas condições ambientes, e o sal foi cristalino pela análise de XRPD.

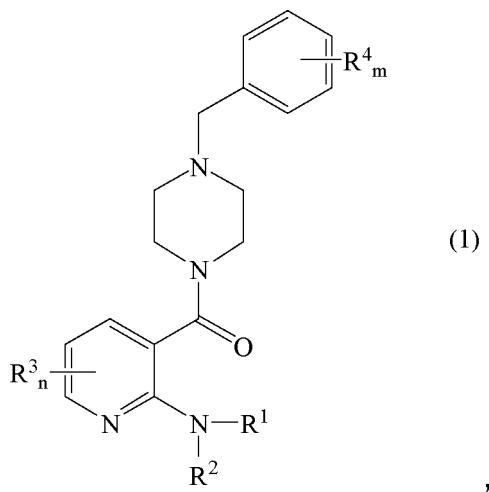
[0097] A análise DSC mostrou um evento endotérmico a 179°C que é consistente com uma fusão.

[0098] A análise de sorção de umidade mostrou que o material foi moderadamente higroscópico, adsorvendo 4,4% em peso de água a 60% RH e 11,2% em peso a 90% RH.

[0099] A análise IC mostrou uma relação de fórmula (1) para contra-íon de 1:1,6 a 1:2,3 em diferentes bateladas do sal.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para sintetizar um composto da fórmula:



ou o sal de fosfato do mesmo,

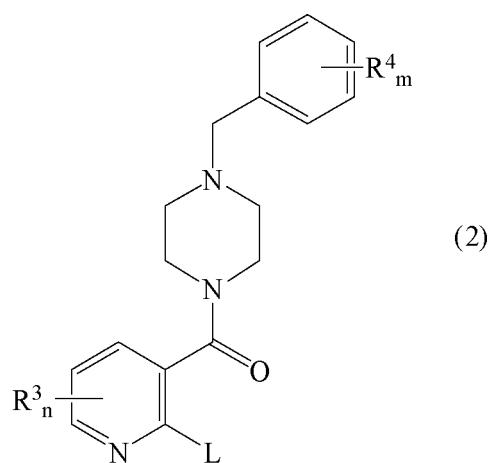
na qual

R^1 é isoamila;

R^2 é H;

cada R^{3n} e R^{4m} é H;

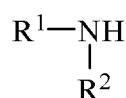
caracterizado pelo fato de que o método compreende reagir
um composto da fórmula



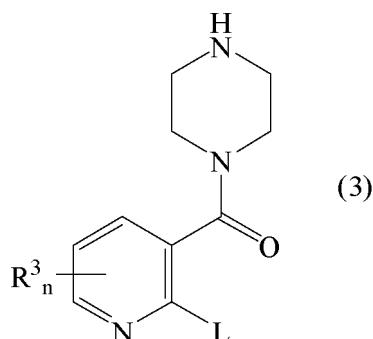
na qual

R^{3n} e R^{4m} são como definidos na fórmula (1) e L é um grupo
de saída,

com um composto da fórmula

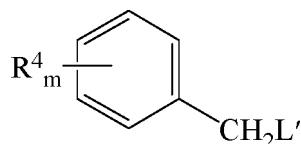


em que R^1 e R^2 são como definidos na fórmula (1),
em que o composto de fórmula (2) é preparado pela reação
de um composto de fórmula



na qual

R^3n é como definido na fórmula (1) e L é um grupo de saída,
com um composto da fórmula

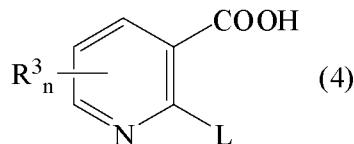


em que R^4m é como definido na fórmula (1), e L' é um grupo
de saída na presença de uma base suave e um solvente aprótico;

para obter o referido composto de fórmula (1) seguido pela
obtenção de uma suspensão em heptanos do composto de fórmula (1)
e

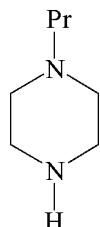
recuperar o composto de fórmula (1) purificado por filtração.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo fato de que o composto de fórmula (3) é obtido pela reação de um
composto da fórmula



em que R^3n é como definido na fórmula (1) e L é um grupo
de saída,

com um composto da fórmula

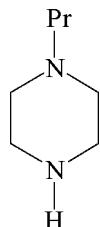


na qual

Pr é um grupo de proteção, na presença de um agente de acoplamento de peptídeo, seguido pela remoção do grupo de proteção; ou

pelo acoplamento seletivo do composto de fórmula (4) com a piperazina não protegida; ou

pela conversão do composto de fórmula (4) no cloreto de benzoíla e o acoplamento do cloreto no composto da fórmula

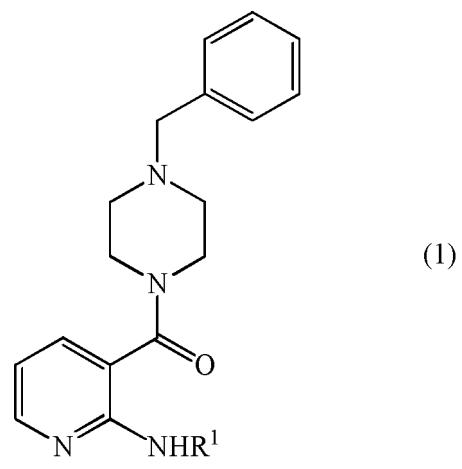


seguido pela remoção do grupo de proteção.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que L e L' são halo.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que inclui ainda converter o composto purificado de fórmula (1) a um sal fosfatado por reação do referido composto com ácido fosfórico, em que a reação ocorre em uma mistura de solventes consistindo em etanol e água.

5. Método para converter um composto da fórmula (1):



na qual

R¹ é isoamila em um sal de fosfato, caracterizado pelo fato de que é pela reação do referido composto com ácido fosfórico, em que a reação ocorre em uma mistura de solventes consistindo em etanol e água.

Diagrama de fluxo do processo da etapa 1

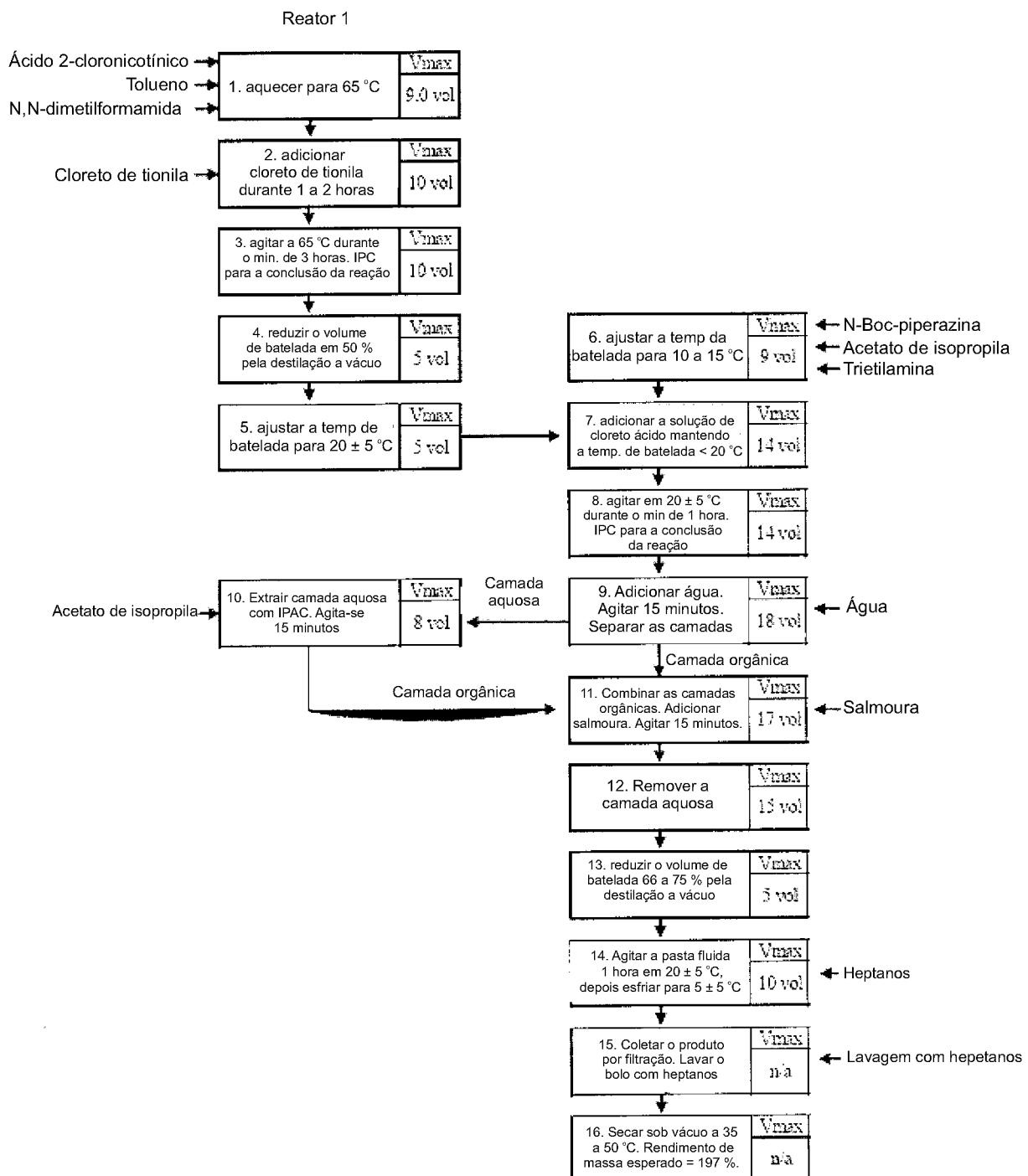


FIG. 1

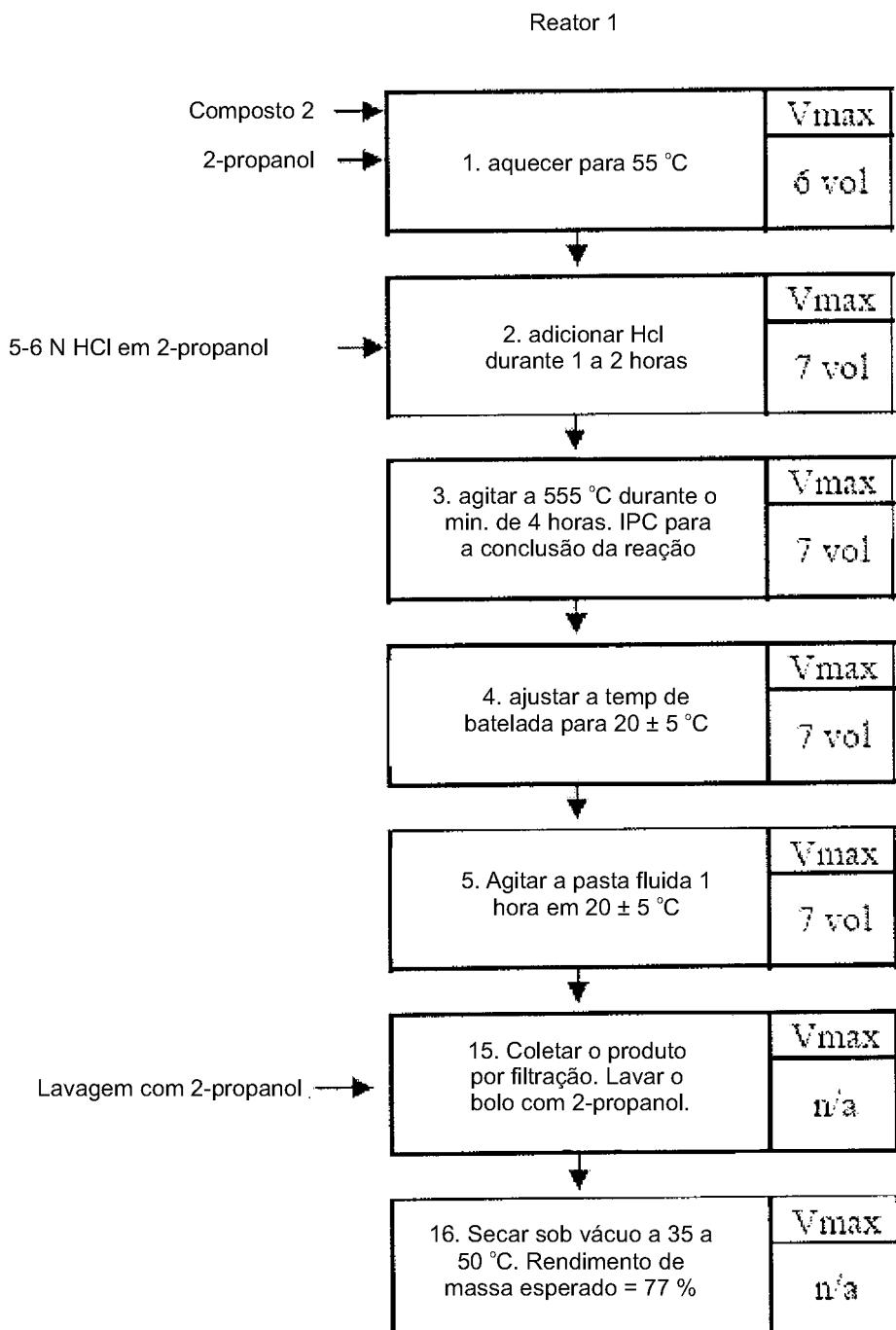
Diagrama de fluxo do processo da etapa 2

FIG. 2

Diagrama de fluxo do processo das etapas 3 e 4

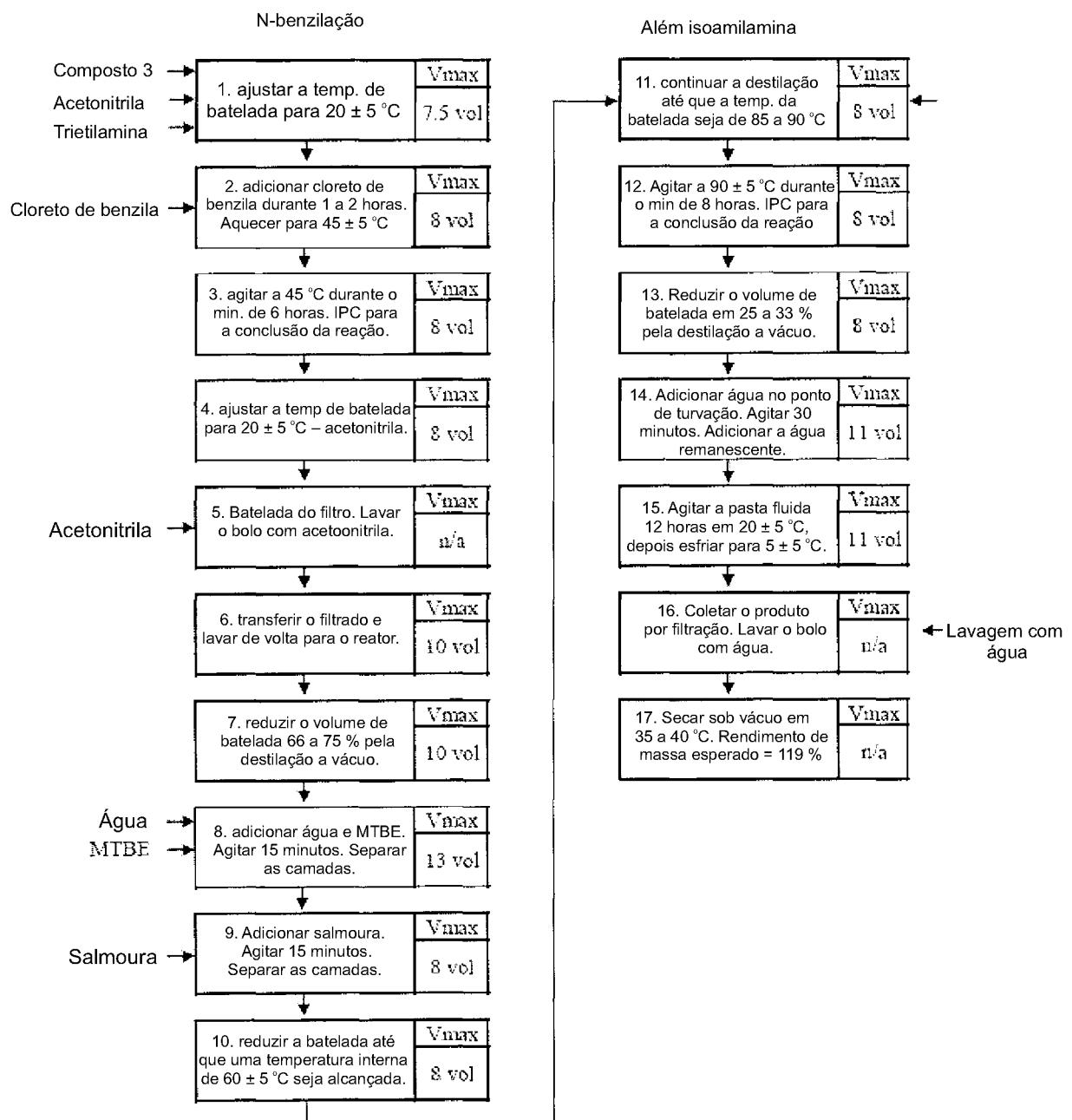


FIG. 3

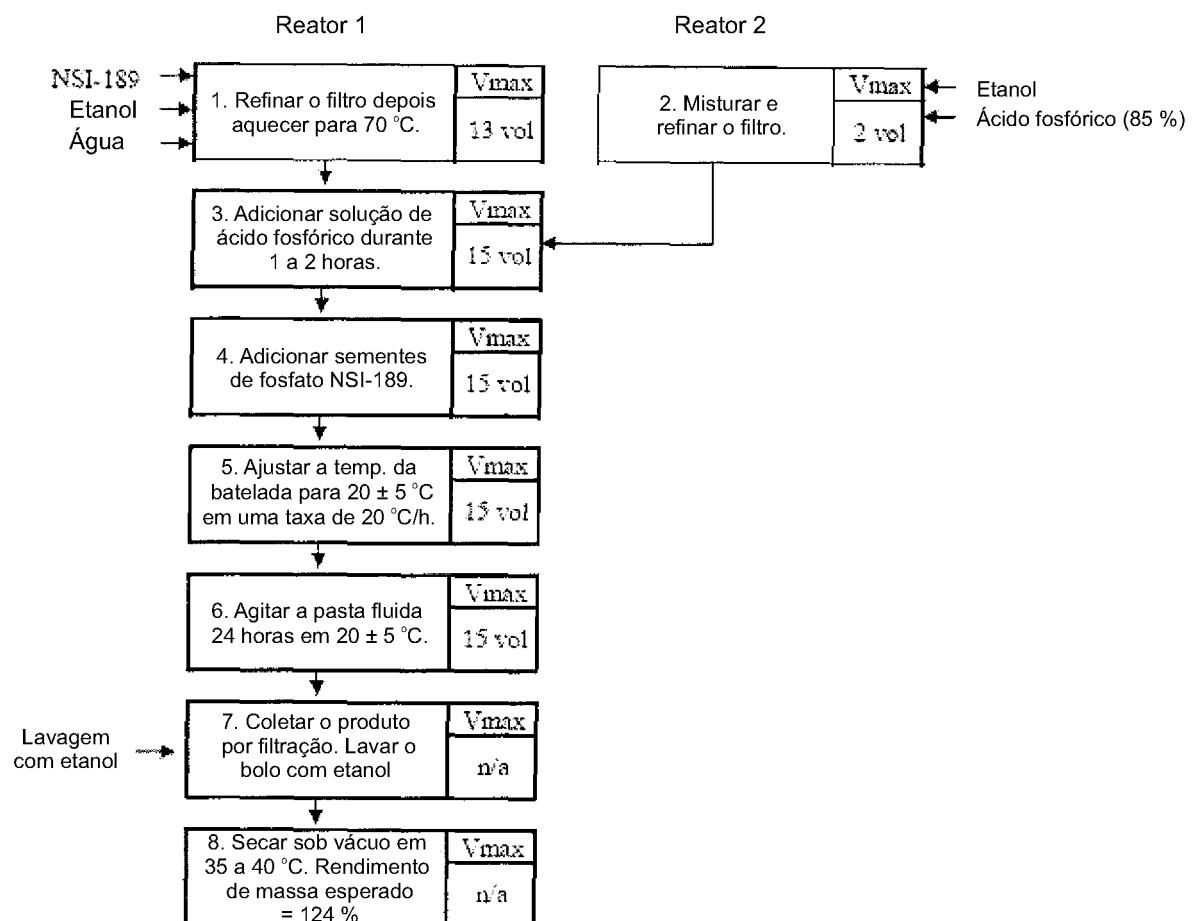
Diagrama de fluxo do processo da etapa 5

FIG. 4