



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 100**

51 Int. Cl.:
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07799822 .7**
96 Fecha de presentación : **26.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2049519**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **Derivados cíclicos como moduladores de la actividad del receptor de quimioquinas.**

30 Prioridad: **28.07.2006 US 834235 P**
21.03.2007 US 896026 P
25.07.2007 US 782810

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2010

73 Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Company**
Route 206 and Province Line Road
Princeton, New Jersey 08543-4000, US

72 Inventor/es: **Carter, Percy H.;**
Cherney, Robert J.;
Hynes, John;
Ko, Soo S.;
Srivastava, Anurag;
Xiao, Zili y
Yang, Michael G.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 346 100 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

Derivados cíclicos como moduladores de la actividad del receptor de quimioquinas.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a moduladores de la actividad del receptor de quimioquina que presentan una combinación no esperada de propiedades farmacológicas deseables. A composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, y a procedimientos de uso de los mismos como agentes para el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares y de forma particular, diabetes, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, y esclerosis múltiples, junto con procedimientos de preparación de compuestos e intermedios para los mismos. Se proporcionan también en esta patente metabolitos de compuestos activos, composiciones farmacéuticas y uso de los mismos.

15 **Antecedentes de la invención**

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas de peso molecular de 6 a 15 kDa, que son liberadas por una amplia variedad de células para atraer y activar, entre otros tipos de células, los macrófagos, linfocitos T y B, eosinófilos, basófilos y neutrófilos (revisado en: Charo y Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445; y Rollins, *Blood* 1997, 90, 909-928). Hay dos clases principales de quimioquinas, CXC y CC, en función de si las dos primeras cisteínas en la secuencia de aminoácidos están separadas por un único aminoácido (CXC) o son adyacentes (CC). Las quimioquinas CXC, tales como interleuquina-8 (IL-8), proteína-2 activante de neutrófilo (NAP-2) y proteína de actividad estimuladora del crecimiento del melanoma (MG-SA) son quimiotácticas principalmente para neutrófilos y linfocitos T, mientras que las quimioquinas CC, tales como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , las proteínas quimiotácticas monocíticas (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y MCP-5) y las eotaxinas (-1 y -2) son quimiotácticas para, entre otros tipos de células, macrófagos, linfocitos T, eosinófilos, células dendríticas y basófilos. También existen las quimioquinas linfotactina-1, linfotactina-2 (ambas quimioquinas C), y fractalquinas (una quimioquina CX₃C) que no se encuentran en ninguna de las subfamilias de quimioquinas principales.

Las quimioquinas se unen a receptores de superficie celular específicos que pertenecen a la familia de proteínas de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G (revisado en: Horuk, *Trends Pharm. Sci.* 1994, 15, 159-165) que se denominan "receptores de quimioquina". En la unión de sus ligandos afines, los receptores de quimioquina transducen una señal intracelular a través de las proteínas G triméricas asociadas, dando lugar, entre otras respuestas, a un aumento rápido en concentración de calcio intracelular, cambios en la forma de la célula, mayor expresión de moléculas de adhesión celular, desgranulación y promoción de migración de células. Hay al menos diez receptores de quimioquina humanos que se unen o responden a quimioquinas CC con las siguientes modelos característicos (revisados en Zlotnik y Oshie, *Immunity* 2000, 12, 121): CCR-1 (o "CKR-1" o "CC-CKR-1") [MIP-1 α , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch, y col., *Cell* 1993, 72, 415-425 y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-2A y CCR-2B (o "CKR-2A"/"CKR-2B" o "CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B") [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 1994, 91, 2752-2756, y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-3 (o "CKR-3" o "CC-CKR-3") [eotaxina-1, eotaxina-2, RANTES, MCP-2, MCP-4] (Combadiere, y col., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 16491-16494, y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-4 (o "CKR-4" o "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power y col., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 19495-19500 y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR-5 (o "CKR-5" o "CC-CKR-5") [MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β] (Sansom y col., *Biochemistry* 1996, 35, 3362-3367); CCR-6 (o "CKR-6" o "CC-CKR-6") [LARC] (Baba, y col., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 14893-14898); CCR-7 (o "CKR-7" o "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie y col., *J. Leukoc. Biol.* 1997, 62, 634-644); CCR-8 (o "CKR-8" o "CC-CKR-8") [1-309] (Napolitano y col., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2759-2763), CCR-10 (o "cur-10" o "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini, y col., *DNA y Cell Biol.* 1997, 16, 1249-1256); y CCR-11 [MCR-1, MCP-2 y MCP-4] (Schweickert, y col., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 90550).

Además se ha demostrado que los receptores de quimioquina de mamíferos, citomegalovirus de mamíferos, virus del herpes, y poxvirus expresan, en células infectadas, proteínas con las propiedades de uniones de receptores de quimioquina (revisado en: Wells y Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.* 1997, 8, 741-748). Las quimioquinas CC humanas tales como RANTES y MCP-3, pueden provocar movilización rápida de calcio mediante estos receptores viralmente codificados. La expresión del receptor puede permitirse para infección permitiendo la subversión de vigilancia del sistema inmune normal y respuesta a infección. De forma adicional receptores de quimioquina humana tales como CXCR4, CCR2, CCR3, CCR5 y CCR8, pueden actuar como co-receptores para la infección de células de mamífero por microbios como, por ejemplo, con los virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Las quimioquinas y sus receptores afines se ha visto implicadas como mediadores importantes de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunoregulatorias, incluyendo asma y enfermedades alérgicas; así como también patologías autoinmunes, tales como artritis reumatoide y esclerosis múltiple; y enfermedades metabólicas, tales como aterosclerosis y diabetes (revisado en: Charo y Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Z. Gao y W. A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3733; P. H. Carter, *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6, 510; Trivedi, y col., *Ann. Reports Med. Chem.* 2000, 35, 191; Saunders y Tarby, *Drug Disc. Today* 1999, 4, 80; Premack y Schall, *Nature Medicine* 1996, 2, 1174). Por ejemplo la quimioquina quimioattractora-1 monocítica (MCP-1) y su receptor

receptor-2 de quimioquina CC (CCR-2) juegan un papel central en la atracción de leucocitos a sitios de inflamación y en consecuencia activan estas células. Cuando la quimioquina MCP-1 se une a CCR-2, esta induce un aumento rápido en la concentración de calcio intracelular, mayor expresión de moléculas de adhesión celular, y la promoción de migración de leucocitos. La demostración de la importancia de la interacción MCP-1/CCR-2 se ha proporcionado mediante experimentos con ratones genéticamente modificados. Los ratones MCP-1^{-/-} fueron incapaces de reclutar monocitos en sitios de inflamación tras diferentes tipos de exposición inmune (Bao Lu, y col., J. Exp. Med. 1998, 187, 601). Igualmente, ratones CCR-2^{-/-} fueron incapaces de reclutar monocitos o producir interferona- γ cuando se exponían a diversos agentes exógenos; además los leucocitos de ratones sin CCR-2 no migraron en respuesta a MCP-1 (Landin Boring, y col., J. Clin. Invest. 1997, 100, 2552), con lo que se demuestra la especificidad de la interacción MCP-1/CCR-2. Otros dos grupos de autores han descrito independientemente resultados equivalentes con cepas diferentes de ratones CCR-2^{-/-} (William A. Kuziel, y col., Proc. Natl. Acad. SCI USA 1997, 94, 12053, y Takao Kur1Hara, y col., J. Exp. Med. 1997, 186, 1757). La viabilidad y salud generalmente normal de animales MCP-1^{-/-} y CCR-2^{-/-} es notoria en cuanto a que la alteración de la interacción de MCP-1/CCR-2 no induce crisis fisiológica. Tomados conjuntamente, estos datos llevan a uno a la conclusión de que las moléculas que bloquean las acciones de MCP-1/CCR2 serían útiles en el tratamiento de un número de trastornos inflamatorios y autoinmunes (revisado en: M. Feria y F. Díaz-Gonzalez, Exp. Opin. Ther. Patents 2006, 16, 49; y J. Dawson, W. Miltz, y C. Wiessner, C. Exp. Opin. Ther. Targets 2003, 7, 35). Esta hipótesis se ha validado ahora en un número de diferentes modelos de enfermedad en animal tal como se describe anteriormente.

Se sabe que MCP-1 es sobrerregulado en pacientes con artritis reumatoide (Alisa Koch, y col., J. Clin. Invest. 1992, 90, 772 - 779). Además varios estudios preclínicos han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de artritis reumatoide. Se demostró recientemente que una vacuna de ADN que codifica MCP-1 alivia la artritis inducida por poliadyuvante crónica en ratas (Sawsan Youssef, y col., J. Clin. Invest. 2000, 106, 361). Igualmente los síntomas de enfermedad se podrían controlar mediante administración directa de anticuerpos para MCP-1 a ratas con artritis inducida por colágeno (Hiroomi Ogata, y col., J. Pathol. 1997, 182, 106), o artritis inducida por pared celular de estreptococo (Ralph C. Schimmer, y col., J. Immunol. 1998, 160, 1466). Quizás del modo más significativo se demostró que un antagonista de péptido de MCP-1, MCP-1(9-76), previene tanto el comienzo de la enfermedad como que reduce los síntomas de enfermedad (en función del tiempo de administración) en el modelo de ratón MRL-1pr de artritis (Jiang-Hong Gong, y col., J. Exp. Med. 1997, 186, 131). Además se ha demostrado que la administración de antagonistas de CCR2 de molécula pequeña reducía la valoración clínica en modelos de artritis de roedor (C. M. Brodmerkel, y col., J. Immunol. 2005, 175, 5370; y M. Xia, y col. Solicitud de Patente de Estados Unidos 0069123, 2006). La administración de un anticuerpo anti-CCR2 presentaba efectos variables en CIA murino, en función del tiempo de administración (H. Bruhl, y col. J. Immunol. 2004, 172, 890). Estudios recientes con ratones CCR2^{-/-} han sugerido que la delección de CCR2 puede exacerbar modelos de artritis en roedor en circunstancias experimentales específicas (M. P. Quinones, y col. J. Clin. Invest. 2004, II 3, 856; M. P. Quinones, y col. J. Mol. Med. 2006, 84, 503).

Se sabe que MCP-1 es sobrerregulado en lesiones ateroscleróticas, y se ha demostrado que niveles en circulación de MCP-1 se reducen mediante tratamiento con agentes terapéuticos (Abdolreza Rezaie-Majd, y col, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 2002, 22, 1194 - 1199). Varios estudios clave han demostrado que el valor potencial terapéutico de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de aterosclerosis. Por ejemplo, cuando se cruzan ratones MCP-1^{-/-} con ratones deficitarios en receptor LDL, se observaba una reducción del 83% en la deposición de lípido aórtico (Long Gu, y col., Mol. Cell 1998, 2, 275). De forma similar, cuando se ablacionó genéticamente en ratones que ya sobreexpresaban apolipoproteína B humana, los ratones resultantes se protegieron de la formación de lesión aterosclerótica respecto a los ratones de control apoB MCP-1^{+/+} (Jennifa Gosling, y col., J. Clin. Invest. 1999, 103, 773). Igualmente cuando se cruzaron ratones CCR-2^{-/-} con ratones E^{-/-} con apolipoproteína, se observaba una disminución significativa en la incidencia de lesiones ateroscleróticas (Landin Boring, y col, Nature 1998, 394, 894; T. C. Dawson, y col. Atherosclerosis 1999, 143, 205). Finalmente cuando se administró a ratones E^{-/-} con apolipoproteína un gen que codifica un antagonista peptídico de CCR2 el tamaño de la lesión se reduce y aumenta la estabilidad de la placa (W. Ni, y col. Circulation 2001, 103, 2096 - 2101). El trasplante de médula ósea de ratones CCR2^{-/-} en ratones ApoE3-Leiden inhibió la aterogénesis temprana (J. Guo, y col. Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 2003, 23, 447), pero tenía efectos mínimos en lesiones avanzadas (J. Guo, y col. Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 2005, 25, 1014).

Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 muestran de forma típica resistencia a insulina como una de las características distintivas de la enfermedad. La resistencia a la insulina se asocia también con el agrupamiento de anormalidades conocidas como el "síndrome metabólico" o "síndrome X", que incluye obesidad, aterosclerosis, hipertensión y dislipidemia (revisado en: Eckel, y col. Lancet 2005, 365, 1415). Es bien sabido que la inflamación juega un papel en la exacerbación del proceso de enfermedad en diabetes de tipo 2 y patologías del "síndrome X" (revisado en: Chen, Pharmacological Research 2006, 53, 469; Neels y Olefsky, J. Clin. Invest. 2006, 116, 33; Danadona y Aljada, Am J Cardiol. 2002 90, 27G-33G; Pickup y Crook, Diabetologia 1998, 41, 1241). Se reconoce que MCP-1 juega un papel en la resistencia a insulina inducida por obesidad. En cultivo, los preadipocitos humanos expresaban de forma constitutiva MCP-1 (Gerhardt, Mol. Cell. Endocrinology 2001, 175, 81). CCR2 se expresa en adipocitos. La adición de MCP-1 a adipocitos diferenciados *en vitro* reduce la captación de glucosa estimulada por insulina y la expresión de diversos genes adipogénicos (LpL, adipina, GLU-4), aP2, receptor β 3-adrenérgico, y PPAR γ) (P. Sartipy y D. Loskutoff, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1999, 96, 6902). Pacientes con diabetes de tipo 2 presentaban mayores niveles de MCP-1 circulante que controles no diabéticos (S. Nomura, y col. Clin. Exp. Immunol. 2000, 121, 437), y se podría reducir la liberación de MCP-1 de tejido adiposo mediante tratamiento con terapias anti-diabéticas tales como

metformina o tiazolidindionas (J. M. Bruun, y col. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005, 90, 2282). Igualmente MCP-1 también era sobreexpresado en modelos murina experimentales de obesidad, y se producía principalmente por el tejido adiposo (Sartipy y Loskutoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 7265). En ratones obesos la expresión de MCP-1 precedió y tuvo lugar de forma concurrente con el comienzo de la resistencia a insulina (H. Xu, y col. J. Clin. Invest. 2003, 112, 1821). Otro estudio mostró que la expresión de MCP-1 se correlacionaba de forma positiva con la masa corporal en el tejido adiposo perigonadal de ratones (Weisberg, y col. J. Clin. Invest. 2003, 112, 1796). Consistentemente con estos datos el desarrollo de resistencia a insulina en ratones db/db se mejoró bien por delección genética de MCP-1 o bien por expresión inducida con gen de un péptido negativo dominante (H. Kanda, y col. J. Clin. Invest. 2006, 116, 1494). La conversión lógica se pudo demostrar también: sobreexpresión de MCP-1 en tejido adiposo promovió la resistencia a insulina (N. Kamei, y col. J. Biol. Chem. 2006, 281, 26602). También ha aparecido un resultado conflictivo muestra que la delección genética de MCP-1 no efectúa resistencia a insulina en el ratón db/db (F. Y. Chow, y col. Diabetologia 2007, 50, 471). En consistencia con los datos de MCP-1, estudios directos con CCR2 (el receptor de MCP-1) han mostrado que este juega un papel en la formación de obesidad y resistencia a insulina inducida por obesidad. El mantenimiento de una dieta con alto contenido en grasas aumentó los valores de monocitos inflamatorios CCR2⁺ en circulación en ambos tipos salvajes (C. L. Tsou, y col. J. Clin. Invest. 2007, 117, 902) y ratones ApoE^{-/-} (F. Tacke, y col. J. Clin. Invest. 2007, 117, 185). La delección genética de CCR2 redujo los valores de macrófagos activados en tejido adiposo murino (C. N. Lumeng, y col. Diabetes 2007, 56, 16), pero no afectó a una población de macrófagos adiposos M2 a pesar de mantener el estado "pobre" (C. N. Lumeng, y col. J. Clin. Invest. 2007, 117, 175). La delección genética de CCR2 redujo la obesidad inducida por la dieta y mejoró la sensibilidad a insulina en el modelo de obesidad inducido por la dieta (S. P. Weisberg, y col. J. Clin. Invest. 2006, 116, 115; P Cornelius, R P Gladue, RS Sebastian, patente WO 2006/013427 A2), 2006), en función de las condiciones experimentales (A. Chen, y col. Obes. Res. 2005, 13, 1311). La administración de un antagonista de CCR2 de molécula pequeña también mejoró la sensibilidad a insulina en este mismo modelo (S. P. Weisberg, y col. J. Clin. Invest. 2006, 116, 115).

Dos estudios describieron el importante papel de CCR2 en la inflamación vascular inducida por hipertensión, remodelación e hipertrofia (E Bush y col., Hypertension 2000, 36, 360; M Ishibashi, y col. Circ. Res. 2004, 94, 1203).

Se sabe que MCP-1 es sobrerregulada en esclerosis múltiple humana y se ha demostrado que la terapia efectiva con interferona β -1b reduce la expresión de MCP-1 en células mononucleares de sangre periférica, lo que sugiere que MCP-1 juega un papel en la progresión de la enfermedad (Carla Iarlori, y col., J. Neuroimmunol. 2002, 123, 170 - 179). Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción de MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de la esclerosis múltiple; todos estos estudios se han demostrado en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal convencional para esclerosis múltiple. La administración de anticuerpos para MCP-1 a animales con EAE redujo de forma significativa la recaída de la enfermedad (K. J. Kennedy, y col., J. Neuroimmunol. 1998, 92, 98). Además dos artículos han mostrado que ratones CCR-2 ^{-/-} son resistentes a EAE (B. T. Fife, y col., J. Exp. Med. 2000, 192, 899; L. Izikson, y col., J. Exp. Med. 2000, 192, 1075). Un artículo subsiguiente extendió estas observaciones iniciales examinando los efectos de la delección de CCR2 en ratones de diferentes cepas (S. Gaupp, y col. Am. J. Pathol. 2003, 162, 139). Es de reseñar que la administración de un antagonista de CCR2 de molécula pequeña también dio lugar a progresión brusca de la enfermedad en ratones C57BL/6 (C. M. Brodmerkel, y col. J. Immunol. 2005, 175, 5370).

Se sabe que MCP-1 está sobrerregulado en pacientes que desarrollan el síndrome de la bronquiолitis obliterante tras trasplante de pulmón (Martine Reynaud-Gaubert, y col., J. of Heart y Lung Transplant, 2002, 21, 721 - 730; John Belperio, y col., J. Clin. Invest. 2001, 108, 547 - 556). En un modelo de ratón de síndrome de la bronquiолitis obliterante, la administración de un anticuerpo para MCP-1 condujo a la atenuación de la obliteración de las vías respiratorias; igualmente los ratones CCR2 ^{-/-} eran resistentes a la obliteración de las vías respiratorias en este mismo modelo (John Belperio, y col., J. Clin. Invest. 2001, 108, 547 - 556). Estos datos sugieren que el antagonismo de MCP-1/CCR2 puede ser beneficioso en el tratamiento de rechazo de órganos tras trasplante. Además los estudios han mostrado que la alteración del eje MCP-1/CCR2 fue capaz de prolongar la supervivencia del trasplante de isleta (I Lee y col. J Immunol 2003, 171, 6929; R Abdi y col., J Immunol 2004, 172, 767). En los modelos de injerto de rata se demostró que CCR2 y MCP-1 están sobrerregulados en injertos que desarrollan las vasculopatía del injerto (K Horiguchi y col., J Heart Lung Transplant. 2002, 21, 1090). En otro estudio la terapia con gen anti-MCP-1 atenuó la vasculopatía del injerto (A Saiura y col., Artheroscler Thromb Vase Biol 2004, 24, 1886). Un estudio describió la inhibición de la formación neointimal de injerto en vena experimental por bloqueo de MCP-1 (H Tatewaki y col., J Vasc Surg. 2007, 45, 1236).

Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento del asma. El secuestro de MCP-1 con un anticuerpo neutralizante en ratones expuestos a ovalbúmina dio lugar a la reducción notable en la hipersensibilidad bronquial e inflamación (Jose-Angel Gonzalo, y col., J. Exp. Med. 1998, 188, 157). Esto mostró la posibilidad de reducir la inflamación alérgica de las vías respiratorias en ratones expuestos a huevos de *Schistosoma mansoni* mediante la administración de anticuerpos para MCP-1 (Nicholas W. Lukacs, y col., J. Immunol. 1997 158, 4398). En coherencia con esto los ratones MCP-1 ^{-/-} mostraron una respuesta reducida a la exposición a huevos de *Schistosoma mansoni* (Bao Lu, y col., J. Exp. Med. 1998, 187 601).

ES 2 346 100 T3

Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de enfermedad renal. La administración de anticuerpos de MCP-1 en un modelo de ratón de glomerulonefritis dio lugar a una reducción notable en la formación crescente glomerular y deposición de colágeno de tipo I (Clare M. Lloyd, y col., J. Exp. Med. 1997, 185, 1371). Además, ratones MCP-1 ^{-/-} con nefritis por suero nefrotóxico inducido mostraron significativamente menos daño tubular que sus equivalentes MCP-1 ^{+/+} (Gregory H. Tesch, y col., J. Clin. Invest. 1999, 103, 73).

Diversos estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de lupus eritematoso sistémico. Ratones CCR2^{-/-} mostraron supervivencia prolongada y enfermedad renal reducida respecto a sus equivalentes WT en un modelo de ratón de lupus eritematoso sistémico (G. Perez de Lema, y col. J. Am. Soc. Neph. 2005, 16, 3592). Estos datos son coherentes con la actividad de modificación de la enfermedad encontrada en estudios recientes de delección genética de MCP-1 (S. Shimizu, y col. Rheumatology (Oxford) 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch, y col., J. Exp. Med. 1999, 190, 1813) o administración de un antagonista peptídico de CCR2 (H. Hasegawa, y col. Arthritis & Rheumatism 2003, 48, 2555) en modelos de roedor de lupus.

Se observó un aumento reseñable de 30 veces en linfocitos CCR2⁺ de lámina propia en los intestinos delgados de pacientes de Crohn respecto a íleo no enfermo (S. J. Connor, y col. Gut 2004, 53, 1287). También es de reseñar que hubiese una expansión en el subconjunto de monocitos CCR2⁺/CD14⁺/CD56⁺ en circulación en pacientes con enfermedad de Crohn activa respecto a los controles. Diversos estudios en roedores han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de enfermedad/colitis de Crohn. Se protegieron ratones CCR2^{-/-} frente a los efectos de colitis inducida por dextrán sulfato sódico (Pietro G. Andres, y col., J. Immunol. 2000, 164, 6303). La administración de un antagonista de molécula pequeña de CCR2, CCR5, y CXCR3 (afinidades de unión a ratón = 24, 236, y 369 nM, respectivamente) también protegieron contra colitis inducida por dextrán sulfato sódico (H. Tokuyama, y col. Int. Immunol. 2005, 17, 1023). Finalmente los ratones MCP-1^{-/-} mostraron daño en colon sustancialmente reducido (tanto macroscópico como histológico) en un modelo inducido por hapteno de colitis (W. I. Khan, y col. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2006, 291, G803).

Dos artículos describieron la sobreexpresión de MCP-1 en las células del epitelio intestinal y mucosa del intestino de pacientes con enfermedad de intestino inflamado (H. C. Reinecker, y col., Gastroenterology 1995, 108, 40, y Michael C. Grimm, y col., J. Leukoc. Biol. 1996, 59, 804).

Un estudio describió la asociación de polimorfismo de promotor en el gen de MCP-1 con esclerodermia (esclerosis sistémica) (S Karrer y col., J Invest Dermatol. 2005, 124, 92). En modelos relacionados de fibrosis tisular, la inhibición del eje CCR2/MCP-1 redujo la fibrosis en la piel (T Yamamoto y K Nishioka, J Invest Dermatol 2003, 121, 510; AM Ferreira y col., J Invest Dermatol. 2006, 126, 1900), pulmón (T Okuma y col., J Pathol. 2004, 204, 594; M Gharaee-Kermani y col., Cytokine 2003, 24, 266), riñón (K Kitagawa y col., Am J Pathol. 2004, 165, 237; T Wada y col., JAM Soc Nephrol 2004, 15, 940), corazón (S Hayashidani y col., Circulation 2003, 108, 2134), e hígado (S Tsuruta y col., Int J Mol Med. 2004, 14, 837).

Un estudio ha demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de alveolitis. Cuando se trataron ratas con lesión pulmonar por complejo inmune de la IgA por vía intravenosa con anticuerpos contra MCP-1 de rata (JE), se aliviaron parcialmente los síntomas de alveolitis (Michael L. Jones, y col., J. Immunol. 1992, 149, 2147).

Diversos estudios han mostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en tratamiento de cáncer (revisado en: M. J. Craig y R. D. Loberg, Cancer Metastasis Rev. 2006, 25, 611; I. Conti y B. Rollins, Seminars in Cancer Biology 2004, 14, 149; R. Giles y R. D. Loberg, Curr. Cancer Drug Targets 2006, 6, 659). Cuando se trataron ratones inmunodeficientes que portan células de carcinoma de mama humano con un anticuerpo anti-MCP-1, se observaron inhibición de micrometástasis en pulmón y aumento en supervivencia (Rosalba Salcedo, y col., Blood 2000, 96, 34 - 40). Usando especímenes de tumor clínico humano se asoció al expresión de CCR2 con el progreso de cáncer de próstata (Y. Lu, y col. J. Cell. Biochem. 2007, 101, 676). La expresión de MCP-1 *in vitro* se ha demostrado que media en el crecimiento celular e invasión de cáncer de próstata (Y. Lu, y col. Prostate 2006, 66, 1311); además MCP-1 expresado por células de cáncer de próstata inducía a progenitores de médula ósea humana a la resorción ósea (Y. Lu, y col., Cancer Res. 2007, 67, 3646).

Múltiples estudios han descrito el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de restenosis. En humanos, los niveles de MCP-1 se correlacionan directamente con el riesgo de restenosis (F. Cipollone, y col. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001, 21, 327). Ratones deficientes en CCR2 o en MCP-1 mostraron reducciones en la zona íntima y en la relación íntima/media (respecto a cachorros de la misma camada de tipo salvaje) tras lesión arterial (Merce Roque, y col. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002, 22, 554; A. Schober, y col. Circ. Res. 2004, 95, 1125; W. J. Kim, y col. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 310, 936). En ratones la transfección de un inhibidor negativo dominante de MCP-1 en el músculo del esqueleto (K. Egashira, y col. Circ. Res. 2002, 90, 1167) también redujo la hiperplasia íntima tras lesión arterial. El bloqueo de CCR2 usando un anticuerpo neutralizante redujo la hiperplasia neointimal tras implantación de prótesis endovascular en primates (C. Horvath, y col. Circ. Res. 2002, 90, 488).

Dos artículos describen la sobreexpresión de MCP-1 en ratas con trauma cerebral inducido (J. S. King, y col., J. Neuroimmunol. 1994, 56, 127, y Joan W. Berman, y col., J. Immunol. 1996, 156, 3017). Además los artículos han

ES 2 346 100 T3

demostrado que tanto ratones CCR2^{-/-} (O. B. Dimitrijevic, y col. Stroke 2007, 38, 1345) como ratones MCP-1^{-/-} (P. M. Hughes, y col. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2002, 22, 308) están parcialmente protegidos frente a lesión por isquemia/reperfusión.

5 Se sabe que monocitos/macrófagos juegan un importante papel en el desarrollo de dolor neuropático (Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, Pain 2000, 86, 25). En coherencia con esta noción se ha descrito recientemente un papel potencial para CCR2 en el tratamiento tanto de dolor inflamatorio como de dolor neuropático. Ratones CCR2^{-/-} mostraron respuestas alteradas a dolor inflamatorio respecto a sus equivalentes WT, incluyendo comportamiento de dolor reducido tras inyección de formalina intraplantar y alodinia mecánica ligeramente reducida tras inyección de CFA por vía intraplantar (C. Abbadie, y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 7947). Además ratones CCR2^{-/-} no mostraron alodinia mecánica significativa tras lesión del nervio ciático. Igualmente un antagonista de CCR2 de molécula pequeña redujo la alodinia mecánica hasta ~80% de niveles pre-lesión tras administración por vía oral (C. Abbadie, J. A. Lindia, y H. Wang, documento WO PCT 110376, 2004).

15 Un estudio describió el papel crítico de MCP-1 en cardiomiopatía isquémica (N. G. Frangogiannis, y col., Circulation 2007, 115, 584). Otro estudio describió la atenuación de fallo cardíaco experimental tras inhibición de MCP-1 (S Hayashidani y col., Circulation 2003, 108, 2134).

20 Otros estudios han proporcionado evidencia de que MCP-1 se sobreexpresa en diversos estados de enfermedad no citados anteriormente. Estos artículos proporcionan evidencia correlativa de que antagonistas de MCP-1 podrían ser agentes terapéuticos útiles para tales enfermedades. Otro estudio ha demostrado la sobreexpresión de MCP-1 en aloinjertos cardíacos en roedor, lo que sugiere un papel para MCP-1 en la patogénesis de arterioesclerosis por trasplante (Mary E. Russell, y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6086). La sobreexpresión de MCP-1 se ha observado en las células del endotelio del pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Harry N. Antoniades, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 5371). De forma similar, la sobreexpresión de MCP-1 se ha observado en la piel de pacientes con psoriasis (M. Deleuran, y col., J. Dermatol. Sci 1996, 13, 228, y R. Gillitzer, y col., J. Invest. Dermatol. 1993, 101, 127); se han descrito también hallazgos correlativos con predominancia de células CCR2+ (C. Vestergaard, y col. Acta Derm. Venerol. 2004, 84, 353). Finalmente un artículo reciente ha mostrado que MCP-1 se sobreexpresa en los cerebros y fluido cerebroespinal de pacientes con demencia asociada a VIH-1 (Alfredo Garzino-Demo, documento WO 99/46991).

Además se ha mostrado que el polimorfismo de CCR2 está asociado con sarcoidosis al menos en un subconjunto de pacientes (P. Spagnolo, y col. Am J Respir Crit Care Med. 2003, 168, 1162).

35 Se debería observar también que se ha implicado CCR-2 como un co-receptor para algunas cepas de VIH (B. J. Doranz, y col., Cell 1996, 85, 1149). Se ha determinado también que el uso de CCR-2 como un co-receptor de VIH se puede correlacionar con progresión de la enfermedad (Ruth I. Connor, y col., J. Exp. Med. 1997, 185, G21). Este hallazgo es coherente con el reciente hallazgo de que la presencia de un mutante de CCR-2, CCR2-64I, se correlaciona positivamente con el comienzo retardado de VIH en la población humana (Michael W. Smith, y col., Science 1997, 277, 959). Si bien MCP-1 no se ha visto implicado en estos procedimientos, puede ser que antagonistas de MCP-1 que actúan mediante unión a CCR-2 puede tener efectos terapéuticos beneficiosos en el retardo de la progresión de la enfermedad hasta SIDA en pacientes infectados con VIH.

45 Se debería observar también que CCR-2 es también el receptor para las quimioquinas humanas MCP-2, MCP-3, y MCP-4 (Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436- 445). Debido a que los nuevos compuestos de fórmula (I) descritos en esta invención antagonizan MCP-1 por unión al receptor CCR-2, puede ser que estos compuestos de fórmula (I) son también antagonistas efectivos de las acciones de MCP-2, MCP-3, y MCP-4, que son mediadas por CCR-2. De acuerdo con lo anterior, cuando se hace referencia en esta invención a "antagonismo de MCP-1", se debe asumir que esto es equivalente a "antagonismo de estimulación de quimioquina de CCR-2".

50 De acuerdo con lo anterior compuestos que modulan la actividad de quimioquina podrían mostrar un amplio intervalo de utilidades en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares. La publicación de solicitud de patente WO2005021500 (incorporada a esta patente por referencia y asignada al presente solicitante) describe compuestos que modulan actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4 mediante CCR2. La referencia también describe diversos procedimientos para preparar estos compuestos incluyendo síntesis multi-etapa que incluyen la introducción y subsiguiente eliminación de grupos protectores.

55 Es deseable encontrar nuevos compuestos con características farmacológicas mejoradas con moduladores de quimioquina conocidos. Por ejemplo, es deseable encontrar nuevos compuestos con actividad inhibitoria de CCR-2 y selectividad por CCR-2 mejoradas frente a otros receptores acoplados con proteína G (es decir, receptor 5HT2A). Es también deseable encontrar compuestos con características ventajosas y mejoradas en una o más de las siguientes categorías:

- 65 (a) propiedades farmacéuticas (es decir, solubilidad, permeabilidad, aptitud para formulaciones de liberación sostenida);
- (b) requerimientos de dosificación (por ejemplo, menores dosificaciones y/o dosificación una vez al día);

ES 2 346 100 T3

- (c) factores que reducen las características de pico de concentración en sangre (por ejemplo, aclaramiento y/o volumen de distribución);
- 5 (d) factores que aumenta la concentración de fármaco activo en el receptor (es decir, unión de proteína, volumen de distribución);
- (e) factores que reducen la dificultad de interacciones fármaco-fármaco clínicas (inhibición o inducción de enzima cytochrome P450, tal como inhibición de CYP 2D6, véase G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, Clin. Pharmacokinet. 2000, 38, 41-57, que se incorpora a esta invención como referencia);
- 10 (f) factores que reducen el potencial de efectos secundarios adversos (por ejemplo, selectividad farmacológica más allá de receptores acoplados con proteína G, reactividad química o metabólica potencial, penetración en el SNC limitada, selectividad del canal de iones. Es especialmente deseable encontrar compuestos que presenten una combinación deseable de las características farmacológicas anteriormente citadas.
- 15

Es también deseable en la técnica proporcionar procedimientos nuevos y/o mejorados para preparar tales compuestos. Estos procedimientos se pueden caracterizar, sin limitación, por a) fácil adaptación a producción a gran escala, tal como planta piloto o escalas de fabricación, b) etapas y/o técnicas de proceso que permitan mejoras en la pureza (incluyendo pureza quiral), estabilidad y/o facilidad de manipulación de intermedios y/o compuestos finales; y/o c) menos etapas de proceso.

20

Sumario de la invención

25 De acuerdo con lo anterior se divulgan en esta patente nuevos moduladores de actividad de quimioquina, o sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos, que presentan una combinación inesperada de características farmacológicas deseables.

30 La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de los compuestos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o forma profármaco del mismo.

35 La presente divulgación también proporciona procedimientos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, de forma particular diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y/o aterosclerosis, que comprende administración a un huésped en necesidad de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de los compuestos de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o forma profármaco del mismo.

40 La presente divulgación proporciona un procedimiento para la preparación de compuestos descritos en la invención e intermedios útiles para los mismos.

45 La presente divulgación también proporciona metabolitos de compuestos activos, o sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos, composiciones farmacéuticas de los mismos y procedimientos de uso de los metabolitos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, de forma particular diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y/o aterosclerosis.

La presente divulgación proporciona nuevos derivados cíclicos para uso en terapia.

50 La presente divulgación proporciona el uso de nuevos derivados cíclicos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 describe una estructura de cristal por rayos X de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo.

60 Descripción detallada

Esta descripción se refiere en general a moduladores de actividad del receptor de quimioquina que presenta combinación inesperada de propiedades farmacológicas deseables. Composiciones farmacéuticas que contienen los mismos y procedimientos de uso de los mismos como agentes para el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, de forma particular diabetes, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple, junto con procedimientos de preparación de compuestos e intermedios para los mismos.

65

ES 2 346 100 T3

Los compuestos de la presente invención demuestran de forma inesperada una combinación deseable de características farmacológicas incluyendo un grado sorprendentemente alto de biodisponibilidad oral en combinación con indicaciones de que los compuestos son altamente eficaces y tienen excelentes criterios de seguridad.

5 Moduladores conocidos de receptores CCR2, tales como los descritos en la publicación de patente WO2005021500 publicada el 10 de Marzo de 2005 (patente de Estados Unidos n° 7.163.937, expedida el 16 de Enero de 2007, asignada al presente solicitante) que muestran un grado adecuado de permeabilidad de membrana (un factor crítico de biodisponibilidad oral), no son suficientemente eficaces, medido por su capacidad de unión a CCR-2, y/o les faltan criterios apropiados para seguridad como indica la selectividad de canal de iones medido por estudios de canal de iones de hERG y Ca.

10 Por el contrario como se ilustra con los datos presentados en esta invención en la sección titulada “características farmacológicas comparativas”, véase anteriormente, las moléculas relativamente polares de la presente invención muestran un grado sorprendentemente alto de permeabilidad de membrana, y aún mantienen capacidad de unión a CCR2 potente con excelente selectividad del canal de iones.

20 De acuerdo con lo anterior la presente invención proporciona nuevos moduladores de quimioquina que presentan características farmacológicas mejoradas que se espera que sean útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares.

También se proporcionan en esta invención metabolitos de compuestos activos, composiciones farmacéuticas, y un procedimiento de uso del mismo para el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, de forma particular diabetes, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiples, junto con procedimientos de preparación de compuestos e intermedios para los mismos. Los compuestos activos son N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida (descrita en la solicitud de patente pendiente junto con la presente, número de expediente del agente 11079) y N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida (descrito en la solicitud de patente pendiente junto con la presente número de expediente del agente 10720). La actividad de estos metabolitos se presenta en esta invención en la sección titulada “Características Farmacológicas Comparativas”, véase anteriormente.

Realizaciones

35 En una realización la descripción se refiere a un compuesto seleccionado de

(i) N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida;

40 N-((1R,2S,5R)-5-(metilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;

N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)formamida;

45 N-((1R,2S,5R)-5-(dimetilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;

50 N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-6-terc-butil-2-piridincarboxamida;

N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)propanamida;

55 2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(metanosulfonilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida;

2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(propionilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida;

60 N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)metanosulfonamida; y

N-(((1S,2S,5R)-5-metoxi-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)metil)acetamida; o

65 N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)metanosulfonamida;

ES 2 346 100 T3

N-(((1S,2S,5R)-5-metoxi-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)metil)acetamida;

5 N-(((1R,2S,5R)-5-(isopropilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;

N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;

10 N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((3S)-2-oxo-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;

N-((1R,2S,5R)-5-(isopropilamino)-2-((3S)-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida; y

15 N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida; o

(ii) una sal farmacéuticamente aceptable de (i) del mismo.

20 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-((1R,2S,5R)-5-(metilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)formamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-((1R,2S,5R)-5-(dimetilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-6-terc-butil-2-piridincarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)propanamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es 2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(metanosulfonilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. 2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)metanosulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 En otra realización la descripción se refiere a un compuesto que es N-(((1S,2S,5R)-5-metoxi-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolín)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)metil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización es una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de los ejemplos.

60 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para la modulación de la actividad de quimioquina o receptor de quimioquina que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

65 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para la modulación de la actividad del receptor CCR-2 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

ES 2 346 100 T3

Otra realización es un compuesto en un procedimiento para la modulación de actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4, y MCP-5 que es mediada por el receptor CCR2 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

5 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para la modulación de la actividad de MCP- que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

10 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para la inhibición de actividad de CCR2 y CCR5 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

15 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

20 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de trastornos, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, dichos trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esquizofrenia, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, fallo cardíaco congestivo, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada a VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis por trasplante, trauma cerebral inducida física o químicamente, enfermedad del intestino inflamado, alveolitis, colitis, lupus sistémico eritematoso, nefritis por suero nefrotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, restenosis, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal por diálisis-injerto, hiperplasia intimal por derivación arteriovenosa, trasplante de órgano, nefropatía crónica del aloinjerto y cáncer.

30 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de trastornos, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en el que dichos trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis por trasplante, trauma cerebral inducido física o químicamente, enfermedad de intestino inflamado, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis de suero neurotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis y artritis reumatoide, restenosis, trasplante de órgano, y cáncer.

35 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de trastornos, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en el que dichos trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sintético, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, restenosis y trasplante de órgano.

40 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de trastornos, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en el que dichos trastornos se seleccionan de esclerosis múltiple, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y diabetes.

45 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de trastornos, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en el que dichos trastornos se seleccionan de restenosis, trasplante de órgano y cáncer.

50 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de diabetes, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

55 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de esclerosis múltiple, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

60 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de aterosclerosis, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

65 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de restenosis, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de trasplante de órgano, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

ES 2 346 100 T3

Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de cáncer, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

5 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de cáncer en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata y melanoma.

10 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, que son al menos parcialmente mediadas por CCR-2, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

15 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para la modulación de actividad de CCR2 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

20 Otra realización es un compuesto en un procedimiento para la modulación de actividad de MIP-1 β y RANTES que es mediado por el receptor CCR5 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra realización es un procedimiento para la modulación de actividad de CCR2 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

25 Otra realización es un procedimiento para la modulación de actividad de MIP-1 β y RANTES que es mediado por el receptor CCR5 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

30 Otra realización es un compuesto de los ejemplos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esquistosomiasis, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, fallo cardíaco congestivo, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada a VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis por trasplante, trauma cerebral inducido física o químicamente, enfermedad del intestino inflamado, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis por suero nefrotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, restenosis, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal por diálisis-injerto, hiperplasia intimal por derivación arteriovenosa, trasplante de órgano, nefropatía crónica del aloinjerto, y cáncer.

Otra realización es un compuesto de los ejemplos para uso en terapia.

40 Otra realización es un procedimiento de preparación de los compuestos de los ejemplos.

45 La invención se puede realizar en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o atributos esenciales de la misma. Esta invención también comprende todas las combinaciones de aspectos alternativos y realizaciones de la invención indicadas en la misma. Se entiende que cualquiera y todas las realizaciones se pueden considerar conjuntamente con cualquier otra realización para describir realizaciones adicionales de la presente invención. Además se entiende que cualquier elemento de una realización (incluyendo aspectos preferidos) se combina con cualquiera y todos los demás elementos de cualquiera de las realizaciones para describir realizaciones adicionales.

50 Definiciones

Los compuestos descritos en esta invención pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo sustituido asimétricamente pueden estar aislados en formas ópticamente activas o racémicas. Es bien conocido en la técnica cómo se preparan formas ópticamente activas, tales como por resolución de formas racémicas o por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces dobles C=N, y similares pueden estar también presentes en los compuestos descritos en esta invención, y todos los isómeros estables se contemplan en la presente invención. Se describen isómeros geométricos cis y trans de los compuestos de la presente invención y se pueden aislar como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas. Se contemplan todas las formas racémicas diastereoméricas quirales y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica específica.

65 Un enantiómero de los compuestos descritos en esta invención puede mostrar actividad superior en comparación con el otro. Por tanto, todas las esteroquímicas se consideran como parte de la presente invención. Cuando se requiera se puede conseguir la separación del material racémico mediante HPLC usando una columna quiral o por una resolución usando un agente de resolución tal como cloruro canfónico como en Steven D. Young y col., Antimicrobial Agents y Chemotherapy, 1995, 2602-2605. Sales básicas de los mismos. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a estas, sales de ácido mineral u orgánico de residuos básicos tales como aminas, sales

alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto padre formado, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares, y las sales preparadas de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto padre que contiene un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. En general, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, cuya descripción se incorpora a esta patente por referencia.

Debido a que los profármacos son conocidos por mejorar numerosas cualidades deseables de productos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.) los compuestos de la presente invención se pueden suministrar en forma de profármaco.

Se entiende que "compuesto estable" y "estructura estable" indican un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento en un grado útil de pureza en una mezcla de reacción, y formulación en un agente terapéutico eficaz. La presente invención se pretende que realice compuestos estables.

Se pretende que "cantidad terapéuticamente efectiva" incluya una cantidad de un compuesto de la presente invención solo o una cantidad de la combinación de compuestos reivindicados o una cantidad de un compuesto de la presente invención en combinación con otros principios activos efectivos para inhibir MCP-1 o efectivos para tratar o prevenir trastornos.

Tal como se usa en esta invención, "tratar" o "tratamiento" cubren el tratamiento de un estado de enfermedad en un mamífero, de forma particular en un humano, e incluyen: (a) prevenir que el estado de enfermedad tenga lugar en un mamífero, de forma particular, cuando tal mamífero está predispuesto al estado de enfermedad pero aún no se ha diagnosticado que lo presente; (b) inhibir el estado de enfermedad, es decir, contrarrestar su desarrollo; y/o (c) aliviar el estado de enfermedad, es decir, provocar la inversión del estado de enfermedad.

Ejemplos

En caso apropiado se llevaron a cabo reacciones en una atmósfera de nitrógeno seco (o argón). Para reacciones anhidras se usaron disolventes Dri-Solv de EM. Para otras reacciones se usaron disolventes de calidad reactiva o de calidad HPLC. A menos que se establezca de otra forma, todos los reactivos adquiridos comercialmente se usaron tal como se recibieron.

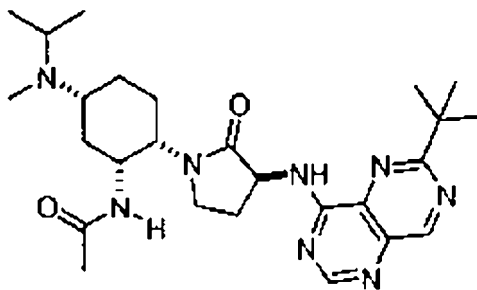
Se obtuvieron medidas de CL/EM usando un sistema híbrido de HPLC/espectrómetro de masas cuádruple simple ZQ de Waters. Se describen datos para el pico de interés en ionización por electropulverización en modo positivo. Se obtuvieron de forma típica espectros de RMN (resonancia magnética nuclear) en instrumentos Bruker o JEOL a 400 MHz y 500 MHz en los disolventes indicados. Todos los desplazamientos químicos se indican en ppm desde tetrametilsilano con la resonancia del disolvente como el patrón interno. Se indican de forma típica datos de espectros de RMN ¹H como sigue: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, s a = singlete ancho, d = doblete, dd = doblete de dobletes, t = triplete, c = cuartete, sep = septeto, m = multiplete, ap = aparente), constantes de acoplamiento (Hz), e integración.

Un especialista en la técnica reconocerá las abreviaturas convencionales usadas en esta invención. Para facilidad de referencia las abreviaturas incluyen, pero sin limitarse necesariamente a estas: sat. = saturado, HPLC = cromatografía líquida de alta resolución, AP = porcentaje de área, KF = Karl-Fischer, RT = temperatura ambiente, mmol = milimoles, HRMS = espectroscopía de masas de alta resolución, TBTU = tetrafluoroborato de O-benzotriazol-2-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio, MTBE = TBME = terc-butilmetiléter, EDAC = clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, EDC = N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, TEA = trietilamina, DPPA = difenilfosforilazida, IPA = alcohol isopropílico, TFA = ácido trifluoroacético, DCM = diclorometano, THF = tetrahydrofurano, DMF = N,N-dimetilformamida, BOP = hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio, EtOAc = acetato de etilo, DMSO = dimetilsulfóxido, °C = grados Celsius, eq = equivalente o equivalentes, g = gramo o gramos, mg = miligramo o miligramos, ml (o mL) = mililitro o mililitros, h = hora u horas, M = molar, N = normal, min = minuto o minutos, MHz = megahercios, tic = cromatografía en capa fina, v/v = relación de volumen a volumen.

"α", "β", "R" y "S" son designaciones estereoquímicas familiares para los especialistas en la técnica.

Ejemplo 1

N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida



Ejemplo 1, etapa 1: se disolvió 2-benciloxicarbonilamino-7-oxo-(aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R, 2S, 5R)-terc-butilo (89,6 g, 0,24 mol, véase: P. H. Carter, y col. Solicitud PCT WO 2005/021500) en acetato de etilo (1,5 l) y se lavó la solución resultante con NHCO_3 sat. (2 x 0,45 l) y NaCl sat. (1 x 0,45 l). Se secó la solución (Na_2SO_4) y se secó luego directamente en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 3 l. Se purgó la solución con inyección de nitrógeno directa antes de cargarse con Pd/C al 10% (13,65 g) en atmósfera de nitrógeno. Se evacuó el matraz y se rellenoó con hidrógeno; se repitió esto dos veces más. Se burbujó hidrógeno a través de la solución durante 30 min y luego se agitó la reacción en 1 atm de H_2 durante 18 h. Se evacuó el matraz, se rellenoó con nitrógeno, y se cargó con catalizador fresco (6 g de Pd/C 10%). Se burbujó hidrógeno a través de la solución durante 30 min y luego se agitó la reacción en 1 atm de H_2 durante 18 h. Se evacuó el matraz y se rellenoó con nitrógeno. Se filtró la mezcla a través de Celite; se lavó luego el lecho de filtro con acetato de etilo. Se diluyó el filtrado (aprox. 1,6 l de volumen de EtOAc) con acetonitrilo (0,3 l) y se cargó secuencialmente con Z-N-Cbz-metionina (68 g, 0,24 mol), TBTU (77 g, 0,24 mol), y N,N-diisopropiletilamina (42 ml, 0,24 mol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 4 h, durante este tiempo cambió desde una suspensión a una solución clara. La reacción se interrumpió con la adición de NH_4Cl sat. (0,75 l) y agua (0,15 l); se diluyó la mezcla adicionalmente con EtOAc (0,75 l). Se mezclaron y separaron las fases y se lavó la fase orgánica con Na_2CO_3 sat. (2 x 0,9 l) y NaCl sat. (1 x 0,75 l). Se secó la solución (Na_2SO_4), se filtró, y se concentró a vacío dando 2-((S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(metiltio)butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R, 2S, 5R)-terc-butilo como un aceite, que se llevó a la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM para pico principal: $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+ = 406,3$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 528,3$. RMN ^1H (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,36 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 2,5 - 2,7 (m, 3H), 2,25 (m, 1H), 2,11 (s, 3H), 2,05 (m, 4H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 2H), 1,54 (s, 9H). También están presentes EtOAc [1,26 (t), 2,03 (s), 4,12 (c)] y N,N,N,N-tetrametilurea [2,83 (S)].

Ejemplo 1, etapa 2: se disolvió una muestra de 2-((S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(metiltio)butanamido)-7-oxo-6-azabicyclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-tert-butilo (0,24 mol estimado; véase procedimiento previo) en yodometano (1,250 g) y se agitó durante 48 h a temperatura ambiente. Se concentró la reacción a vacío. Se disolvió el residuo en diclorometano y se concentró a vacío. Se repitió esto dos veces más. El lodo resultante se disolvió en diclorometano (0,4 l) y se vertió en una solución agitada rápidamente de MTBE (4,0 l). Se recogieron los sólidos amarillos resultantes mediante filtración con succión y se secaron a alto vacío dando la sal de sulfonio (179 g). Este material se llevó a la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM para pico principal: $[\text{M}-\text{Me}_2\text{S}+\text{H}]^+ = 458,4$; $[\text{M}]^+ = 520,4$, RMN ^1H (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 4,33 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,3 - 3,45 (m, 2H), 2,97 (s, 3H), 2,94 (s, 3H), 2,78 (m, 1H), 2,0 - 2,3 (m, 4H), 1,7 (m, 2H), 1,52 (s, 9H). También están presentes MTBE [1,18 (s), 3,2 (s)] y trazas de N,N,N,N-tetrametilurea [2,81 (s)].

Ejemplo 1, etapa 3: toda la sal sulfonio de la etapa previa (0,24 mol estimado) se disolvió en DMSO (2,0 l). Se agitó la solución resultante en nitrógeno a temperatura ambiente y se cargó con carbonato de cesio (216 g) en porciones. Se agitó la suspensión a temperatura ambiente durante 3 h y luego se filtró para eliminar los sólidos. Se dividió la solución en porciones de aprox. 0,22 l y se procesó como sigue: se diluyó la mezcla de reacción (aprox. 0,22 l) con acetato de etilo (1,5 l) y se lavó sucesivamente con agua (3 x 0,5 l) y salmuera (1 x 0,3 l). Se secó la fase orgánica (Na_2SO_4), se filtró, y se concentró a vacío. Se obtuvo el 2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabicyclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo deseado (90,8 g, 83%) como una espuma microcristalina, libre de impurezas de tetrametilurea. CL/EM para pico principal: $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+ = 358,4$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 480,4$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,2 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,3 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,28 - 2,42 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,7 - 2,0 (m, 5H), 1,55 (s, 9H). Si se desea se puede aislar este material como un sólido disolviendo en MTBE (1 volumen), añadiéndolo a heptano (3,3 volúmenes), y recogiendo el precipitado resultante.

Ejemplo 1, etapa 4: se cargó una solución en agitación de 2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabicyclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo (108 g, 0,236 mol) en THF (1 l) con hidróxido de litio monohidratado (21,74 g, 0,519 mol). Se añadió agua (0,3 l) lentamente, de modo tal que la temperatura no superase 20°C . Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche y se eliminaron los compuestos volátiles a vacío. Se ajustó el pH a ~ 4 mediante la adición de HCl 1 N (450 ml) y NaH_2PO_4 . Se recogieron los precipitados

ES 2 346 100 T3

blancos resultantes por filtración y se lavaron con agua (2 x 1 l). Se disolvió el sólido en diclorometano (1,5 l) y agua (~ 1 l). Se secó la capa orgánica (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en EtOAc (0,7 l) y se calentó la solución resultante a reflujo durante 1 h. Se separaron los sólidos tras enfriamiento hasta temperatura ambiente, y se recogieron mediante filtración. Se purificaron estos sólidos por recristalización en isopropanol dando el ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico deseado como un sólido blanco (104,5 g, 93% de rendimiento). CL/EM para pico principal: [M-tBu+H]⁺ = 420,2; [M-Boc+H]⁺ = 376,2; [M+H]⁺ = 476,2. ¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 3,45 - 3,6 (m, 2H), 2,99 (m, 1H), 2,41 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,6 - 1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

Ejemplo 1, etapa 5: se cargó un matraz de fondo redondo de 3 l con ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (75,5 g, 0,158 mol), EDC-HCl (33,5 g, 0,175 mol), 1-hidroxibenzotriazol (23,6 g, 0,175 mol), y diclorometano (1 l). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 h, durante este tiempo cambió de una suspensión blanca a una solución clara. Se burbujó amoníaco (gas) en la solución hasta que el pH fuese fuertemente básico (papel) y se agitó la reacción durante 10 min; se repitió esta adición de amoníaco y se agitó la reacción durante unos 10 min más. Se añadió agua. Se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ sat., NaH₂PO₄, y salmuera antes de concentrarse a vacío. Se suspendió el residuo con acetonitrilo (0,5 l) y luego se concentró dando (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxamida como un sólido blanco (75,9 g, aprox. 100%), que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM para pico principal: [M-Boc+H]⁺ = 375,3; [M+H]⁺ = 475,4; [M-tBu+H]⁺ = 419,3. RMN ¹H (400 MHz, (I₄-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,25 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,9 - 2,05 (m, 2H), 1,65 - 1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

Ejemplo 1, etapa 6: se llevó a cabo la reacción en tres porciones iguales y se combinaron para el procesamiento acuoso. Se cargó un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 5 l con (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxamida (25,3 g, 53 mmol), acetonitrilo (1,9 l), y 2,6 l de agua/hielo. Se agitó y enfrió la mezcla a 0°C. Se añadió diacetato de yodobenceno (25,77 g, 80 mmol) y se agitó la reacción durante 2 h; se añadió otros 0,5 eq de diacetato de yodobenceno. Se agitó la reacción durante 9 h (temperatura de reacción < 10°C). Se cargó esta mezcla con 8 eq de N,N-diisopropiletilamina y 2 eq de anhídrido acético. Durante los siguientes treinta minutos se añadieron 4 eq de N,N-diisopropiletilamina y 2 eq de anhídrido acético cada diez minutos, hasta que la reacción se completase (HPLC). Se eliminó el acetonitrilo a vacío; se separó algo de sólido del residuo y se recogió este mediante filtración. Se extrajo el residuo resultante con diclorometano (3 l, luego 1 l). Se lavó la fase orgánica secuencialmente con agua, NaHCO₃ sat., y salmuera. Se añadieron los sólidos recogidos a la fase orgánica junto con carbón activado (15 g). Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 40°C antes de ser filtrada y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en EtOAc (1 l), y se agitó la solución resultante a 75°C durante 1 h antes de dejarse enfriar hasta temperatura ambiente. Se separó un sólido y se recogió por filtración. Este sólido se purificó adicionalmente mediante recristalización: se disolvió en primer lugar en 0,5 l de CH₂Cl₂, luego se concentró a vacío, luego se recristalizó en 1 l de EtOAc; esto se repitió tres veces. Se recristalaron los sólidos obtenidos de los licores madre anteriores tres veces usando el mismo procedimiento. Se recristalaron los sólidos reunidos dos veces más en acetonitrilo (0,7 l) dando 66 g (84%) de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (pureza >99,5% por HPLC). CL/EM para pico principal: [M+H]⁺ = 489,4; [M-tBu+H]⁺ = 433,3. ¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3 - 7,4 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,6 (m, 2H), 2,44 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,87 - 2,05 (m, 4H), 1,87 (s, 3H), 1,55 - 1,7 (m, 2H), 1,46 (s, 9H). Se confirmó la fidelidad estereoquímica de la redistribución de Hofmann mediante análisis de estructura del cristal por rayos X de este compuesto, como se muestra en la figura 1.

Ejemplo 1, etapa 7: se cargó una solución en agitación de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (66 g, 0,135 mol) en diclorometano (216 ml) con ácido trifluoroacético (216 ml). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en metanol y se concentró la solución resultante a vacío; esto se repitió una vez. Se obtuvo (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un aceite y se usó directamente en la etapa 8 siguiente. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 389,4. RMN ¹H (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3 - 7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,41 (s a, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,00 (t, J= 9,3 Hz, 1H), 3,81 (t, J= 9,1 Hz, 1H), 3,65 (c, J= 8,4 Hz, 1H), 3,3 - 3,4 (m, 1H), 2,45 (m, 1H), 1,95 - 2,24 (m, 5H), 2,00 (s, 3H), 1,6 - 1,8 (m, 2H).

Ejemplo 1, etapa 8: se cargó una solución en agitación de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (aprox. 0,135 mol) en metanol (675 ml) secuencialmente con acetona (37,8 g, 4 eq), acetato de sodio (33,2 g, 3 eq), y cianoborohidruro sódico (16,9 g, 2 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 6 h y se filtró. Se disolvió el filtrado en diclorometano (1 l); se lavó esta solución con NaOH 1 N (1 l). Se disolvieron los sólidos recogidos en la filtración en NaOH 1N (1 l) a 0°C y luego se extrajeron con diclorometano (1 l). Se reunieron los extractos orgánicos y se extrajeron con HCl acuoso (200 ml de HCl 1N + 800 ml de agua). Se basificó la fase acuosa con NaHCO₃ sat. (500 ml) y luego NaOH 1N (100 ml) hasta pH 11. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (2 l). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró a vacío dando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un aceite. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 431,45. RMN ¹H (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3 - 7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,31 (m, 1H), 4,24 (t, J= 9,4 Hz, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,61 (t, J= 9,1 Hz, 1H), 3,52 (c, J= 8,6 Hz, 1H), 3,04 (s a, 1H), 2,96 (sep, J= 6,3 Hz, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,92 (s, 3H), 1,7 - 1,9 (m, 5H), 1,65 (m, 1H), 1,12 (dd ap., J= 6,3, 1,1 Hz, 6H).

ES 2 346 100 T3

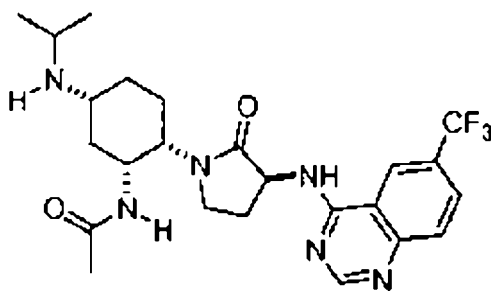
Ejemplo 1, etapa 9 (véase etapa alternativa 9, a continuación): se enfrió una solución en agitación de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (aprox. 115 mmol) en diclorometano (600 ml) a 0°C y se cargó secuencialmente con formaldehído (18,6 g, solución al 37% en peso), trietilamina (23 ml), y triacetoxiborohidruro sódico (28,7 g). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos y se diluyó con diclorometano (hasta 1,2 l). Esta solución se lavó dos veces con 500 ml de NaHCO₃ sat. + NaOH (NaHCO₃ sat., pH a 11 p/NaOH 1 N). Se extrajo la capa orgánica con HCl ac. (200 ml de HCl 1N + 600 ml de agua). Se basificó la fase acuosa con NaHCO₃ sat. (500 ml) y luego NaOH 1N (100 ml) hasta pH 11. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (1,2 l). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró a vacío dando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un aceite, que se usó directamente en la etapa 10 siguiente. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 445,4. RMN ¹H (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3 - 7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,33 (s a, 1H), 4,25 (t, J= 9,2 Hz, 1H), 4,11 (s a, 1H), 3,5 - 3,6 (m, 2H), 2,77 (v s a, 2 H), 2,41 (m, 1H), 2,26 (s, 3H), 2,0 - 2,1 (m, 2H), 1,92 (s, 3H), 1,7 - 1,9 (m, 5H), 1,10 (dd ap., J = 17, 6,4 Hz, 6H).

Ejemplo 1, etapa 10: se añadió a una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)-ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (aprox. 0,115 mol) en metanol (600 ml) Pd/C al 10% (6 g de catalizador húmedo al 50%). Se evacuó el matraz y se rellenoó con hidrógeno. Se agitó la mezcla en 1 atm de H₂ durante 2 h y se eliminó el catalizador mediante filtración a través de Celite. Se concentró el filtrado a vacío dando N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida como un aceite, que se llevó a la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 311,47. RMN ¹H (400 MHz, I₄-MeOH): δ 4,39 (s a, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,3 - 3,5 (m, 4H), 2,73 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,0 - 2,2 (m, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,6 - 1,75 (m, 4H), 1,07 (dd ap., J= 21, 6,4 Hz, 6H).

Ejemplo 1, etapa 11: se añadió a una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida (62 mg, 0.2 mmol) en isopropanol (3 ml), 2-terc-butil-8-cloro-pirimido[5,4-d]pirimidina (49 mg, 1,1 eq, véase: P. H. Carter y col, solicitud PCT WO 2005/021500) y trietilamina (40,4 mg, 2 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo con HPLC preparativa dando el compuesto del título como su sal de TFA (125 mg, 86,3%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 497. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 9,31 (1 H, s), 8,67 (1 H, s), 5,07 (1 H, t, J=9,92 Hz), 4,14 - 4,31 (2 H, m), 3,57 - 3,89 (4 H, m), 2,78 (3 H, s), 2,58 - 2,67 (1 H, m), 2,38 - 2,50 (1 H, m), 1,94 - 2,29 (6 H, m), 1,92 (3 H, s), 1,51 (9 H, s), 1,41 (3 H, d, J=6,61 Hz), 1,34 (3 H, dd, J=6,36, 3,81 Hz).

Ejemplo 2

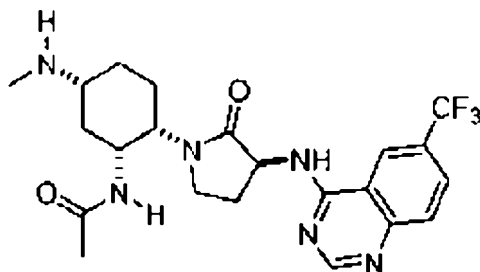
N-((1R,2S,5R)-5-(isopropilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida



Ejemplo 2, etapa 1: se añadió a una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (30 mg, 0,07 mmol; véase ejemplo 1, etapa 8) en metanol (3 ml) Pd/C al 10% (30 mg de catalizador húmedo al 50%). Se evacuó el matraz y se rellenoó con hidrógeno desde un balón de hidrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 h en 1 atm de hidrógeno y luego se eliminó el catalizador por filtración. Se concentró el filtrado a vacío. Se disolvió el residuo en isopropanol (3 ml) y se cargó secuencialmente con 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (19,4 mg, 1,2 eq) y diisopropiletilamina (18 mg, 2 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo mediante HPLC de fase inversa preparativa dando el compuesto del título como su sal de TFA (47 mg, 93%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 493. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 8,90 (1 H, s), 8,81 (1 H, s), 8,25 - 8,29 (1 H, m), 7,96 (1 H, d, J=8,65 Hz), 5,44 (1 H, t, J=9,92 Hz), 4,42 (1 H, d, J=2,54 Hz), 4,15 - 4,24 (1 H, m), 3,90 (1 H, t, J=8,65 Hz), 3,70 - 3,79 (1 H, m), 3,46 - 3,62 (2 H, m), 2,56 - 2,67 (1 H, m), 2,33 - 2,47 (1 H, m), 1,70 - 2,23 (9 H, m), 1,35 (6 H, d, J=6,10 Hz).

Ejemplo 3

N-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(metilamino)-2-((3*S*)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida



Ejemplo 3, etapa 1: se disolvió una muestra de (1*R*,3*R*,4*S*)-3-acetamido-4-((*S*)-3-(benciloxycarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-ciclohexilcarbamato de terc-butilo (43,2 g, 88 mmol; véase el ejemplo 1, etapa 6) en diclorometano (200 ml). Se cargó la solución con TFA (100 ml), se agitó durante 2,5 h, y se concentró a vacío. Se redisolvió el residuo en diclorometano (200 ml) y se añadió la solución resultante por goteo a una solución agitada de dietiléter puro (2,0 l). Se recogió el sólido blanco con lavados de éter y luego se disolvió en una solución salina básica (2,0 M en NaCl y 1,0 M en K₂CO₃, 350 ml en total). Se añadió diclorometano (1,2 l), y se mezclaron vigorosamente las dos fases antes de separarse. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (3 x 450 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró a vacío dando (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (34,8 g, cuantitativo) como un sólido microcristalino tras bombear a alto vacío. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 389,5.

Ejemplo 3, etapa 2: se disolvió una muestra de (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (34,8 g, aprox. 90 mmol) en metanol (400 ml). Se purgó el matraz con nitrógeno y se cargó con trietilamina (15,61 ml, 112 mmol), seguido de 4-metoxibenzaldehído (13,62 ml, 112 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 14 h, en ese momento CL/EM de la reacción mostró consumo total de amina primaria y formación de la imina deseada (CL/EM encontró [M + H]⁺ = 507,4). Se enfrió la reacción a 0°C y se cargó con borohidruro sódico (5,08 g, 134 mmol) en porciones durante 1 minuto. Se retiró el baño de hielo después de 30 min y se agitó la solución durante 3,5 h más. Se concentró la reacción a vacío dando un sólido blanco/goma blanco que se disolvió en 400 ml de NaHCO₃ sat. y 1200 ml de EtOAc. Se mezclaron las fases vigorosamente y luego se separaron. Se lavó la fase orgánica 2 x 800 ml de HCl 0,5 N (nota: un pequeño tercio de fase oleosa se encontraba en el fondo en la primera extracción; se recogió junto con la fase ácida). Se reunieron las aguas de lavado ácidas, se basificó con NaOH sólido hasta pH 13, se enfrió hasta temperatura ambiente, y luego se extrajo con EtOAc (1 x 1000 ml; 2 x 600 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se lavó con salmuera (1 x 120 ml), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en diclorometano y se concentró; se repitió este procedimiento dando (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(4-metoxibencilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (43,68 g, 86 mmol, 96% de rendimiento) como un sólido microcristalino que fluye tras bombear a alto vacío. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 509,6.

Ejemplo 3, etapa 3: se disolvió una muestra de (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(4-metoxibencilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (54,45 g, 107 mmol) en diclorometano (400 ml). Se enfrió la solución resultante a 0°C en corriente de N₂ y luego se cargó secuencialmente con trietilamina (29,8 ml, 214 mmol), formaldehído acuoso (11,96 ml de una solución al 37%, 161 mmol), y triacetoxiborohidruro sódico (34,0 g, 161 mmol). Se retiró el baño de hielo y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 h antes de diluirse con 750 ml de EtOAc y se lavó con NaHCO₃ sat. (2 x 250 ml). Se concentró la fase orgánica a vacío y se disolvió el residuo resultante en EtOAc (750 ml). Se lavó la fase orgánica con ácido [2 x (200 ml de HCl 1N/300 ml de H₂O)]. Se reunieron las aguas de lavado ácidas y luego se basificó con NaOH 6N (80 ml) y NaHCO₃ sat. (70 ml). Se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x 500 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se lavó con salmuera (1 x 100 ml), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en cloruro de metileno y se concentró; esto se repitió dos veces dando (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-((4-metoxibencil)(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (54,14 g, 104 mmol, 97% de rendimiento) como una espuma microcristalina blanca dura tras bombear a alto vacío. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 523,6.

Ejemplo 3, etapa 4: se disolvió una muestra de (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-((4-metoxibencil)(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (25,0 g, 47,8 mmol) en MeOH. Se cargó el matraz con dihidropaladio (6 g, 8,54 mmol), se evacuó, y se llenó con hidrógeno desde un balón de hidrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche y luego se filtró (3 X 80 ml de lavados de isopropanol). Se concentró el residuo a alto vacío hasta sequedad. Se secó el residuo azeotrópicamente con iso-propanol (4 X 150 ml) a presión reducida dando *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(metilamino)ciclohexil)acetamida (12,5 g, 46,6 mmol, 97% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 269.

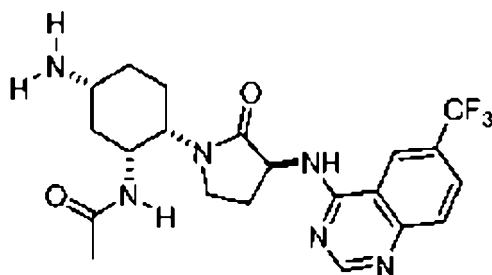
ES 2 346 100 T3

Ejemplo 3, etapa 5: se añadió a una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(metilamino)ciclohexil)acetamida (12,5 g, 46,6 mmol) en diclorometano trietilamina (12,98 ml, 93 mmol) y 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (10,83 g, 46,6 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a presión reducida hasta sequedad. Se disolvió el residuo en diclorometano (350 ml) y se extrajo con una solución de ácido acético acuoso (1 x 200 ml, 1 x 100 ml; preparado a partir de 300 ml de H₂O y 16 ml de ácido acético). Se extrajo la capa acuosa ácida (pH 4 - 5) con diclorometano (2 x 300 ml), se basificó con Na₂CO₃ hasta pH 10 - 11, y luego se extrajo con diclorometano (2 x 350 ml; manteniendo el pH de la capa acuosa a 10 - 11 con Na₂CO₃ según fuese necesario). Se lavó la fase orgánica con solución de NaCl saturada (1 x 200 ml); se extrajo de nuevo la capa acuosa con diclorometano (1 x 100 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró a vacío dando el compuesto del título (19,4 g, 90%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 465. HPLC muestra la pureza de 99,4%, siendo la mayor impureza simple 0,5%. RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD), δ ppm: 8,77 (1 H, s), 8,56 (1 H, s), 8,02 (1 H, dd, J=8,80, 1,37 Hz), 7,87 (1 H, d, J=8,52 Hz), 5,25 (1 H, t, J=8,52 Hz), 4,53 (1 H, q, J=3,94 Hz), 4,01 (1 H, dt, J=1,96, 3,85, 3,71 Hz), 3,46 - 3,64 (2 H, m), 2,77 - 2,86 (1 H, m), 2,47 - 2,57 (1 H, m), 2,41 (3 H, s), 2,22 (1 H, dc, J=12,51, 12,44, 3,57 Hz), 1,98 (3 H, s), 1,95 - 1,98 (1 H, m), 1,92 - 1,98 (1 H, m), 1,84 - 1,91 (1 H, m), 1,78 (1 H, t, J=3,44 Hz), 1,71 - 1,76 (1 H, m), 1,62 - 1,69 (1 H, m).

Ejemplo 3, recristalización: se añadió una muestra del compuesto del título (19,4 g) de la etapa 5 a 300 ml de etanol absoluto. Se llevó la mezcla a reflujo en atmósfera de nitrógeno, dando lugar a la disolución completa del sólido, y luego se enfrió lentamente hasta aprox. 60°C con agitación (se formó algo de sólido antes de la concentración). Se concentró la mezcla lentamente a presión reducida con agitación (baño de aceite mantenido a -64°C) hasta que el peso total del producto y etanol fuese aprox. 62 g. Precipitó una cantidad sustancial de sólido durante la concentración. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente lentamente y luego se enfrió en un baño de hielo durante 1 h. Se filtró la mezcla fría y se lavó el sólido con etanol frío (aprox. 15 ml). Se secó el sólido a 55 - 60°C durante la noche a presión reducida dando la base libre del compuesto del título (17,4 g; 90% de recuperación). HPLC muestra la pureza de 99,9%.

Ejemplo 4

N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida



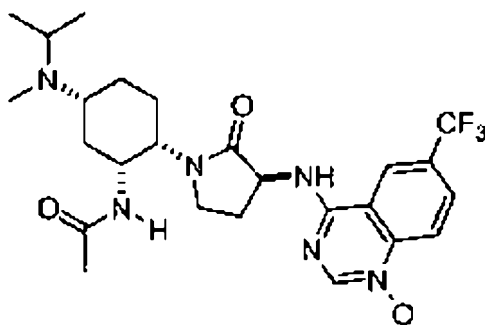
Ejemplo 4, etapa 1: se añadió a una solución de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (1,7 g, 3,48 mmol; véase el ejemplo 1, etapa 6) en metanol (10 ml) Pd/C al 10% (0,6 g de catalizador húmedo al 50%). Se evacuó el matraz y se rellenó con hidrógeno con un balón de hidrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente en 1 atm de hidrógeno durante 14 h y se eliminó el catalizador por filtración. Se concentró el filtrado a vacío dando (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo, que se llevó a la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 355.

Ejemplo 4, etapa 2: se añadió a una solución de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (aprox. 3,4 mmol) en isopropanol (10 ml) 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (0,97 g, 1,2 eq) y diisopropiletilamina (0,88 g, 2 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2,5 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo con cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con MeOH al 1% y 5% en diclorometano dando (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (2,0 g, aprox. 100%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 551.

Ejemplo 4, etapa 3: se cargó una solución en agitación de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (1,65 g, 3 mmol) en diclorometano (8 ml) con ácido trifluoroacético (4 ml). Se agitó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en una mezcla de 1 ml de metanol y 5 ml de diclorometano. Se añadió la solución resultante por goteo a 80 ml de t-butilmetiléter con agitación. Se recogió el sólido formado con filtración y se secó dando el compuesto del título como su sal de TFA (1,75 g, 86%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 451. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 8,82 (1 H, s), 8,77 (1 H, s), 8,20 - 8,27 (1 H, m), 7,95 (1 H, d, J=8,65 Hz), 5,32 (1 H, t, J=9,92 Hz), 4,36 (1 H, t, J=4,07 Hz), 4,16 - 4,23 (1 H, m), 3,87 (1 H, t, J=9,16 Hz), 3,70 - 3,79 (1 H, m), 3,39 (1 H, s), 2,54 - 2,67 (1 H, m), 2,32 - 2,45 (1 H, m), 2,08 - 2,23 (2 H, m), 1,88 - 2,04 (6 H, m), 1,73 - 1,87 (1 H, m).

Ejemplo 5

N-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((3*S*)-3-((1-óxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida



Ejemplo 5, etapa 1: se purificó una muestra de (1*R*,3*R*,4*S*)-3-acetamido-4-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (véase el ejemplo 4, etapa 2) mediante HPLC de fase inversa. Se disolvió la sal de TFA resultante en EtOAc y se lavó sucesivamente con NaOH 1*N* y NaCl sat. Se secaron los extractos orgánicos (Na₂SO₄), se filtraron, y se concentraron a vacío. Se disolvió la base libre resultante (117 mg, 0,21 mmol) en cloruro de metileno (4 ml) y se cargó la solución resultante con ácido meta-cloroperoxisbenzoico (105 mg de reactivo comercial al 77% de pureza). La solución se volvió amarilla a los 5 minutos. Se agitó la reacción durante 3 h antes de ser interrumpida con la adición de Na₂S₂O₃ acuoso. Se diluyó la mezcla con EtOAc y se separaron las capas. Se lavó la fase orgánica sucesivamente con NaHCO₃ sat. y salmuera antes de secarse (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró a vacío dando 1-óxido de 4-((*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina como un sólido amarillo. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 567. Se disolvió todo este material en cloruro de metileno (6 ml) y se trató con ácido trifluoroacético (2,5 ml). Se dejó reposar la solución resultante durante 3 h antes de ser concentrada a vacío. Se redisolvió el residuo en cloruro de metileno (6 ml) y se trató con ácido trifluoroacético (2,5 ml). Se dejó reposar la solución resultante durante 0,5 h antes de ser concentrada a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC de fase inversa dando la sal de TFA de 1-óxido de 4-((*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina como un polvo amarillo (13,6 mg) tras liofilización. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 467,3.

Ejemplo 5, etapa 2: se disolvió una muestra de 1-óxido de 4-((*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina (sal de TFA, 13,6 mg) en 2 ml de acetona/metanol 1:1 y se cargó la solución resultante con cianoborohidruro sódico (0,3 ml de una solución 0,1 M en metanol). Análisis por CL/EM después de 1,5 h muestra consumo de material de partida y conversión en 1-óxido de 4-((*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(isopropilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina, EM encontró [M + H]⁺ = 509,3. Este material no fue aislado más bien se hizo reaccionar adicionalmente: se cargó la solución con formaldehído acuoso al 37% (0,06 ml) y se agitó durante 30 min, en ese momento el análisis por CL/EM mostró producción del 1-óxido de 4-((*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina deseado, [M + H]⁺ = 523,3. Se redujo el volumen con corriente de nitrógeno y se purificó el residuo resultante mediante HPLC de fase inversa dando la sal de TFA del compuesto del título como un polvo amarillo (1,7 mg). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 523,3.

Preparación alternativa del ejemplo 5

Ejemplo 5, preparación alternativa, etapa 1: se disolvió una muestra de 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (3,25 g, 13,97 mmol) en acetonitrilo (60 ml) en atmósfera de N₂. Se cargó la solución turbia resultante con Cs₂CO₃ (6,83 g, 20,96 mmol) y fenol (1,578 g, 16,77 mmol) y se agitó a temperatura ambiente. Después de aprox. 65 horas se filtró la reacción para eliminar los sólidos. Se concentró la fase orgánica a vacío dando un sólido naranja. Se purificó el material mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (80 g de gel de sílice) usando EtOAc/hexanos 1:3 como el eluyente dando la 4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina deseada como un sólido cristalino. CL/EM encontró (M+H)⁺ = 291,1.

Ejemplo 5, preparación alternativa, etapa 2: se añadió a una solución de 4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina (1,61 g, 5,55 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 ml) ácido 3-clorobenzoperoxoico (1,243 g, 5,55 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 h. En este momento empezaron a precipitar sólidos blancos. Se interrumpió la reacción con varias gotas de Me₂S. Se añadió a la mezcla 40 ml de hexano para precipitar el 1-óxido de 2-hidroxi-

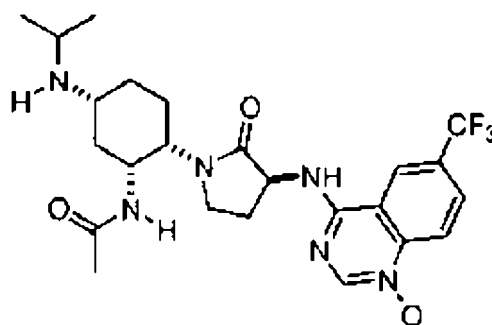
ES 2 346 100 T3

4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina no deseado (0,43 g), que se recogió por filtración. Se concentró el filtrado para precipitar 1-óxido de 4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina deseado (0,93 g), contaminado con subproductos de ácido benzoico y aproximadamente 15% de 1-óxido 2-hidroxi-4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina. Se usó este material sin más purificación para la química subsiguiente. CL/EM encontró $(M+H)^+ = 307,06$.

5 Ejemplo 5, preparación alternativa, etapa 3: se añadió a una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida (50 mg, 0,161 mmol; véase el ejemplo 1, etapa 10) y 1-óxido de 4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina (99 mg, 0,161 mmol) en i-PrOH (2 ml) N,N-diisopropiletilamina (0,056 ml, 0,322 mmol). Se selló el recipiente en argón y se calentó en un microondas durante 1 h a 120°C. CL/EM encontró: $(M + H)^+ = 523,3$ como el pico de producto principal. Se concentró la mezcla y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (40 g de gel de sílice, eluyendo con cNH_4OH al 10%/MeOH 8:92). Se reunieron las fracciones que contienen el producto deseado y se concentraron a vacío. Se cristalizó el residuo en CH_2Cl_2 y hexano. Se reunieron los dos cultivos y se secó a vacío dando el compuesto del título, 1-óxido de 4-((S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina (93 mg). El análisis por RMN 1H mostró que este material contenía aprox. 0,75 equivalentes molares de CH_2Cl_2 . RMN 1H (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 8,99 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,62 (d, J= 8,9 Hz, 1H), 8,32 (dd, J= 9,0, 1,5 Hz, 1H), 5,28 (t, J= 8,4 Hz, 1H), 4,59 (s a, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,55 - 3,65 (m, 2H), 3,43 (m, 1H), 2,75 (s a, 1H), 2,55 (m, 1H), 2,27 (s, 3H), 2,1 - 2,3 (m, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,0 (m, 1H), 1,65 - 1,7 (m, 3H), 1,12 (d, J= 6,0 Hz, 3H), 1,06 (d, J= 6,0 Hz, 3H). CL/EM encontró: $[M+H]^+ = 523,33$.

Ejemplo 6

25 *N-((1R,2S,5R)-5-(isopropilamino)-2-((3S)-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida*



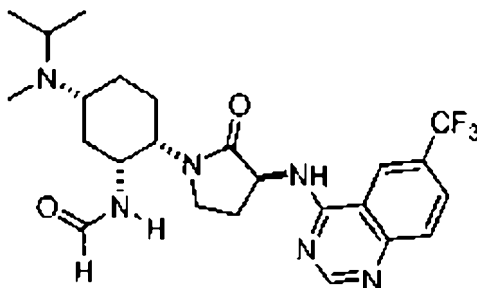
45 Ejemplo 6, etapa 1: se sintetiza el producto del título como parte de la síntesis listada en primer lugar en el ejemplo 5 (llevado a cabo en dos etapas). Si se desea, el compuesto del título se podría purificar en este procedimiento más que hacerse reaccionar adicionalmente para formar el ejemplo 5.

Preparación alternativa del ejemplo 6

50 Ejemplo 6, preparación alternativa, etapa 1: se añadió a una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (0,090 g, 0,209 mmol; véase el ejemplo 1, etapa 8) en MeOH (10 ml) aprox. 100 mg de Pd/C al 10% (50%, húmedo). Se agitó la mezcla en H_2 (344,737 kPa (50 psi)) durante 14 h. Se separó el catalizador por filtración y se evaporó el disolvente dando N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropilamino)ciclohexil)acetamida como un residuo sólido espumoso (50 mg, 0,169 mmol). Se disolvió este material en i-PrOH (2 ml), y se cargó la solución resultante con 1-óxido de 4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina (103 mg, 0,169 mmol; véase el ejemplo 5, preparación alternativa, etapa 2) y N,N-diisopropiletilamina (0,059 ml, 0,337 mmol). Se selló el recipiente en atmósfera de argón y se calentó en un microondas durante 1 h a 120°C. Se evaporó la reacción dando un residuo oleoso, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada dando un sólido amarillo. Este se recrystalizó en CH_2Cl_2 -hexano dando el 1-óxido de 4-((S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina deseado (primer cultivo, 43,5 mg y segundo cultivo, 3,1 mg). CL/EM encontró: $(M+H)^+ = 509,32$. RMN 1H (400 MHz, CD_3OD), δ ppm: 8,99 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,62 (d, J=9,0 Hz, 1H), 8,33 (dd, J=9,0, 1,6 Hz, 1H), 5,28 (t, J=8,3 Hz, 1H), 4,56 (s a, 1H), 4,02 (d a, 1H), 3,63 (m, 2H), 3,18 (s a, 1H), 2,55 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,03 (s, 3H), 1,97-1,67 (m, 7H), 1,16 (d, J=5,5 Hz, 3H), 1,15 (d, J=5,5 Hz, 3H).

Ejemplo 7

N-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)formamida



Ejemplo 7, etapa 1: se cargó una solución en agitación de ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (38 g, 0,0799 mol; véase el ejemplo 1, etapa 4) en diclorometano (400 ml) con ácido trifluoroacético (100 ml) a 0°C. Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en diclorometano (100 ml) y se añadió la solución resultante por goteo a dietiléter (1500 ml) con agitación. Se recogió el sólido formado con filtración y se lavó con dietiléter (3 x 50 ml). Se secó a vacío el sólido blanco dando ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-5-amino-2-((*S*)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexanocarboxílico como su sal de TFA (35,5 g, 86%). El compuesto se usó en la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM encontró $[M + H]^+ = 376$.

Ejemplo 7, etapa 2: se cargó una solución en agitación de ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-5-amino-2-((*S*)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexanocarboxílico (sal de TFA, 35,5 g, 0,0725 mol) en dicloroetano (350 ml) secuencialmente con *N*-metilmorfolina (29,3 g, 4,0 eq) y acetona (42,05 g, 10 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. y se añadió triacetoxiborohidruro sódico (30,7 g, 2 eq) a 0°C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 14 h, luego se añadieron formaldehído (solución al 37% en peso, 28,4 g, 5 eq) y triacetoxiborohidruro sódico (18,4 g, 1,2 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió agua (70 ml) y se continuó agitando durante 10 minutos. Se concentró la mezcla a presión reducida para eliminar los disolventes orgánicos. Se ajustó el pH de la mezcla resultante a 7-8 con solución de NaHCO₃ saturada y luego hasta pH ~ 6 con HCl 1*N*. Se extrajo la mezcla con diclorometano (5 x 250 ml). Se reunieron los extractos, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo en diclorometano (100 ml) y se añadió la solución resultante por goteo a dietiléter (1500 ml) con agitación. Se recogió el sólido formado con filtración y se lavó con dietiléter (3 x 50 ml). Se secó a vacío el sólido blanco dando ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexanocarboxílico (31 g, 99%). Se usó el compuesto en la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM encontró $[M + H]^+ = 432$.

Ejemplo 7, etapa 3: se cargó una solución en agitación de ácido (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexanocarboxílico (15,0 g, 0,0348 mol) en 1,4-dioxano (200 ml) con *N*-metilmorfolina (5,26 g, 1,5 eq) y DPPA (14,3 g, 1,5 eq) a 0°C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. Se cargó esta mezcla con 2-(trimetilsilil)etanol (6,16 g, 1,5 eq) y luego se agitó durante 2,5 h a 85°C con la protección de nitrógeno. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo resultante en acetato de etilo (250 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado (3 x 80 ml) y salmuera (3 x 80 ml). Se secó la solución sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido con cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con 1% y 2,5% de metanol en diclorometano dando (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (9,3 g, 49%). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 547$.

Ejemplo 7, etapa 4: se cargó una solución en agitación de (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (272 mg, 0,5 mmol) en diclorometano (3 ml) con ácido trifluoroacético (2 ml). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en diclorometano (50 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado (15 ml), se extrajo la capa acuosa con diclorometano (4 x 30 ml). Se combinaron todas las capas de diclorometano y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró a vacío dando (S)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-amino-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (190 mg, 94,5%). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 403$.

Ejemplo 7, etapa 5: se añadió a 460 mg (10 mmol) de ácido fórmico, anhídrido acético (204 mg, 2 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. Luego se añadió una quinta parte de la anterior solución a una mezcla de (S)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-amino-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (60 mg, 0,149 mmol) en diclorometano (3 ml) y trietilamina (62,3 μl, 3 eq) a 0°C con agitación. Se agitó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente y se añadió 1 ml de agua para interrumpir la reacción. Se diluyó la mezcla con diclorometano

ES 2 346 100 T3

(60 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado (20 ml). Se secó la solución sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró a vacío dando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-formamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (50 mg, 78%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 431.

5 Ejemplo 7, etapa 6: se añadió a una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-formamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (50 mg, 0,116 mmol) en metanol (3 ml) Pd/C al 10% (40 mg de catalizador húmedo al 50%). Se evacuó el matraz y se rellenoó con hidrógeno desde un balón de hidrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h y se eliminó el catalizador por filtración. Se concentró el filtrado a vacío dando N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)formamida (35 mg, 100%) que se llevó a la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 297.

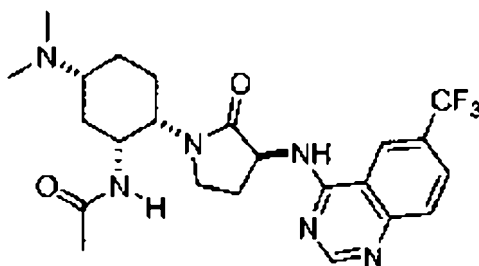
15 Ejemplo 7, etapa 7: se añadió a una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)formamida (34 mg, 0,115 mmol) en isopropanol (3 ml) 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (32 mg, 1,2 eq, véase: P. H. Carter y col, solicitud PCT WO 2005/021500) y trietilamina (29,1 mg, 2,5 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo con HPLC preparativa dando el compuesto del título como su sal de TFA (76 mg, 91,7%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 493. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 8,73 - 8,90 (2 H, m), 8,26 (1 H, d, J=8,65 Hz), 8,09 (1 H, s), 7,96 (1 H, d, J=9,16 Hz), 5,35 (1 H, t, J=9,66 Hz), 4,30 (2 H, s), 3,57 - 3,92 (4 H, m), 2,77 - 2,83 (3 H, m), 2,56 - 2,68 (1 H, m), 1,91 - 2,46 (6 H, m), 1,29 - 1,48 (6 H, m).

20

Ejemplo 8

25 *N-((1R,2S,5R)-5-(dimetilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida*

30



35

40 Ejemplo 8, etapa 1: se cargó una solución en agitación de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (66 g, 0,135 mol; véase ejemplo 1, etapa 6) en diclorometano (216 ml) con ácido trifluoroacético (216 ml). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en metanol y se concentró la solución resultante a vacío; esto se repitió una vez. Se obtuvo (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un aceite. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 389,4. RMN ¹H (400 MHz, (d₄-MeOH): δ 7,3 - 7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,41 (s a, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,00 (t, J= 9,3 Hz, 1H), 3,81 (t, J= 9,1 Hz, 1H), 3,65 (c, J= 8,4 Hz, 1H), 3,3 - 3,4 (m, 1H), 2,45 (m, 1H), 1,95 - 2,24 (m, 5H), 2,00 (s, 3H), 1,6 - 1,8 (m, 2H).

45

50 Ejemplo 8, etapa 2: se añadió secuencialmente a una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo, sal de TFA (500 mg, 0,99 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml), formaldehído (5 ml, solución al 37% en peso), trietilamina (0,35 ml, 2,4 mmol), y triacetoxiborohidruro sódico (315 mg, 1,5 mmol). Después de 16 h, se diluyó la solución con CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ saturado. Se recogió la capa orgánica y se extrajo con solución de HCl ac. (5 ml en HCl y 20 ml de agua). Se recogió la fase acuosa y se basificó con solución de NaOH ac. (-10 ml de NaOH 1N y 20 ml de agua) y luego se extrajeron con diclorometano (2 x 50 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró a vacío dando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(dimetilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un aceite (280 mg, 68% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 417.

55

60 Ejemplo 8, etapa 3: se añadió a una mezcla de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(dimetilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (70 mg) y Pd/C al 10% (30 mg de catalizador húmedo al 50%) EtOAc (50 ml) y luego se evacuó el matraz y se rellenoó con hidrógeno. Se agitó la mezcla en 1 atm de H₂ durante 16 h y se eliminó el catalizador mediante filtración a través de Celite. Se concentró el filtrado a vacío dando N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(dimetilamino)ciclohexil)acetamida como un sólido blanco (40 mg, 85% de rendimiento), que se llevó a la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 283.

65

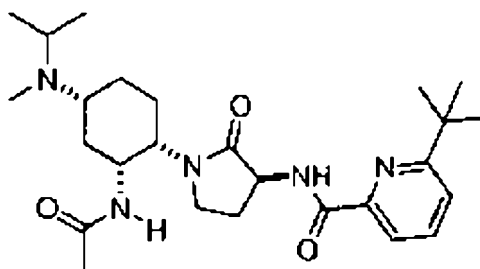
Ejemplo 8, etapa 4: se añadió a una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(dimetilamino)ciclohexil)acetamida (40 mg, 0,14 mmol) en isopropanol (6 ml) 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (39 mg, 0,17 mmol) y trietilamina (0,02 ml, 0,14 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h y se concentró a vacío hasta un aceite bruto, que se purificó mediante HPLC de fase inversa semi-preparativa (elución por gra-

ES 2 346 100 T3

diente, agua/metanol/TFA) dando el compuesto del título (70 mg, 71% de rendimiento). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 479$. RMN 1H (400 MHz, CD_3OD), δ ppm: 8,87 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,22 (m, 1H), 7,87 (m, 1H), 5,49 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,38 (m, 1H), 2,82 (s, 6H), 2,51 (m, 1H), 2,35 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,14-1,86 (m, 5H), 1,84 (s, 3H).

Ejemplo 9

N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-6-terc-butil-2-piridin-carboxamida

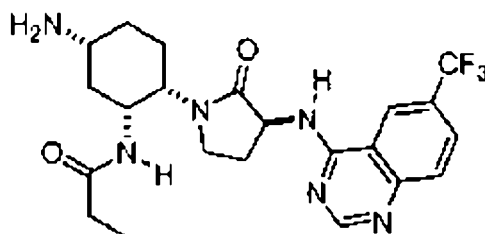


Ejemplo 9, etapa 1: se disolvió 6-terc-butilpicolinonitrilo (662 mg, 4,1 mmol; véase: P. H. Carter y col., solicitud PCT WO 2005/021500) en ácido acético glacial (6,8 ml) antes de la adición de HCl conc. (1,6 ml). Se calentó esta mezcla en un baño de aceite (95°C) durante la noche. Después de enfriar se concentró la solución. Se transfirió el sólido bruto resultante en Et₂O/hexano 50/50 a un embudo Buchner. Se lavó este sólido con más Et₂O/hexano 50/50 dando sal HCl del ácido 6-terc-butilpicolinico (880 mg). CL/EM encontró $(M+H)^+ = 180,0$.

Ejemplo 9, etapa 2: se disolvió *N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida* (70 mg, 0,22 mmol; véase ejemplo 1, etapa 10, en DMF (2 ml) antes de la adición de 4-metilmorfina (0,1 ml, 0,91 mmol) y sal HCl de ácido terc-butilpicolinico (90 mg, 0,50 mmol). Después de enfriar hasta 0°C se añadió BOP (175 mg, 0,39 mmol). Se calentó la solución a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se filtró luego la solución y se concentró. Se purificó el residuo resultante mediante HPLC de fase inversa (elución en gradiente, agua/metanol/TFA) dando el compuesto del título como su sal de TFA (85,1 mg). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 487,45$. RMN 1H (400 MHz, CD_3OD), δ ppm: 7,9 (m, 2H), 7,67 (m, 1H), 4,47 (m, 1H), 4,38 (t, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,97-3,74 (m, 3H), 3,64 (m, 1H), 2,82 (s, 3H), 2,6 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 2,25-2,05 (m, 2H), 2,01 (s, 3H), 1,95-1,8 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,37 (m, 3H).

Ejemplo 10

N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)propanamida



Ejemplo 10, etapa 1: se añadió a una solución de *(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxamida* (2,0 g, 4,21 mmol; véase ejemplo 1, etapa 5) en MeCN (150 ml) y H₂O (205 ml), diacetato de yodobenceno (1,357 g, 4,21 mmol). Se agitó la mezcla a 0°C durante 1 h y luego se dejó calentar hasta temperatura ambiente en el baño de hielo en fusión durante 14 h. Se acidificó la mezcla hasta pH 4 con la adición de ácido acético, y luego se extrajo con dietiléter (2 x 60 ml). Se concentró la capa acuosa a presión reducida para eliminar acetonitrilo. Se extrajo la solución residual con cloruro de metileno (2 x 80 ml) después de ajustar el pH a 9-10 usando NaHCO₃ saturada. Se secó la capa de cloruro de metileno (Na₂SO₄) y se concentró a vacío dando el *(1R,3R,4S)-3-amino-4-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato* de terc-butilo deseado (1,8 g, 4,03 mmol, 96% de rendimiento). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 447$.

ES 2 346 100 T3

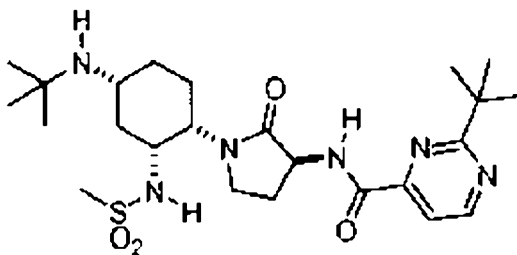
Ejemplo 10, etapa 2: se añadió a una solución de (1R,3R,4S)-3-amino-4-((S)-3-benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (1,8 g, 4,03 mmol) en 3 ml de DMF, ácido propiónico (0,285 g, 3,85 mmol), BOP (1,704 g, 3,85 mmol) y trietilamina (0,059 ml, 0,423 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 h y luego se vertió en agua (75 ml). Se extrajo la mezcla resultante con EtOAc (2 x 60 ml). Se reunieron las fases orgánicas y se lavó con NaHCO₃ sat. (2 x 40 ml) y salmuera (50 ml). Se secó luego la fase orgánica (MgSO₄), se filtró, y se concentró a vacío. Se dispersó el residuo en dietiléter. Se recogió el sólido precipitado por filtración, se lavó con dietiléter (2 x 40 ml), y se secó a vacío dando el (1R,3R,4S)-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-3-propionamido-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (1,6 g, 3,18 mmol, 79% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 503.

Ejemplo 10, etapa 3: se añadió a una solución de (1R,3R,4S)-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-3-propionamido-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (900 mg, 1,79 mmol) en 10 ml de MeOH hidróxido de paladio sobre carbono, 20% (340 mg, 2,42 mmol). Se evacuó la mezcla y se relleno con hidrógeno desde un balón de hidrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 h en 1 atm de H₂. La filtración, seguido de concentración a presión reducida, proporcionó (1R,3R,4S)-4-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-propionamidociclohexilcarbamato de terc-butilo (650 mg, 1,764 mmol, 99% de rendimiento), que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 369.

Ejemplo 10, etapa 4: se añadió a una solución de (1R,3R,4S)-4-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-propionamidociclohexilcarbamato de terc-butilo (650 mg, 1,764 mmol) en 5 ml de isopropanol, 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (492 mg, 2,117 mmol) y trietilamina (0,492 ml, 3,53 mmol). Se agitó la mezcla a 50°C durante 4 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se diluyó el residuo con 30 ml de AcOH al 20% en agua antes de extraerse con dietiléter (2 x 20 ml). Se extrajo la capa etérea con solución de AcOH al 20% en agua (3x 30 ml). Se reunieron las capas acuosas y se basificó con Na₂CO₃ y se extrajo con cloruro de metileno (3x 50 ml). Se reunieron los extractos orgánicos, se lavó con salmuera (40 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida dando (1R,3R,4S)-4-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)-3-propionamidociclohexilcarbamato de terc-butilo, CL/EM encontró [M + H]⁺ = 565. Se disolvió la totalidad de este producto bruto en 5 ml de cloruro de metileno. Se cargó la solución resultante con TFA (3 ml), se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, y luego se concentró a vacío. Se purificó el residuo con HPLC preparativa de fase inversa dando el compuesto del título como su sal de TFA en solución de metanol acuosa. Se concentró esta solución a vacío para eliminar el metanol y se basificó la solución residuo con NaHCO₃ saturada y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 ml), se secó (Na₂SO₄) y se concentró a vacío dando el compuesto del título como su base libre (550 mg, 1,184 mmol, 67% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 465. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 8,77 (1 H, s), 8,57 (1 H, s), 8,03 (1 H, dd, J=9,16, 2,03 Hz), 7,88 (1 H, d, J=8,65 Hz), 5,24 (1 H, t, J=8,65 Hz), 4,55 (1 H, d, J=3,56 Hz), 3,97 - 4,05 (1 H, m), 3,52 - 3,67 (2 H, m), 3,35 - 3,41 (1 H, m), 2,47 - 2,58 (1 H, m), 2,20 - 2,34 (3 H, m), 1,62 - 2,04 (6 H, m), 1,14 (3 H, t, J=7,63 Hz).

Ejemplo 11

2-terc-butil-N-((S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(metilsulfonamido)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-il)pirimidina-4-carboxamida



Ejemplo 11, etapa 1: se equipó un matraz de fondo redondo de 3 bocas secado en estufa con una barra agitadora seca, un condensador de reflujo seco, y dos septos. Después de enfriar en N₂, se cargó el matraz secuencialmente con ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (60 g, 126 mmol; véase ejemplo 1, etapa 4), acetonitrilo (800 ml), N-metilmorfolina (27,7 ml, 252 mmol), y difenilfosforilazida (29,9 ml, 139 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 h 40 min, en ese momento se añadió 2-trimetilsililetanol (90 ml, 631 mmol). Se dejó calentar la reacción y alcanzó el reflujo 30 minutos más tarde. Se dejó a reflujo durante 1 h, en ese momento se dejó enfriar hasta 50°C gradualmente y luego se enfrió hasta 15°C con enfriamiento externo. La reacción se interrumpió con la adición de ácido acético (1,734 ml, 30,3 mmol). Se concentró la reacción a vacío y luego se disolvió en EtOAc (1,2 l). Se lavó secuencialmente con agua (1 x 0,3 l), NaHCO₃ sat. (2 x 0,3 l), HCl 1N (1 x 0,3 l), y salmuera (2 x 0,3 l). Se secó la fase orgánica (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró a vacío. Apareció un sólido muy pronto en el proceso de concentración. Una

ES 2 346 100 T3

vez se eliminaron los compuestos volátiles se añadió 800 ml de EtOAc/hexanos al 10%, y se agitó la mezcla durante la noche. Se recogió el sólido y se secó dando (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-((2-trimetilsilil)etoxicarbonilamino)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (60,5 g, 102 mmol, 81% de rendimiento). HPLC mostró que el material era 72% puro, con dos impurezas del 12%. Este material se llevó a la siguiente etapa sin purificación. El filtrado se concentró más tarde dando otros 4,38 g de producto. Rendimiento total = 64,9 g (87%).

Ejemplo 11, etapa 2: se equipó un matraz de fondo redondo de 500 ml seco con una barra agitadora y se cargó secuencialmente con (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-((2-trimetilsilil)etoxicarbonilamino)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (60,5 g), CH₂Cl₂ (180 ml), y una solución de ácido para-toluenosulfónico monohidratado (19,48 g, 102 mmol) en CH₂Cl₂ (120 ml) y metanol (30 ml). Se dispuso la mezcla en un evaporador rotativo y se eliminó el grueso del CH₂Cl₂ (temperatura del baño aprox. 20°C). Cuando la mezcla comenzó a espumar se liberó el vacío, y la temperatura del baño aumentó hasta 46°C (la temperatura variaba entre 44 y 51°C; esto se controló con la adición de hielo externo). Se rotó la mezcla a esta temperatura durante exactamente una hora (el desprendimiento de gas era visible en todo momento) y luego se diluyó con EtOAc (1 l). Se lavó la fase orgánica con NH₄OH 0,5 N (2 x 250 ml). Se reunieron las aguas de lavado acuosas y se dejaron a parte. Se lavó la fase orgánica con NH₄Cl sat. (1 x 250 ml) y NaCl sat. (1 x 250 ml); se desecharon estas aguas de lavado acuosas. Las aguas de lavado de NH₄OH reunidas iniciales se re-extrajeron con EtOAc (1 x 250 ml), y se lavó el extracto orgánico con NH₄Cl sat. (1 x 60 ml) y NaCl sat. (1 x 60 ml). Se reunieron todos los extractos orgánicos, se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró. Se purificó el residuo mediante elución a través de un lecho de SiO₂ (13 cm de ancho x 7,5 cm de altura). El primer eluyente era EtOAc puro (aprox. 4 l). El segundo eluyente era (NH₄OH al 10% en MeOH)/CH₂Cl₂ 1:9 (aprox. 5 l). Se reunieron las fracciones que contenían el producto deseado conjuntamente y se evaporó dando el (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo deseado (31,6 g, 64,4 mmol, 63% de rendimiento).

Ejemplo 11, etapa 3: se añadió a una solución de (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (1,03 g, 2,099 mmol) en metanol (10 ml) 3,5-di-terc-butil-1,2-benzoquinona (0,555 g, 2,52 mmol). Esta mezcla se agitó durante 2 h antes de añadirse THF (6 ml) y agua (2 ml) junto con ácido oxálico hasta pH 4. Se concentró la mezcla. Se disolvió el residuo resultante en acetato de etilo y se lavó con salmuera. Se secó la capa orgánica (MgSO₄), se filtró, y se concentró. Esto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida dando (1R,2S)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-oxociclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (0,550 g, 1,123 mmol, 53,5% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 491,3.

Ejemplo 11, etapa 4: se añadió a una solución de (1R,2S)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-oxociclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (0,550 g, 1,123 mmol) en cloruro de metileno (0,4 ml) t-butilamina (1,180 ml, 11,23 mmol) e isopropóxido de titanio (IV) (6,63 ml, 22,47 mmol). Se agitó esta mezcla durante 2 h antes de añadirse cianoborohidruro sódico (127 mg, 2,022 mmol) y MeOH (1 ml). Después de 2 h se añadió cloruro de metileno (50 ml), seguido de NaOH 1 N. Se filtró la mezcla a través de Celite para eliminar las sales de titanio. Se secó el filtrado y se concentró a vacío dando (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo y su diastereómero 5S como una mezcla (510 mg, 0,933 mmol, 83% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 547,31.

Ejemplo 11, etapa 5: se disolvió el producto de la etapa 4 (510 mg, 0,933 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) y trifluoroácido acético (2,87 ml, 37,3 mmol). Después de 30 min se concentró la solución dando la sal bis de TFA de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(terc-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como una mezcla con su diastereómero 4S (520 mg, 0,825 mmol, 88% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 403,25.

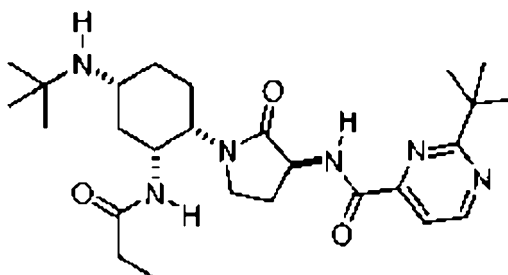
Ejemplo 11, etapa 6: se disolvió una porción de la amina de la etapa 5 (362 mg, 0,57 mmol) en cloruro de metileno (3 ml). Se cargó la solución resultante sucesivamente con trietilamina (0,125 ml, 0,900 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (0,070 ml, 0,900 mmol). Se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó con solución de NaHCO₃ sat., se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en metanol (3 ml). Se cargó el recipiente con Pd/C (150 mg, 1,410 mmol) y se equipó con un balón de hidrógeno. Después de 1 h se filtró la solución y se concentró a vacío. Se re-disolvió el residuo en metanol (3 ml) y se cargó de nuevo el recipiente con Pd/C (150 mg, 1,410 mmol) y se equipó con un balón de hidrógeno. Después de 1 h se filtró la solución y se concentró a vacío dando N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexil)metanosulfonamida como una mezcla con su diastereómero 5S (190 mg, 0,548 mmol, 75% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 347,3.

Ejemplo 11, etapa 7: se disolvió el producto amina de la etapa 7 (190 mg, 0,548 mmol) en cloruro de metileno (3 ml). Se añadieron el ácido 2-terc-butilpirimidin-4-carboxílico (196 mg, 1,09 mmol; véase P. H. Carter y col, solicitud PCT WO 2005/021500), EDC (210 mg, 1,097 mmol), y N-metilmorfolina (0,247 ml, 2,193 mmol) antes de la adición de HOBt (364 mg, 2,7 mmol). Se agitó esta mezcla durante la noche. Se concentró la solución, se filtró, y se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa dando la sal de TFA del compuesto del título en forma diastereoméricamente pura (123 mg, 0,198 mmol, 36%). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 509,35. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 9,36 (d a, 1H), 8,97 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 4,49 (m, 2H), 3,94-3,75 (m, 3H), 3,64 (m, 1H), 3,04 (s, 3H), 2,58 (m, 1H), 2,33 (m, 2H), 2,2-1,96 (m, 4H), 1,88 (m, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,44 (s, 9H).

ES 2 346 100 T3

Ejemplo 12

2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(propionilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida



Ejemplo 12, etapa 1: se disolvió una muestra de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxycarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo y su diastereómero 5S (68 mg, 0,141 mmol; véase ejemplo 11, etapa 4) en MeOH (3 ml) antes de la adición de Pd/C al 10% (100 mg, 0,940 mmol) y un balón de hidrógeno. Después de 1 h se filtró la solución y se concentró a vacío. Se estableció luego la reacción de nuevo con reactantes frescos. Después de 1 h se filtró la solución y se concentró dando (1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo como una mezcla con su diastereómero 5S (139,4 mg, 0,338 mmol, 99% de rendimiento): CL/EM encontró $[M + H]^+ = 413,4$.

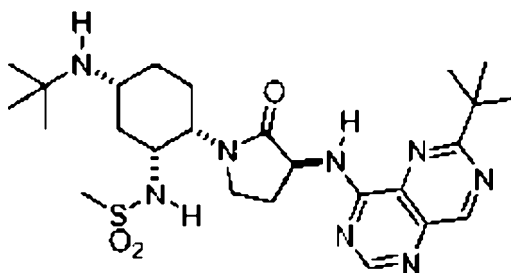
Ejemplo 12, etapa 2: se disolvió el producto de la etapa 1 anterior (139,4 mg, 0,338 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml). Se cargó la solución secuencialmente con ácido 2-terc-butilpirimidin-4-carboxílico (122 mg, 0,676 mmol), 1H-benzo [d][1,2,3]triazol-1-ol (91 mg, 0,676 mmol), y 4-metilmorfolina (0,149 ml, 1,351 mmol). Se cargó luego la solución con clorhidrato de 1-(3-dimetilamino)propil)-3-etil-carbodiimida (130 mg, 0,676 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche. Se concentró la solución, se filtró, y se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa (Phenomenex 21 X 250 mm, de 0% a 100% de metanol-agua que contiene 0,1% de trifluoroácido acético durante 30 min, 15 ml/min, 220 nM, tiempo de retención del producto = 29,9 min) dando la sal de TFA de (1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(2-terc-butilpirimidin-4-carboxamido)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (92 mg, 0,134 mmol, 39,5% de rendimiento). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 575,5$.

Ejemplo 12, etapa 3: se disolvió el producto de la etapa 2 (92 mg, 0,134 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml) antes de la adición de ácido trifluoroacético (3,09 ml, 40,1 mmol). Después de 30 min, se concentró la solución dando la sal de TFA de N-((S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(terc-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-il)-2-terc-butilpirimidin-4-carboxamida (87 mg, 0,132 mmol, 99% de rendimiento). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 431,37$.

Ejemplo 12, etapa 4: se disolvió la sal de TFA de N-((S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(terc-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-il)-2-terc-butilpirimidin-4-carboxamida (87 mg, 0,132 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml) antes de la adición de trietilamina (0,092 ml, 0,660 mmol). Se enfrió la solución a 0°C y se cargó con anhídrido propiónico (0,051 ml, 0,396 mmol). Después de 30 min. se concentró la solución, se filtró, y se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa (Phenomenex 21 X 100 mm, de 0% a 100% de metanol-agua que contiene 0,1% de ácido trifluoroacético durante 10 min, 20 ml/min, 220 nM, tiempo de retención del producto = 8,2 min) dando el compuesto del título como su sal de TFA. Se disolvió este material en cloruro de metileno. Se lavó la solución resultante con Na_2CO_3 sat. y luego se secó y se concentró a vacío dando el compuesto del título (46 mg, 0,095 mmol, 72% de rendimiento). CL/EM encontró $[M + H]^+ = 487,45$. RMN ¹H (400 MHz, CD_3OD), δ ppm: 8,84 (d, 1H), 7,73 (d, 1H), 4,57 (t, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,51 (m, 2H), 2,97 (m, 1H), 2,42 (m, 1H), 2,12 (c, 2H), 2,06 (m, 1H), 1,9 (m, 1H), 1,75-1,55 (m, 5H), 1,36 (s, 9H), 1,36-1,02 (m, 12H).

Ejemplo 13

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)metanosulfonamida



ES 2 346 100 T3

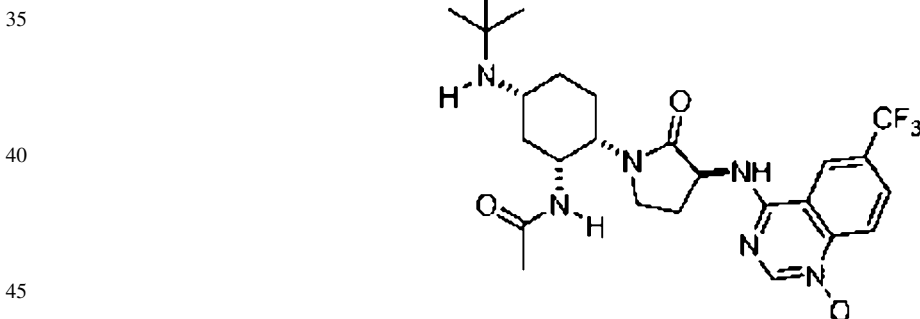
Ejemplo 13, etapa 1: se disolvió una muestra de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo y su diastereómero 5S (100 mg, 0,183 mmol; véase ejemplo 11, etapa 4) en diclorometano (2 ml) antes de la adición de ácido trifluoroacético (2,54 ml, 32,9 mmol). Después de 30 min se concentró la solución a vacío. Se disolvió el residuo en diclorometano (3 ml) antes de la adición
5 de trietilamina (0,100 ml, 0,720 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (0,018 ml, 0,234 mmol). Después de 2 h se lavó esto con solución de NaHCO₃ sat. y se secó la capa orgánica (Na₂SO₄), se filtró y se concentró dando (S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(metilsulfonamido)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como una mezcla con su diastereómero 4S (66 mg, 0,137 mmol, 76% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 481,22.

10 Ejemplo 13, etapa 2: se disolvió el producto de la etapa 1 anterior (0,066 g, 0,137 mmol) en MeOH (4 ml) antes de la adición de Pd/C al 10% (150 mg, 1,410 mmol) y un balón de hidrógeno. Después de 1 h se filtró la solución y se concentró a vacío. Se estableció de nuevo la reacción con reactantes frescos. Después de 1 h se filtró la solución y se concentró dando N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexil)metanosulfonamida como una mezcla con su diastereómero 5S (47,5 mg, 0,137 mmol, 100% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 347,3.
15

Ejemplo 13, etapa 3: se disolvió el producto de la etapa 2 (47,5 mg, 0,137 mmol) en 2-propanol (2 ml). Se cargó la solución resultante secuencialmente con trietilamina (0,057 ml, 0,411 mmol) y 2-terc-butil-8-cloropirimido[5,4-d]pirimidina (45,8 mg, 0,206 mmol; véase P.H. Carter y col., solicitud PCT WO 2005/021500). Después de agitar durante 2 h, se concentró la solución. Se purificó el residuo mediante HPLC de fase inversa preparativa (Phenomenex Luna 5u C18 21,2 x 100 mm, % de metanol-agua que contiene 0,1% de ácido trifluoroacético, gradiente durante 12 min, 20 ml/min, 220 nM, tiempo de retención del producto = 8,2 min) dando el producto como un sal de TFA. Esto se disolvió en diclorometano y se lavó con solución de Na₂CO₃ al 20%. Se concentró la capa orgánica dando el compuesto del título (18 mg, 0,034 mmol, 24,66% de rendimiento). CL/EM encontró [M + H]⁺ = 533,3. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 9,15 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 5,16 (m, 1H), 3,91 (m, 2H), 3,83 (m, 1H), 3,55 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 2,91 (s, 3H), 2,53 (m, 1H), 2,1 (m, 2H), 1,9 (m, 1H), 1,77-1,55 (m, 4H), 1,40 (s, 9H), 1,07 (s, 9H).
20
25

Ejemplo 14

30 N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida



Ejemplo 14, etapa 1: se añadió a una solución de (1R,3R,4S)-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (100 g, 0,205 mol; véase ejemplo 1, etapa 6) en diclorometano (400 ml) TFA (400 ml) a -20°C. Se agitó la solución de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente y la mayor parte de TFA se eliminaron a presión reducida, y se diluyó el residuo con diclorometano (2 l) y solución de K₂CO₃ acuosa (2 l). Se ajustó el pH a 10 con HCl 1N. Se extrajo la capa acuosa con diclorometano (3 x 1 l). Se secó la capa orgánica reunida sobre Na₂SO₄, y se concentró dando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un aceite (81 g, 100% de rendimiento). Se usó esta amina directamente en la siguiente etapa sin más purificación.
50
55

Ejemplo 14, etapa 2: se agitó una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (13,3 g, 34 mmol) y 3,5-di-tert-butilciclohexa-3,5-dieno-1,2-diona (7,54 g, 34 mmol) en metanol (160 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Se concentró la solución y se diluyó con acetona (132 ml) y agua (33 ml), seguido de adición de Dowex-50WX8-200 (33 g). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se eliminó Dowex-50WX8-200 por filtración y se lavó con diclorometano (300 ml). Se concentró el filtrado a vacío eliminado la mayor parte de acetona. Se diluyó este residuo con diclorometano (200 ml) y se lavó con solución de NaHCO₃ acuosa (200 ml) y salmuera (200 ml). Se extrajeron las capas acuosas reunidas con diclorometano (2 x 100 ml). Se secaron los extractos orgánicos reunidos sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se obtuvo el producto (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un sólido (12 g, 90% de rendimiento) mediante cristalización en EtOAc (100 ml) y hexano (200 ml). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 7,99 (d, J=9,35 Hz, 1 H), 7,44 (d, J=8,80 Hz, 1 H), 7,28-7,39 (m, 5 H), 5,03 (s, 2 H), 4,50 (s, 1 H), 4,31 (d, J=12,10 Hz, 1 H), 4,18 (c,
60
65

ES 2 346 100 T3

J=8,98 Hz, 1 H), 3,27 (m, 2 H), 2,82 (dd, J=15,12, 5,22 Hz, 1 H), 2,52 - 2,65 (m, 1 H), 2,40 (dd, J=12,92, 4,67 Hz, 1 H), 2,15 - 2,31 (m, 2 H), 2,09 (d, J=15,40 Hz, 1 H), 1,90 (m, 1 H), 1,81 (s, 3 H), 1,68 (m, 1 H). m/z: 388,46 [M+H].

5 Ejemplo 14, etapa 3: se añadió a una solución de TiCl₄ (1 M en diclorometano, 36 ml, 36 mmol) en diclorometano (30 ml) a 0°C Ti(OiPr)₄ (10,8 ml, 36 mmol). Se agitó luego la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió a una solución de (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (23,25 g, 60 mmol) en diclorometano (600 ml) terc-butilamina (30 ml, 300 mmol) a temperatura ambiente, seguido de la adición de la solución de TiCl₄ATi(OiPr)₄ a -50°C. Se dejó calentar la reacción lentamente hasta temperatura ambiente. Se finalizó la reacción tras 2 h (la reacción se controló en HPLC desactivando una muestra de HPLC con
10 NaBH₄ en metanol). Se enfrió la solución a 10°C y se añadió BH₃·SMe₂ (1 M en diclorometano, 66 ml, 66 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 h luego se interrumpió con solución de Na₂CO₃ acuosa (300 ml). Se separó el precipitado por filtración. Se separaron las dos capas y se extrajo la capa acuosa con diclorometano (600 ml). Se extrajeron las capas de diclorometano reunidas con HCl 1 N dos veces (150 ml y 15 ml). (El producto y el isómero trans no deseado se encontraban ambos en la fase acuosa ácida). Se neutralizaron las capas acuosa ácidas reunidas con solución acuosa de NH₄OH 12 M (12 ml) hasta pH~8 y se extrajeron con diclorometano dos veces (600 ml, 450
15 ml). (El producto estaba en la fase orgánica mientras el isómero trans estaba aún en la capa acuosa). Se lavaron las capas orgánicas reunidas con solución acuosa de NH₄Cl 3 veces (3 x 200 ml) hasta que no quedase isómero trans en la capa orgánica. Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se purificó el residuo mediante cristalización en EtOAc/hexano (200 ml/800 ml) dando el (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo deseado (20,80 g, 78% de rendimiento) como un sólido blanco con 99,5% de pureza. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 8,76 (s, 1H), 7,27 - 7,46 (m, 6 H), 5,03 (m, 2 H), 4,14 (m, 1 H), 4,07 (c, J=8,80 Hz, 1 H), 3,83 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 2,91 (s, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,04 (m, 1H), 1,78 (s, 3H), 1,41 - 1,74 (m, 7H), 1,04 (s, 9H). m/z: 445,54 [M+H].

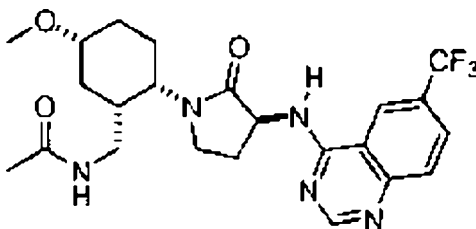
25 Ejemplo 14, etapa 4: se añadió a una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (43,3 g, 98 mmol) en metanol (400 ml), Pd/C al 10% húmedo (4,34 g). Se evacuó la mezcla y se relleno con hidrógeno de un balón de hidrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 h. Se filtró la mezcla y se lavó con metanol (500 ml) y se concentró a vacío hasta sequedad. Se destiló el producto bruto obtenido con IPA (2 x 100 ml) a presión reducida dando el producto N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexil)acetamida como un aceite (30 g, 98% de rendimiento). Se usó esta amina en la siguiente etapa sin más purificación.
30

Ejemplo 14, etapa 5: se añadió a una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butilamino)ciclohexil)acetamida (50 mg, 0,161 mmol, preparada como se describió anteriormente) y 1-óxido de 4-fenoxi-6-(trifluorometil)quinazolina (99 mg, 0,161 mmol; véase ejemplo 5, preparación alternativa, etapa 2) en i-PrOH (2 ml) N,N-diisopropiletilamina (0,056 ml, 0,322 mmol). Se selló el recipiente en atmósfera de argón y se calentó en un microondas durante 1 h a 120°C. CL/EM encontró: (M + H)⁺ = 523,3 como el pico de producto principal. Se repitió la reacción en la misma escala en un recipiente a parte. Se reunieron y evaporaron las dos reacciones dando un residuo oleoso que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (40 g de gel de sílice) con elución mediante 8:92 (10% de CNH₄OH en MeOH). Se reunieron las fracciones que contienen el producto deseado y se concentró a vacío. Se cristalizó el residuo en CH₂Cl₂ y hexano. Se reunieron los dos cultivos y se secó a vacío dando 1-óxido de 4-((S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(terc-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilamino)-6-(trifluorometil)quinazolina (101 mg). El análisis por RMN ¹H mostró que este material contenía aprox. 0,6 equivalentes molares de CH₂Cl₂. CL/EM encontró: [M+H]⁺ = 523,30. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ ppm: 9,00 (s, 1H), 8,80 (s, 1H), 8,61 (d, J=9,0 Hz, 1H), 8,32 (dd, J=9,0, 1,6 Hz, 1H), 5,28 (t, J=8,3 Hz, 1H), 4,57 (s a, 1H), 4,02 (d a, 1H), 3,65-3,51 (m, 2H), 3,24 (s a, 1H), 2,59-2,51 (m, 1H), 2,34-2,20 (m, 1H), 2,04 (s, 3H), 2,04 (m, 1H), 1,89 (sa, 3H), 1,74 (s a, 2H), 1,20 (s, 9H).
45

50 Ejemplo 15

N-(((1S,2S,5R)-5-metoxi-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)metil)acetamida

55



60

65 Ejemplo 15, etapa 1: se disolvió una muestra de (1R,2S,5R)-7-oxo-6-oxabicyclo[3.2.1]octan-2-ilcarbamato de bencilo (9 g, 32,7 mmol; véase P. H. Carter y col., solicitud PCT WO 2005/021500) en THF (50 ml) y agua (16,67 ml) a temperatura ambiente antes de la adición de borohidruro sódico (1,237 g, 32,7 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 22 h. Se interrumpió con solución de NaHCO₃ saturada. Se extrajo la mezcla de reacción con una mezcla 1:9

ES 2 346 100 T3

de MeOH-CH₂Cl₂ (5 veces). Se lavó luego la capa orgánica reunida con salmuera y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Se obtuvo el producto deseado (1S,2R,4R)-4-hidroxi-2-(hidroximetil)ciclohexilcarbamato de bencilo (8,75 g, 31,3 mmol, 96% de rendimiento) como un sólido espumoso blanco. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 280,30.

5 Ejemplo 15, etapa 2: se disolvió una muestra de (1S,2R,4R)-4-hidroxi-2-(hidroximetil)ciclohexilcarbamato de bencilo (20,5 g, 73,4 mmol) en piridina anhidra (140 ml) a temperatura ambiente antes de la adición de cloruro de tritilo (20,46 g, 73,4 mmol) en una porción. Se agitó la mezcla de reacción durante dos días. Se evaporó piridina y se disolvió el residuo en EtOAc. Se lavó la solución con agua (2 veces) seguido de salmuera. Se reextrajo la capa acuosa reunida con EtOAc. Se lavó esta capa orgánica con salmuera. Se secó luego la capa orgánica reunida sobre Na₂SO₄
10 y se evaporó para conseguir un residuo oleoso que dio producto cristalino blanco en EtOAc y hexano. Se sometió el licor madre a cromatografía (400 g de gel de sílice con EtOAc/hexano al 20% seguido de 40% y finalmente 70%). Se obtuvo el regioisómero deseado (1S,2R,4R)-4-hidroxi-2-(tritoloximetil)ciclohexilcarbamato de bencilo (33,08 g, 63,4 mmol, 86% de rendimiento) como un sólido blanco. EM encontró [M - H]⁻ = 520,2 (AP/CI). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm 7,4 (d, J = 7,12 Hz, 6H), 7,19 - 7,34 (m, 15H), 5,25 - 5,31 (m, 1H), 4,98 - 5,09 (m, 2H), 3,92 (s, 1H),
15 3,66 (sa, 1H), 3,14 - 3,24 (m, 1H), 2,97 (dd, J = 9,41, 4,83 Hz, 1H), 1,98 - 2,08 (m, 1H), 1,91 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 1,76 - 1,84 (m, 1H), 1,36 - 1,49 (m, 2H), 1,39 - 1,43 (m, 1H), 1,19 - 1,30 (m, 1H). Se obtuvo también una pequeña cantidad del isómero deseado, (1S,2R,4R)-2-(hidroximetil)-4-(tritoloxi)ciclohexil carbamato de bencilo (1,17 g, 2,243 mmol, 3,06% de rendimiento). EM encontró [M - H]⁻ = 520,2 (AP/CI). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm 7,48 (d, J = 7,12 Hz, 6H), 7,32 - 7,40 (m, 5H), 7,21 - 7,32 (m, 10H), 5,05 - 5,14 (m, 2H), 4,96 (d, J = 8,65 Hz, 1H), 3,89 (dd, J = 8,39, 2,8 Hz, 1H), 3,84 (dd, J = 10,7, 4,58 Hz, 1H), 3,46 (ddd, J = 14,5, 9,92, 4,07 Hz, 1H), 3,07 (ddd, J = 15,26, 10,43, 4,3 Hz, 1H), 1,66 (dd, J = 14,24, 3,05 Hz), 1,43 - 1,51 (m, 1H), 1,30 - 1,40 (m, 2H), 1,14 - 1,23 (m, 1H), 0,79 - 0,91 (m, 1H), 0,72 - 0,79 (m, 1H).

25 Ejemplo 15, etapa 3: se disolvió una muestra de (1S,2R,4R)-4-hidroxi-2- (tritoloximetil)ciclohexilcarbamato de bencilo (11,5 g, 21,47 mmol) en CH₂Cl₂ (100 ml) a temperatura ambiente en N₂ antes de la adición de, secuencialmente, 1,8-bis(dimetilamino) naftaleno (11,50 g, 53,7 mmol), tamices moleculares (pulverizados a 4Å, 5 g) y tetrafluoroborato de trimetiloxonio (6,35 g, 42,9 mmol, en tres porciones). Se agitó la mezcla de reacción durante 48 h. Aún quedaba material de partida. Se añadieron cantidades adicionales de tetrafluoroborato de trimetiloxonio (1,5 g) y tamices moleculares (1 g) y se agitó la mezcla de reacción durante otras 5 h. Se diluyó con 200 ml de CH₂Cl₂
30 y se filtró a través de Celite. Se lavó el filtrado con HCl 0,5N (3 veces con 50 ml) seguido de Na₂CO₃ saturado y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Se evaporó luego la solución y se secó a vacío dando una espuma amarilla clara. Se recogió la espuma amarilla en 100 ml de AcOH:agua (7:3) y se agitó a 60°C durante 3h. Se concentró la solución rosa resultante y se basificó con NaOH 1N. Se extrajo la mezcla con EtOAc (5 veces, 150 ml cada vez). Se lavó la capa orgánica reunida con salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se concentró y se sometió a cromatografía (300 g de gel de sílice; eluyendo con EtOAc:hexano 7:3, seguido de EtOAc). Se obtuvo el (1S,2R,4R)-2-(hidroximetil)-4-metoxiciclohexilcarbamato de bencilo deseado (6,1 g, 20,79 mmol, 97%) como un aceite. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 294,41.

40 Ejemplo 15, etapa 4: se disolvió una muestra de trifetilfosfina (7,39 g, 28,2 mmol) en THF (60 ml) a 0°C antes de la adición por goteo del dietilazodicarboxilato (4,46 ml, 28,2 mmol). Se continuó agitando durante 30 min a 0°C, cuando se añadió una solución de (1S,2R,4R)-2-(hidroximetil)-4-metoxiciclohexilcarbamato de bencilo (4,13 g, 14,08 mmol) en THF (40 ml) a la mezcla de reacción lentamente. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 30 min cuando se añadió lentamente una solución de azida de hidrógeno (14,08 ml, 28,2 mmol) (como una solución 2M en benceno). Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 90 min. Se interrumpió con MeOH y se agitó durante la noche a
45 temperatura ambiente. Se concentró la solución amarilla rojiza y se sometió a cromatografía. Se obtuvo el (1S,2S,4R)-2-(azidometil)-4-metoxiciclohexilcarbamato de bencilo (4,19 g, 13,16 mmol, 93% de rendimiento) como un aceite muy viscoso. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 319,5.

50 Ejemplo 15, etapa 5: se disolvió una muestra de (1S,2S,4R)-2-(azidometil)-4-metoxiciclohexilcarbamato de bencilo (4,7 g, 14,76 mmol) en THF a temperatura ambiente antes de la adición de agua (0,293 ml, 16,24 mmol) y trifetilfosfina (4,26 g, 16,24 mmol). Se agitó la reacción a 60°C durante 4 h. Se enfrió luego y se trató con una solución acuosa de Na₂CO₃ (3,13 g, 29,5 mmol) seguido de di-t-butildicarbonato (3,77 ml, 16,24 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente. Se repartió entre EtOAc y agua. Se lavó la capa orgánica con salmuera y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Se concentró la solución y se sometió a cromatografía (500 ml de gel
55 de sílice eluido con EtOAc/hexano al 30%). Se obtuvo el ((1S,2S,5R)-2-benciloxycarbonilamino-5-metoxiciclohexil) metilcarbamato de terc-butilo como un aceite viscoso. CL/EM encontró [M - Boc + H]⁺ = 293,25.

Ejemplo 15, etapa 6: se disolvió una muestra del producto de la etapa 5 en MeOH (100 ml). Se añadió paladio sobre carbono (0,185 g, 1,743 mmol) a la solución y se agitó la mezcla de reacción en 344,737 kPa (50 psi) de hidrógeno durante 2 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite con EtOAc. Se concentró la solución resultante a vacío dando ((1S,2S,5R)-2-amino-5-metoxiciclohexil)metilcarbamato de terc-butilo como un aceite claro que se usó sin
60 purificación adicional alguna. Se estimó un rendimiento cuantitativo. CL/EM encontró [M + H]⁺ = 259,41.

Ejemplo 15, etapa 7: se disolvió una muestra de ((1S,2S,5R)-2-amino-5-metoxiciclohexil)metilcarbamato de terc-butilo (2,53 g, 9,79 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) a temperatura ambiente. Se cargó la solución secuencialmente con 1-hidroxibenzotriazol (1,456 g, 10,77 mmol), N-carbobenciloxi-L-metionina (4,16 g, 14,69 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (2,440 g, 12,73 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Esta se diluyó con EtOAc y se lavó con Na₂CO₃ saturado, seguido de salmuera. Se secó la solución (MgSO₄), se filtró, y se

ES 2 346 100 T3

concentró a vacío dando ((1S,2S,5R)-2-((S)-2-benciloxicarbonilamino-4-(metiltio)butanamido)-5-metoxiciclohexil)metilcarbamato de terc-butilo como un sólido pegajoso incoloro. CL/EM encontró $[M + H]^+ = 524,31$.

5 Ejemplo 15, etapa 8: se disolvió una muestra del producto de la etapa 7 en yodometano (30 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante dos días. Se evaporó la mezcla de reacción y se secó a vacío. Se disolvió el residuo en CH_2Cl_2 y se evaporó. Se repitió el procedimiento cuatro veces más. Se secó el residuo resultante a vacío dando un sólido espumoso amarillo que se ha recogido en DMF (20 ml) y se trató con CS_2CO_3 (6,36 g, 19,52 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se diluyó con EtOAc y se lavaron con agua (2 veces). Se extrajo la capa acuosa reunida con EtOAc (2 veces). Se lavó luego la capa orgánica reunida con salmuera
10 y se secó sobre $MgSO_4$ anhidro. Se concentró luego la solución y se sometió a cromatografía dando ((1S,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-metoxiciclohexil)metilcarbamato de terc-butilo como un sólido espumoso blanco. CL/EM encontró $[M + H]^+ = 476,4$.

15 Ejemplo 15, etapa 9: se disolvió una muestra de ((1S,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-metoxiciclohexil)metilcarbamato de terc-butilo (0,75 g, 1,577 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml) a temperatura ambiente. Se cargó la solución con ácido trifluoroacético (1,215 ml, 15,77 mmol) y se agitó durante 6 h. Se evaporó luego y se secó a vacío. Se disolvió el residuo en EtOAc y se lavó con Na_2CO_3 saturado seguido de salmuera. Se secó luego la capa orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro, se concentró y se secó a vacío dando una espuma amarilla clara. Se disolvió este material en CH_2Cl_2 (10 ml) a temperatura ambiente. Se cargó la solución secuencialmente con trietilamina (0,659 ml, 4,73 mmol), dimetilaminopiridina (0,019 g, 0,158 mmol), y anhídrido acético (0,164 ml, 1,734 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 90 min y luego se interrumpió con $NaHCO_3$ saturado. Se extrajo luego la mezcla de reacción con CH_2Cl_2 (3 veces). Se reunieron las capas orgánicas, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se concentró y se sometió a cromatografía. Se obtuvo el producto deseado, (S)-1-((1S,2S,4R)-2-(acetamidometil)-4-metoxiciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo, como un sólido blanco. CL/EM encontró $[M + H]^+ = 418,4$.

25 Ejemplo 15, etapa 10: se agitó una muestra de (S)-1-((1S,2S,4R)-2-(acetamidometil)-4-metoxiciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (614 mg, 1,471 mmol) y Pd/C (62,6 mg, 0,294 mmol) en MeOH (30 ml) a temperatura ambiente en 344,737 kPa (50 psi) de atmósfera de hidrógeno durante 2 h. Se filtró la suspensión a través de Celite con EtOAc, se concentró y se secó a vacío dando N-(((1S,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-metoxiciclohexil)metil)acetamida (410 mg, 1,447 mmol, 98% de rendimiento) como un sólido blanco. CL/EM encontró $[M + H]^+ = 284,24$.

30 Ejemplo 15, etapa 11: se disolvió una muestra de N-(((1S,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-metoxiciclohexil)metil)acetamida (220 mg, 0,776 mmol) en 2-propanol (10 ml) a temperatura ambiente. Se añadió a esta solución de trietilamina (0,433 ml, 3,11 mmol), seguido de 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (235 mg, 1,009 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Se concentró y se sometió a cromatografía (120 g de gel de sílice eluyendo con MeOH al 5% seguido al 10% en CH_2Cl_2) dando el compuesto del título (300 mg, 0,626 mmol, 81% de rendimiento) como un sólido blanco. CL/EM encontró $[M + H]^+ = 480,4$. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ ppm: 8,6 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,92 (s a, 1H), 7,87-7,82 (m, 2H), 6,28 (s a, 1H), 5,00 (dd, J=16,02, 8,65 Hz, 1H), 4,36-4,35 (m, 1H), 3,72-3,68 (m, 1H), 3,63-3,56 (m, 1H), 3,37-3,23 (m, 2H), 3,31 (s, 3H), 3,18-3,13 (m, 1H), 2,69-2,66 (m, 1H), 2,12-2,07 (m, 1H), 2,06-1,89 (m, 4H), 1,96 (s, 3H), 1,74-1,67 (m, 1H), 1,57-1,51 (m, 1H), 1,30-1,28 (m, 1H).

Características farmacológicas comparativas

45 Se presentan a continuación ensayos y datos que comparan las características farmacológicas de los compuestos de la presente invención y compuestos que se encuentran en el documento WO2005021500 (que corresponde a la patente de Estados Unidos nº 7.163.937, asignada al presente solicitante).

Unión de células mononucleares de sangre periférica humana (“unión a CCR2”)

50 Véase también: Yoshimura y col., J. Immunol. 1990, 145, 292. El ensayo de unión a CCR2 humano se llevó a cabo con células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC) usando ^{125}I -MCP-1 humana como el ligando trazador. Se aislaron hPBMC de leukopak humana (Biological Specialty Inc.) usando un protocolo convencional con Ficoll-Hypaque (Mediatech Cellgro). Se lavaron hPBMC aisladas y se diluyeron hasta 1×10^7 /ml en tampón de unión (RPMI-1640, BSA al 0,1%, HEPES 20 mM, pH 7,4). Se diluyó ^{125}I -MCP-1 (NEN/Perk Elmer) a 0,45 nM en tampón de unión. Se diluyó el compuesto en tampón de unión a 3 veces las concentraciones finales usadas en el ensayo de unión. Se llevó a cabo el ensayo de unión usando una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore). Se evaluó la unión ^{125}I -MCP-1 total como sigue: se añadieron a cada reacción de un volumen total de $150 \mu l$ 5×10^5 células, ^{125}I -MCP-1 0,15 nM, y compuesto tal que la concentración final variaba de 0 a 100 nM. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido de tres lavados con RPMI-1640, BSA al 0,1%, NaCl 0,4 M, HEPES 20 mM, pH 7,4 usando una filtración múltiple a vacío (Millipore). Después de lavar se secó al aire la placa durante 60 minutos a temperatura ambiente. Esto fue seguido de la adición de $25 \mu l$ de Microscint 20 en cada pocillo. Se selló la placa y se recuenta en el Trilux durante 1 minuto. Se determinó la unión no específica en presencia de MCP-1 frío 300 nM (PeproTech Inc.). Se calculó ^{125}I -MCP-1 específico como la diferencia entre unión total y no específica. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. La CI50 se define como la concentración de compuesto de competencia requerida para reducir la unión específica en el 50%.

ES 2 346 100 T3

Flujo en hERG

Se cultivaron células HEK293 que expresan de forma estable canales hERG (37°C, CO₂ al 5%) en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM y 500 µg/ml de G418, en el incubador. Se usó tampón de disociación celular para extraer las células de matraces, que se dispusieron luego en placas negras/claras recubiertas con poli-D-lisina de Corning de 384 pocillos con una densidad de 2×10^4 células por pocillo (20 µl) en medio de suero al 10%, y se incubaron durante 15 a 24 horas a 37°C en un incubador con CO₂ al 5% hasta que se obtuvo una monocapa confluyente de células.

Se preparó una solución madre de tinte BTC-AM 2 mM (Molecular Probes, Eugene, OR) en DMSO al 100% y luego se añadió 1:1 a ácido plurónico al 10% (p/v) en DMSO en el día del ensayo. Se diluyó luego el tinte en tampón EP externo para hERG (NaCl 140 mM, KCl 4,0 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,0 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3 y glucosa 10 mM; todos los componentes tampón se adquirieron en Sigma Chemical). Esta mezcla de tinte BTC (30 µl) se añadió a las células y se produjo una concentración de carga final de 2,5 µM. Se incubaron células a 21°C durante 45 minutos.

Se diluyeron compuestos de ensayo en DMSO 10 mM en 60 µl. Estos compuestos se diluyeron luego en serie a una relación de 1:2 en DMSO en columnas 1-10 y 11-20 de una placa de 384 pocillos. Se generaron placas listas para ensayo mediante estampación de 2,5 µl de la placa diluida en serie con DMSO, que se preparó en el Velocity 11 BioCel. Se crearon placas acuosas añadiendo 48 µl de tampón EP y luego se diluyeron durante 30 a 45 minutos antes de que se leyese el ensayo en el FLIPR. Después de la carga de tinte se añadieron compuestos diluidos en agua a las células de las placas por triplicado (10 µl) dando un intervalo de concentración de diez puntos de 80 µM a 0,156 nM. La concentración de DMSO final en el ensayo es 1%. Se prepararon las placas acuosas listas para el ensayo y se diluyeron en un manipulador de líquidos Cybio.

Se leyeron células cargadas con tinte en el FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que excita el tinte usando la línea de 488 nm de un láser de argón. Se filtró la emisión usando un filtro de paso de banda de 540 ± 30 nm. Se estimularon canales hERG para abrirse con la adición de 20 µl/pocillo de tampón EP que contiene K₂SO₄ 66 mM y Ti₂SO₄ 1,3 mM (Sigma/Aldrich). Para cada placa se registraron datos cada segundo durante un periodo de 12 segundos, en este tiempo se añadió el tampón de estímulo que contiene TI⁺. El registro de datos tuvo lugar cada segundo durante 48 segundos, y luego continuó cada tres segundos durante 2 minutos más.

Se determinó el intervalo dinámico del ensayo partiendo de pocillos *blancos* y *completos*. Los pocillos *completos* (columnas 21 y 22) definen la activación de hERG máxima para la placa (sin compuesto de ensayo presente), y los pocillos *blancos* (columnas 23 y 24) definen la inhibición de hERG al 100%. Los pocillos *blancos* contienen 400 nM de los inhibidores de hERG convencionales dofetilida (Ficker y col, 1998) o bien E-4031. Se corrigieron en primer lugar puntos de datos brutos en cada pocillo de muestra en variación de célula/señal, fondo de control negativo (blancos), y se normalizaron con los controles positivos (completos) usando el software FLIPR en línea. Las curvas de respuesta a la concentración del compuesto de ensayo para los datos de flujo de Ti⁺ en hERG se ajustaron luego usando Excel Fit (ID Business Solutions Limited, Surrey, RU) con una ecuación logística de punto único, $Y = A + ((B-A)/1 + ((C/X)^D))$ donde A= inhibición máxima. Se analizaron los datos mediante ajuste de amplitudes máximas de cambio en fluorescencia para flujo de Ti⁺ para un estado dado del compuesto de ensayo. Se calcularon potencias (valores CI₅₀) de compuestos a partir de las medias de pocillos por triplicado.

Canal de sodio, ensayo de unión en sitio 2

Véase también: W. A. Catterall, y col. J. Biol. Chem. 1981, 256, 8922. El tampón de unión convencional contenía HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, cloruro de colina 130 mM, KCl 5,4 mM, MgCl₂ 0,8 mM, glucosa 5,5 mM, 40 µg/ml de LqT. Se iniciaron reacciones de unión mediante adición de sinaptosomas (preparados a partir de cerebro de rata Wistar) a la mezcla de reacción que contiene [³H]-batracotoxina 5 nM en un tampón de unión convencional y el compuesto que se va a ensayar en la concentración deseable. Se mezclaron luego muestras y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Se detuvieron las reacciones mediante adición de tampón de lavado enfriado con hielo que contiene HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,8 mM y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. Los sinaptosomas se recogieron inmediatamente en filtros de fibra de vidrio y se lavaron 3 veces con tampones de lavado. Se recontó la radioactividad de [³H]-batracotoxina que queda en los filtro usando espectrómetros de centelleo en líquido.

Ensayo paralelo artificial de la membrana permeable (PAMPA)

El ensayo paralelo artificial de la membrana permeable (PAMPA) consiste en una combinación de lípido basado en lecitina formulado especialmente designado como el lípido del tracto gastrointestinal (GIT). El lípido GIT se usa para formar una membrana en un ensamblaje de placa sándwich similar al usado en los ensayos Caco-2. El lípido GIT recuerda estrechamente a la composición de membrana *in vivo* y se comprueba el funcionamiento con compuestos patrón que son conocidos por absorberse pasivamente en humanos. El ensayo PAMPA se usa ampliamente como un modelo *in vitro* para seguimiento de la permeabilidad de compuestos descubiertos. La velocidad de paso de los compuestos a través de la membrana PAMPA se usa para determinar un coeficiente de permeabilidad (Pc), que se puede relacionar con la permeabilidad pasiva *in vivo* del compuesto.

ES 2 346 100 T3

El coeficiente de permeabilidad (Pc) de un compuesto determinado se examina en unas condiciones dependientes del pH con pH apical y basolateral de 7,4. Todos los experimentos se llevan a cabo con determinaciones por triplicado.

5 Se diluyeron compuestos (soluciones madre de 10 mM en DMSO al 100%) a 1:100 en tampón para pocillo donador de pH 7,4 (cat. de pION n° 110151), proporcionando una solución de ensayo de 100 μM en DMSO al 1%. Se transfirió el compuesto diluido en tampón para pocillo donador a una placa Whatman Unifilter y se filtró antes de dispensar 200 μl al pocillo donador de la placa de ensayo (cat. de pION n° 110163). La membrana PAMPA se formó pipeteando 4 μl de la solución de lípido (cat. de pION n° 110169) sobre la placa del filtro (cat. de VWR n° 13503). Se cubrió luego la membrana con 200 μl de tampón para pocillo aceptor a pH 7,4 (cat. de pION n° 110139). Se combinó la placa de ensayo PAMPA (lado donador y lado aceptor) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 4 horas. Se desmontó luego la placa y se rellenaron placas de espectrofotómetro (cat. de VWR n° 655801) (150 μl/pocillo). Se leyeron el donador, aceptor, referencia, y placas de blanco en el lector de placa UV SpectraMax. Se capturaron los datos con el software pION, que analiza los espectros y genera valores de Pc.

15 *Quimiotaxis de CCR2*

Se llevó a cabo el ensayo de quimiotaxis de CCR2 humano con la línea celular monocítica humana, THP-1. Se marcaron en primer lugar células THP-1 con el tinte fluorescente Calcein-AM en fenol sin rojo, RPMI-1640 sin BSA (pH 7,4) a 37°C durante 30 minutos con mezcla suave cada 15 minutos. Se lavaron luego las células marcadas y se resuspendieron a 1x10⁵/ml en tampón de quimiotaxis (fenol RPMI-1640 sin rojo, BSA al 0,1%, pH 7,4). Se diluyó el compuesto de ensayo en tampón de quimiotaxis tal que la concentración de ensayo final variase de 0,01 nM a 1 μM. Se diluyó el ligando MCP-1 (PeproTech Inc.) hasta 20 nM en tampón de quimiotaxis. Para llevar a cabo el ensayo se mezcló un volumen igual de diluciones de compuesto de ensayo con un volumen igual de células THP-1 marcadas (mezcla 1), y se mezcló un volumen igual de diluciones de compuesto de ensayo con un volumen igual de ligando MCP-1 diluido (mezcla T). Se incubaron ambas mezclas independientemente a 37°C durante 10 minutos seguido de mezcla suave. Se midió luego la quimiotaxis inducida por MCP-1 en una placa de quimiotaxis (Becton Dickinson) disponiendo 50 μl de mezcla 1 en la cámara superior y 225 μl de mezcla 2 en la cámara inferior. Se cubrió la placa con una tapa y se incubó a 37°C durante 30 minutos. 30 minutos después se leyó la placa en un Cytofluor. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Para la determinación de la señal de ruido se dispusieron 50 μl de células THP-1 marcadas solas (5x10⁴/pocillo) en la cámara superior y 225 μl de ligando MCP-1 solo en la cámara inferior (concentración final de 10 nM). Se calculó la inhibición conseguida por concentraciones graduadas de compuesto de ensayo como un porcentaje del control de MCP-1 sin compuesto. La CI50 se define como la concentración del compuesto de ensayo requerida para conseguir 50% de inhibición de quimiotaxis celular.

35 *Pinzamiento zonal de hERG*

Se usó técnicas de pinzamiento zonal de célula completa para medir directamente las corrientes de hERG en células HEK-293 que expresan de forma estable la subunidad α del canal de potasio del hERG clonado. Se ensayó el compuesto en un tampón acuoso con pH 7,4 a temperatura ambiente. Se aplicaron pulsos de ensayo repetitivos (0,05 Hz) a partir de un potencial de -80 mV a +20 mV durante 2 segundos y se educieron corrientes residuales tras los pulsos de ensayo por escalonamiento del voltaje en -65 mV. Se calcularon los efectos del compuesto midiendo la inhibición de corriente residual del pico.

45 *Pinzamiento zonal del canal de sodio*

Se usó técnicas de pinzamiento zonal de célula completa para medir directamente corrientes de sodio internas en células HEK-293 que expresan el canal de sodio cardiaco humano, SCN5A. Se ensayó el compuesto en un tampón acuoso sin proteína. Para la determinación de la inhibición del estado estacionario se enducieron corrientes de sodio cada 5 segundos usando el protocolo de voltaje siguiente: se mantuvieron las células a un potencial de -90 mV y se escalonaron a -20 mV durante 60 ms. Se calcularon los efectos midiendo la inhibición de corriente de pico durante el pulso de ensayo a -20 mV. Se evaluó la tasa de dependencia de inhibición mediante estimulación a frecuencias de 1 Hz y 4 Hz.

55 *Parámetros farmacocinéticos de dosis única en ratas*

Se usaron ratas Sprague-Dawley macho (250-300 g) para los estudios farmacocinéticos. Se mantuvieron las ratas en ayunas durante la noche antes de la dosificación PO y se alimentaron 4 horas tras la dosis. Se recogieron muestras de sangre (~0,3 ml) de la vena yugular en tubos que contienen K₂EDTA y luego se centrifugaron a 4°C (1500-2000xg) para obtener plasma. En un estudio de biodisponibilidad oral 2 grupos de animales (N= 2 a 3 por grupo) recibieron el compuesto de ensayo bien como infusión intravenosa (IV) (durante 10 minutos) por la vena yugular o bien por toma por vía oral. Se obtuvieron muestras de sangre en serie a 0,17 (sólo para IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h tras la dosis. Se conservaron muestras de plasma obtenidas por centrifugación a 4°C (1500-2000xg), a -20°C hasta el análisis por CL/EM/EM.

65 *Parámetros farmacocinéticos de dosis única en monos*

Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de diversos compuestos de ensayo en monos Cynomolgus macho en un diseño cruzado. Se mantuvieron los monos en ayunas durante la noche antes de la dosificación PO y se alimentaron

ES 2 346 100 T3

4 h tras la dosis. Un grupo de 1 a 3 animales (de 3 a 5 kg) recibió el compuesto por infusión IV (durante 10 minutos) por una vena femoral y por toma por vía oral, con una eliminación de 1 semana entre tratamientos. Se recogieron muestras de sangre en serie (~0,3 ml) desde una arteria femoral a 0,17 (sólo IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h tras la dosis, y se centrifugó a 4°C (1500-2000xg) para obtener plasma. Se conservaron las muestras a -20°C hasta el análisis por CL/EM/EM.

Análisis de datos para ensayos farmacocinéticos

Se obtuvieron parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimentales de concentración en plasma vs datos de tiempo (software KINETICA™, versión 4.2, InnaPhase Corporation, Philadelphia, PA). Se registraron la concentración de pico (C_{max}) y el tiempo para C_{max} directamente de observaciones experimentales. Se calculó el área bajo la curva desde tiempo cero al último tiempo de muestreo (AUC(0-T)) usando una combinación de sumas lineales y trapezoidales logarítmicas. Se estimaron tras administración por vía IV el aclaramiento en plasma total (CL_{Tp}), volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}), semi-vida de eliminación aparente (T_{1/2}) y tiempo de residencia medio (MRT). Las estimaciones de T_{1/2} se realizaron usando un mínimo de 3 puntos de tiempo con concentraciones cuantificables. Se estimó la biodisponibilidad oral absoluta (F) como la relación de dosis-valores de AUC normalizados tras dosis por vía oral e IV.

Unión de THP-1

Se estableció también el ensayo de unión a CCR2 humano con la línea celular leucémica monocítica humana THP-1, que expresa CCR2 endógeno, usando ¹²⁵I-MCP-1 humano como el ligando trazador. Se usaron ensayos de unión por competición de radioligando para la valoración de la afinidad de unión de los compuestos de ensayo al receptor CCR2. Para los estudios de competición del radioligando se añadieron 100 μl que contienen 2,5 x 10⁵ células THP-1/pocillo (en tampón de ensayo que contiene HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM y BSA al 0,5%) a placas de ensayo de 96 pocillos que contienen el compuesto de ensayo en dilución de 3 veces en serie, con concentraciones finales que varían de 5 μM a 100 pM. Subsiguientemente se añadieron a la reacción 50 μl de radioligando ¹²⁵I-NICP-1 a una concentración final de 0,2 nM en tampón de ensayo. Después de un periodo de incubación de 90 minutos a temperatura ambiente se finalizó la reacción de unión cosechando en placas de filtro GF/B (PerkinElmer n° cat. 6005177) seguido de lavado con tampón de lavado enfriado con hielo (HEPES 50 mM, pH 7,4, BSA al 0,1%, NaCl 0,5 M) para eliminar el ligando no unido. Después de lavar se secó la placa durante 45 minutos a 60°C seguido de la adición de 40 μl de fluido de centelleo MicroScint 20, se selló y analizó con el lector TopCount de Packard. Se determinó la unión no específica en presencia de 10 μM (un exceso molar de 5000 veces) de un antagonista de molécula pequeña de CCR2 in-house (ejemplo 2k, documento WO2005021500; CCR2 CI₅₀ = 2 nM). Se calculó la unión específica de ¹²⁵I-MCP-1 como la diferencia entre la unión total y no específica. Se representaron los datos de competición como una inhibición en porcentaje de unión específica del radioligando en ausencia de compuesto de ensayo (porcentaje de señal total). Después de la corrección de la unión no específica se determinaron los valores CI₅₀. La CI₅₀ se define como la concentración de compuesto de ensayo requerida para reducir la unión específica ¹²⁵I-MCP-1 en 50% y se calculó usando la ecuación logística de cuatro parámetros para ajustar los datos normalizados.

A continuación se dan datos para cada compuesto medido en los ensayos descritos anteriormente.

TABLA 1

Datos comparativos in vitro

Compuesto	Unión a CCR2 CI ₅₀	FLUJO EN HERG (nM) CI ₅₀ (nM)	Unión al canal de Na ⁺ (% de inhibición)	Permeabilidad PAMPA (nm/segundo)
Ejemplo 12as Documento WO2005021500	0,27 (1)	2,8	No disponible	No disponible
Ejemplo 12aj Documento WO2005021500	0,43 + 0,06 (2)	0,77	No disponible	No disponible
Ejemplo 2k	0,88 ± 0,60 (23)	51.000	97%, 10.000 nM	529 ± 157 (9)

ES 2 346 100 T3

	Documento WO2005021500				
5	Ejemplo 12bd Documento WO2005021500	$1,15 \pm 0,07$ (2)	> 80.000	54%, 10.000 nM	392
10	Ejemplo 8a Documento WO2005021500	$1,83 \pm 0,80$ (12)	> 80.000	3%, 10.000 nM 33%, 30.000 nM	94 ± 58 (19)
15	Ejemplo 8e Documento WO2005021500	$2,20 \pm 0,03$ (2)	> 80.000	-6%, 10.000 nM	2 ± 2 (2)
20	Ejemplo 9c Documento WO2005021500	$0,96 \pm 0,26$ (19)	> 80.000	48%, 10.000 nM 75%, 30.000 nM	145 ± 71 (8)
25	Ejemplo 1, presente invención	$3,34 \pm 0,32$ (3)	> 80.000	12%, 10.000 nM 6%, 30.000 nM	187
30	Ejemplo 3, presente invención	$4,47 \pm 58$ (3)	> 80.000	17%, 10.000 nM 42%, 30.000 nM	235 ± 68 (5)
35	Ejemplo 7, presente invención	$1,72 \pm 0,54$ (7)	> 80.000	22%, 10.000 nM 44%, 30.000 nM	326 ± 221 (2)
40	Ejemplo 8, presente invención	$3,58 \pm 0,78$ (3)	> 80.000	14%, 10.000 nM 19%, 30.000 nM	557
45	Ejemplo 9, presente invención	$1,69 \pm 0,67$ (3)	> 80.000	13%, 10.000 nM 48%, 30.000 nM	266
50	Ejemplo 10, presente invención	$5,18 \pm 1,98$ (6)	> 80.000	48%, 10.000 nM 18%, 30.000 nM 45%, 30.000 nM	228
55	Ejemplo 11, presente invención	$1,91 \pm 0,52$ (3)	> 80.000	14%, 10.000 nM 34%, 30.000 nM	350
60	Ejemplo 12, presente invención	$449 \pm 1,35$ (3)	> 80.000	18%, 10.000 nM 36%, 30.000 nM	239
	Ejemplo 13, presente invención	$4,02 \pm 1,31$ (3)	> 80.000	5%, 10.000 nM 21%, 30.000 nM	54 ± 63 (2)
	Ejemplo 15, presente invención	$3,34 \pm 0,71$ (4)	> 80.000	-5%, 10.000 nM 5%, 30.000 nM	186

65

ES 2 346 100 T3

TABLA 2a

Datos comparativos adicionales in vitro

Compuesto	Quimiotaxis de CCR2 CI ₅₀ (nM)	Pinzamiento local de hERG (% de inhibición)	Pinzamiento local del canal de Na ⁺ (% de inhibición)
Ejemplo 2k, documento WO200550215	0,24 ± 0,16 (12)	83%, 10.000 M	52%, 10.000 nM 90%, 30.000 nM
Ejemplo 8a, documento WO200550215	2,63 ± 1,24 (4)	4%, 10.000	22%, 10.000 nM 49%, 30.000 nM
Ejemplo 9c, documento WO2005021500	0,21	4%, 10.000 nM	19%, 10.000 nM 39%, 30.000 nM
Ejemplo 1, presente invención	3,85 ± 0,36 (2)	8%, 10.000 nM 17%, 30.000 nM	13%, 30.000 nM
Ejemplo 3, presente invención	2,20 ± 1,59 (5)	6%, 10.000 nM 24%, 30.000 nM	3%, 30.000 nM
Ejemplo, presente invención	7, 2,85	12%, 10.000 nM 29%, 30.000 nM	10%, 30.000 nM
Ejemplo 8, presente invención	4,09 ± 1,21 (4)	18%, 10.000 nM 37%, 30.000 nM	11%, 30.000 nM
Ejemplo 9, presente invención	0,35	26%, 10.000 nM 41%, 30.000 nM	6%, 30.000 nM
Ejemplo 10, presente invención	1,6 ± 0,42 (4)	33%, 30.000 nM	35%, 30.000 nM
Ejemplo 11, presente invención	0,92	15%, 30.000 nM	No disponible
Ejemplo 12, presente invención	0,88	6%, 10.000 nM 7%, 30.000 nM	No disponible
Ejemplo 13, presente invención	0,49	10%, 30.000 nM	No disponible
Ejemplo 15, presente invención	0,9 ± 0,67 (6)	29%, 10.000 nM 47%, 100.000 nM	No disponible

ES 2 346 100 T3

TABLA 2b

Datos farmacocinéticos comparativos In Vivo en rata

Compuesto	Dosis IV/PO (mg/kg)	Cl (ml/min/kg)	%F	AUC oral (nM*h)
Ejemplo 2k, documento WO20050215	25/25	40	68	9294
Ejemplo 8a, documento WO2005021500	6/72	42	1,4	690
Ejemplo 9c, documento WO20050215	4/43	54	14	1855
Ejemplo 1, presente invención	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 3, presente invención	2/10	31	88	10068
Ejemplo 7, presente invención	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 8, presente invención	8,6 (PO)	No disponible	No disponible	7281
Ejemplo 9, presente invención	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 10, presente invención	1,6/9,3	45	57	4227
Ejemplo 11, presente invención	2/10	56	52	3043
Ejemplo 12, presente invención	2/10	59	91	5228
Ejemplo 13, presente invención	2/10	26	88	10522
Ejemplo 15, presente invención	2,7/11	23	93	16221

TABLA 2c

Datos farmacocinéticos comparativos In Vivo en mono

Compuesto	Dosis IV/PO (mg/kg)	Cl (ml/min/kg)	%F	AUC oral (nM*h)
Ejemplo 2k, documento WO2005021500	1 / 1,4	25	46	862
Ejemplo 8a, documento WO2005021500	1/11	14	9,4	1896
Ejemplo 9c, documento WO2005021500	1/10	12	26	6763
Ejemplo 1, presente invención	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 3, presente invención	1/1 1	15	91	2051
Ejemplo 7, presente invención	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 8, presente invención	8,6 (PO)	No disponible	No disponible	558
Ejemplo 9, presente invención	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 10, presente invención	1/1	21	67	1085
Ejemplo 11, presente invención	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 12, presente invención	1 (PO)	No disponible	No disponible	413
Ejemplo 13, presente invención	1,7 (PO)	No disponible	No disponible	263
Ejemplo 15, presente invención	0,9/1,5	28	19	333

Compuesto	Unión de PBMC CI_{50} (nM)	Unión de THP-1 CI_{50} (nM)
Ejemplo 2, presente invención	15,0 ± 7,3 (6)	27 (1)
Ejemplo 4, presente invención	3,46 ± 1,10 (5)	4,22 ± 1,22 (4)
Ejemplo 5, presente invención	27,5 ± 1,4 (2)	21,3 (1)
Ejemplo 6, presente invención	No disponible	139,1 (1)
Ejemplo 14, presente invención	14,9 ± 5,2 (2)	19,9 (1)

Utilidad

Los compuestos representativos de los ejemplos muestran que son moduladores de actividad del receptor de quimioquina usando ensayos conocidos por los especialistas en la técnica. En esta sección los inventores describen tales ensayos y se da su referencia bibliográfica. Se describen más ensayos en esta invención en la sección titulada "Características farmacológicas comparativas", véase anteriormente. Mostrando esta actividad en estos ensayos de antagonismo de MCP-1, se espera que los compuestos de los ejemplos sean útiles en el tratamiento de enfermedades humanas asociadas con quimioquinas y sus receptores afines. La definición de actividad en estos ensayos es un compuesto que muestra una CI_{50} de 30 μ M o inferior en concentración cuando se mide en un ensayo determinado.

Antagonismo de unión de MCP-1 a PBMC humanas

(Yoshimura y col., *J. Immunol.* **1990**, 145, 292)

Al menos uno de los compuestos descritos en los ejemplos presentan actividad en el antagonismo de unión de MCP-1 a PBMC humanas (células mononucleares de sangre periférica humana) descrito anteriormente.

Se tratan placas de filtro Millipore (#MABVN 1250) con 100 μ l de tampón de unión (albúmina de suero bovino al 0,5%, tampón HEPES 20 mM y cloruro de magnesio 5 mM en medio RPMI 1640) durante treinta minutos a temperatura ambiente. Para medir la unión se combina 50 μ l de tampón de unión, con o sin un compuesto de concentración conocida con 50 μ l de MCP-1 humana marcada con ^{125}I (dando una concentración final de 150 pM de radioligando) y 50 μ l de tampón de unión que contiene 5×10^5 células. Las células usadas para tales ensayos de unión pueden incluir células mononucleares de sangre periférica humana aisladas mediante centrifugación con gradiente de Ficoll-Hypaque, monocitos humanos (Weiner y col., *J. Immunol. Methods.* 1980, 36, 89), o la línea celular THP-1 que expresa el receptor endógeno. La mezcla de compuesto, células y radioligando se incubaba a temperatura ambiente durante treinta minutos. Se disponen placas a vacío, y se lavan las placas tres veces con tampón de unión que contiene NaCl 0,5 M. Se retira la camisa de plástico de la placa, la placa se deja secar al aire, los pocillos se marcan y se somete a recuento. El porcentaje de inhibición de unión se calcula usando los recuentos totales obtenidos en ausencia de cualquier compuesto competitivo y la unión previa se determinó con adición de MCP-1 100 nM en lugar del compuesto de ensayo.

Antagonismo de influjo de calcio inducido por MCP-1

(Sullivan y col., *Methods Mol. Biol.* **1999**, 114, 125-133)

Al menos algunos compuestos descritos en los ejemplos presentan actividad en el antagonismo de ensayo de influjo de calcio inducido por MCP-1 descrito en el presente documento.

Se mide la movilización del calcio usando el tinte indicador de Ca^{2+} fluorescente, Fluo-3. Se incuban células a 8×10^5 células/ml en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,1%, tampón HEPES 20 mM, glucosa 5 mM, suero bovino fetal al 1%, Fluo-3 AM 4 μ M y probenecida 2,5 mM durante 60 minutos a 37°C. Células usadas para tales ensayos de calcio pueden incluir monocitos humanos aislados como se describe por parte de Weiner y col., *J. Immunol. Methods* 1990, 36, 89-97 o líneas celulares que expresan el receptor CCR2 endógeno tal como THP-1 y MonoMac-6. Se lavaron luego las células tres veces en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,1%, HEPES 20 mM, glucosa 5 mM y probenecida 2,5 mM. Se resuspendieron células en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,5%, HEPES 20 mM y probenecida 2,5 mM a una concentración final de $2-4 \times 10^6$ células/ml. Se dispusieron células en microplacas de pared oscura de 96 pocillos (100 μ l/pocillo) y se centrifugaron las placas a 200 x g durante 5 minutos. Se añadieron varias concentraciones de compuesto a los pocillos (50 μ l/pocillo) y después de 5 minutos, se añade 50 μ l/pocillo de MCP-1 dando una concentración final de 10 nM. Se detecta la movilización de calcio usando un lector de placa por imagen fluorescente. Se excita la monocapa celular con un láser de argón (488 nM) y se midió la fluorescencia asociada a las células durante 3 minutos, (cada segundo durante los primeros 90 segundos y cada 10 segundos durante los siguientes 90 segundos). Se generan datos como unidades de fluorescencia arbitrarias y se

ES 2 346 100 T3

determina el cambio en fluorescencia para cada pocillo como la diferencia máximo-mínimo. Se calcula la inhibición dependiente del compuesto respecto a la respuesta de MCP-1 sola.

Antagonismo de quimiotaxis de PBMC humanas inducida por MCP-1

(Bacon y col, *Brit. J. Pharmacol.* **1988**, 95, 966)

Al menos algunos compuestos descritos en los ejemplos presentan actividad en el antagonismo de ensayo de quimiotaxis de PBMC humanas inducida por MCP-1 descrito en esta invención.

Se calentó la cámara de quimiotaxis de 96 pocillos MBA96 de Neuroprobe, placa de 96 pocillos MPC de Poly-filtronics, y filtros de 8 micrómetros PFD5 de policarbonato sin polivinilpirrolidona de Neuroprobe en un incubador a 37°C. Se suspendieron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (Boyum y col., *Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl.* 1968, 97, 31) recién aisladas mediante un procedimiento de separación por densidad ficoll convencional, en DMEM a 1×10^7 c/ml y se calentaron a 37°C. Se calentó también una solución 60 nM de MCP-1 humano a 37°C. Se prepararon diluciones de compuestos de ensayo hasta 2 veces la concentración necesaria en DMEM. La suspensión de PBMC y la solución de MCP-1 60 nm se mezclaron 1:1 en tubos de polipropileno con DMEM precalentado con o sin una dilución de los compuestos de ensayo. Se calentaron estas mezclas en un calentador de tubo a 37°C. Para iniciar el ensayo se añadió la mezcla de MCP-1/compuesto en los pocillos de la placa de 96 pocillos de MPC de Polyfiltronics que se dispusieron en el fondo de la cámara de quimiotaxis de Neuroprobe. El volumen aproximado es de 400 μ l para cada pocillo y debería haber un menisco positivo tras la dispensación. El filtro de 8 micrómetros se dispuso suavemente en la parte superior de la placa de 96 pocillos, se aportó un relleno de caucho al fondo de la cámara superior y se ensambló la cámara. Se añadió una mezcla de suspensión celular/compuesto de 200 μ l de volumen a los pocillos apropiados de la cámara superior. Se cubrió la cámara superior con un sellador de placa, y se dispuso la unidad ensamblada en un incubador a 37°C durante 45 minutos. Tras la incubación se retiró el sellador de placa y se aspiró toda la suspensión celular restante. Se desensambló la cámara y se retiró suavemente el filtro. Mientras se mantuvo el filtro en un ángulo de 90 grados, se arrastraron por lavado las células no migradas usando una corriente suave de solución salina tamponada con fosfato y se enjuagó la parte superior del filtro con la punta de una rasqueta de caucho. Se repitió este lavado dos veces más. El filtro se secó al aire y luego se sumergió completamente en tinte Wright Geimsa durante 45 segundos. Se lavó luego el filtro mediante humedecido en agua destilada durante 7 minutos, y luego un lavado adicional de 15 segundos en agua destilada fresca. Se secó de nuevo el filtro al aire. Se cuantificaron las células migradas en el filtro mediante microscopía visual.

Los receptores de quimioquina de mamífero proporcionaron una diana para la interferencia con o promoción de función celular inmune en un mamífero, tal como un humano. Son particularmente útiles compuestos que inhiben o promueven función del receptor de quimioquina para la modulación de la función celular inmune para fines terapéuticos. De acuerdo con lo anterior la presente invención se refiere a compuestos que son útiles en la prevención y/o tratamiento de una amplia variedad de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunoregulatorias, incluyendo asma y enfermedades alérgicas, infección por microbios patógenos (que, por definición, incluyen virus), así como también patologías autoinmunes tales como la artritis reumatoide y aterosclerosis.

Por ejemplo, se puede administrar un compuesto presente que inhibe una o más funciones de un receptor de quimioquina de mamífero (por ejemplo, un receptor de quimioquina humano) para inhibir (es decir, reducir o prevenir) inflamación o enfermedad infecciosa. Como consecuencia se inhibe uno o más procesos inflamatorios, tales como migración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis (por ejemplo, de enzimas, histamina) o liberación de mediador inflamatorio.

De forma similar se administra un compuesto presente que promueve una o más funciones del receptor de quimioquina de mamífero (por ejemplo, una quimioquina humana) para estimular (inducir o potenciar) una respuesta inmune o inflamatoria, tal como migración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis (por ejemplo, de enzimas, histamina) o liberación de mediador inflamatorio, dando lugar a la estimulación beneficiosa de procesos inflamatorios. Por ejemplo, se pueden reducir eosinófilos para combatir infecciones parasitarias. Además se pueden contemplar también el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes anteriormente citadas para un compuesto presente que promueva una o más funciones del receptor de quimioquina de mamífero, si se contempla la liberación de suficiente compuesto para provocar la pérdida de la expresión del receptor en células a través de la inducción de internalización del receptor de quimioquina, o la liberación de compuesto de una forma que de lugar a errar la dirección de la migración de células.

Además de los primates, tales como seres humanos, se pueden tratar una variedad de otros mamíferos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, mamíferos, incluyendo pero sin limitarse a estos, vacas, oveja, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otros bovinos, ovinos, equinos, caninos, felinos, roedores o especies murinas. No obstante el procedimiento se puede llevar a cabo también en otras especies, tales como especies de aves. El sujeto tratado en los procedimientos anteriores es un mamífero, macho o hembra, en el que se desea la modulación de la actividad del receptor de quimioquina. "Modulación" tal como se usa en esta invención se pretende que comprenda antagonismo, agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

ES 2 346 100 T3

Ensayos de unión a CCR5 y funcionales

Derivación celular y cultivo celular

5 Se desarrollaron un grupo de células HT 1080 que expresan de forma estable receptor 5 de quimioquina CC endógena (CCR5) usando los procedimientos descritos por Harrington, Sherf, y Rundlett (véase patentes de Estados Unidos US 6.361.972 y US 6.410.266). Se aislaron clones de mayor expresión usando citometría de flujo repetitiva, seguido de subclonación. Se cultivaron luego estas células en platos de 6 pocillos a 3×10^5 células/pocillo y se transfectan con un vector de ADN que contiene la proteína G Gqi5 marcada con HA quimérica (tamices moleculares; se usó para la
10 transfección 5 microgramos de vector ADN linearizado en 15 microlitros de Ex-Gen de Fermentes). Dos días después de la transfección se combinaron los pocillos y se dispusieron en placas P100. Siete días después de la disposición en placas se recolectaron colonias, se expandieron y se analizó el contenido de Gqi5 mediante Western blot. Se seleccionó un clon (designado como 3559.1.6) que presenta gran expresión de Gqi5 (de transfección) y se seleccionó y de CCR5 (endógeno) y se usó para los experimentos descritos a continuación. Se cultivaron las células HT1080 (clon 3559.1.6)
15 con alfa-MEM suplementado con suero bovino fetal dializado al 10%, penicilina/estreptomicina/glutamina al 2%, y 500 microgramos/ml de higromicina B (concentración final) a 37°C con CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada.

Preparación de membrana

20 Se resuspendió un agregado celular que contiene 1×10^8 células HT1080 (clon 3559.1.6) en 5 ml de tampón Membrane Prep enfriado con hielo (HEPES 50 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM) y se homogenizó a alta velocidad en un homogenizador Polytron durante 20 segundos en hielo. Se diluyó el homogenato con otros 25 ml de tampón de Membrane Prep y se centrifugó durante 12 min ($48.000 \times g$ a 4°C). Se resuspendió el agregado celular en 5 ml de tampón de Membrane Prep antes de ser rehomogenizado como se describe previamente. Se diluyó el homogenato con
25 5 ml de tampón Membrane Prep y se ensayó la concentración de proteína CCR5.

Ensayo de unión

30 Se diluyó el homogenato recién preparado de la preparación de membrana descrita anteriormente en tampón de unión (HEPES 50 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, BSA al 0,1%; se añadió un comprimido de inhibidor de proteasa completo antes del ensayo) para alcanzar una concentración de proteína final de 10 microgramos/pocillo (placas de 96 pocillos blancas compactas de Corning, Inc.). Se mezcló esta preparación de membrana con esferas WGA-SPA (Amerhsam; pre-humedecidas en tampón de ensayo) dando una concentración de 200 microgramos/pocillo. Se añadió luego la mezcla de membrana/esferas SPA (100 microlitros/pocillo) a una placa que se había pre-dopado con 2 microlitros de DMSO que contiene diversas concentraciones de artículos de ensayo (DMSO puro para control negativo; diversas concentraciones de ejemplos de esta invención para artículos de ensayo; MIP-1 beta 500 nM como un control positivo). El ensayo de unión se inició mediante la adición de 50 microlitros de [¹²⁵I]-MIP-1 beta (Perkin Elmer; el material se diluyó en tampón de unión tal que la adición de 50 microlitros/pocillo da una concentración final de [¹²⁵I]-MIP-1 beta de 0,1 nM). Se selló la placa y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 - 6 h antes de recontarse
40 en un Packard TopCount. Se calculó el porcentaje de unión para el artículo de ensayo usando controles negativos y positivos para definir el intervalo para cada experimento.

Ensayo funcional basado en lector de placas de imágenes fluorométrico (FLIPR)

45 Se dispusieron en placas células HT1080 (clon 3559.1.6) a 10.000 células/pocillo (30 microlitros) en placas de 384 pocillos (Biocoat PDL de fondo negro/claro, Beckton Dickinson) y se cargaron con 30 microlitros/pocillo de tinte fluorescente Fluro-4 AM (preparado mediante disolución de 1 mg de Fluro-4 AM en 440 microlitros de DMSO y diluyendo con 100 microlitros de solución plurónica antes de diluir más con 10 ml de tampón de Hanks). Se incubaron las células a 37°C con CO₂ al 5% durante 30 minutos antes de lavarse tres veces y suspenderse en tampón de ensayo
50 (HEPES 20 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 5 mM, probenecida 2,5 mM, BSA al 0,5%, 1 x Hanks). Se diluyó en serie el artículo de ensayo en DMSO y luego se diluyó a 1:10 con tampón de ensayo antes de añadirse a las células (10 microlitros/pocillo). Se leyeron las placas usando FLIPR (10 - 70 segundos) en lo referente a inducción de flujo (es decir, actividad agonista). Se cargaron luego adicionalmente las células con solución agonista (30 microlitros/pocillo; preparada mediante dilución de 30 microlitros de MIP-1-beta 100 microMolar en 100 ml de tampón de ensayo; este protocolo da una concentración final de MIP-1 beta 5 nM en el ensayo) y se leyeron las placas usando FLIPR durante
55 un minuto. Se determina la actividad antagonista del artículo de ensayo respecto al control negativo de DMSO/tampón al 0,4%.

60 Al menos un compuesto de la descripción es un inhibidor tanto de CCR2 como de CCR5 y se pueden usar para tratar enfermedades asociadas con cualquier quimioquina. Estos compuestos de la presente invención se consideran antagonistas duales.

65 Enfermedades o afecciones de humanos u otras especies que se pueden tratar con inhibidores de función del receptor de quimioquina, incluyen, pero sin limitarse a estas: enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad, celulitis eosinofílica (por ejemplo, síndrome de Well), pneumonías eosinofílica (por ejemplo, síndrome de Loeffler, pneumonía eosinofílica crónica), fascitis eosinofílica (por ejemplo, síndrome de Shulman), hipersensibilidad de tipo retardado, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD) (por ejem-

plo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociada con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), síndrome de eosinofilia-mialgia debido a la ingestión de triptófano contaminado, alergias a picaduras de insectos; enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, artritis psoriática, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes de comienzo juvenil; glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet; rechazo a injerto (por ejemplo, en trasplante), incluyendo rechazo a aloinjerto o enfermedad de injerto-*versus*-huésped; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; escleroderma; psoriasis (incluyendo psoriasis mediada por células T) y dermatosis inflamatoria tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis por contacto alérgica, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y por hipersensibilidad); miositis eosinofílica, fascitis eosinofílica; cánceres con infiltración leucocítica de la piel u órganos. Otras enfermedades o afecciones en las que se pueden tratar respuestas inflamatorias indeseables que se deben inhibir son, incluyendo pero sin limitarse a estas, lesión por reperusión, aterosclerosis, ciertos cánceres hematológicos, toxicidad inducida por citoquinas (por ejemplo, choque séptico, choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis, enfermedades o afecciones infecciosas de humano u otras especies que se pueden tratar con inhibidores de función del receptor de quimioquina, incluyendo pero sin limitarse a estas, VIH.

Enfermedades o afecciones de humanos u otras especies que se pueden tratar con promotores de función del receptor de quimioquina, incluyen pero sin limitarse a estos: inmunosupresión, tal como la de individuos con síndromes de inmunodeficiencia tales como SIDA u otras infecciones virales, individuos que sufren terapia de radiación, quimioterapia, terapia de enfermedad autoinmune o terapia con fármaco (por ejemplo, terapia con corticosteroides), que provoca inmunosupresión; inmunosupresión debida a deficiencia congénita en función del receptor u otras causas; y enfermedades infecciosas, tales como enfermedades parasíticas, incluyendo pero si limitarse a estas: infecciones por helmintos, tales como nematodos (gusanos redondos); (*Trichuriasis*, *Enterobiasis*, *Ascariasis*, *Hookworm*, *Strongyloidiasis*, *Trichinosis*, *filariasis*); trematodos (flukes) (*Schistosomiasis*, *Clonorchiasis*), cestodos (gusanos planos) (*Echinococcus*, *Taeniasis saginata*, *Cysticercosis*); gusanos viscerales, larva migrans visceral (por ejemplo, *Toxocara*), gastroenteritis eosinofílica (por ejemplo, *Anisaki sp.*, *Phocanema sp.*), larva migrans cutánea (*Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*). Los compuestos de la presente invención son útiles de acuerdo con lo anterior en la prevención y tratamiento de una amplia variedad de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunoregulatorias.

Además, el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes anteriormente citadas se puede contemplar también para promotores de función de receptor de quimioquina si se contempla la liberación de suficiente compuesto para provocar la pérdida de expresión del receptor en células mediante la inducción de internalización del receptor de quimioquina o liberación de compuesto de una forma que de lugar a la pérdida de dirección de la migración de células.

En otro aspecto, la presente invención se puede usar para evaluar los agonistas o antagonistas específicos putativos de un receptor acoplado a proteína G. La presente invención se refiere al uso de estos compuestos en la preparación y ejecución de ensayos de seguimiento para compuestos que modulan la actividad de receptores de quimioquina. Además los compuestos de esta invención son útiles en el establecimiento o determinación del sitio de unión de otros compuestos en receptores de quimioquina, por ejemplo, mediante inhibición competitiva o como una referencia en un ensayo para comparar su actividad conocida para un compuesto con una actividad desconocida. Cuando se desarrollan nuevos ensayos o protocolos los compuestos de acuerdo con la presente invención se podrían usar para ensayar su efectividad. De forma específica tales compuestos se pueden proporcionar en un kit comercial, por ejemplo, para uso en investigación farmacéutica que implica las enfermedades anteriormente citadas. Los compuestos de la presente invención son también útiles para la evaluación de moduladores específicos putativos de los receptores de quimioquina. Además, se podría usar compuestos de esta invención para examinar la especificidad de receptores acoplados a proteína G que no se cree que sean receptores de quimioquina, bien que sirven como ejemplos de compuestos que no se unen o bien como variantes estructurales de compuesto activos en estos receptores que pueden ayudar a definir sitios específicos de interacción.

Los compuestos descritos en esta invención son útiles para tratar o prevenir trastornos seleccionados de artritis reumatoide, osteoartritis, choque séptico, aterosclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, choque hemodinámico, síndrome de sépsis, lesión por reperusión post-isquémica, malaria, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias del intestino, infección micobacteriana, meningitis, psoriasis, fallo cardiaco congestivo, enfermedades fibróticas, caquexia, rechazo a injerto, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias de la piel, esclerosis múltiple, daño por radiación, lesión alveolar hiperóxica, VIH, demencia por VIH, diabetes mellitus no dependiente de la insulina, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, fibrosis pulmonar idiopática, pemfigoide bulloso, infecciones parasitarias helmínticas, colitis alérgica, eccema, conjuntivitis, trasplante, eosinofilia familiar, celulitis eosinofílica, neumonía eosinofílica, fascitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, eosinofilia inducida por fármaco, fibrosis quística, síndrome de Churg-Strauss, linfoma, enfermedad de Hodgkin, carcinoma de colon, síndrome de Felty, sarcoidosis, uveitis, Alzheimer, glomerulonefritis y lupus eritematoso sistémico, carcinoma de células escamosas esofageales, dolor neuropático y obesidad.

En otro aspecto los compuestos son útiles para tratar o prevenir trastornos inflamatorios seleccionados de artritis reumatoides, osteoartritis, aterosclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias del intestino, psoriasis, fallo cardiaco congestivo, esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias de la piel.

ES 2 346 100 T3

En otro aspecto los compuestos se usan para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias seleccionadas de artritis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias del intestino y esclerosis múltiple.

5 En otro aspecto los ejemplos descritos en esta invención pueden ser útiles para el tratamiento de una variedad de cánceres, incluyendo pero sin limitarse a estos, los siguientes:

10 carcinoma incluyendo el de vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico); mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no
pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides, y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma distinto de Hodgkin, linfoma de células del cabello, linfoma histiocítico, y linfoma de Burkett;

15 tumores hematopoyéticos de linaje mielode que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplástico, leucemia mielode, y leucemia promielocítica;

20 tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y neurilemomas;

tumores de origen mesenquimal incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y

25 otros tumores que incluyen melanoma, xenodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

30 En otro aspecto se describen en esta invención procedimientos de tratamiento de cáncer, en los que el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata y melanoma. De forma adicional los compuestos descritos en esta invención pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer de ovarios y mieloma múltiple.

La presente invención proporciona procedimientos para el tratamiento de una variedad de enfermedades proliferativas no cancerosas.

35 Se ilustra terapia combinada para prevenir y tratar trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunoregulatorias, incluyendo asma y enfermedades alérgicas, así como también patologías autoinmunes tales como artritis reumatoide y aterosclerosis, y aquellas patologías indicadas anteriormente, con la combinación de los compuestos de esta invención y otros compuestos que son conocidos para tales finalidades. Por ejemplo, en el tratamiento o prevención de inflamación los presentes compuestos se pueden usar junto con un agente anti-inflamatorio o analgésico tal como un agonista opiáceo, un inhibidor de lipoxigenasa, un inhibidor de ciclooxigenasa-2, un inhibidor de interleuquina, tal como un inhibidor de interleuquina-1, un inhibidor de factor de necrosis tumoral, un antagonista de NMDA, un inhibidor de óxido nítrico o un inhibidor de la síntesis del óxido nítrico, un agente anti-inflamatorio no esteroideo, un inhibidor de fosfodiesterasa, o un agente anti-inflamatorio supresor de citoquinas, por ejemplo, con un compuesto tal como acetaminofeno, aspirina, codeína, fentanilo, ibuprofeno, indometacina, ceterolac, morfina, naproxeno, fenacetina, piroxicam, un analgésico esteroideo, sufentanilo, sunlindac, interferona alfa y similares. De forma similar, los presentes compuestos se pueden administrar con un aliviador del dolor; un potenciador tal como cafeína, un antagonista de H₂, simeticona, hidróxido de aluminio o de magnesio; un descongestionante tal como fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudofedrina, oximetazolina, efinefrina, nafazolina, xilometazolina, propilhexedrina, o levodesoxiefedrina; y antitusivos tales como codeína, hidrocodona, caramifeno, carbetapentano, o dextramorfano; un diurético; y una antihistamina sedante o no sedante. Igualmente se pueden usar compuestos descritos en esta invención en combinación con otros fármacos que se usan en el tratamiento/prevención/supresión o mejora de las enfermedades o afecciones para las que son útiles el compuesto de la presente invención. Se pueden administrar otros fármacos de este tipo por una ruta y en una cantidad habitualmente usada para los mismos, simultánea o secuencialmente con un compuesto de la presente invención. Cuando se usa un compuesto simultáneamente con uno o más de otros fármacos se puede usar una composición farmacéutica que contiene otros fármacos además del compuesto de la presente invención. De acuerdo con lo anterior, las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas que contienen también uno o más principios activos, además de un compuesto de la presente descripción.

60 Ejemplos de otros principios activos que se pueden combinar con un compuesto de la presente invención, bien administrados por separado o bien en las mismas composiciones farmacéuticas, incluyen, pero sin limitarse a estos: (a) antagonistas de integrina tales como los descritos para selectinas, ICAM y VLA-4; (b) esteroides tales como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona, e hidrocortisona; (c) inmunosupresores tales como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina y otros inmunosupresores de tipo FK-506; (d) antihistamínicos (antagonistas de H₁-histamina) tales como bromofeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, triprolidina, clemastina, difenhidramina, difenilpiralina, tripeleminamina, hidroxizina, metdilazina, prometazina, trimeprazina, azatadina, ciproheptadina, antazolina, feniramina pirilamina, astemizol, terfenadina, loratadina, cetirizina, fexofenadina, descarboetxiloratadina, y similares; (e) anti-histamínicos no esteroideos tales como agonistas b₂ (terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetarina, albuteral, bitolterol, y pirbuterol), teofilina, cromolina sódica, atropina, bromuro de

ES 2 346 100 T3

ipratropio, antagonistas de leucotrieno (zafirlukast, montelukast, pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-102,203), inhibidores de la biosíntesis de leucotrieno (zileuton, BAY-1005); (f) agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) tales como derivados de ácido propiónico (alminoprofeno, benxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, cetoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, 5 pirprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico, y tioxaprofeno), derivados de ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenac, clidanac, diclofenac, fenclofenac, ácido fenclózico, fentiazac, furofenac, ibufenac, isoxepac, oxpinac, sulindac, tiopinac, tolmetina, zidometacina, y zomepirac), derivados de ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflímico y ácido tolfenámico), derivados de ácido bifencilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicán), salicilatos (ácido acetilsalicílico, 10 sulfasalazina) y las pirazolonas (apazona, bezpiperilón, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona); (g) inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2); (h) inhibidores de fosfodiesterasa de tipo IV (PDE-IV); (i) otros antagonistas de los receptores de quimioquina; (j) agentes que reducen el colesterol tales como inhibidores de HMG-COA reductasa (lovastatina, simvastatina y pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, y otras estatinas), secuestrantes (colestiramina y colestipol), ácido nicotínico, derivados de ácido fenofíbrico (gemfibrozilo, clofibrato, fenofibrato y benzafibrato), 15 y probucol; (k) agentes anti-diabéticos tales como insulina, sulfonilureas, biguanidas (metformina), inhibidores de α -glucosidasa (acarbose) y glitazonas (troglitazona y pioglitazona); (l) preparaciones de interferonas (interferona alfa-2a, interferona-2B, interferona alfa-N3, interferona beta-1a, interferona beta-1b, interferona gamma-1b); (m) compuestos antivirales tales como efavirenz, nevirapina, indinavir, ganciclovir, lamivudina, famciclovir, y zalcitabina; (o) otros compuestos tales como ácido 5-aminosalicílico y profármacos de los mismos, antimetabolitos tales como aza- 20 tioprina y 6-mercaptopurina, y agentes quimioterapéuticos citotóxicos para cáncer. La relación en peso del compuesto de la presente invención respecto al segundo ingrediente activo puede variar y dependerá de las dosis efectivas de cada ingrediente.

Por lo general se usará una dosis efectiva de cada uno. Así pues, por ejemplo, cuando se combina un compuesto 25 con un NSAID la relación en peso del compuesto de la presente invención al NSAID variará en general de aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 1:1000, o de forma alternativa de aproximadamente 200:1 a aproximadamente 1:200. También se encontrarán en general dentro del intervalo anteriormente citado combinaciones de un compuesto de la presente invención y otros ingredientes activos, pero en tal caso se debería usar una dosis efectiva de cada ingrediente activo.

En el tratamiento de cáncer es frecuentemente ventajosa una combinación de agentes quimioterapéuticos y/o otros 30 tratamientos (por ejemplo, terapia por radiación). El segundo (o tercer) agente puede presentar el mismo o diferente mecanismo de acción que el agente terapéutico principal. Puede ser especialmente útil usar combinaciones de fármaco citotóxico en las que los dos o más fármacos se administran de diferentes formas o en diferente fase del ciclo celular, 35 y/o cuando los dos o más fármacos tienen toxicidades o efectos secundarios que se solapan, y/o cuando los fármacos que se combinan presenta cada uno una eficacia demostrada en el tratamiento del estado de enfermedad particular manifestado por el paciente.

De acuerdo con lo anterior, los compuestos descritos en esta invención (u otras fórmulas descritas en la misma) se 40 pueden administrar en combinación con otros agentes anticáncer y citotóxicos y tratamientos útiles en el tratamiento de cáncer u otras enfermedades proliferativas. La invención de este documento comprende además el uso de los compuestos del mismo (u otras fórmulas descritas en el mismo), la preparación de medicamentos para el tratamiento de cáncer y/o comprende el envasado de los compuestos de esta invención junto con instrucciones de que los compuestos se han de usar en combinación con otros agentes anti-cáncer o citotóxicos y tratamientos para el tratamiento de cáncer. 45 La presente invención comprende además combinaciones de los compuestos de uno o más agentes adicionales en forma de kit, por ejemplo, cuando se envasan conjuntamente o se disponen en envases separados para ser comercializados juntos como un kit, o cuando se envasan para ser formulados conjuntamente.

El segundo (o más) agentes anti-cáncer se puede(n) seleccionar de uno cualquiera o más de los siguientes:

50 agentes alquilantes (incluyendo mostazas del nitrógeno, alquilsulfonatos, nitrosoureas, derivados de etileniminas y triazenos); anti-angiogénicos (incluyendo inhibidores de metaloproteína de matriz); antimetabolitos (incluyendo inhibidores de adenosindeaminasa, antagonistas de ácido fólico, análogos de purina y análogos de pirimidina); antibióticos o anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos de CTLA-4, antraciclina); inhibidores de aromatasas;

55 modificadores de respuesta del ciclo celular; enzimas; inhibidores de farnesil-proteíntransferasa; agentes hormonales y antihormonales y esteroides (incluyendo análogos sintéticos, glucocorticoides, estrógenos/anti-estrógenos [por ejemplo, SERM], andrógenos/anti-andrógenos, progestinas, agonistas del receptor de progesterona, y agonistas y antagonistas de liberación de la hormona luteinizante [LHRH]); factor de crecimiento de tipo insulina (IGF)/moduladores del sistema del receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR) (incluyendo inhibidores de IGFR); inhibidores de señalización de integrina; inhibidores de quinasa (incluyendo inhibidores de multi-quinasa y/o inhibidores de Src quinasa o Src/abl, inhibidores de quinasa dependiente de ciclina [CDK], anticuerpos de panHer, Her-1 y Her-2, inhibidores de VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF, 65 inhibidores de EGFR, inhibidores de proteína de mitógeno activado [MAP], inhibidores de MEK, inhibidores de Aurora quinasa, inhibidores de PDGF, y otros inhibidores de tirosinquinasa o inhibidores de serina/treoninaquinasa);

ES 2 346 100 T3

agentes disruptores de microtúbulos, tales como ecteinascidinas o sus análogos y derivados; agentes estabilizantes de microtúbulos tales como taxanos, y las epotilonas de origen natural y sus análogos sintéticos y semisintéticos;

5 agentes desestabilizantes de unión a microtúbulos (incluyendo alcaloides de la vinca); e

inhibidores de topoisomerasa; inhibidores de prenil-proteintransferasa; complejos de coordinación de platino; inhibidores de transducción de señal; y otros agentes usados como agentes anticáncer y citotóxicos tales como modificadores de la respuesta biológica, factores de crecimiento y moduladores autoinmunes.

10

De forma adicional los compuestos de la presente invención se pueden formular o coadministrar con otros agentes terapéuticos que se seleccionan para su utilidad particular en el direccionamiento de efectos secundarios asociados con las afecciones anteriormente citadas. Por ejemplo, se pueden formular compuestos de la invención con agentes para prevenir náuseas, hipersensibilidad e irritación gástrica, tales como antieméticos y antihistamínicos H₁ y H₂. Los otros agentes terapéuticos anteriores, cuando se usan en combinación con los compuestos de la presente invención, se pueden usar, por ejemplo, en las cantidades indicadas en Physicians' Desk Reference (PDR) o como se determine de otro modo por un especialista en la técnica.

15

Los compuestos se administran a un mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad de un compuesto de la presente descripción que, cuando se administran solos o en combinación con un agente terapéutico adicional a un mamífero, es efectivo para prevenir o mejorar el estado de enfermedad o la progresión de la enfermedad.

20

Dosificación y formulación

25

Los compuestos de esta descripción se pueden administrar en formas de dosificación orales tales como comprimidos, cápsulas (cada una de ellas incluye formulaciones de liberación sostenida o liberación temporizada), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Estas se pueden administrar también en forma intravenosa (bolo o infusión), intraperitoneal, subcutáneo o intramuscular, todas usan formas de dosificación bien conocidas por lo especialistas en las técnicas farmacéuticas. Estas se pueden administrar solas, pero en general se administrarán con un vehículo farmacéutico seleccionado en base a la ruta elegida de administración y práctica farmacéutica convencional.

30

El régimen de dosificación para los compuestos de la presente invención variará, por supuesto, en función de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y ruta de administración; la especie, edad, sexo, salud, estado médico, y peso del receptor; la naturaleza y extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; la ruta de administración, la función renal y hepática del paciente, y el efecto deseado. Un facultativo o veterinario puede determinar y prescribir la cantidad efectiva del fármaco requerido para prevenir, controlar o contrarrestar el progreso del trastorno.

35

A modo de directriz general la dosificación oral diaria de cada principio activo, cuando se usa para los efectos indicados, variará entre aproximadamente 0,001 y 1000 mg/kg de peso corporal, o entre aproximadamente 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal por día, o de forma alternativa, entre aproximadamente 1,0 y 20 mg/kg/día. Por vía intravenosa, las dosis variarán entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/kg/minuto durante una infusión a velocidad constante. Los compuestos de esta invención se pueden administrar en una dosis diaria única, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. En una realización la dosificación oral diaria del ingrediente activo se encuentra entre 3 y 600 mg ya sea administrado una vez al día o en dosis divididas administradas dos veces al día. De forma alternativa el ingrediente activo se puede administrar en dosis de 10 a 20 mg administradas dos veces al día o de 40 a 100 mg administradas una vez al día. De forma alternativa el ingrediente activo se puede administrar en una dosis de 12,5 mg dos veces al día o de 75 mg una vez al día. De forma alternativa el ingrediente activo se puede administrar en dosis de 3, 10, 30, 100, 300, y 600 mg administrado una o dos veces al día.

40

Se pueden administrar los compuestos de esta invención en forma intranasal mediante uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o mediante rutas transdérmicas, usando parches para piel transdérmicos. Cuando se administran en la forma de un sistema de liberación transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua más que intermitente en todo el régimen de dosificación.

45

Los compuestos se administran de forma típica en mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (denominados de forma colectiva en esta invención como vehículos farmacéuticos) seleccionados de forma adecuada respecto a la forma pretendida de administración, esto es, comprimidos, cápsulas, elixires, jarabes y similares para vía oral, y de forma coherente con prácticas farmacéuticas convencionales.

50

Por ejemplo, para administración por vía oral en la forma de un comprimido o cápsula, el componente fármaco activo se puede combinar con un vehículo oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, inerte tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares; para administración por vía oral en forma líquida, los componentes del fármaco oral se pueden combinar con cualquier vehículo inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua, y similares. Además, cuando se desea o es necesario, se pueden incorporar también en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agen-

55

ES 2 346 100 T3

tes disgregantes y colorantes adecuados. Aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes del maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantano y similares.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar también en la forma de sistemas de liberación de liposoma, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

También se pueden acoplar compuestos de la presente invención con polímeros solubles como vehículos de fármaco que se pueden dirigir. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspirtamidafenol, o poli(óxido de etileno)-polilisina substituida con residuos palmitoílo. Además los compuestos de la presente invención se pueden acoplar con una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico), poliepsilon caprolactona, poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacilatos, y copolímeros de bloques reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Formas de dosificación (composiciones farmacéuticas) adecuadas para administración pueden contener de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 100 miligramos de ingrediente activo por unidad de dosificación. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo estará presente de forma ordinaria en una cantidad de aproximadamente 0,5% a 95% en peso basado en el peso total de la composición.

Las cápsulas de gelatina pueden contener el ingrediente activo y vehículos en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, y similares. Se pueden usar diluyentes similares para preparar comprimidos prensados. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación sostenida para proporcionar liberación continua de medicación durante un periodo de horas. Los comprimidos prensados pueden estar recubiertos con azúcar o recubiertos con película para enmascarar el sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o disgregación entérica recubierta o selectiva en el tracto gastrointestinal.

Formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y aromatizantes para aumentar la aceptación por parte del paciente.

Por lo general agua, un aceite adecuado, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y soluciones de azúcar y glicoles relacionadas tales como propilenglicol o polietilenglicoles son vehículos adecuados para soluciones parenterales. Soluciones para administración parenteral pueden contener una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizantes adecuados, y en caso necesario sustancias tampón. Son adecuados agentes antioxidantes tales como bisulfito de sodio, sulfito de sodio o ácido ascórbico, bien solos o combinados. También se usan ácido cítrico y sus sales y EDTA sódico. Además soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil- o propil-parabeno, y clorobutanol.

Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en Remington 's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia convencional en este campo.

Se puede ilustrar como sigue formas de dosificación farmacéuticas útiles representativas para administración de los compuestos de esta invención:

Cápsulas

Se puede preparar un gran número de cápsulas unidad mediante llenado de cápsulas de gelatina dura de dos piezas convencionales cada una con 100 miligramos de ingrediente activo en polvo, 150 miligramos de lactosa, 50 miligramos de celulosa, y 6 miligramos de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda

Se puede preparar una mezcla de ingrediente activo en un aceite digerible tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva e inyectar por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina para formar cápsulas de gelatina dura que contienen 100 miligramos del ingrediente activo. Las cápsulas se deberían lavar y secar.

Comprimidos

Se pueden preparar comprimidos mediante procedimientos convencionales de modo que la unidad de dosificación sea 100 miligramos de ingrediente activo, 0,2 miligramos de dióxido de silicio coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 miligramos de celulosa microcristalina, 11 miligramos de almidón y 98,8 miligramos de lactosa. Se pueden aplicar recubrimientos apropiados para aumentar la palatabilidad o retardar la absorción.

ES 2 346 100 T3

Injectables

Se puede preparar una composición parenteral adecuada para administración mediante inyección agitando 1,5% en peso del ingrediente activo en 10% en volumen de propilenglicol y agua. La solución se debería hacer isotónica con cloruro de sodio y esterilizarse.

Suspensión

Se puede preparar una suspensión acuosa para administración por vía oral de modo que cada 5 ml contengan 100 mg de ingrediente activo finamente dividido, 200 mg de carboximetilcelulosa sódica, 5 mg de benzoato de sodio, 10 g de solución de sorbitol, U.S.P., y 0,025 ml de vainilina.

Cuando los compuestos de esta invención se combinan con otros agentes anticoagulantes, por ejemplo, una dosificación diaria puede ser de aproximadamente 0,1 a 100 miligramos del compuesto de fórmula I y de aproximadamente 1 a 7,5 miligramos del segundo anticoagulante, por kilogramo de peso corporal del paciente. Para una forma de dosificación comprimido los compuestos de esta invención pueden estar presentes en general en una cantidad de aproximadamente 5 a 10 miligramos por unidad de dosificación, y el segundo anti-coagulante en una cantidad de aproximadamente 1 a 5 miligramos por unidad de dosificación.

Cuando se administran dos o más de los segundos agentes terapéuticos precedentes con el compuesto de los ejemplos, en general se puede reducir la cantidad de cada componente en una dosificación diaria típica y forma de dosificación típica respecto a la dosificación usual del agente cuando se administra solo, a la vista del aditivo o efecto sinérgico de los agentes terapéuticos cuando se administran en combinación.

De forma particular cuando se proporciona como una unidad de dosificación única existe el potencial de una interacción química entre los ingredientes activos combinados. Por esta razón cuando el compuesto de los ejemplos y un segundo agente terapéutico se combinan en una unidad de dosificación única estos se formulan tal que aunque se combinen los ingredientes activos en una unidad de dosificación única, el contacto físico entre los ingredientes activos se minimiza (esto es, se reduzca). Por ejemplo, un ingrediente activo puede estar recubierto entéricamente. Recubriendo entéricamente uno de los ingredientes activos, es posible no sólo minimizar el contacto entre los ingredientes activos combinados, sino también, es posible controlar la liberación de uno de estos componentes en el tracto gastrointestinal tal que uno de estos componentes no sea liberado en el estómago sino que se libere en los intestinos. Uno de los ingredientes activos puede estar también recubierto con un material que efectúa una liberación sostenida a través del tracto gastrointestinal y sirve también para minimizar el contacto físico entre los ingredientes activos reunidos. Además el componente de liberación sostenida pueden estar recubierto adicionalmente entéricamente tal que la liberación de este componente tenga lugar sólo en el intestino. Aún otro enfoque implicaría la formulación de un producto de combinación en el que el componente esté recubierto con un polímero de liberación sostenida y/o entérico, y el otro componente esté también recubierto con un polímero tal como una hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de baja viscosidad u otros materiales apropiados como se conoce en la técnica, con el fin de separar adicionalmente los componentes activos. El recubrimiento polimérico sirve para formar una barrera adicional de interacción con el otro componente.

Estas así como otras formas de minimizar el contacto entre los componentes de los productos de combinación de la presente invención, ya sea administrados en una forma de dosificación única o administrados en formas separadas pero al mismo tiempo de la misma forma, serán evidentes para los especialistas en la técnica, una vez documentados con la presente descripción.

De forma adicional ciertos compuestos descritos en esta invención pueden ser útiles como metabolitos de otros compuestos. Por tanto, en una realización los compuestos pueden ser útiles bien como un compuesto sustancialmente puro, que puede incorporarse luego también en una composición farmacéutica, o puede ser útil como metabolito que se genera tras administración del profármaco de ese compuesto. En una realización, un compuesto puede ser útil como un metabolito siendo útil para el tratamiento de trastornos como se describe en el presente documento.

“Sustancialmente puro” tal como se usa en esta invención se pretende que incluya un compuesto que presente una pureza mayor de aproximadamente 90 por ciento en peso, incluyendo aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, y 100 por ciento.

Como un ejemplo un compuesto descrito en esta invención puede ser sustancialmente puro presentando una pureza mayor de aproximadamente 90 por ciento (en peso), cuando menos del aproximadamente 10 por ciento restante del material comprenda otro metabolito del compuesto, un profármaco del compuesto, y/o impurezas de reacción y/o procesamiento que surgen de su preparación.

ES 2 346 100 T3

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de:

- 5 (i) N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida;
- 10 N-((1R,2S,5R)-5-(metilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;
- 15 N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)formamida;
- 20 N-((1R,2S,5R)-5-(dimetilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;
- 25 N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-6-terc-butil-2-piridincarboxamida;
- 30 N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)propanamida;
- 35 2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(metanosulfonilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida;
- 40 2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(propionilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida;
- 45 N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)metanosulfonamida; y
- 50 N-(((1S,2S,5R)-5-metoxi-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)metil)acetamida;
- 55 N-(((1R,2S,5R)-5-(isopropilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;
- 60 N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;
- 65 N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((3S)-2-oxo-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida;
- 70 N-((1R,2S,5R)-5-(isopropilamino)-2-((3S)-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida; y
- 75 N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((1-oxido-6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida; o
- (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de (i) los mismos.

2. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-((1R,2S,5R)-5-(metilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-((1R,2S,5R)-5-(isopropil(metil)amino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)formamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-((1R,2S,5R)-5-(dimetilamino)-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolinil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(isopropil(metil)amino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-6-terc-butil-2-piridincarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 346 100 T3

7. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-((1R,2S,5R)-5-amino-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolínil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)propanamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 8. Un compuesto de la reivindicación 1, que es 2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(metanosulfonilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 9. Un compuesto de la reivindicación 1, que es 2-terc-butil-N-((3S)-1-((1S,2R,4R)-4-(terc-butilamino)-2-(propionilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)-4-pirimidincarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 10. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-(((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((3S)-3-((6-terc-butilpirimidol[5,4-d]pirimidin-4-il)amino-2-oxo-1-pirrolidinil)ciclohexil)metanosulfonamida, N-(((1S,2S,5R)-5-metoxi-2-((3S)-2-oxo-3-((6-(trifluorometil)-4-quinazolínil)amino)-1-pirrolidinil)ciclohexil)metil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en terapia.

25 13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esqueroderma, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, fallo cardíaco congestivo, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada a VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis por trasplante, trauma cerebral inducido física o químicamente, enfermedad del intestino inflamado, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis por suero nefrotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, restenosis, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal por diálisis-injerto, hiperplasia intimal por derivación arteriovenosa, trasplante de órgano, nefropatía de aloinjerto crónico y cáncer.

35 14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis, esclerosis múltiples, aterosclerosis, restenosis, y trasplante de órgano, preferiblemente esclerosis múltiple, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y diabetes.

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

