

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 293**

51 Int. Cl.:

C07D 413/14 (2006.01)

A61K 31/422 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2013 PCT/JP2013/051857**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13115162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2013 E 13743422 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2810943**

54 Título: **Derivado de sitaxentán**

30 Prioridad:

31.01.2012 US 201261592923 P

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

25.01.2018

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
4-6-10 Koishikawa Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**TANAKA KEIGO y
NISHIOKA TOMOKI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

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

ES 2 651 293 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

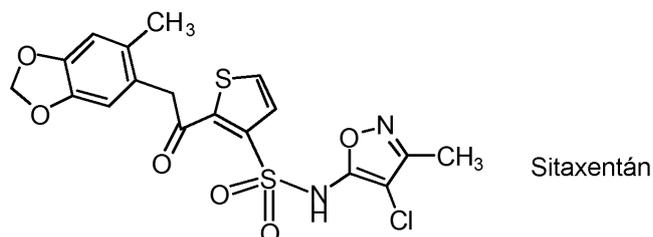
Derivado de sitaxentán

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un compuesto con un anillo ftalánico. Más específicamente, se refiere a *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

Antecedentes de la técnica

10 Los compuestos de tipo tienilsulfonamida se sabe que son antagonistas de receptores de endotelinas. Por ejemplo, el sitaxentán, conocido también como *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-2*H*-1,3-benzodioxol-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, es un compuesto que se ha comercializado por su efectividad para la hipertensión arterial pulmonar y otras afecciones (referencia 1 de la bibliografía de patentes).



15 Sin embargo, la estructura del sitaxentán incluye un anillo benzodioxólico y, en general, los compuestos con estos anillos benzodioxólicos se convierten en metabolitos muy reactivos químicamente cuando son metabolizados por el citocromo P450 (CYP), y se sabe que inhiben de forma irreversible la actividad de CYP por inactivación debido a la unión covalente con CYP (referencias 1-3 de la bibliografía no relacionada con patentes). El sitaxentán se sabe que presenta actividad inhibitoria de CYP y existen varios informes sobre sus interacciones farmacológicas con medicamentos de uso clínico. Para resolver este problema, se ha desarrollado un compuesto con un átomo de deuterio que sustituye a un átomo de hidrógeno en el carbono metilénico del grupo benzodioxolilo del sitaxentán, pero este tipo de compuesto aún no se comercializa y sus efectos no han sido satisfactorios (referencia 2 de la bibliografía de patentes). Además, se sabe que los compuestos que contienen deuterio suelen requerir costos de producción más elevados. Por consiguiente, para resolver este problema se necesita un método que no emplee deuterio.

Lista de citas**25 Bibliografía de patentes**

[Referencia 1 de la bibliografía de patentes] WO 96/31492

[Referencia 2 de la bibliografía de patentes] WO 2008/124803

Bibliografía no relacionada con patentes

30 [Referencia 1 de la bibliografía no relacionada con patentes] *Pharmacological reviews* 42, 85, 1990 (Selectivity in the inhibition of Mammalian Cytochrome P-450 by Chemical Agents)

[Referencia 2 de la bibliografía no relacionada con patentes] *Current Drug Metabolism*, 6, 413, 2005

[Referencia 3 de la bibliografía no relacionada con patentes] *Drug Metabolism and Disposition* 31, 289, 2003

Resumen de la invención**Problema técnico**

35 Es un objeto de la presente invención proporcionar un compuesto que retenga el efecto terapéutico principal del sitaxentán y que tenga un efecto inhibitorio de CYP mejorado así como también una estructura que no contenga deuterio.

Solución al problema

40 Como resultado de estudios intensivos, los presentes inventores han descubierto la presente invención. Específicamente, la presente invención se refiere a los siguientes apartados [1]-[3].

[1] *N*-(4-Cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida o una sal

farmacológicamente aceptable de esta.

[2] Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal farmacológicamente aceptable de este de acuerdo con el apartado [1].

5 [3] El compuesto o la sal farmacológicamente aceptable de este de acuerdo con el apartado [1] o la composición farmacéutica de acuerdo con el apartado [2] para su uso con el fin de tratar o prevenir la hipertensión arterial pulmonar.

Ventajas de la invención

10 *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida o una sal farmacológicamente aceptable de esta retiene el efecto terapéutico principal del sitaxentán y tiene un efecto inhibitorio de CYP mejorado en comparación con el sitaxentán.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que muestra la activación dependiente de la dosis (elevación de Ca^{2+}) por parte de un ligando (endotelina) en células EDNRA/293, mostrándose la activación (elevación de Ca^{2+}) en el eje vertical y la concentración de endotelina (nM) en el horizontal;

15 La Fig. 2 es una gráfica que muestra la supresión dependiente de la dosis de la elevación de Ca^{2+} en células EDNRA/293 por parte del sitaxentán, la elevación de Ca^{2+} relativa, correspondiendo el 100% al valor sin sitaxentán, se muestra en el eje vertical, mientras que la concentración de sitaxentán (nM) se muestra en el eje horizontal y las concentraciones de endotelina (nM) se muestran a la derecha de la gráfica; y

20 La Fig. 3 es una gráfica que muestra la supresión dependiente de la dosis de la elevación de Ca^{2+} en células EDNRA/293 por parte del compuesto del Ejemplo 1, la elevación de Ca^{2+} relativa, correspondiendo el 100% al valor sin el compuesto del Ejemplo 1, se muestra en el eje vertical, mientras que la concentración del compuesto del Ejemplo 1 (nM) se muestra en el eje horizontal y las concentraciones de endotelina (nM) se muestran a la derecha de la gráfica.

Descripción de las realizaciones

25 A continuación se describirá la presente invención detalladamente.

En la presente memoria descriptiva, la presente invención no se limita a una forma cristalina particular sino que puede incluir cualquiera de las formas cristalinas o mezclas de estas, aunque puedan existir polimorfos cristalinos. La presente invención también incluye las formas amorfas y el compuesto de acuerdo con la presente invención incluye anhídridos e hidratos.

30 A continuación, se explican los significados de los términos, símbolos y similares utilizados en la presente memoria descriptiva, y la presente invención se explica detalladamente.

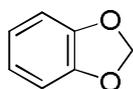
En la presente memoria descriptiva, el término "CYP" es la enzima metabolizadora de fármacos citocromo P450.

35 En la presente memoria descriptiva, la expresión "mejorar el efecto inhibitorio de CYP" o "efecto inhibitorio de CYP mejorado" quiere decir que el grado de inhibición de una o dos de entre cinco moléculas CYP (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4), las moléculas CYP principales, es mejor por lo general que el del sitaxentán.

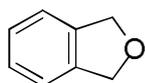
En la presente memoria descriptiva, la expresión "retiene el principal efecto terapéutico" quiere decir que presenta actividad farmacológica *in vitro* o *in vivo* en estudios preclínicos, y se espera que presente efecto terapéutico clínico al igual que el sitaxentán. La actividad farmacológica *in vitro* se refiere, por ejemplo, a la supresión de actividad con respecto al receptor A de endotelina.

40 En la presente memoria descriptiva, el término "IC₅₀" se refiere a la concentración que produce el 50% de inhibición o concentración inhibitoria media.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "anillo benzodioxólico" es un anillo o grupo funcional con la siguiente estructura:



45 En la presente memoria descriptiva, la expresión "anillo ftalánico" se refiere a un anillo o grupo funcional con la siguiente estructura:



En la presente memoria descriptiva, la expresión "sal farmacológicamente aceptable" no está particularmente limitada, siempre que forme una sal con *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida de acuerdo con la presente invención, y sea farmacológicamente aceptable, y los ejemplos incluyen sales de adición de ácidos inorgánicos, sales de adición de ácidos orgánicos, sales de adición de bases inorgánicas, sales de adición de bases orgánicas y sales de adición de aminoácidos ácidos o básicos.

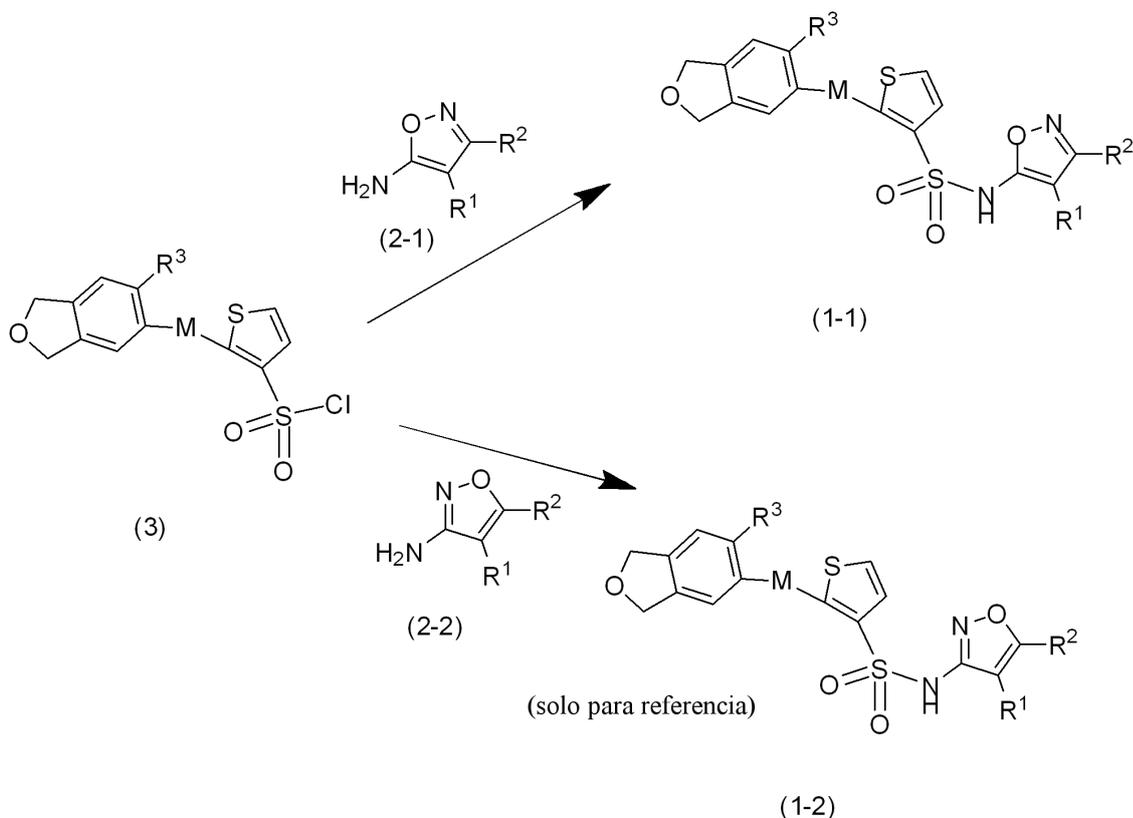
Los ejemplos preferidos de sales de adición de ácidos inorgánicos incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, nitratos y fosfatos, y los ejemplos preferidos de sales de adición de ácidos orgánicos incluyen acetatos, succinatos, fumaratos, maleatos, tartratos, citratos, lactatos, estearatos, benzoatos, mandelatos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, *p*-toluenosulfonatos y bencenosulfonatos.

Los ejemplos preferidos de sales de adición de bases inorgánicas incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y sales de potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y sales de magnesio, sales de aluminio y sales de amonio, y los ejemplos preferidos de sales de adición de bases orgánicas incluyen sales de dietilamina, sales de dietanolamina, sales de meglumina y sales de *N,N'*-dibenciletilendiamina.

Los ejemplos preferidos de sales de adición de aminoácidos ácidos incluyen aspartatos y glutamatos, y los ejemplos preferidos de sales de adición de aminoácidos básicos incluyen sales de arginina, sales de lisina y sales de ornitina.

El compuesto reivindicado que corresponde a la fórmula (1-1) se puede producir mediante los métodos que se describen a continuación con mejoras realizadas por un experto en la técnica basándose en conocimientos generales. Sin embargo, el método para producir el compuesto reivindicado no se limita a estos.

Proceso A



donde R^1 , R^2 , R^3 y M son como se han definido para el compuesto reivindicado.

Este proceso es un proceso mediante el cual el Compuesto (1-1) se obtiene mediante una reacción de condensación de un compuesto de tipo cloruro de sulfonilo (3) con un compuesto aminoisoxazólico (2-1) en presencia o ausencia de un disolvente, en presencia de una base, y en presencia o ausencia de un catalizador.

El disolvente empleado no está particularmente limitado, siempre que disuelva los materiales de partida en cierta

medida sin inhibir la reacción, e incluye, por ejemplo, tetrahidrofurano y piridina.

La base empleada incluye, por ejemplo, hidruro de sodio o piridina.

Se puede emplear 4-dimetilaminopiridina o similar como catalizador.

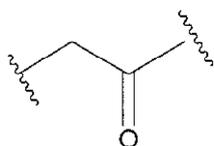
5 La temperatura de reacción difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similares, pero normalmente está comprendida entre 0°C y 120°C, y preferentemente entre 15°C y 100°C.

El tiempo de reacción difiere dependiendo de los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendido entre 10 minutos y 5 días, y preferentemente entre 1 hora y 3 días.

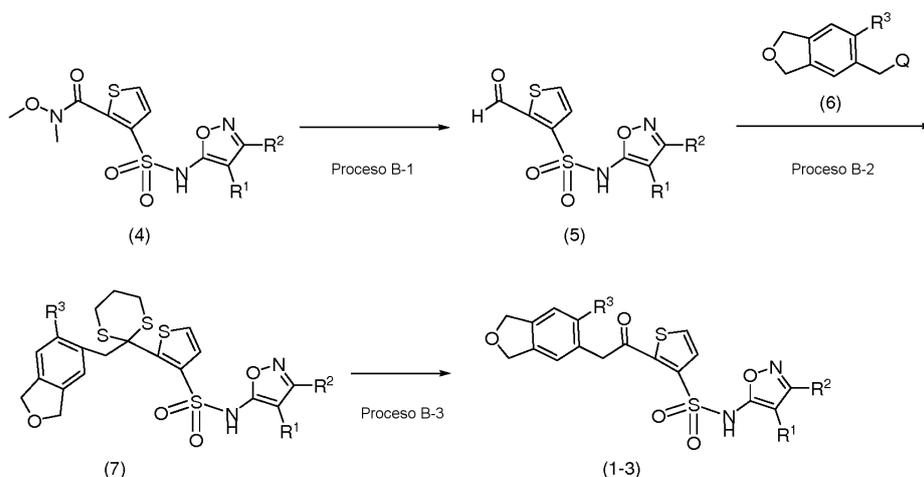
10 El compuesto de tipo cloruro de sulfonilo (3) y el compuesto aminoisoxazólico (2-1) o (2-2) pueden ser productos comerciales, o se pueden utilizar los que se describen en los siguientes ejemplos, o los compuestos se pueden sintetizar mediante métodos con los que estarán familiarizados los expertos en la técnica (por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.ºs 4659369, 4861366 y 4753672).

Proceso B

Cuando M en el Compuesto (1-1) sea el grupo representado por:



15 el Compuesto (1-1) se puede obtener mediante el Proceso B que se indica a continuación.



20 donde R¹, R² y R³ son como se han definido anteriormente; y Q es un grupo saliente que incluye un átomo halógeno tal como un átomo de bromo, un átomo de cloro y un átomo de yodo, un grupo alcanosulfoniloxi C₁₋₄ tal como un grupo metanosulfoniloxi y un grupo sulfoniloxi tal como un grupo bencenosulfoniloxi y un grupo *p*-toluenosulfoniloxi.

El Compuesto (4) y el Compuesto (6) pueden ser compuestos conocidos o pueden ser compuestos que un experto en la técnica puede producir mediante métodos habituales a partir de compuestos conocidos.

Proceso B-1

25 Este proceso es un proceso para convertir el Compuesto (4) en el Compuesto (5) utilizando un agente reductor en presencia de un disolvente.

El disolvente empleado no está particularmente limitado, siempre que disuelva los materiales de partida en cierta medida sin inhibir la reacción, e incluye, por ejemplo, tetrahidrofurano.

El agente reductor empleado incluye, por ejemplo, hidruro de diisobutilaluminio.

La temperatura de reacción difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendida entre -78°C y 100°C , y preferentemente entre -78°C y temperatura ambiente.

El tiempo de reacción difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendido entre 10 minutos y 5 días, y preferentemente entre 30 minutos y 1 día.

5 Proceso B-2

Este proceso es un proceso que consiste en convertir primero el grupo formilo del Compuesto (5) en ditiano con 1,3-propanoditiol, a continuación utilizar una base para generar un anión en el ditiano y a continuación hacer que este reaccione con el Compuesto (6) para obtener el Compuesto (7). También se puede añadir un ácido de Lewis para obtener mejores resultados durante la conversión en ditiano.

10 El disolvente empleado en la reacción de conversión en ditiano no está particularmente limitado, siempre que disuelva los materiales de partida en cierta medida sin inhibir la reacción, e incluye, por ejemplo, diclorometano.

El ácido de Lewis empleado en la reacción de conversión en ditiano incluye, por ejemplo, eterato dietílico de trifluoruro de boro.

15 La temperatura de reacción para la reacción de conversión en ditiano difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendida entre 0°C y 100°C , y preferentemente es temperatura ambiente.

El tiempo de reacción para la reacción de conversión en ditiano difiere de acuerdo con los materiales de partida sin tratar, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendido entre 10 minutos y 5 días, y preferentemente entre 30 minutos y 1 día.

20 El disolvente empleado para la generación del anión y la reacción con el Compuesto (6) no está particularmente limitado, siempre que disuelva los materiales de partida en cierta medida sin inhibir la reacción, e incluye, por ejemplo, tetrahidrofurano.

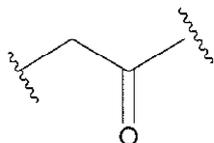
La base empleada para la generación del anión y la reacción con el Compuesto (6) incluye, por ejemplo, *n*-butilitio.

25 La temperatura de reacción difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendida entre -78°C y 100°C , y preferentemente entre -78°C y temperatura ambiente.

El tiempo de reacción difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendido entre 10 minutos y 5 días, y preferentemente entre 30 minutos y 1 día.

Proceso B-3

30 El proceso es un proceso para convertir el anillo ditiánico del Compuesto (7) en un grupo carbonilo para obtener el Compuesto (1-3) o, dicho de forma, el Compuesto (1-1) en el que M es el grupo representado por:



Este proceso se puede llevar a cabo mediante una reacción de desprotección por eliminación del anillo ditiánico convencional, por ejemplo, una reacción con un agente oxidante tal como un nitrato de plata.

35 El disolvente empleado en la reacción de desprotección por eliminación del anillo ditiánico no está particularmente limitado, siempre que disuelva los materiales de partida en cierta medida sin inhibir la reacción, e incluye, por ejemplo, metanol, agua y tetrahidrofurano.

El agente oxidante empleado en la reacción de desprotección por eliminación del anillo ditiánico incluye, por ejemplo, nitrato de plata.

40 La temperatura de reacción para la reacción de desprotección por eliminación del anillo ditiánico difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendida entre 0°C y 150°C , y preferentemente entre temperatura ambiente y 100°C .

El tiempo de reacción para la reacción de desprotección por eliminación del anillo ditiánico difiere de acuerdo con los materiales de partida, el disolvente y similar, pero normalmente está comprendido entre 30 minutos y 5 días, y preferentemente entre 1 día y 4 días.

45 Una vez finalizada la reacción en cada proceso de cada método descrito anteriormente, el compuesto deseado de

cada proceso se puede separar de la mezcla de reacción de acuerdo con un método convencional.

Por ejemplo, cuando toda la mezcla de reacción sea un líquido, la mezcla de reacción se enfría hasta temperatura ambiente o se enfría con hielo, según se prefiera, y se neutraliza con un ácido, álcali, agente oxidante o agente reductor, según proceda, se añade un disolvente orgánico inmiscible con agua y que no sea reactivo con el compuesto deseado, tal como acetato de etilo, y se separa la capa que contenga el compuesto deseado. A continuación, se añade un disolvente inmiscible con la capa resultante y que no sea reactivo con el compuesto deseado, se lava la capa que contenga el compuesto deseado y se separa la capa. Es más, cuando la capa sea una capa orgánica, el compuesto deseado se puede separar secando con un agente secante, tal como sulfato de magnesio anhidro o sulfato de sodio anhidro, y eliminando el disolvente por destilación. Cuando la capa sea una capa acuosa, el compuesto deseado se puede separar desmineralizando eléctricamente la capa y a continuación liofilizándola.

Además, cuando toda la mezcla de reacción sea un líquido y cuando sea posible, el compuesto deseado se puede separar simplemente eliminando por destilación el resto de las sustancias que no sean el compuesto deseado (tal como un disolvente o un reactivo) a presión normal o a presión reducida.

Asimismo, cuando solamente el compuesto deseado precipite como un sólido, o cuando toda la mezcla de reacción descrita anteriormente sea un líquido y solamente el compuesto deseado precipite durante el curso de la separación, el compuesto deseado se puede separar recogiendo por filtración primero, lavando el compuesto deseado recogido por filtración con un disolvente orgánico o inorgánico adecuado y secándolo, de modo que las aguas madres se traten de una forma similar al caso en el que toda la mezcla de reacción descrita anteriormente sea un líquido.

Es más, cuando solamente el reactivo o el catalizador esté presente como un sólido, o toda la mezcla de reacción descrita anteriormente sea un líquido y solamente el reactivo o el catalizador precipite como un sólido durante el curso de la separación, y el compuesto deseado se disuelva en la solución, el compuesto deseado se puede separar eliminando el reactivo o el catalizador por filtración primero, lavando el reactivo o catalizador eliminado por filtración con un disolvente orgánico o inorgánico adecuado, combinando el líquido de lavado resultante con las aguas madres y tratando la mezcla resultante de una forma similar al caso en el que toda la mezcla de reacción descrita anteriormente sea un líquido.

En particular, cuando las sustancias que no sean el compuesto deseado que estén contenidas en la mezcla de reacción no inhiban la reacción en el siguiente paso, la mezcla de reacción también se puede utilizar en el siguiente paso tal cual sin aislar particularmente el compuesto deseado.

Se puede realizar una recristalización, diversos métodos cromatográficos y una destilación, según proceda, para mejorar la pureza del compuesto deseado separado mediante el método anterior.

Normalmente, cuando el compuesto deseado sea un sólido, la pureza del compuesto deseado se puede mejorar mediante recristalización. En la recristalización, se puede emplear un único disolvente o una mezcla de una pluralidad de disolventes que no sean reactivos con el compuesto deseado. Específicamente, el compuesto deseado se disuelve primero en uno o más disolventes que no sean reactivos con el compuesto deseado a temperatura ambiente o con calentamiento. La mezcla resultante se enfría con agua helada o similar, o se agita, o se deja reposar a temperatura ambiente, de modo que el compuesto deseado pueda cristalizar en la mezcla.

La pureza del compuesto deseado separado se puede mejorar mediante varios métodos cromatográficos. Por lo general, es posible emplear geles de sílice con un carácter ácido débil tales como el de sílice 60 fabricado por Merck KGaA (malla 70-230 o malla 340-400) y BW-300 fabricado por Fuji Silysia Chemical Ltd. (malla 300). Cuando el compuesto deseado sea básico y se adsorba sobre los geles de sílice anteriores demasiado fuertemente, también será posible emplear geles de sílice de tipo NH, tales como el gel de sílice recubierto con propilamina fabricado por Fuji Silysia Chemical Ltd. (malla 200-350) y una columna empacada preparativa de presión media desechable fabricada por Yamazen Corporation (Hi-Flash Amino). Cuando el compuesto deseado sea dipolar o se deba eluir con un disolvente más polar, tal como metanol, por ejemplo, también será posible emplear NAM-200H o NAM-300H fabricados por NAM Laboratory o YMC GEL ODS-A fabricado por YMC Co. Ltd. También es posible utilizar columnas empacadas preparativas de media presión desechables como la descrita anteriormente que han sido empacadas previamente con rellenos y que son fabricadas por Yamazen Corporation, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Biotage AB o W. R. Grace & Co. (Hi-Flash). El compuesto deseado, cuya pureza se mejora, se puede obtener por elución del compuesto deseado con uno o más disolventes que no sean reactivos con el compuesto deseado utilizando estos geles de sílice y destilando el o los disolventes.

Cuando el compuesto deseado separado sea un líquido, la pureza del compuesto deseado también se puede mejorar mediante destilación. En la destilación, el compuesto deseado se puede destilar sometiendo el compuesto deseado a presión reducida a temperatura ambiente o con calentamiento.

Algunos ejemplos representativos del método para producir el Compuesto (1-1) se han descrito previamente. Los compuestos que constituyen la materia prima y diversos reactivos de la producción del Compuesto (1-1) pueden formar sales o solvatos, tales como hidratos, todos ellos varían dependiendo del material de partida, el disolvente

- utilizado, y no están particularmente limitados, siempre que no inhiban la reacción. Además, el disolvente empleado varía dependiendo del material de partida, el reactivo, y no está particularmente limitado, siempre que no inhiba la reacción y disuelva el material de partida en cierta medida, obviamente. Cuando el Compuesto (1-1) se obtenga como una forma libre, se puede convertir en una sal que el Compuesto (1-1), o solvato del compuesto o sal pueda formar mediante métodos convencionales.
- 5
- Cuando el Compuesto (1-1) se obtenga como una sal o solvato, se puede convertir en una forma libre del Compuesto (1-1) mediante métodos convencionales.
- Los diversos isómeros obtenidos para el Compuesto (1-1) (tales como isómeros geométricos, isómeros ópticos, rotámeros, estereoisómeros y tautómeros) se pueden purificar y aislar mediante medios de separación habituales, por ejemplo, recristalización, formación de sales diastereoméricas, resolución enzimática y diversos métodos cromatográficos (tales como cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y cromatografía de gases).
- 10
- El Compuesto (1-1) y en particular *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida de acuerdo con la presente invención, o una sal farmacológicamente aceptable de estos se pueden formular mediante métodos convencionales, y los ejemplos de formas farmacéuticas incluyen formulaciones orales (tales como comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas y jarabes), inyecciones (para la administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea y administración intraperitoneal) y formulaciones externas (tales como formulaciones de absorción transdérmica (tales como pomadas y parches), preparados oftálmicos, preparados nasales y supositorios).
- 15
- Estas formulaciones sólidas, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos, pueden contener normalmente entre un 0.001 y un 99.5%p, preferentemente entre un 0.01 y un 90%p, del Compuesto (1-1) y en particular de *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida o una sal farmacológicamente aceptable de estos.
- 20
- Cuando se fabrican formulaciones sólidas orales, se pueden preparar comprimidos, gránulos, polvos y cápsulas por adición de diluyentes, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, colorantes al Compuesto (1-1) o (1-2), y en particular a *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida o a una sal farmacológicamente aceptable de estos, según sea necesario, y tratamiento mediante métodos convencionales. Los comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas también pueden recubrirse con una película, en caso necesario.
- 25
- Los ejemplos de diluyentes incluyen lactosa, almidón de maíz y celulosa microcristalina; los ejemplos de aglutinantes incluyen hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa; y los ejemplos de desintegrantes incluyen carboximetilcelulosa cálcica y croscarmelosa sódica.
- 30
- Los ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio y estearato de calcio; y los ejemplos de colorantes incluyen óxido de titanio.
- Los ejemplos de agentes pelculígenos incluyen hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa.
- Cualesquiera excipientes descritos anteriormente no se limitan a estos ejemplos, obviamente.
- 35
- Cuando se fabrican inyecciones (para la administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea y administración intraperitoneal), estas se pueden fabricar por adición de reguladores del pH, tampones, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, antioxidantes, conservantes (antisépticos), agentes reguladores de la tonicidad al Compuesto (1-1), y en particular a *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, o una sal farmacológicamente aceptable de estos, según sea necesario, y tratamiento mediante métodos convencionales. Las formulaciones liofilizadas que se han de disolver antes de usarlas también se pueden preparar mediante liofilización. Estas inyecciones se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea e intramuscular, por ejemplo.
- 40
- Los ejemplos de reguladores del pH y tampones incluyen ácidos orgánicos o inorgánicos y/o sales de estos; los ejemplos de agentes de suspensión incluyen metilcelulosa, polisorbato 80 y carboximetilcelulosa sódica; los ejemplos de agentes solubilizantes incluyen polisorbato 80 y monolaurato de sorbitán polioxietilenado; los ejemplos de antioxidantes incluyen α -tocoferol; los ejemplos de conservantes incluyen *para*-hidroxibenzoato de metilo y *para*-hidroxibenzoato de etilo; y los ejemplos de agentes reguladores de la tonicidad incluyen glucosa, cloruro de sodio y manitol; sin embargo, los excipientes no se limitan a estos ejemplos, obviamente.
- 45
- Estas inyecciones pueden contener normalmente entre un 0.000001 y un 99.5%p, preferentemente entre un 0.00001 y un 90%p, del Compuesto (1-1) y en particular de *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, o una sal farmacológicamente aceptable de estos.
- 50
- Cuando se fabrican formulaciones externas, se pueden fabricar formulaciones de absorción transdérmica (tales como pomadas y parches), preparados oftálmicos, preparados nasales, supositorios y similares, por adición de materiales base y, según sea necesario, los emulsionantes, conservantes, reguladores del pH, colorantes descritos anteriormente al Compuesto (1-1) y en particular a *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-
- 55

benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, o una sal farmacológicamente aceptable de estos, y tratamiento mediante métodos convencionales.

5 Se pueden emplear diversas materias primas de uso común para fármacos, productos parafarmacéuticos, productos cosméticos como materiales base, y los ejemplos incluyen materias primas tales como aceites animales o vegetales, aceites minerales, aceites de ésteres, ceras, alcoholes superiores y agua purificada.

Estas formulaciones externas pueden contener normalmente entre un 0.000001 y un 99.5%p, preferentemente entre un 0.00001 y un 90%p del Compuesto (1-1) y en particular de *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, o una sal farmacológicamente aceptable de estos.

10 La dosis del medicamento de acuerdo con la presente invención normalmente varía dependiendo del síntoma, la edad, el sexo, el peso, pero es aceptable si es una dosis suficiente para producir un efecto deseado. Por ejemplo, para un adulto, se emplea una dosis comprendida entre aproximadamente 0.1 y 5000 mg (preferentemente entre 0.5 y 1000 mg, más preferentemente entre 1 y 600 mg) al día en una dosis durante uno o más días, o en 2-6 dosis divididas durante un día.

15 El Compuesto (1-1) y en particular *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida de acuerdo con la presente invención, se pueden emplear como sonda química para atrapar proteínas diana en compuestos bioactivos con un peso molecular bajo. Específicamente, el Compuesto y en particular *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, se pueden convertir en una sonda de cromatografía por afinidad, una sonda de fotoafinidad introduciendo un grupo marcador, un conector en un resto que no sea un resto estructural esencial para la expresión de actividad del compuesto mediante una técnica descrita en *J. Mass Spectrum. Soc. Jpn.*, Vol. 51, N.º 5, 2003, págs. 492-498, o WO 2007/139149 o similar.

Los ejemplos de grupos marcadores, conectores o similares empleados para sondas químicas incluyen los grupos que se muestran en el grupo constituido por los siguientes elementos (1)-(5):

25 (1) grupos marcadores de proteínas tales como grupos marcadores de fotoafinidad (tales como un grupo benzoílo, un grupo benzofenona, un grupo azido, un grupo carbonilazido, un grupo diaziridina, un grupo enona, un grupo diazo y un grupo nitro) y grupos de afinidad química (tales como un grupo cetona en el que un átomo de carbono α se reemplaza con un átomo halógeno, un grupo carbamoílo, un grupo éster, un grupo alquiltio, receptores de Michael tales como cetonas y ésteres α,β -insaturados, y un grupo oxirano),

30 (2) conectores escindibles tales como -S-S-, -O-Si-O-, monosacáridos (tales como un grupo glucosa y un grupo galactosa) o disacáridos (tales como lactosa) y conectores oligopeptídicos escindibles mediante una reacción enzimática,

(3) grupos marcadores de captura tales como biotina y un grupo 3-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4*H*-3*a*,4*a*-diaz-4-bora-s-indacen-3-il)propionilo,

35 (4) marcadores detectables tales como grupos radiomarcadores como, por ejemplo, ^{125}I , ^{32}P , ^3H y ^{14}C ; grupos marcadores de fluorescencia tales como fluoresceína, rodamina, dansilo, umbelliferona, 7-nitrofurazano y un grupo 3-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4*H*-3*a*,4*a*-diaz-4-bora-s-indacen-3-il)propionilo; grupos quimioluminiscentes tales como luciferina y luminol; e iones de metales pesados tales como iones de lantánidos e iones de radio; o

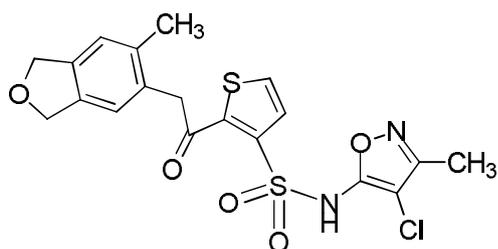
40 (5) grupos unidos a portadores de fase sólida tales como microesferas de vidrio, lechos de vidrio, placas de microvaloración, microesferas de agarosa, lechos de agarosa, microesferas de poliestireno, lechos de poliestireno, microesferas de nailon y lechos de nailon.

Las sondas preparadas introduciendo grupos marcadores seleccionados del grupo constituido por los elementos (1)-(5) anteriores en el Compuesto (1-1) y en particular en *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, de acuerdo con el método descrito en los documentos anteriores se pueden emplear como sondas químicas para identificar proteínas marcadas útiles para la búsqueda de dianas farmacéuticas novedosas, por ejemplo.

Ejemplos

El Compuesto (1-1) y en particular *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida de acuerdo con la presente invención, se pueden producir, por ejemplo, mediante los métodos que se describen en los siguientes ejemplos y los efectos del Compuesto (1-1) y en particular con *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida, se pueden confirmar mediante los métodos que se describen en los siguientes ejemplos de ensayo.

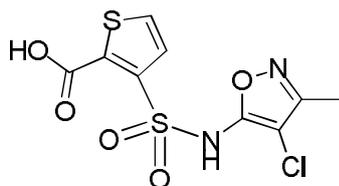
[Ejemplo 1] *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida



Una mezcla de la *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)metil]-1,3-ditian-2-il]tiofen-3-sulfonamida descrita en el Ejemplo de producción 1-7 (300 mg, 0.55 mmol), metanol (20 mL), agua (2 mL) y nitrato de plata (940 mg, 5.5 mmol) se agitó durante 3 días a 55°C. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se añadieron tetrahidrofurano (40 mL) y salmuera (1 mL) a esta temperatura, y la mezcla se filtró con Celite. El filtrado se extrajo mediante la adición de acetato de etilo (200 mL), agua (100 mL) y solución acuosa saturada de ácido cítrico (1 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (metanol:acetato de etilo = 1:9) y a continuación se purificó además mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice (metanol:acetato de etilo = 1:32) para obtener el compuesto del título (45 mg, 18% de rendimiento).

Espectro de ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.99 (3H, s), 2.13 (3H, s), 4.89 (2H, s), 4.92 (2H, s), 4.95 (2H, s), 7.07 (1H, s), 7.09 (1H, s), 7.42 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.77 (1H, d, *J* = 5.1 Hz).

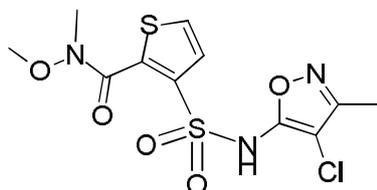
[Ejemplo de producción 1-1] ácido 3-[(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)sulfamoil]tiofen-2-carboxílico



A una mezcla de hidruro de sodio (60%, 2.1 g, 52 mmol) y tetrahidrofurano (20 mL) se añadió una mezcla de 4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-amina (3.0 g, 23 mmol) y tetrahidrofurano (20 mL) a 0°C, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 30 minutos. Se añadió 3-(clorosulfonil)tiofen-2-carboxilato de metilo (5.3 g, 22 mmol) a esta temperatura a la mezcla de reacción, que a continuación se agitó durante 1 hora a 0°C y después se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió hexano (100 mL) a temperatura ambiente a la mezcla de reacción y el sólido precipitado se separó por filtración. Se añadió metanol (20 mL) al sólido, seguido de una solución acuosa 2 N de hidróxido sódico (20 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida y se añadió agua helada (20 mL) al residuo, seguida de una solución acuosa 2 N de ácido clorhídrico (20 mL). El sólido precipitado se separó por filtración para obtener el compuesto del título (2.5 g, 35% de rendimiento).

Espectro de ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.16 (3H, d, *J* = 1.8 Hz), 7.45 (1H, dd, *J* = 1.3, 5.3 Hz), 7.95 (1H, dd, *J* = 0.9, 5.3 Hz).

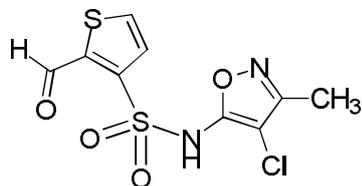
[Ejemplo de producción 1-2] 3-[(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)sulfamoil]-*N*-metoxi-*N*-metiltiofen-2-carboxamida



A una mezcla del ácido 3-[(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)sulfamoil]tiofen-2-carboxílico (2.5 g, 7.8 mmol) descrito en el Ejemplo de producción 1-1 y tetrahidrofurano (25 mL) se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (2.0 g, 12 mmol) a temperatura ambiente y a continuación se agitó a esta temperatura durante 30 minutos. Se añadieron imidazol (1.1 g, 16 mmol) y clorhidrato de *N,O*-dimetilhidroxilamina (1.2 g, 12 mmol) sucesivamente a temperatura ambiente a la mezcla de reacción, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 5 horas. Se añadió una solución acuosa 1 N de ácido clorhídrico (50 mL) a la mezcla de reacción, la cual se extrajo a continuación con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo:metanol = 9:1) para obtener el compuesto del título (1.5 g, 53% de rendimiento).

Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 2.23 (3H, s), 3.45 (3H, s), 3.74 (3H, s), 7.47 (1H, d, $J = 5.3$ Hz), 7.53 (1H, d, $J = 5.3$ Hz).

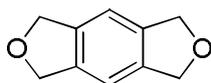
[Ejemplo de producción 1-3] *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-formiltiofen-3-sulfonamida



5 A una mezcla de la 3-[(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)sulfamoil]-*N*-metoxi-*N*-metiltiofen-2-carboxamida descrita en el Ejemplo de producción 1-2 (8.0 g, 22 mmol) y tetrahidrofurano (160 mL) se añadió gota a gota hidruro de diisobutilaluminio (46 mL, 48 mmol, solución 1.0 M en *n*-hexano) a -78°C y a continuación se agitó a 0°C durante 30 minutos. Se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio gota a gota a 0°C a la mezcla de reacción, la cual se dejó calentar a continuación gradualmente hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora a esta temperatura. La mezcla de reacción se filtró con Celite y se añadió agua al filtrado, el cual se extrajo a continuación con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:metanol = 30:1) para obtener el compuesto del título (5.1 g, 75% de rendimiento).

15 Espectro de $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1.97 (3H, s), 7.35 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 7.97 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 10.52 (1H, d, $J = 1.1$ Hz).

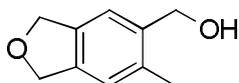
[Ejemplo de producción 1-4] 5,11-dioxatriciclo[7.3.0.0 $^{\{3,7\}}$]dodeca-1,3(7),8-trieno



20 A una mezcla de 1,2,4,5-tetrakis-(bromometil)benceno (150 g, 0.33 mmol) y 1,4-dioxano (2 L) se añadió una solución acuosa al 55% de hidróxido de tetrabutilamonio (640 mL) a temperatura ambiente, seguido de agitación a 90°C durante 6 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se extrajo con acetato de etilo tras añadir una solución acuosa 2 N de ácido clorhídrico (2 L). La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:9) para obtener el compuesto del título (35 g, 63% de rendimiento).

25 Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 5.10 (8H, s), 7.08 (2H, s).

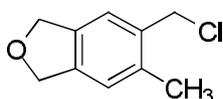
[Ejemplo de producción 1-5] (6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)metanol



30 A una mezcla de litio en polvo (15 g, 2.1 mol), 4,4'-di-*tert*-butilbifenilo (5.0 g, 0.021 mol) y tetrahidrofurano (200 mL) se añade una mezcla de 5,11-dioxatriciclo[7.3.0.0 $^{\{3,7\}}$]dodeca-1,3(7),8-trieno (35 g, 0.21 mol) descrito en el Ejemplo de producción 1-4 y tetrahidrofurano (100 mL) a -78°C , y a continuación se agitó a esta temperatura durante 4 horas. Se añadió agua (10 mol) a esta temperatura a la mezcla de reacción y se agitó completamente. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se extrajo con acetato de etilo tras añadir una solución acuosa 2 N de ácido clorhídrico (500 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano = 3:7) para obtener el compuesto del título (10 g, 30% de rendimiento).

35 Espectro de $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 2.24 (3H, s), 4.48 (2H, d, $J = 5.3$ Hz), 4.96 (4H, s), 5.10 (1H, t, $J = 5.3$ Hz), 7.07 (1H, s), 7.29 (1H, s).

[Ejemplo de producción 1-6] 5-(clorometil)-6-metil-1,3-dihidro-2-benzofurano

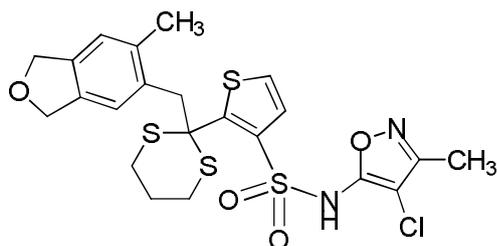


40

Se añadió trietilamina (1.7 mL, 12 mmol) enfriando con hielo a una mezcla del (6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)metanol descrito en el Ejemplo de producción 1-5 (1.0 g, 6.1 mmol) y diclorometano (10 mL), y a continuación se añadió cloruro de metanosulfonilo (470 μ L, 6.1 mmol) a esta temperatura. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua a la mezcla de reacción, la cual se extrajo a continuación con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:heptano = 1:10) para obtener el compuesto del título (680 mg, 61% de rendimiento).

Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 2.44 (3H, s), 4.63 (2H, s), 5.08 (4H, s), 7.09 (1H, s), 7.20 (1H, s).

[Ejemplo de producción 1-7] *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-{2-[(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)metil]-1,3-ditian-2-il}tiofen-3-sulfonamida



A una mezcla de la *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-formiltiofen-3-sulfonamida descrita en el Ejemplo de producción 1-3 (4.9 g, 16 mmol) y diclorometano (100 mL) se añadieron sucesivamente eterato dietílico de trifluoruro de boro (8.1 mL, 64 mmol) y 1,3-propanoditiol (1.9 mL, 19 mmol) enfriando con hielo, y a continuación se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se añadió agua enfriando con hielo a la mezcla de reacción, la cual se extrajo a continuación con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo) para obtener *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-(1,3-ditian-2-il)tiofen-3-sulfonamida como producto crudo. A una mezcla de *N*-(4-cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-(1,3-ditian-2-il)tiofen-3-sulfonamida cruda y tetrahidrofurano (50 mL) se añadió gota a gota *N*-butillitio (9.7 mL, 16 mmol, solución 1.6 M en *n*-hexano) a -78°C , y a continuación se agitó durante 20 minutos a una temperatura interna de -35°C . La mezcla de reacción se enfrió hasta -78°C y se añadió el 5-(clorometil)-6-metil-1,3-dihidro-2-benzofurano descrito en el Ejemplo de producción 1-6 (960 mg, 5.3 mmol) a esta temperatura y se agitó durante 1 hora a 0°C . La mezcla de reacción se enfrió hasta -78°C , y se añadió una mezcla de ácido acético (0.90 mL, 16 mmol) y tetrahidrofurano (7 mL) a esta temperatura. La mezcla de reacción se volvió a enfriar gradualmente hasta temperatura ambiente, se añadieron agua y una solución acuosa de ácido cítrico a esta temperatura, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:heptano = 4:1) para obtener el compuesto del título (1.6 g, 54% de rendimiento).

Espectro de $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1.68-1.76 (1H, m), 2.01-2.05 (1H, m), 2.15 (3H, s), 2.20 (3H, s), 2.80-2.85 (4H, m), 3.73 (2H, s), 4.79 (2H, s), 4.90 (2H, s), 6.64 (1H, s), 7.02 (1H, s), 7.44 (1H, d, $J = 5.5$ Hz), 7.54 (1H, d, $J = 5.5$ Hz).

Ejemplo de ensayo 1

Efectos de supresión del sitaxentán y del compuesto del Ejemplo 1 sobre el receptor A de endotelina (EDNRA)

La región codificante de proteína del EDNRA derivado de humano (número de gen NM_001957.2) se transdujo en células HEK-293 (riñón embrionario humano, N.º de ATCC CRL-1573) con un vector retroviral de leucemia murino, para preparar una línea celular que expresase de forma estable EDNRA (células 293/EDNRA). Se empleó DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y penicilina y estreptomina como medio de cultivo.

Un día antes de la medición, las células 293/EDNRA se inocularon en una placa de 384 pocillos con una densidad de 5000 células/pocillo. El día de la medición, se añadió un reactivo fluorescente para medir el calcio (Calcium4, Molecular Device) disuelto en solución tampón equilibrada de Hank a cada pocillo y se dejó reposar durante aproximadamente 1 hora. A continuación, se añadieron sitaxentán y el compuesto preparado en el Ejemplo 1 en concentraciones finales predeterminadas (denominadas especímenes en lo sucesivo en la presente) a algunos de los pocillos, y se dejaron reposar durante aproximadamente 1 hora para dejar que los especímenes actúen sobre las células 293/EDNRA.

Se aplicó endotelina, un ligando (activador) de EDNRA, a los pocillos no tratados con los especímenes, y la reacción de activación resultante (elevación de calcio) se detectó con un instrumento de medición (FDSS7000, Hamamatsu Photonics) para obtener una reacción de activación dependiente de la dosis como la que se muestra en la Fig. 1. En

dosis mayores o iguales a 1 nM, la reacción de activación se volvió prácticamente saturada. Por esta razón, las dosis de endotelina empleadas para la detección en las siguientes reacciones de supresión se fijaron en 0.03, 0.1 o 0.3 nM.

- 5 Cuando la reacción de activación (elevación de calcio) que tuvo lugar cuando se aplicaron 0.03, 0.1 o 0.3 nM de endotelina a pocillos independientes tratados con los especímenes se detectó con un instrumento de medición (FDSS7000, Hamamatsu Photonics), tanto el sitaxentán como el compuesto del Ejemplo 1 suprimían la reacción de activación tal como se muestra en la Fig. 2 y en la Fig. 3.

Ejemplo de ensayo 2

Efectos inhibitorios de CYP

- 10 Los efectos inhibitorios de CYP por acción del sitaxentán y del compuesto del Ejemplo 1 se evaluaron mediante los dos métodos que se indican a continuación.

- 15 Debido a que la inhibición de CYP dependiente del tiempo por acción del sitaxentán se puede evaluar comprobando el aumento de la inhibición tras una preincubación con una solución que contenga una coenzima y una fracción microsomal hepática humana que contenga CYP, se realizó un ensayo de determinación de la inhibición dependiente del tiempo para el compuesto del Ejemplo 1 como Método 1. La inhibición competitiva de CYP también se evaluó como Método 2.

Método 1

Se evaluó la capacidad de inhibición dependiente del tiempo del sitaxentán y del compuesto del Ejemplo 1 con respecto a cinco enzimas CYP (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4).

- 20 La sustancia de ensayo se añadió a una solución enzimática (que contenía microsoma hepático humano (0.2 mg/mL), Kpi 100 mM y EDTA 0.1 mM), y se preincubó durante 30 minutos a 37°C en presencia o ausencia de la coenzima. La concentración final de la sustancia de ensayo se fijó en 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2, 10 o 50 µM. Se empleó un sistema generador de NADPH (solución 60 mM de MgCl₂ que contenía β-NADP⁺ 3.6 mM, glucosa-6-fosfato 90 mM y 1 unidad/mL de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, incubada durante 5 minutos para generar NADPH) como la
- 25 coenzima. Tras preincubar, parte de la solución de reacción se recogió, se diluyó 10 veces mezclándola con una solución de sustrato modelo y el sistema generador de NADPH, y a continuación se incubó durante 10 minutos a 37°C. Se añadió una cantidad equivalente de una solución mezclada de acetonitrilo y metanol (1:1, que contenía dextrofanol 0.05 µM o propranolol 0.05 µM como patrón interno) para detener la reacción, y los metabolitos del sustrato modelo en la solución de reacción se midieron mediante LC-MS/MS. Los sustratos modelo y los
- 30 metabolitos de los sustratos modelo para cada enzima CYP se muestran en la Tabla 1. También se realizó un ensayo similar sin añadir sustancia de ensayo como ensayo de control. La relación relativa entre la cantidad de metabolitos de los sustratos modelo en el ensayo de control se proporcionó como actividad residual. Se evaluó la relación entre la actividad residual en presencia de NADPH relativa a la actividad residual en ausencia de NADPH, y una relación menor o igual a un 80% se definió como “+”, mientras que una relación superior a un 80% se definió como “-”. Los resultados se muestran en la Tabla 2.
- 35

Si se comparan los resultados del sitaxentán con los del compuesto del Ejemplo 1 se puede observar que la inhibición dependiente del tiempo se redujo al convertir el anillo benzodioxólico en un anillo ftalánico.

[Tabla 1]

Sustratos modelo y metabolitos de los sustratos modelo para cada enzima CYP

Isoforma CYP	Sustrato modelo	Concentración del sustrato (µM)	Metabolito del sustrato modelo
CYP1A2	Fenacetina	50	Acetaminofeno
CYP2C9	Tolbutamida	500	4-Hidroxitolbutamida
CYP2C19	S-Mefenitoína	200	4'-Hidroximefenitoína
CYP2D6	Bufuralol	50	1'-Hidroxibufuralol
CYP3A4	Midazolam	30	1'-Hidroximidazolam

40 [Tabla 2]

Efecto de la preincubación con microsoma hepático humano y la sustancia de ensayo sobre la actividad de CYP (promedio, n = 2)

Sustancia de ensayo	Concentración (µM)	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Sitaxentán	10	-	+	+	-	+

ES 2 651 293 T3

	50	+	+	+	+	+
Ejemplo 1	10	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	+

Método 2

Se investigó la capacidad de inhibición en función de la inhibición competitiva de cinco enzimas CYP (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4) utilizando sitaxentán y el compuesto del Ejemplo 1.

- 5 La sustancia de ensayo se añadió en una concentración final de 1 o 10 μM a una solución enzimática (que contenía microsoma hepático humano (0.2 mg/mL), Kpi 100 mM y EDTA 0.1 mM) que contenía una solución de sustrato modelo, y se incubó durante 10 minutos a 37°C en presencia de un sistema generador de NADPH. Se añadió una cantidad equivalente de una solución mezclada de acetonitrilo y metanol (1:1, que contenía dextrofano 0.05 μM o propranolol 0.05 μM como patrón interno) para detener la reacción, y los metabolitos del sustrato modelo en la solución de reacción se midieron mediante LC-MS/MS. El sustrato modelo y el metabolito del sustrato modelo para cada enzima CYP se muestran en la Tabla 3. Se realizó un ensayo similar sin añadir la sustancia de ensayo como ensayo de control. La tasa de inhibición se determinó a partir de las cantidades de metabolitos de los sustratos modelo con o sin adición de la sustancia de ensayo en cada concentración de la sustancia de ensayo, y el valor de CI_{50} se calculó a partir de la tasa de inhibición (método de cálculo de acuerdo con Xenobiotica, 1999, 29(1), 53-75). Se otorgó un puntaje de “++” si la CI_{50} era menor o igual a 1 μM , “+” si estaba comprendida entre 1 y 10 μM , y “-” si era mayor de 10 μM . Los resultados se muestran en la Tabla 4.
- 10
- 15

Si se comparan los resultados del sitaxentán con los del compuesto del Ejemplo 1 se puede observar que la capacidad de inhibición se redujo al convertir el anillo benzodioxólico en un anillo ftalánico.

[Tabla 3]

Sustratos modelo y metabolitos de los sustratos modelo para las enzimas CYP

Isoforma CYP	Sustrato modelo	Concentración del sustrato (μM)	Metabolito del sustrato modelo
CYP1A2	Fenacetina	10	Acetaminofeno
CYP2C9	Tolbutamida	100	4-Hidroxitolbutamida
CYP2C19	S-Mefenitoína	40	4'-Hidroximefenitoína
CYP2D6	Bufuralol	10	1'-Hidroxibufuralol
CYP3A4	Midazolam	3	1'-Hidroximidazolam

20 [Tabla 4]

Efecto de la sustancia de ensayo sobre las enzimas CYP (n = 2)

Sustancia de ensayo	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Sitaxentán	-	++	+	-	+
Ejemplo 1	-	++	-	-	-

REIVINDICACIONES

1. *N*-(4-Cloro-3-metil-1,2-oxazol-5-il)-2-[2-(6-metil-1,3-dihidro-2-benzofuran-5-il)acetil]tiofen-3-sulfonamida o una sal farmacológicamente aceptable de esta.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal farmacológicamente aceptable de este de acuerdo con la Reivindicación 1.
3. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con la Reivindicación 1 o la composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 2 para su uso en un método para tratar o prevenir la hipertensión arterial pulmonar.

Figura 1

Respuesta a la dosis de endotelina (nM)

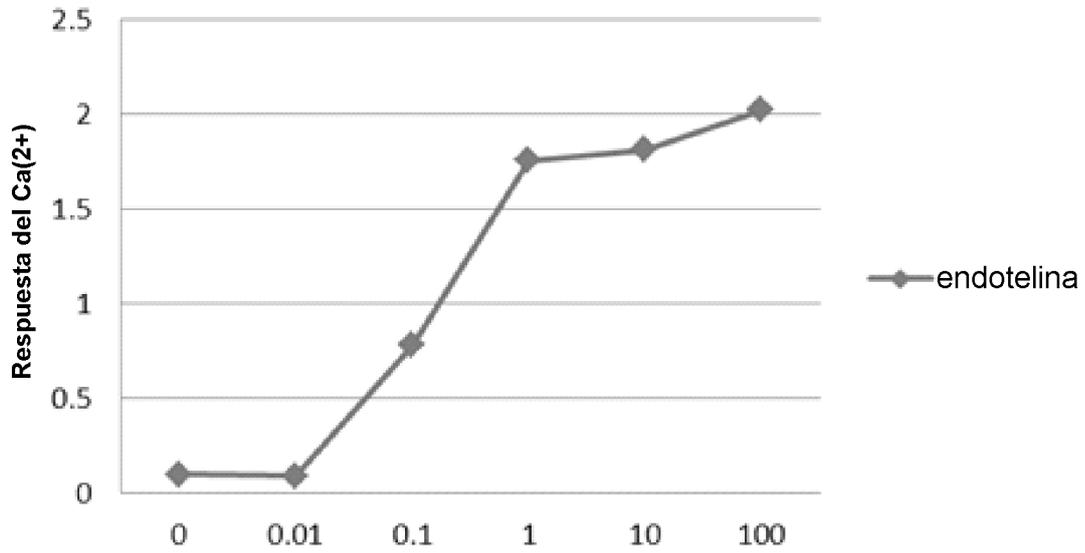


Figura 2

Ejemplo 1/receptor A de endotelina

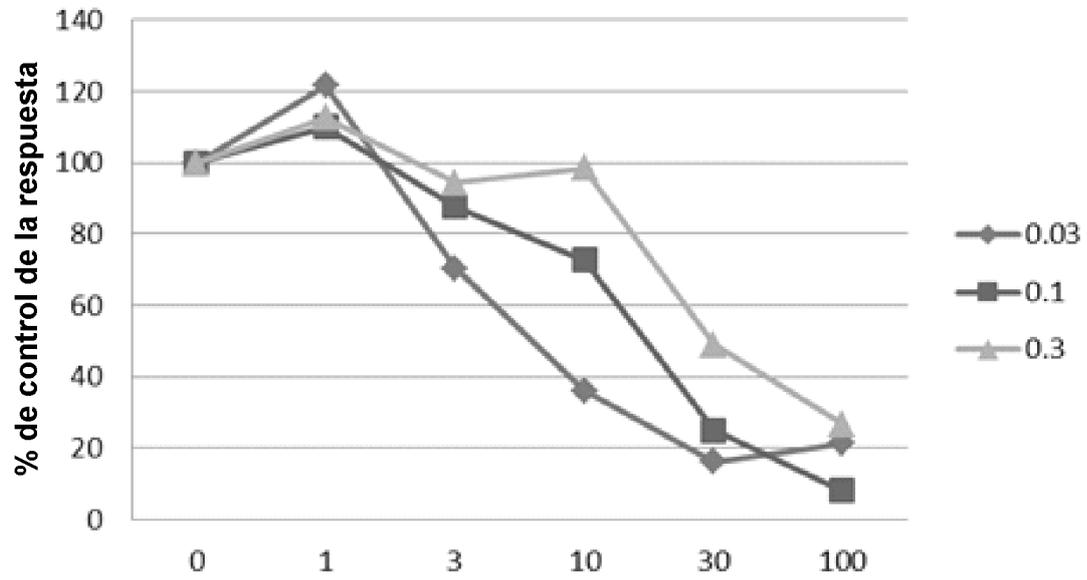


Figura 3

sitaxentán/receptor A de endotelina

