

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 573**

51 Int. Cl.:

**C07D 249/08** (2006.01)

**A61K 31/4196** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2019 PCT/CN2019/127155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020 WO20125776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2019 E 19897902 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3901143**

54 Título: **Ruta de procedimiento del compuesto de fórmula (IV), forma cristalina y método de preparación para el mismo**

30 Prioridad:

**20.12.2018 CN 201811565301**

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

**09.10.2024**

73 Titular/es:

**SHANGDONG DANHONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)**

**No.99, Kunming Road, Mudan Industrial Park District, Heze Shangdong 274000, CN**

72 Inventor/es:

**LUO, ZHI;  
LI, XIAOLIN;  
YANG, YAXUN;  
YANG, LELE;  
LI, PENG;  
HE, HAIYING;  
LI, JIAN y  
CHEN, SHUHUI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 981 573 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

Ruta de procedimiento del compuesto de fórmula (IV), forma cristalina y método de preparación para el mismo

## Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a una ruta de procedimiento del compuesto de fórmula (IV), forma cristalina y método de preparación para el mismo.

## Antecedentes de la invención

10 En la mayoría de los organismos, incluidos los humanos, dos grupos de amino oxidasas de mamífero metabolizan diversas monoaminas, diaminas y poliaminas producidas endógenamente o absorbidas exógenamente. Estas incluyen las monoaminoxidasas (MAO-A y MAO-B) que están presentes en las mitocondrias de la mayoría de los tipos celulares y que utilizan el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) unido covalentemente como cofactor. La poliamina oxidasa es otra amina oxidasa dependiente de FAD que oxida la espermina y la espermidina desaminadas. La SSAO/VAP-1 pertenece al segundo grupo de las dependientes de cobre y usa otros cofactores tales como los restos de tirosina oxidada (abreviados como TPQ o LTQ) además de FAD. La desaminación oxidativa de MAO y SSAO/VAP-1 incluye algunos sustratos comunes de monoaminas, tales como dopamina, tiramina y bencilamina. La SSAO/VAP-1 oxida también la metilamina y la aminoacetona endógenas.

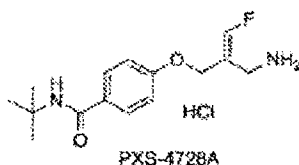
15 La amina oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO), también conocida como amina oxidasa primaria, amina oxidasa plasmática y bencilamina oxidasa, es estructuralmente la misma que la proteína de adhesión vascular-1 (VAP-1). Se usa SSAO/VAP-1 para describir la proteína.

20 Estas enzimas se definieron originalmente por los compuestos capaces de inhibir su actividad enzimática. Por ejemplo, la MAO-A es inhibida selectivamente por la clorgilina, y la MAO-B es inhibida selectivamente por el L-deprenilo (selegilina), aunque ni la clorgilina ni el L-deprenilo pueden inhibir la actividad amina oxidasa de la SSAO/VAP-1. La SSAO/VAP-1 puede ser inhibida por la semicarbazida, denominada por tanto amina oxidasa sensible a semicarbazida.

25 La SSAO/VAP-1 es una enzima extracelular que contiene una cola citoplásmica muy corta, un único dominio transmembranario y un dominio extracelular grande, muy glucosilado, que contiene un centro activo para la actividad amina oxidasa. La SSAO/VAP-1 también existe en forma disuelta que circula en el plasma de algunos animales. Se ha demostrado que esta forma es un producto de fragmentación de la SSAO/VAP-1 unida a membranas.

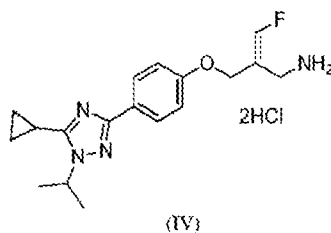
30 Parece que la SSAO/VAP-1 tiene dos funciones fisiológicas: la primera es la actividad amina oxidasa mencionada anteriormente y la segunda es la actividad de adhesión celular. Ambas actividades están relacionadas con el proceso inflamatorio. Se ha demostrado que la SSAO/VAP-1 desempeña una función importante en la extravasación circulante de las células inflamatorias desde el sitio de la inflamación. Se confirmó que el anticuerpo contra la VAP-1 reducía el proceso inflamatorio bloqueando el sitio de adhesión de la proteína SSAO/VAP-1, y se proporcionaron muchas pruebas de inactivación *in vitro* e *in vivo*. Ahora está claro que la SSAO/VAP-1 es un importante mediador celular inflamatorio.

35 En la solicitud de patente internacional WO2013163675 se describió el compuesto PXS-4728A, cuya estructura es la siguiente.



## Contenido de la presente invención

40 La presente invención da a conocer una forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV), cuyo patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $11,27 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,32 \pm 0,2^\circ$ ,



En algunos aspectos de la presente invención, la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) tiene picos de difracción característicos en su patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo en los siguientes ángulos  $2\Theta$ :  $11,27 \pm 0,2^\circ$ ,  $12,46 \pm 0,2^\circ$ ,  $18,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,32 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,51 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,94 \pm 0,2^\circ$ ,  $26,49 \pm 0,2^\circ$ .

5 En algunos aspectos de la presente invención, la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) tiene picos de difracción característicos en su patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo en los siguientes ángulos  $2\Theta$ :  $11,27 \pm 0,2^\circ$ ,  $12,46 \pm 0,2^\circ$ ,  $18,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,03 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,32 \pm 0,2^\circ$ ,  $23,37 \pm 0,2^\circ$ ,  $24,19 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,51 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,94 \pm 0,2^\circ$ ,  $26,49 \pm 0,2^\circ$ ,  $28,12 \pm 0,2^\circ$ .

En algunas realizaciones de la presente invención, el patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) se muestra en la figura 1.

10 **Tabla 1.** Datos de análisis del patrón de XRPD de la forma cristalina B

Número	Ángulo $2\Theta$ ( $^\circ$ )	Separación interplanar (Å)	Tensión relativa (%)	Número	Ángulo $2\Theta$ ( $^\circ$ )	Separación interplanar (Å)	Tensión relativa (%)
1	6,13	14,42	31,94	19	25,94	3,43	78,35
2	11,27	7,85	100,00	20	26,49	3,36	79,46
3	12,46	7,10	74,08	21	27,08	3,29	8,95
4	14,42	6,14	20,36	22	27,70	3,22	32,45
5	15,79	5,61	25,74	23	28,12	3,17	48,03
6	16,49	5,38	5,12	24	28,56	3,13	30,53
7	18,08	4,91	35,03	25	29,94	2,98	35,20
8	18,44	4,81	79,62	26	30,25	2,95	34,12
9	18,85	4,71	10,82	27	31,05	2,88	10,83
10	20,03	4,43	43,13	28	31,80	2,81	10,64
11	21,44	4,14	90,07	29	32,45	2,75	8,89
12	21,94	4,05	38,44	30	32,95	2,72	25,09
13	22,32	3,98	96,82	31	33,22	2,70	19,38
14	23,37	3,81	45,05	32	33,53	2,67	14,09
15	23,66	3,76	43,95	33	34,29	2,62	7,63
16	24,19	3,68	55,33	34	35,13	2,55	8,13
17	24,77	3,59	35,01	35	35,96	2,50	14,04
18	25,51	3,49	77,38	36	37,36	2,41	5,35

En algunas realizaciones de la presente invención, la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) tiene una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un pico endotérmico a  $221,9^\circ\text{C} \pm 3,0^\circ\text{C}$ .

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el perfil de DSC de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) se muestra en la figura 2.

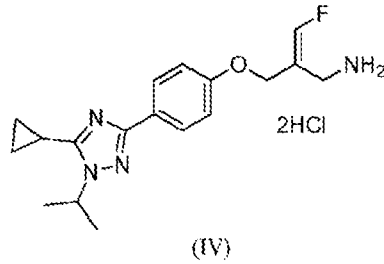
En algunas realizaciones de la presente invención, la curva del análisis termogravimétrico de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) tiene una pérdida de peso del 1,05 % a  $150,0^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ .

En algunas realizaciones de la presente invención, la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) tiene un perfil de TGA como el que se muestra en la figura 3.

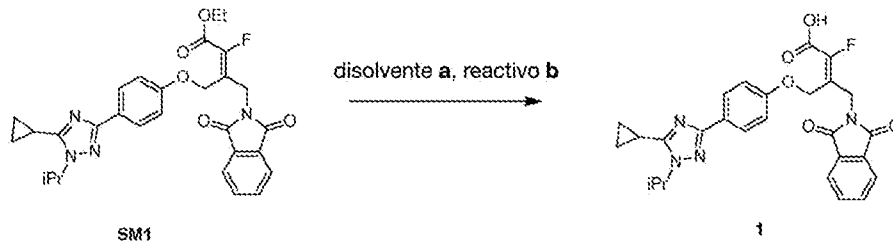
20 La presente invención también da a conocer un método para preparar la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV), que comprende añadir una cualquiera de las formas del compuesto de fórmula (IV) a éter de metilo y terc-butilo para preparar una suspensión, en donde la temperatura para preparar una suspensión varía de  $40^\circ\text{C}$  a  $60^\circ\text{C}$ ; el tiempo utilizado para preparar una suspensión varía de 30 h a 60 h; la relación peso-volumen del compuesto de fórmula (IV) a éter de metilo y terc-butilo varía de 1:5 a 40.

25

La presente invención también da a conocer un método de preparación del compuesto de fórmula (IV),



que comprende las etapas siguientes:



5 en donde,

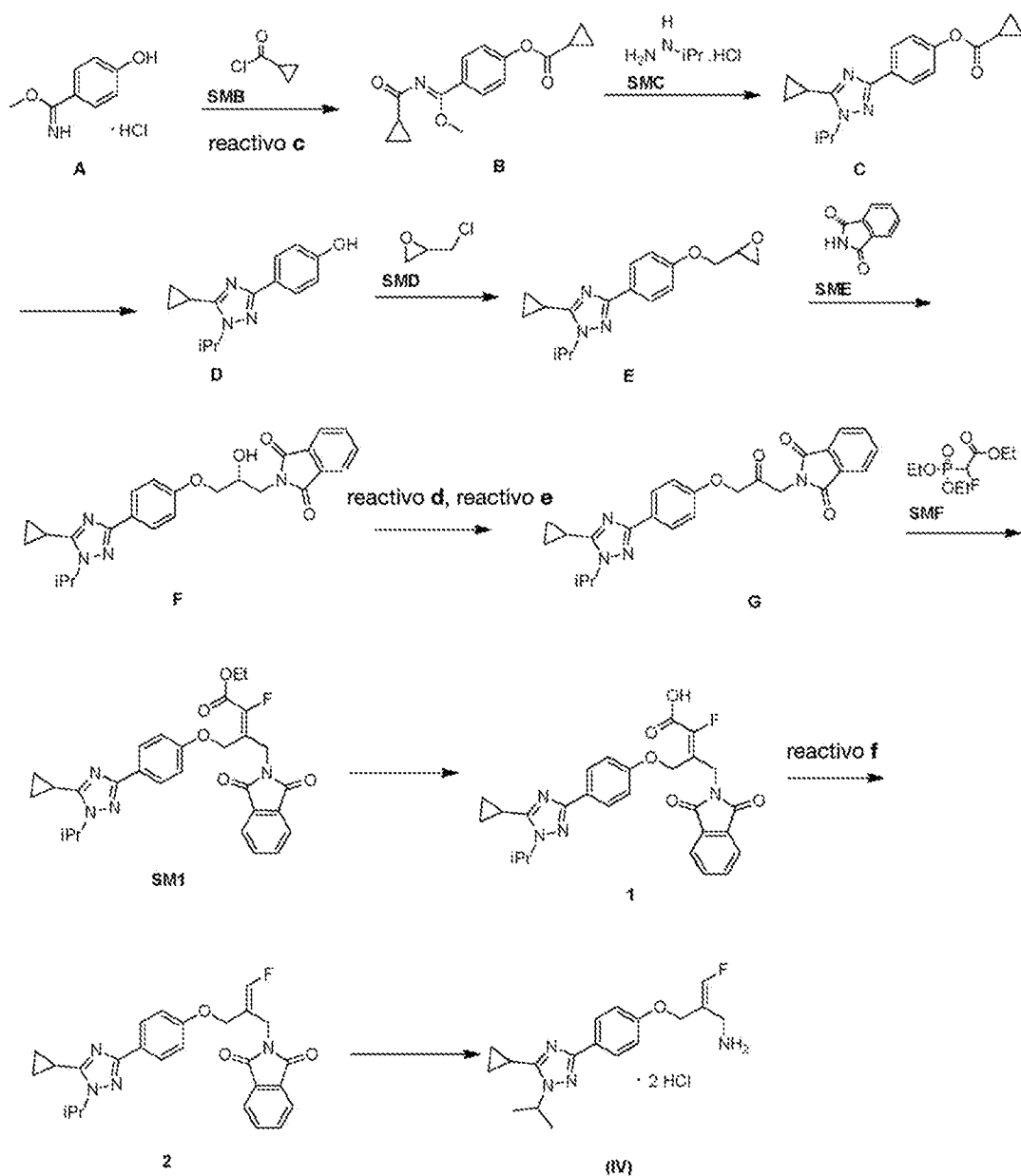
el disolvente **a** es ácido acético;

el reactivo **b** es ácido clorhídrico.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, en el método de preparación del compuesto de fórmula (IV), la relación volumen-masa del disolvente **a** por **SM1** oscila de 3,0 a 3,5:1, y la relación volumen-masa del reactivo **b** por **SM1** oscila de 3,0 a 10:1.

En algunas realizaciones de la presente invención, en el método de preparación del compuesto de fórmula (IV), en donde la temperatura interna de la reacción se controla para que esté a 75-80 °C.

En algunas realizaciones de la presente invención, el método de preparación del compuesto de fórmula (IV) comprende las siguientes etapas:



En algunas realizaciones de la presente invención, en el método de preparación el compuesto de fórmula (IV), en donde el reactivo **c** es piridina; la preparación del compuesto **D** es a través de una reacción de hidrólisis en condiciones alcalinas; el reactivo **d** es bromuro de potasio, y el reactivo **e** es hipoclorito sódico; el reactivo **f** es acetato de plata.

## 5 Efectos técnicos

La forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) de la presente invención tiene buena estabilidad. El compuesto de fórmula (IV) y la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) mostraron una fuerte actividad inhibitora contra la enzima VAP-1/SSAO recombinante humana y contra la célula VAP-1/SSAO en los ensayos *in vitro*.

## Definiciones y descripciones

10 A menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos y frases usados en la presente memoria pretenden tener los siguientes significados. Una frase o término específico no debe considerarse incierto o poco claro sin una definición especial, sino que debe entenderse en su significado habitual. Cuando aparece un nombre comercial en la presente memoria, se pretende hacer referencia a su producto comercial correspondiente o a su ingrediente activo.

15 Los compuestos intermedios de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de métodos sintéticos que conocen bien los expertos en la técnica, incluidas las realizaciones específicas enumeradas a continuación, las realizaciones formadas al combinarlas con otros métodos de síntesis química, y las alternativas

equivalentes que conocen bien los expertos en la técnica. Las aplicaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a ellas, las realizaciones de la presente invención.

5 Las reacciones químicas en las realizaciones específicas de la presente invención se completan en los disolventes adecuados, y los disolventes deben ser adecuados para los cambios químicos de la presente invención y los reactivos y materiales requeridos. Para obtener los compuestos de la presente invención, a veces es necesario que los expertos en la técnica modifiquen o seleccionen las etapas de síntesis o los esquemas de reacción basándose en las realizaciones existentes.

La presente invención se describirá específicamente a continuación a través de las realizaciones.

10 La estructura del compuesto de la presente invención puede confirmarse mediante métodos convencionales que conocen bien los expertos en la técnica. Si la presente invención se refiere a la configuración absoluta del compuesto, la configuración absoluta puede confirmarse por medios técnicos convencionales en el campo. Por ejemplo, el método de difracción de rayos X de monocristal (SXR), en donde se usó el difractor Bruker D8 venture para recopilar los datos de intensidad de difracción del monocristal. La fuente de luz es la radiación de  $\text{CuK}\alpha$ , y el método de exploración es la exploración de  $\phi/\omega$ . Después de recopilar los datos relevantes, el método directo (Shelxs97) se adopta además para analizar la estructura del cristal, y la configuración absoluta del compuesto puede confirmarse de este modo.

Todos los disolventes usados en la presente invención están disponibles comercialmente y pueden usarse sin ninguna purificación adicional.

20 La presente invención utiliza los siguientes acrónimos: DMF representa dimetilformamida; DCM representa diclorometano; DMSO representa dimetilsulfóxido; MeOH representa metanol; MsOH representa ácido metanosulfónico; EtOH representa etanol; NaOH representa hidróxido de sodio; TEA representa trietilamina; HCl representa ácido clorhídrico; Tol representa tolueno; KOH representa hidróxido de potasio; TEBAc representa cloruro de benciltriethylamonio; KBr representa bromuro de potasio;  $\text{NaHCO}_3$  representa bicarbonato de sodio; NaClO representa hipoclorito de sodio; TEMPO representa óxido de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  representa tiosulfato de sodio; AcOH representa ácido acético; NMP representa N-metilpirrolidona; AgOAc representa acetato de plata; 2-MeTHF representa 2-metiltetrahydrofurano; DAST representa trifluoruro de dietilaminoazufre; TBSCl representa terc-butildimetilclorosilano; DMP representa ftalato de dimetilo; NaHMDS representa bis(trimetilsilil)amida de sodio; TBAF representa fluoruro de tetrabutylamonio; MgEtBr representa bromuro de etilmagnesio.

30 Los compuestos se nombran según los principios de denominación convencionales o el programa ChemDraw<sup>®</sup>, y para los compuestos disponibles en el mercado se usan los nombres de catálogo de los proveedores.

#### **Método de difracción de rayos X de muestras en polvo (XRPD) en la presente invención**

Modelo del instrumento: difractor de rayos X Bruker D8 advance

Método de ensayo: Se usaron aproximadamente 10 ~ 20 mg de muestra para la detección por XRPD

Los parámetros de XRPD en detalle son los siguientes:

35 Tubo de luz: Cu,  $\text{K}\alpha$ , ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ )

Tensión del tubo de luz: 40 kV, corriente del tubo de luz: 40 mA

Ranura de divergencia: 0,60 mm

Rendija de detección: 10,50 mm

Ranura antidispersión: 7,10 mm

40 Intervalo de exploración: 4-40°

Tamaño de paso: 0,02°

Duración del paso: 0,12 s

Velocidad de rotación del disco de muestra: 15 rpm

#### **El método de análisis térmico diferencial (con calorímetro diferencial de barrido, DSC) de la presente invención**

45 Modelo del instrumento: Calorímetro diferencial de barrido TA Q2000

Método de ensayo: la muestra (aproximadamente 1 mg) se colocó en una bandeja de aluminio de DSC para el ensayo. En las condiciones de 50 ml/min de  $\text{N}_2$  a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, la muestra se calentó de 30 °C (temperatura ambiente) a 300 °C (o 350 °C).

**El método de termogravimetría (con analizador termogravimétrico, TGA) de la presente invención**

Modelo de instrumento: analizador termogravimétrico TA Q5000IR

5 Método de ensayo: la muestra (2-5 mg) se colocó en un recipiente de platino de TGA para el ensayo. En las condiciones de 25 ml/min de N<sub>2</sub> a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, la muestra se calentó de la temperatura ambiente a 350 °C o a una pérdida de peso del 20 %.

**Método de difracción de rayos X de monocristal de la presente invención**

Modelo de instrumento: Rigaku Oxford Diffraction XtaLAB Synergy-S

10 Método de ensayo: la muestra se disolvió en 1 ml de diclorometano/metanol (1:1) a temperatura ambiente. La solución de muestra se colocó en una botella de muestra semisellada de 4 ml y se evaporó lentamente a temperatura ambiente. Al día siguiente se obtuvo una gran cantidad de cristales incoloros. Temperatura del experimento de difracción T = 99,99(11) K.

**Parámetros del instrumento:**

Difractómetro de cuatro círculos Rigaku Oxford Diffraction XtaLAB Synergy equipado con un detector de área HyBeacon-6000HE.

15 Sistema criogénico: Oxford Cryostream 800

Cu:  $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$ , 50 W, fuente de microenfoque con espejo multicapa ( $\mu$ -CMF).

Distancia desde el cristal al detector CCD: d = 35 mm

Tensión del tubo: 50 kV

Corriente del tubo: 1 mA

20 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un espectro de XRPD de la radiación de Cu-K $\alpha$  de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV).

La figura 2 es un perfil de DSC de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV).

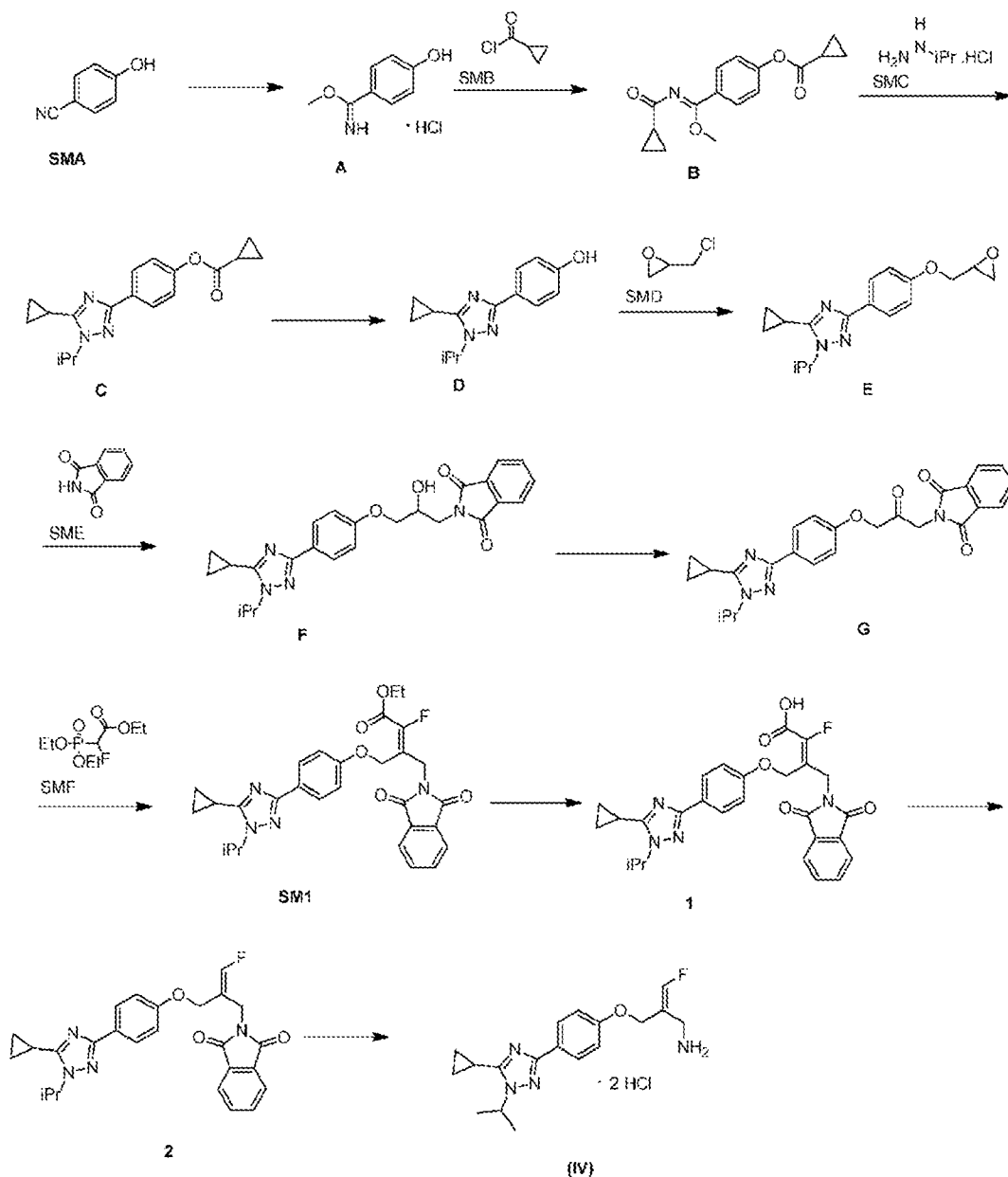
La figura 3 es un diagrama de TGA de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV).

25 La figura 4 es un diagrama elipsoide de la estructura tridimensional del compuesto de fórmula (IV).

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

Para conocer mejor el contenido de la presente descripción, se usan los siguientes ejemplos específicos para una descripción adicional.

## Ejemplo 1: Preparación de un compuesto de fórmula (IV)



## Etapa 1:

5 Se añadió MeOH (2,5 l) a un matraz de tres bocas de 50 l limpio y seco con agitación, y se le añadió SMA (572 g, 4,80 mol). En un baño María con hielo, la temperatura del sistema se mantuvo controlada a 0-30 °C. Se le añadió lentamente, gota a gota, cloruro de acetilo (2,26 kg, 28,81 mol, 2,06 l) al sistema. En esta etapa, el calor se liberó violentamente. La velocidad de goteo se controló con mucho cuidado. La adición se completó al cabo de 3 h. Después de la adición, se retiró el baño María con hielo y la temperatura del sistema se mantuvo controlada a 20-30 °C. La solución de reacción se agitó continuamente durante 16 h. Después de que se terminara la agitación, la solución de reacción se transfirió a un filtro de sobremesa con succión y se filtró con succión, y se aclaró una vez con 1 l de MeOH. La torta del filtro se recogió y se drenó. La torta del filtro se transfirió a una bandeja limpia y se dejó secar a temperatura ambiente durante >24 h. El material se recogió para obtener el compuesto **A**.

10 RMN-<sup>1</sup>H (399 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11,18 (br s, 1H), 10,59 - 10,53 (m, 1H), 8,08 - 7,97 (m, 2H), 7,04 - 6,96 (m, 2H), 4,24 (s, 3H).

15

**Etapa 2:**

El compuesto A (500 g, 2,66 mol de HCl) se disolvió en DCM (3 l). Se le añadió TEA (404,49 g, 4,00 mol, 556,39 ml) y la solución se agitó durante 30 min. Después se le añadió piridina (421,59 g, 5,33 mol, 430,19 ml) al sistema anterior. Se le añadió gota a gota lentamente SMB (612,87 g, 5,86 mol, 532,93 ml) y la temperatura del sistema se mantuvo controlada a 10-30 °C. La reacción se agitó a 20 °C durante 1 h. Se le añadieron 1,5 l de agua y HCl 0,5 M (1,4 l) sucesivamente para ajustar el pH del sistema a 5-6. La fase acuosa se extrajo con 1,5 l de DCM una vez y se combinaron las fases orgánicas. Se le añadieron 4 l de agua para lavar la fase orgánica combinada, y la fase orgánica se lavó con 3 l de salmuera saturada, y se dejó que las fases se separan. La fase orgánica se secó después sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para obtener un producto en bruto. El producto en bruto se añadió a 2200 ml de disolvente (n-heptano:acetato de etilo = 10:1) para que se suspendieran a 25 °C durante 4 h, y el compuesto **B** se obtuvo después de la filtración.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,77 - 7,69 (m, 2H), 7,19 - 7,12 (m, 2H), 3,89 (s, 3H), 1,89 - 1,80 (m, 1H), 1,72 - 1,62 (m, 1H), 1,21 - 1,14 (m, 2H), 1,10 - 1,01 (m, 4H), 0,89 (qd, *J* = 3,7, 7,7 Hz, 2H).

**Etapa 3:**

Se añadieron SMC (230,94 g, 2,09 mol) y tolueno (3000 ml) a un matraz seco de tres bocas. Después se les añadió TEA (211,32 g, 2,09 mol, 290,67 ml, 1 equiv.), la agitación se puso en marcha y la temperatura se elevó a una temperatura externa de 80 °C a 90 °C (la temperatura interna era estable a 72 °C). Se le añadió el compuesto B (600 g, 2,09 mol) de forma discontinua (la temperatura se elevó a 78 °C en la mitad de la adición), y la temperatura durante la adición se mantuvo controlada a 70-80 °C. Después de la adición, la temperatura interna se estabilizó a 74 °C y la mezcla se agitó durante 2 h. Se le añadieron 2 l de agua y se dejó que se separan las fases de la mezcla. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (1 l × 2) y se combinaron las fases orgánicas. La fase orgánica se lavó con salmuera saturada (2 l × 2) y se separó. La fase orgánica se secó después sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para obtener un producto en bruto. El producto en bruto se añadió a 2 l de disolvente (n-heptano:acetato de etilo = 10:1) para que se suspendiera a 25 °C durante 2 h. Se obtuvo el compuesto **C**.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,93 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,17 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 4,90 - 4,77 (m, 1H), 2,22 - 2,12 (m, 1H), 1,95 - 1,83 (m, 1H), 1,46 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H), 1,04 (dtd, *J* = 3,0, 5,0, 9,8 Hz, 6H), 1,00 - 0,96 (m, 2H).

**Etapa 4:**

De forma discontinua, se añadió EtOH (10 l) a un baño con circulación seco de 50 l de temperatura alta-baja, después el compuesto C (3,3 10,6 mol) se añadió al recipiente de reacción y se puso en marcha la agitación. La temperatura interna se mantuvo controlada a 0-40 °C, y se le añadió una solución mixta de NaOH (0,860 kg, 21,5 mol) y agua (10 l). La temperatura se elevó durante el proceso de adición, pero sin violencia. Después de la adición, la reacción se agitó a 25-35 °C durante 17-18 h. La temperatura del líquido de reacción se mantuvo controlada y se añadió HCl a 12 N al líquido de reacción para ajustar el pH a 3-4. El sólido se precipitó. El líquido de reacción se filtró en un filtro de sobremesa, y la torta del filtro se recogió para obtener un producto en bruto. Se combinaron 5 lotes de 20 kg de productos en bruto y se suspendieron con 2 volúmenes de acetonitrilo a 25 °C durante 1 h. La mezcla se filtró a través de un filtro de sobremesa, y la torta del filtro se enjuagó con acetonitrilo y luego se recogió. Se transfirió la torta de filtración a una bandeja limpia y se dejó secar de forma natural durante 24 h. Se obtuvo el compuesto **D**.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,60 (s, 1H), 7,73 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 4,81 (quin, *J* = 6,6 Hz, 1H), 2,20 - 2,09 (m, 1H), 1,44 (d, *J* = 6,5 Hz, 6H), 1,09 - 1,00 (m, 2H), 0,98 - 0,92 (m, 2H).

**Etapa 5:**

Se añadió epíclorhidrina (6,600 kg) a un baño con circulación seco de temperatura alta-baja de 50 l. Después se le añadió DMSO (6 l), se puso en marcha la agitación y se le añadió el compuesto **D** (3,200 kg). El material restante se enjuagó con DMSO (3 l). La temperatura interna se mantuvo controlada a 20-30 °C, se le añadió KOH (0,889 kg) y la temperatura se aumentó ligeramente. Después de la adición, la temperatura interna se estabilizó a 27-30 °C, y la mezcla se agitó durante 18 h. Se descargó la solución de reacción, y se le añadieron 8 l de agua a la caldera de reacción, la agitación se puso en marcha, la temperatura se mantuvo controlada a 0-30 °C, y la solución de reacción se transfirió lentamente a la caldera de reacción mediante una bomba peristáltica. Después se le añadieron 8 l de éter de metilo y terc-butilo. La mezcla se agitó durante 15 min y se dejó reposar durante 15 min. Se dejó que se separan las fases del líquido y se recogió la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo de nuevo y se recogió la fase orgánica. Se combinaron las dos fases orgánicas. Con agitación, se le añadió 1 kg de sulfato de sodio anhidro a la fase orgánica para secar la fase orgánica. La fase orgánica se concentró a presión reducida, y la temperatura del baño María se mantuvo controlada para que fuera inferior a 45 °C. La presión del vacío rotatorio se mantuvo controlada para que fuera inferior a -0,08 MPa para que se concentrara. La bomba de aceite se usó para reducir aún más la presión. La temperatura del baño María se mantuvo controlada a <70°C, y la presión del vacío rotatorio fue inferior a -0,08 MPa. La fase orgánica se concentró finalmente hasta el 105 % de la cantidad teórica. El líquido concentrado se usó directamente en la siguiente reacción. Se obtuvo el compuesto **E**.

RMN-<sup>1</sup>H (399 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,88 - 7,80 (m, 2H), 6,99 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 4,83 (quin, *J* = 6,6 Hz, 1H), 4,35 (dd, *J* = 2,6, 11,4 Hz, 1H), 3,85 (dd, *J* = 6,4, 11,2 Hz, 1H), 3,36 - 3,34 (m, 1H), 2,85 (t, *J* = 4,6 Hz, 1H), 2,72 (dd, *J* = 2,6, 4,8 Hz, 1H), 2,23 - 2,07 (m, 1H), 1,45 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H), 1,07 - 1,00 (m, 2H), 0,99 - 0,94 (m, 2H).

#### Etapa 6:

- 5 Se disolvió el compuesto **E** (3,86 kg) en isopropanol (15 l), y la solución mixta se añadió a un baño con circulación de temperatura alta-baja de 50 l seco, y se puso en marcha la agitación. Se le añadieron sucesivamente TEBAC (0,592 kg) y SME (2,295 kg) y finalmente se añadieron 5 l de isopropanol para enjuagar las paredes de la caldera de reacción. La temperatura se mantuvo controlada a 80-90 °C y la reacción continuó durante 22 h. Se le añadieron 15 l de *n*-heptano al sistema de reacción, se redujo la velocidad de agitación, se redujo la temperatura lentamente hasta 20-25 °C, y se agitó la mezcla durante 1 h para precipitarla. Se usó una bomba peristáltica para transferir la disolución de reacción a un filtro de sobremesa. La mezcla se filtró con succión, y la torta del filtro se lavó con 5 l de *n*-heptano. Se recogió la torta del filtro y se colocó en una bandeja limpia, después se dejó secar por medios naturales durante >24 h. Se obtuvo el compuesto **F**.

- 15 RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,90 - 7,83 (m, 4H), 7,81 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,90 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 5,40 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,88 - 4,75 (m, 1H), 4,25 - 4,11 (m, 1H), 3,99 (br s, 2H), 3,73 (s, 2H), 2,22 - 2,07 (m, 1H), 1,45 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H), 1,07 - 1,00 (m, 2H), 0,96 (br s, 2H).

#### Etapa 7:

- 20 El compuesto **F** (3,01 kg) se disolvió en DCM (15 l). La solución mixta se añadió a un baño seco con circulación de temperatura alta-baja, y se puso en marcha la agitación. Se le añadió KBr (0,97 kg), seguido de una solución mixta de NaHCO<sub>3</sub> (2,83 kg) y H<sub>2</sub>O (100 ml), y después TEMPO (54,00 g). La temperatura interna se mantuvo controlada a 0-5 °C, y se le añadió gota a gota NaClO (16,4 kg, contenido en masa del 6 %). La temperatura del sistema se mantuvo controlada después por debajo de 20-25 °C y el sistema se agitó durante 2 h. Se detuvo la reacción y se dejó reposar durante 15 min. Se dejó que las fases del líquido se separaran y se recogió la fase orgánica. Se le añadió Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> saturado (ac.) (15 l) para lavar la fase orgánica, y la mezcla se agitó durante 5 min, se dejó reposar durante 25 15 min, y se separó la fase orgánica. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. La temperatura del baño María se mantuvo controlada por debajo de 45 °C, y la presión del vacío rotatorio fue de menos de -0,08 MPa. La fase orgánica se concentró hasta que precipitó un sólido. Se le añadieron 5 l de acetato de etilo, y la mezcla se transfirió a un recipiente de reacción esférico de 50 l. Se le añadió 10 l de *n*-heptano y la mezcla se suspendió durante 16 h. El sólido se separó por filtración, y se recogió la torta de filtración y se puso en una bandeja 30 limpia y se dejó secar por medios naturales durante más de 24 h. Se obtuvo el compuesto **G**.

RMN-<sup>1</sup>H (399 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,95 - 7,87 (m, 4H), 7,84 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,00 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 5,13 (s, 2H), 4,90 - 4,80 (m, 1H), 4,78 (s, 2H), 2,22 - 2,12 (m, 1H), 1,46 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H), 1,08 - 1,01 (m, 2H), 1,00 - 0,93 (m, 2H).

#### Etapa 8:

- 35 Se añadió MgEtBr (3 M, 63,74 ml) a una solución de **SMF** (46,31 g, 191,23 mmol, 38,92 ml) en 2-MeTHF (200 ml) a 0 °C, y el resultado hizo reaccionar a 0-10 °C durante 20 min, y se le añadió el compuesto **G** (50 g, 112,49 mmol). Después de que se completara la adición, la solución se calentó a 40 °C y se hizo reaccionar durante 1 h. Se le añadió una solución saturada de ácido cítrico (200 ml) a la solución y la solución se agitó durante 10 min. Se separó la fase orgánica y se lavó con solución acuosa de NaOH a 1 M (200 ml). La mezcla se agitó durante 10 min, y se separó la 40 fase orgánica. La fase orgánica se secó después mediante un evaporador rotatorio y se suspendió en 100 ml del disolvente éter de metilo y terc-butilo:isopropanol = 1:1 (2 V) a 25 °C durante 16 h, y la torta del filtro se recogió mediante filtración (la fase orgánica se secó directamente mediante un evaporador rotatorio, y el producto se aglomeró reemplazando una pequeña cantidad de 2-MeTHF con isopropanol). Se obtuvo el **SM1**.

- 45 RMN-<sup>1</sup>H (399 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,87 - 7,79 (m, 4H), 7,73 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,73 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H), 4,98 (d, *J* = 0,9 Hz, 2H), 4,87 - 4,77 (m, 1H), 4,58 (d, *J* = 2,6 Hz, 2H), 4,26 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,20 - 2,11 (m, 1H), 1,44 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H), 1,22 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H), 1,07 - 1,00 (m, 2H), 0,98 - 0,92 (m, 2H).

#### Etapa 9:

- Se añadió AcOH (8 l) a un reactor con camisa de 50 l seco y limpio a 20-25 °C. Se le añadió el **SM1** (2450 g, 4,60 mol) con agitación, y el sistema se convirtió en un sistema de suspensión. Se le añadió al sistema una solución preparada de HCl a 6 M (8 l) y el sistema se calentó hasta 90-95 °C (la temperatura interna se mantuvo controlada a 75-80 °C). 50 La mezcla anterior se hizo reaccionar a 90-95 °C durante 16 h. El matraz de tres bocas se transfirió a un baño María con hielo a 0 °C y la temperatura interna se redujo a 0-10 °C. El sistema de reacción se transfirió a un filtro de sobremesa para la filtración por succión para obtener una torta de filtro, y la torta del filtro se lavó dos veces con agua (2 l). La filtración por succión continuó hasta que no se produjo ningún filtrado. Se le añadió dos veces AcOH (12 l) al matraz de tres bocas, se puso en marcha la agitación, y se añadieron la torta del filtro y la disolución de HCl a 6 M 55 preparada (12 l). La solución se calentó a 90-95 °C (la temperatura interna se mantuvo controlada a 75-80 °C). La solución se hizo reaccionar a 90-95 °C durante 48 horas y se tomaron muestras. Cuando la cantidad residual del **SM1** fue inferior al 2,0 %, se detuvo la reacción. La solución de reacción se enfrió a 0-10 °C, se filtró y la torta del

filtro se lavó dos veces con 5 l de agua para obtener un producto en bruto. El producto en bruto se añadió a acetonitrilo (8 l). La temperatura se elevó a 50-55 °C, y la solución se agitó durante 3 h. La mezcla se filtró mientras estaba caliente, y se recogió la torta del filtro. La torta del filtro se colocó en una campana de gases a 25-30 °C para secar durante 24 h. Se obtuvo el compuesto 1.

- 5 RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,86 - 7,80 (m, 4H), 7,80 - 7,75 (m, 2H), 6,76 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,92 - 4,82 (m, 2H), 4,56 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 2,28 - 2,15 (m, 1H), 1,45 (d, *J* = 6,5 Hz, 5H), 1,12 - 1,04 (m, 4H).

#### Etapa 10:

Se añadió NMP (1,34 l) a un matraz de tres bocas de 5 l a 20-25 °C, y se le añadió el **compuesto 1** (1,34 kg, 2,66 mol) con agitación, el sistema se convirtió en un sistema de suspensión y se calentó a 135-140 °C (la temperatura interna se mantuvo controlada a 120-125 °C). Se le añadió AgOAc (433,98 g, 2,66 mol) a la solución previamente mezclada, y el resultante se hizo reaccionar a 135-140 °C (la temperatura interna se mantuvo controlada a 120-125 °C) durante 16 h. Se le añadieron 0,2 eq de AgOAc (88,80 g, 0,48 mol) y se continuó manteniendo a 135-140 °C (la temperatura interna se mantuvo controlada a 120-125 °C) hasta que la reacción terminó. La solución se enfrió a 20-25 °C, se le añadió acetato de etilo (6,85 l) a la solución para diluirla, también se le añadieron carbón activado (543 g) y tierra de diatomeas (543 g). La mezcla se agitó durante 20 min y después se filtró a través de gel de sílice (543 g). La torta del filtro se lavó tres veces con acetato de etilo (6,85 l). El filtrado se lavó dos veces con una solución de tiosulfato de sodio al 10 % (6,85 l), una vez con una solución de hidróxido de sodio a 0,5 M (6,85 l) y finalmente dos veces con agua (6,85 l). La fase orgánica se secó a presión reducida mediante un evaporador rotatorio para obtener el producto en bruto. A 20-25 °C, se le añadieron acetato de etilo (2,64 l) y n-heptano (13,2 l) en un tambor de 25 l, después se le añadió el producto en bruto (2,64 kg, 5,73 mol). La mezcla se suspendió a 20-25 °C durante 16 h. La torta de filtración se recogió por filtración para obtener el **compuesto 2**.

- 20 RMN-<sup>1</sup>H (399 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,91 - 7,79 (m, 4H), 7,70 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,38 - 7,08 (m, 1H), 6,73 - 6,65 (m, 2H), 4,82 (quin, *J* = 6,6 Hz, 1H), 4,49 - 4,38 (m, 4H), 2,21 - 2,09 (m, 1H), 1,44 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H), 1,06 - 1,00 (m, 2H), 0,97 - 0,91 (m, 2H).

#### 25 Etapa 11:

Se añadió la solución de 2-MeTHF (6 l) a una caldera con camisa de temperatura alta-baja de 50 l a 20-25 °C. Se le añadió el **compuesto 2** (2 kg, 4,343 mol) con agitación. Se le añadieron agua (3 l) y etanolamina (2,652 kg, 43,43 mol) cuando el sistema se disolvió totalmente. El sistema se calentó a 75-80 °C (la temperatura interna se mantuvo controlada a 65-70 °C) y se hizo reaccionar a 75-80 °C (la temperatura interna se mantuvo controlada a 65-70 °C) durante 16 h. La solución de reacción se enfrió a 20-25 °C, después se dejó que se separan las fases del líquido y se recogió la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo una vez con solución de 2-MeTHF (6 l); se combinaron las fases orgánicas y se secaron a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en ácido clorhídrico a 3 N (6 l) y la solución acuosa se extrajo una vez con éter de metilo y terc-butilo (6 l) y dos veces con acetato de etilo (6 l). El pH de la solución acuosa se ajustó a más de 10 con la solución de hidróxido sódico a 1 M. La solución acuosa se extrajo dos veces con éter de metilo y terc-butilo (6 l) y se combinaron las fases orgánicas. La materia insoluble se retiró por filtración de la fase orgánica y la fase orgánica se secó a presión reducida mediante un evaporador rotatorio. La fase orgánica se disolvió después en la solución de 2-MeTHF (6 l), se lavó una vez con la solución de hidróxido sódico a 0,5 M (6 l) y dos veces con agua (6 l). Se recogió la fase orgánica y se secó a presión reducida mediante un evaporador rotatorio. El producto en bruto se añadió a un matraz de una sola boca de 5 l, después se le añadieron acetato de etilo (2,86 l) e isopropanol (2,86 l). La temperatura externa se mantuvo controlada a 70-75 °C, y la mezcla se agitó y se disolvió durante 10 min. La mezcla anterior se filtró mientras estaba caliente, y se eliminó la materia insoluble. Se recogió el filtrado. A 70-75 °C, se le añadieron acetato de etilo (1,43 l) e isopropanol (1,43 l) y se le añadió gota a gota una solución de clorhidrato de isopropanol (1,086 l) al filtrado. Después de la adición, la mezcla se enfrió a 50-55 °C y hizo reaccionar a 50-55 °C durante 2 h. Cuando terminó la reacción, la solución se enfrió a 20-25 °C y se filtró. La torta del filtro se lavó dos veces con acetato de etilo (1,43 l) para obtener un producto en bruto. El producto en bruto sólido y el acetato de etilo (4,29 l) se añadieron a un matraz de tres bocas único de 3 l a 20-25 °C, y la mezcla se agitó a 20-25 °C durante 16 h, y se filtró para obtener el sólido. El sólido, el acetato de etilo (2,15 l) y el metanol (2,15 l) se añadieron a un matraz de tres bocas de 3 l a 20-25 °C y se agitaron a 20-25 °C durante 16 h. Se obtuvo el **compuesto de fórmula (IV)** por filtración.

- 50 RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,46 (br s, 3H), 8,00 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,47 - 7,19 (m, 1H), 7,10 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 4,92 (td, *J* = 6,6, 13,1 Hz, 1H), 4,71 (d, *J* = 3,1 Hz, 2H), 3,59 (br d, *J* = 4,6 Hz, 2H), 2,36 - 2,26 (m, 1H), 1,47 (d, *J* = 6,5 Hz, 5H), 1,22 (br d, *J* = 2,6 Hz, 2H), 1,17 - 1,09 (m, 2H)

#### Ejemplo 2: Análisis de difracción de rayos X de monocristal del compuesto de fórmula (IV)

55 Procedimiento de preparación de monocristales: la muestra se disolvió en 1 ml de diclorometano/metanol (1:1) a temperatura ambiente. La solución de muestreo se colocó en una botella de muestreo semisellada de 4 ml y se evaporó lentamente a temperatura ambiente. Al día siguiente se obtuvieron una gran cantidad de cristales incoloros. El diagrama elipsoidal de la estructura tridimensional del compuesto de fórmula (IV) se muestra en la figura 4. Los datos de la estructura cristalina y los parámetros del compuesto de fórmula (I) se muestran en las tablas 2, 3, 4, 5 y 6.

**Tabla 2.** Datos de cristales del compuesto de fórmula (IV)

Tamaño del cristal	0,20 × 0,10 × 0,04 mm <sup>3</sup>
Tipo de radiación	Cu K $\alpha$ ( $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$ )
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /n
Tamaño de las células	a = 8,28140(10) $\text{\AA}$ b = 28,8396(3) $\text{\AA}$ c = 8,53030(10) $\text{\AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 107,9200(10)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Volumen celular	V = 1938,47(4) $\text{\AA}^3$
Unidades de fórmula celular	Z = 4
Densidad cristalina	D <sub>c</sub> = 1,382 Mg/m <sup>3</sup>
Cristal F(000)	848,0
Coefficiente de absorción $\mu$	$\mu(\text{Cu K}\alpha) = 3,221 \text{ mm}^{-1}$
Índices de limitación	-9 ≤ h ≤ 9 -34 ≤ k ≤ 34 -10 ≤ l ≤ 8
Temperatura de medición celular	T = 99,99 (11) K
Intervalo 2 $\theta$ para la recogida de datos	6,13 a 133,198°
Bondad de ajuste en F <sup>2</sup>	1,103
Índices R finales [ $l > 2\sigma(l)$ ]	R <sub>1</sub> = 0,0471, wR <sub>2</sub> = 0,1179
Índices R (todos los datos)	R <sub>1</sub> = 0,0494, wR <sub>2</sub> = 0,1198
Pico y hueco de mayor diff.	0,59 y -0,37 e. $\text{\AA}^{-3}$
Reflexiones recogidas/únicas	69088 / 3421 [R <sub>(int)</sub> = 0,0898]

**Tabla 3.** Coordenadas atómicas ( $\times 10^4$ ) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) del cristal del compuesto de fórmula (IV)

	x	y	z	U (eq)
Cl(2)	7011,4(8)	7783,5(2)	13110,2(7)	18,93(17)
F(1)	8152(2)	7832,6(5)	8261(2)	27,2(4)
O(1)	6213(2)	6329,9(6)	7217(2)	19,0(4)
N(1)	1869(3)	4411,7(7)	5275(3)	14,9(4)
N(2)	-12(3)	4419,0(7)	2907(3)	15,2(4)
N(3)	760(3)	4846,1(7)	3072(3)	15,4(4)
N(4)	5759(3)	7011,9(8)	10443(3)	19,1(5)
C(8)	1911(3)	4832,0(8)	4533(3)	14,2(5)
C(11)	5379(3)	5556,7(9)	7373(3)	16,7(5)

	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>	<b>U (eq)</b>
C(9)	3049(3)	5217,9(9)	5234(3)	14,3(5)
C(4)	648(3)	4155,3(9)	4232(3)	15,6(5)
C(10)	4336(3)	5180,4(9)	6741(3)	16,0(5)
C(16)	6696(3)	7127,8(9)	7944(3)	16,7(5)
C(12)	5143(3)	5973,7(9)	6509(3)	15,5(5)
C(13)	3889(3)	6010,2(9)	4989(3)	18,7(5)
C(18)	7188(3)	7495,3(9)	7302(3)	20,0(6)
C(15)	5541(3)	6789,7(9)	6784(3)	16,9(5)
C(14)	2852(3)	5633,9(9)	4367(3)	17,7(5)
C(5)	-1357(3)	4290,5(9)	1366(3)	17,0(5)
C(3)	135(3)	3685,4(9)	4456(3)	18,2(5)
C(1)	212(4)	3510,1(9)	6155(3)	21,9(6)
C(2)	1447(4)	3332,1(9)	5351(3)	21,2(6)
C(17)	7227(3)	7033,8(10)	9762(3)	20,7(6)
C(7)	-2110(3)	4722,7(10)	395(3)	21,9(6)
C(6)	-633(4)	3958(1)	362(3)	24,4(6)
Cl(1)	4148,9(9)	4026,1(2)	8556,6(8)	23,69(18)

**Tabla 4.** Longitud de enlace (Å) del compuesto de fórmula (IV)

	Longitud de enlace/Å		Longitud de enlace/Å
F(1)-C(18)	1,360(3)	C(9)-C(10)	1,398(4)
O(1)-C(12)	1,370(3)	C(9)-C(14)	1,393(4)
O(1)-C(15)	1,442(3)	C(4)-C(3)	1,450(4)
N(1)-C(8)	1,373(3)	C(16)-C(18)	1,314(4)
N(1)-C(4)	1,344(3)	C(16)-C(15)	1,504(3)
N(2)-N(3)	1,375(3)	C(16)-C(17)	1,500(4)
N(2)-C(4)	1,332(3)	C(12)-C(13)	1,393(4)
N(2)-C(5)	1,485(3)	C(13)-C(14)	1,384(4)
N(3)-C(8)	1,316(3)	C(5)-C(7)	1,520(4)
N(4)-C(17)	1,501(3)	C(5)-C(6)	1,526(4)

	Longitud de enlace/Å		Longitud de enlace/Å
C(8)-C(9)	1,462(3)	C(3)-C(1)	1,518(4)
C(11)-C(10)	1,389(4)	C(3)-C(2)	1,514(4)
C(11)-C(12)	1,393(4)	C(1)-C(2)	1,487(4)

**Tabla 5.** Ángulo de enlace (°) del compuesto de fórmula (IV)

	Ángulo de enlace/°		Ángulo de enlace/°
C(12)-O(1)-C(15)	115,50(19)	C(18)-C(16)-C(17)	123,1(2)
C(4)-N(1)-C(8)	107,5(2)	C(17)-C(16)-C(15)	119,2(2)
N(3)-N(2)-C(5)	120,82(19)	O(1)-C(12)-C(11)	116,6(2)
C(4)-N(2)-N(3)	111,6(2)	O(1)-C(12)-C(13)	123,4(2)
C(4)-N(2)-C(5)	127,5(2)	C(11)-C(12)-C(13)	120,1(2)
C(8)-N(3)-N(2)	104,3(2)	C(14)-C(13)-C(12)	119,6(2)
N(1)-C(8)-C(9)	126,0(2)	C(16)-C(18)-F(1)	121,7(2)
N(3)-C(8)-N(1)	110,5(2)	O(1)-C(15)-C(16)	108,1(2)
N(3)-C(8)-C(9)	123,5(2)	C(13)-C(14)-C(9)	120,9(2)
C(10)-C(11)-C(12)	120,0(2)	N(2)-C(5)-C(7)	110,4(2)
C(10)-C(9)-C(8)	122,0(2)	N(2)-C(5)-C(6)	109,7(2)
C(14)-C(9)-C(8)	118,9(2)	C(7)-C(5)-C(6)	112,1(2)
C(14)-C(9)-C(10)	119,1(2)	C(4)-C(3)-C(1)	120,6(2)
N(1)-C(4)-C(3)	128,2(2)	C(4)-C(3)-C(2)	120,1(2)
N(2)-C(4)-N(1)	106,1(2)	C(2)-C(3)-C(1)	58,73(17)
N(2)-C(4)-C(3)	125,8(2)	C(2)-C(1)-C(3)	60,51(17)
C(11)-C(10)-C(9)	120,2(2)	C(1)-C(2)-C(3)	60,75(18)
C(18)-C(16)-C(15)	117,7(2)	C(16)-C(17)-N(4)	113,2(2)

**Tabla 6.** Ángulo de torsión (°) del compuesto de fórmula (IV)

	Ángulo de torsión/°		Ángulo de torsión/°
O(1)-C(12)-C(13)-C(14)	-179,5(2)	C(4)-N(2)-C(5)-C(7)	163,0(2)
N(1)-C(8)-C(9)-C(10)	4,8(4)	C(4)-N(2)-C(5)-C(6)	-73,1(3)
N(1)-C(8)-C(9)-C(14)	-175,7(2)	C(4)-C(3)-C(1)-C(2)	-108,8(3)
N(1)-C(4)-C(3)-C(1)	33,3(4)	C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	109,6(3)
N(1)-C(4)-C(3)-C(2)	-35,9(4)	C(10)-C(11)-C(12)-O(1)	179,5(2)
N(2)-N(3)-C(8)-N(1)	-0,2(3)	C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-1,6(4)

	Ángulo de torsión/°		Ángulo de torsión/°
N(2)-N(3)-C(8)-C(9)	-179,9(2)	C(10)-C(9)-C(14)-C(13)	-1,1(4)
N(2)-C(4)-C(3)-C(1)	-147,4(3)	C(12)-O(1)-C(15)-C(16)	167,3(2)
N(2)-C(4)-C(3)-C(2)	143,3(3)	C(12)-C(11)-C(10)-C(9)	0,1(4)
N(3)-N(2)-C(4)-N(1)	-0,1(3)	C(12)-C(13)-C(14)-C(9)	-0,3(4)
N(3)-N(2)-C(4)-C(3)	-179,5(2)	C(18)-C(16)-C(15)-O(1)	131,7(2)
N(3)-N(2)-C(5)-C(7)	-19,8(3)	C(18)-C(16)-C(17)-N(4)	118,9(3)
N(3)-N(2)-C(5)-C(6)	104,1(3)	C(15)-O(1)-C(12)-C(11)	-152,8(2)
N(3)-C(8)-C(9)-C(10)	-175,5(2)	C(15)-O(1)-C(12)-C(13)	28,4(3)
N(3)-C(8)-C(9)-C(14)	4,0(4)	C(15)-C(16)-C(18)-F(1)	176,2(2)
C(8)-N(1)-C(4)-N(2)	0,0(3)	C(15)-C(16)-O(17)-N(4)	-60,9(3)
C(8)-N(1)-C(4)-C(3)	179,4(2)	C(14)-C(9)-C(10)-C(11)	1,2(4)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-179,3(2)	C(5)-N(2)-N(3)-C(8)	-177,4(2)
C(8)-C(9)-C(14)-C(13)	179,4(2)	C(5)-N(2)-C(4)-N(1)	177,2(2)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	1,7(4)	C(5)-N(2)-C(4)-C(3)	-2,2(4)
C(4)-N(1)-C(8)-N(3)	0,1(3)	C(17)-C(16)-C(18)-F(1)	-3,6(4)
C(4)-N(1)-C(8)-C(9)	179,8(2)	C(17)-C(16)-C(15)-O(1)	-48,5(3)
C(4)-N(2)-N(3)-C(8)	0,2(3)		

### Ejemplo 3: Preparación de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV)

5 El compuesto de fórmula (IV) (50 mg) se añadió a éter de metilo y terc-butilo (1 ml) y se suspendió a 50 °C durante 48 h. La mezcla se enfrió a 20-25 °C y se filtró, y se recogió el sólido. El sólido se secó al vacío a 40 °C durante 48 h para obtener la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV).

### Ejemplo 4: Estudio de la estabilidad de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV)

10 Se usó una balanza electrónica para pesar con precisión 60 mg de muestra de la forma cristalina B del compuesto (IV) (3 muestras en paralelo para cada condición de ensayo de estabilidad). Las muestras se colocaron en un vaso de precipitados de 5 ml seco y limpio, y se extendieron en una capa fina. La lámina de aluminio se perforó con agujeros y se colocó en el vaso de precipitados, fijada con bandas de caucho. El vaso de precipitados se colocó en el entorno de diversas condiciones de ensayo de estabilidad y permaneció para la toma de muestras en el momento de la investigación. Las muestras se investigaron a 60 °C (5 días, 10 días), 25 °C/92,5 % RH (5 días, 10 días), 40 °C/75 % RH (un mes, dos meses, tres meses), 60 °C/75 % RH (un mes, dos meses) y condiciones de luz (10 días). Se usó la difracción de rayos X de muestras en polvo (XRPD) para caracterizar el sólido en las diversas condiciones.

15 **Tabla 7.** Resultados de la prueba de estabilidad en sólido de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV)

Condición de prueba	Punto de tiempo	Forma cristalina
-	0 días	B
Alta temperatura (60°C, abierta)	5 días	B
	10 días	B
Humedad elevada (temperatura ambiente/humedad relativa del 92,5 %, abierta)	5 días	B
	10 días	B
Alta temperatura y alta humedad (40 °C/humedad relativa del 75 %, abierta)	1 mes	B
	2 meses	B
	3 meses	B

Condición de prueba	Punto de tiempo	Forma cristalina
Alta temperatura y alta humedad (60°C/humedad relativa del 75 %, abierta)	1 mes	B
	2 meses	B
Luz (iluminancia total = $1,2 \times 10^6$ lux, ultravioleta cercano = $200 \text{ W h m}^{-2}$ , sellado)	10 días	B

Conclusión: la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) tiene buena estabilidad a alta temperatura, alta humedad y en condiciones de luz fuerte.

#### Ejemplo experimental 1: ensayo *in vitro*

##### 5 Ensayo de la actividad enzimática de la VAP-1 humana

Se usó el kit Amplex® Red para la monoamina oxidasa (Invitrogen #A12214) para determinar los efectos inhibidores de la muestra sobre la actividad enzimática de VAP-1. Se añadieron 100 nl del compuesto de ensayo (el disolvente era DMSO) que se había diluido en gradiente a una placa de 384 pocillos. Se le añadieron 25 µl de la solución de la enzima VAP-1 a 10 nM, y la solución se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla del sustrato a la que se había añadido la enzima VAP-1 (Amplex Red a 200 µM, HRP a 1 U/ml, bencilamina a 1 mM) se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. Después de la incubación, la señal de fluorescencia se leyó con un lector de microplacas Envision (la longitud de onda de la luz de excitación es 530-560 nm, la longitud de onda de la luz de emisión es 590 nm). El valor de la señal de fluorescencia después de eliminar el ruido de fondo se analizó con el programa Prism. Se calculó la  $CI_{50}$  de la muestra de la enzima VAP-1.

15 **Tabla 8.** Resultado del ensayo de cribado *in vitro* para el compuesto de fórmula (IV)

Compuesto	$CI_{50}$ (nM) de la actividad inhibidora de la enzima VAP-1/SSAO recombinante humana
Compuesto de fórmula (IV)	1,2
Forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV)	$0,71 \pm 0,21$

Conclusión: el compuesto de fórmula (IV) y su forma cristalina B mostraron una fuerte actividad inhibidora contra la enzima VAP-1/SSAO recombinante humana en un ensayo *in vitro*.

#### Ejemplo experimental 2: Ensayo de actividad celular de VAP-1

20 Se usó el kit Amplex® Red para la monoamina oxidasa (Invitrogen #A12214) para determinar el efecto inhibidor de la muestra sobre la actividad enzimática de VAP-1.

##### Preparación celular

25 Las células HUVEC o CHO se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 0,8 M/pocillo, se colocaron en una incubadora con  $CO_2$  al 5 % a 37 °C durante 24 h, y luego se transfectaron con el reactivo Lipo2000 y el plásmido VAP-1/pCDNA (3.1). El medio se cambió al cabo de 5 h (el Lipo2000 es tóxico para las células). Después de 24 h, las células se digirieron y se sembraron en una placa de 384 pocillos a una densidad de 25 µl, 10 000 células/pocillo, 6-7 h, y el medio celular se cambió al medio sin FBS y la placa con las células se colocó en una incubadora con  $CO_2$  al 5 % a 37 °C durante la noche.

##### Determinación de la concentración inhibitoria mediana del compuesto

30 1) Dilución del compuesto: dilución seriada de 4 veces con DMSO al 100% y diluida a 10 puntos. La concentración inicial del compuesto de ensayo fue de 0,5 mM (la concentración final fue de 1 µM); se usó ECHO para transferir 100 nl de la solución del compuesto a una placa para detección de células de 384 pocillos. Pocillo de control negativo: 100 nl de DMSO; pocillo de control del ruido de fondo: 100 nl de DMSO + 25 µl de medio.

2) La reacción se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente y protegida de la luz.

35

3) Preparación de la solución de trabajo del sustrato de reactivo Amplex Red + HRP + bencilamina:

Solución de trabajo del sustrato de reactivo Amplex Red + HRP + bencilamina (reactivo Amplex Red a 200  $\mu$ M + HRP a 1 U/ml + bencilamina a 1 mM): a 4,3875 ml de tampón de reacción a 1X se le añadieron 45  $\mu$ l de la solución concentrada del reactivo Amplex Red a 20 mM, 22,5  $\mu$ l de la solución concentrada de peroxidasa de rábano picante (HRP) a 200 U/ml y 45  $\mu$ l de bencilamina a 100 mM.

4) Al cabo de 30 min, a una placa de 384 pocillos se le añadieron 25  $\mu$ l de la solución de trabajo de sustrato. La concentración final fue reactivo Amplex Red a 100  $\mu$ M + HRP a 0,5 U/ml + bencilamina a 0,5 mM.

5) La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y se protegió de la luz durante 60 min, y el valor de fluorescencia se midió con Envision: la longitud de onda de excitación fue de 535 nm, y la longitud de onda de emisión fue de 590 nm.

6) Fórmula para calcular la tasa de inhibición: tasa de inhibición (%) =  $(1 - (\text{pocillo experimental sin ruido de fondo} - \text{pocillo de control positivo sin ruido de fondo}) / (\text{pocillo de control negativo sin ruido de fondo} - \text{pocillo de control positivo sin ruido de fondo})) \times 100$

7) Se usó Prism para analizar los datos, y se calculó la  $CI_{50}$  de la muestra contra las células VAP-1.

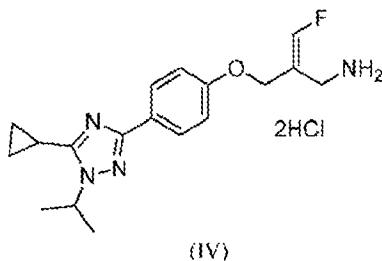
**Tabla 9.** Resultados del ensayo de cribado *in vitro* de los compuestos de la presente invención

Compuesto	$CI_{50}$ (nM) del ensayo de actividad celular de VAP-1/SSAO
Compuesto de fórmula (IV)	1,3
Forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV)	2,2 $\pm$ 1,49

Conclusión: el compuesto de fórmula (IV) y su forma cristalina B mostraron una fuerte actividad inhibidora contra las células VAP-1/SSAO en los ensayos *in vitro*.

## REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV), en donde su patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\Theta$ :  $11,27 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,32 \pm 0,2^\circ$ ;



5 2. La forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) según se define en la reivindicación 1, en donde su patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\Theta$ :  $11,27 \pm 0,2^\circ$ ,  $12,46 \pm 0,2^\circ$ ,  $18,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,32 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,51 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,94 \pm 0,2^\circ$ ,  $26,49 \pm 0,2^\circ$ .

10 3. La forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) según se define en la reivindicación 2, en donde su patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\Theta$ :  $11,27 \pm 0,2^\circ$ ,  $12,46 \pm 0,2^\circ$ ,  $18,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,03 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,44 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,32 \pm 0,2^\circ$ ,  $23,37 \pm 0,2^\circ$ ,  $24,19 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,51 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,94 \pm 0,2^\circ$ ,  $26,49 \pm 0,2^\circ$ ,  $28,12 \pm 0,2^\circ$ ;

y/o, su curva calorimétrica diferencial de barrido presenta un pico endotérmico a  $221,9 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

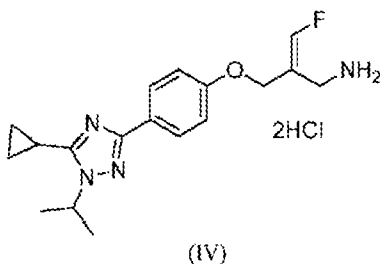
y/o, su curva de termogravimetría muestra una pérdida de peso del 1,05 % a  $150,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ .

15 4. Un método de preparación de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (IV) según se define en la reivindicación 1, que comprende añadir una cualquiera de las formas del compuesto de fórmula (IV) a éter de metilo y terc-butilo para preparar una suspensión, en donde la temperatura para preparar una suspensión varía de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

el tiempo utilizado para preparar una suspensión está comprendido entre 30 h y 60 h;

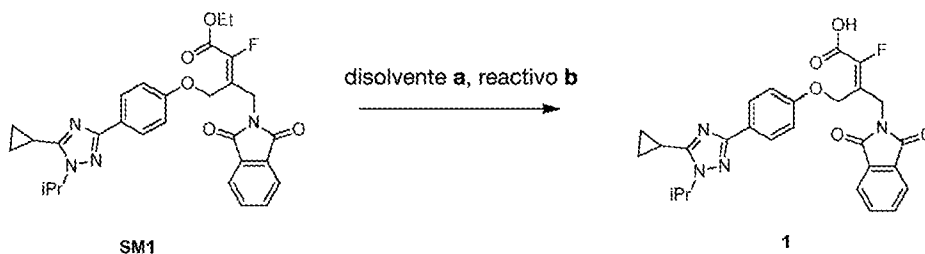
la relación peso-volumen del compuesto de fórmula (IV) por éter de metilo y terc-butilo varía de 1:5-40.

5. Un método de preparación del compuesto de fórmula (IV),



20

que comprende las etapas siguientes:



en donde,

el disolvente a es ácido acético;

25

el reactivo b es ácido clorhídrico.



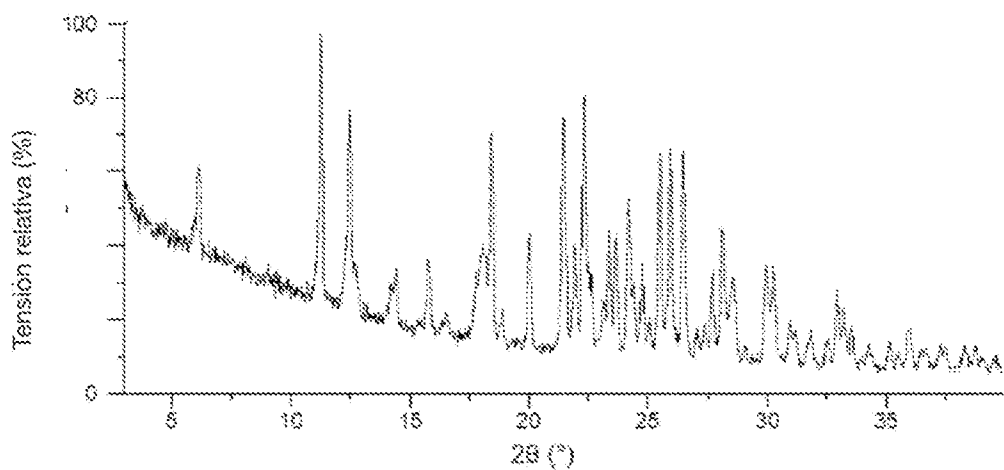


Figura 1

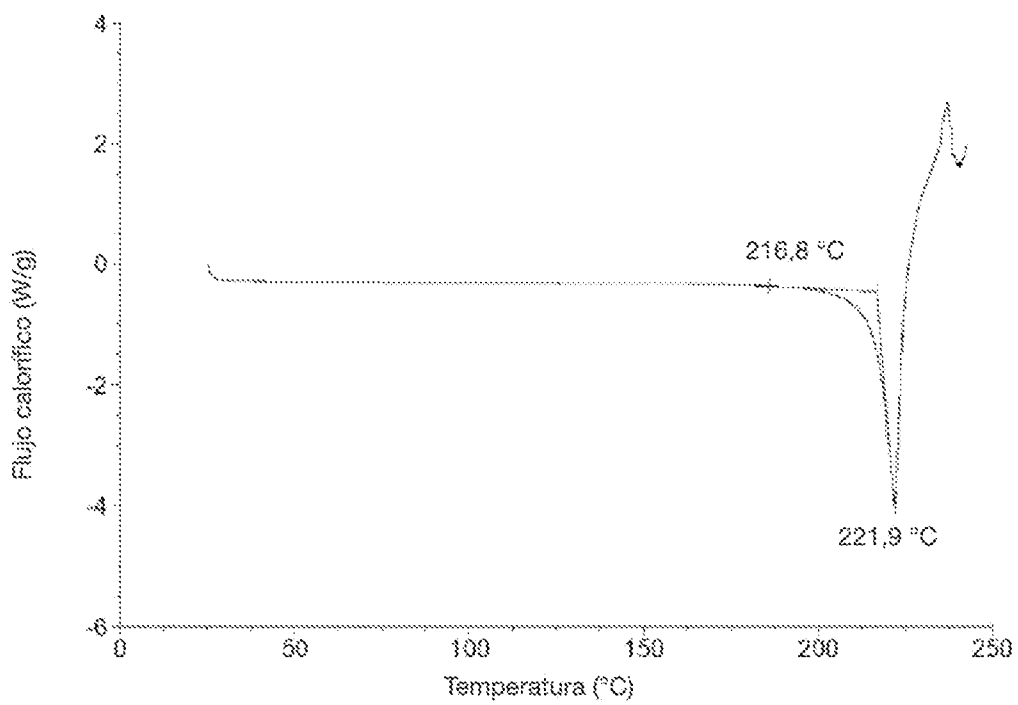


Figura 2

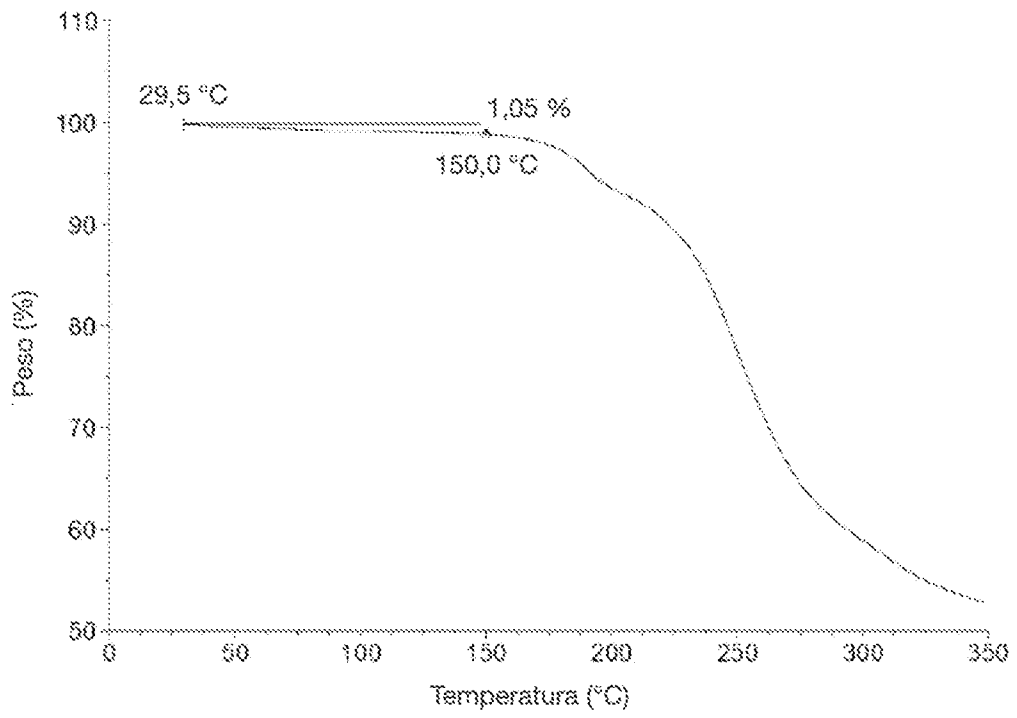


Figura 3

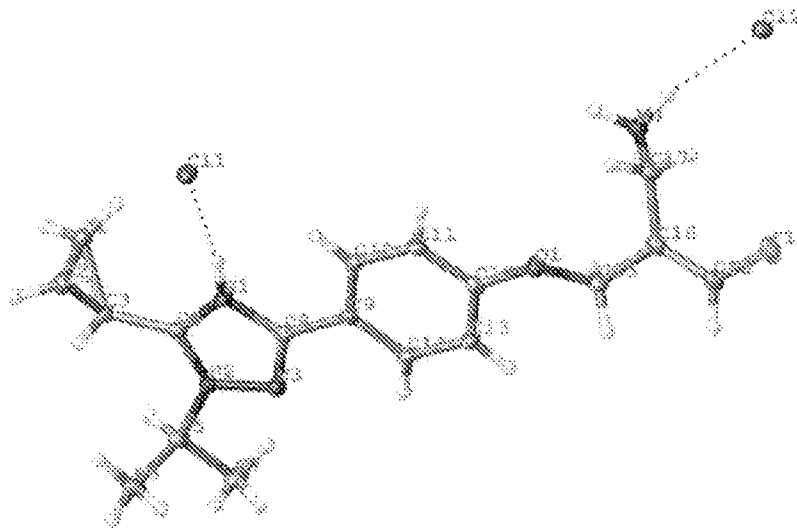


Figura 4