



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 436**

51 Int. Cl.:
A61K 31/5375 (2006.01)
C07D 265/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03712117 .5**
96 Fecha de presentación : **27.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1487453**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **N-[[{(2S)-4-(3,4-difluorobencil)morfolin-2-il]metil}2-{3'-[(metilsulfonyl)amino]fenil}acetamida como antagonista CCR-3 para el tratamiento de condiciones inflamatorias.**

30 Prioridad: **28.03.2002 GB 0207449**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.05.2010

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Ancliff, Rachael, Ann;**
Cook, Caroline, Mary;
Eldred, Colin, David;
Gore, Paul, Martin;
Harrison, Lee, Andrew;
Hayes, Martin, Alistair;
Hodgson, Simon, Teanby;
Judd, Duncan, Bruce;
Keeling, Suzanne, Elaine;
Lewell, Xiao, Qing;
Mills, Gail;
Robertson, Graeme, Michael;
Swanson, Stephen;
Walker, Andrew, John y
Wilkinson, Mark

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

N-[[[(2S)-4-(3,4-difluorobencil)morfolin-2-il]metil]-2-{3'-[(metilsulfonyl)amino]fenil}acetamida como antagonista CCR-3 para el tratamiento de condiciones inflamatorias.

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto, a un procedimiento para su preparación, a formulaciones farmacéuticas que lo contienen y a su uso en terapia.

La inflamación es una respuesta primaria a lesiones tisulares o a invasiones microbianas y se caracteriza por la adhesión de leucocitos al endotelio, diapédesis y activación dentro del tejido. La activación de leucocitos puede ocasionar la generación de especies de oxígeno tóxicas (tales como anión superóxido) y la liberación de productos granulados (tales como peroxidasas y proteasas). Los leucocitos circulantes incluyen neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. Las diferentes formas de inflamación implican diferentes tipos de leucocitos infiltrantes, estando regulado el perfil particular por el perfil de moléculas de adhesión, de citoquinas y de expresión de factores quimiotácticos dentro del tejido.

La principal función de los leucocitos es defender al huésped de organismos invasores, tales como bacterias y parásitos. Una vez que un tejido está lesionado o infectado, tiene lugar una serie de acontecimientos que causan el reclutamiento local de leucocitos desde la circulación al interior del tejido afectado. El reclutamiento de leucocitos se controla para permitir la destrucción ordenada y la fagocitosis de células extrañas o muertas, seguido de la reparación del tejido y de la resolución del infiltrado inflamatorio. Sin embargo, en estados inflamatorios crónicos, el reclutamiento a menudo es inapropiado, la resolución no se controla de forma adecuada y la reacción inflamatoria origina la destrucción del tejido.

Cada vez hay más evidencias de que la inflamación bronquial característica del asma representa una forma especializada de inmunidad mediada por células, en la que productos de citoquinas, tales como IL-4 e IL-5, liberados por linfocitos T-adyuvantes 2 (Th2), dirigen la acumulación y activación de granulocitos, en particular eosinófilos y, en menor extensión, basófilos. Mediante la liberación de proteínas básicas citotóxicas, mediadores pro-inflamatorios y radicales de oxígeno, los eosinófilos generan lesiones en la mucosa e inician mecanismos que subyacen a la hiperreactividad bronquial. Por lo tanto, es probable que el bloqueo del reclutamiento y la activación de células Th2 y eosinófilos tenga propiedades antiinflamatorias en el asma. Además, los eosinófilos se han implicado en otros tipos de enfermedades tales como rinitis, eccema, síndrome del intestino irritado e infecciones parasitarias.

Las quimioquinas son una gran familia de pequeñas proteínas que participan en el tráfico y reclutamiento de leucocitos (como revisión, véase Luster, *New Eng. J. Med.*, 338, 436-445 (1998)). Éstas se liberan por una amplia diversidad de células y actúan atrayendo y activando diversos tipos celulares, incluyendo eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B. Hay dos familias principales de quimioquinas, quimioquinas CXC-(α) y CC-(β), clasificadas de acuerdo con la separación de dos restos de cisteína conservados cerca del extremo amino de las proteínas quimioquinas. Las quimioquinas se unen a receptores específicos de la superficie celular que pertenecen a la familia de proteínas de siete dominios transmembrana acopladas a la proteína G (como revisión, véase Luster, 1998). La activación de receptores de quimioquina produce, entre otras respuestas, un aumento del calcio intracelular, cambios en la forma celular, una mayor expresión de moléculas de adhesión celular, desgranulación y promoción de la migración celular (quimiotaxis).

Hasta la fecha, se han identificado varios receptores de quimioquina CC y tiene una importancia particular para la presente invención el receptor-3 de quimioquina CC (CCR-3), que se expresa predominantemente en eosinófilos y también en basófilos, células cebadas y células Th2. Se sabe que las quimioquinas que actúan en CCR-3, tales como RANTES, MCP-3 y MCP-4, reclutan y activan los eosinófilos. Son de un interés particular la eotaxina y la eotaxina-2, que se unen específicamente a CCR-3. La localización y función de las quimioquinas CCR-3 indican que desempeñan un papel central en el desarrollo de enfermedades alérgicas tales como el asma. De esta forma, CCR-3 se expresa específicamente en todos los tipos celulares principales implicados en respuestas alérgicas inflamatorias. Las quimioquinas que actúan en CCR-3 se generan en respuesta a estímulos inflamatorios y actúan reclutando estos tipos celulares en los sitios de inflamación, donde llevan a cabo su activación (por ejemplo, Griffiths y col., *J. Exp. Med.*, 179, 881-887 (1994), Lloyd y col., *J. Exp. Med.*, 191, 265-273 (2000)). Además, los anticuerpos monoclonales anti-CCR-3 inhiben completamente la interacción de la eotaxina con eosinófilos (Heath, H. y col., *J. Clin. Invest.* 99 (2), 178-184 (1997)), mientras que un anticuerpo para la quimioquina específica CCR-3, eotaxina, redujo tanto la hiperreactividad bronquial como la eosinofilia pulmonar en un modelo animal de asma (Gonzalo y col., *J. Exp. Med.*, 188, 157-167 (1998)). De esta forma, muchas líneas de evidencia indican que es muy probable que los antagonistas del receptor CCR-3 tengan utilidad terapéutica para el tratamiento de una serie de afecciones inflamatorias.

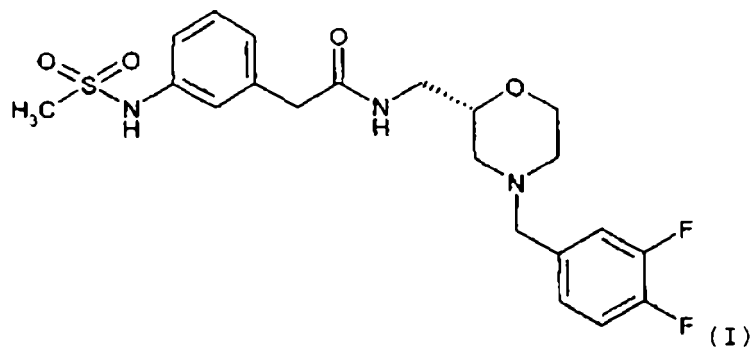
Además de un papel clave en los trastornos inflamatorios, las quimioquinas y sus receptores también desempeñan un papel en enfermedades infecciosas. Los citomegalovirus de mamíferos, los virus del herpes y los poxvirus expresan homólogos de receptores de quimioquinas, que pueden activarse por quimioquinas CC humanas tales como RANTES y receptores MCP-3 (como revisión, véase Wells y Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.*, 8, 717-748, 1997). Además, los receptores de quimioquina humanos, tales como CXCR-4, CCR-5 y CCR-3, pueden actuar como co-receptores para la infección de células de mamífero por microbios tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De esta

forma, los antagonistas de receptores de quimioquinas, incluyendo los antagonistas de CCR-3, pueden ser útiles en el bloqueo de la infección de células que expresan CCR-3 por VIH o en la prevención de la manipulación de respuestas celulares inmunes por virus tales como citomegalovirus.

La publicación de la solicitud de patente internacional número WO 01/24786 (Shionogi & Co. Ltd.) describe ciertos derivados de arilo y heteroarilo para tratar la diabetes. El documento WO 00/69830 (Torrey Pines Institute for Molecular Studies) describe ciertos compuestos diazáclicos, y bibliotecas que los contienen, para la investigación biológica. El documento WO 00/18767 (Neurogen Corporation) describe ciertos derivados de piperazina como antagonistas del receptor D4 de dopamina. La patente de Estados Unidos 6.031.097 y el documento 99/21848 (Neurogen Corporation) describen ciertos derivados de aminoisoquinolina como ligandos del receptor de dopamina. El documento WO 99/06384 (Recordati Industria Chimica) describe derivados de piperazina útiles para el tratamiento de la disfunción neuromuscular del tracto urinario inferior. El documento WO 98/56771 (Schering Aktiengesellschaft) describe ciertos derivados de piperazina como agentes antiinflamatorios. El documento WO 97/47601 (Yoshitomi Pharmaceutical Industries Ltd.) describe ciertos compuestos heterocíclicos condensados como agentes bloqueantes del receptor D de dopamina. El documento WO 96/39386 (Schering Corporation) describe ciertos derivados de piperidina como antagonistas de neuroquinina. El documento WO 96/02534 (Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH) describe ciertas piperazina tiopiridinas útiles para combatir bacterias del género *Helicobacter*. El documento WO 95/32196 (Merck Sharp & Dohme Limited) describe ciertos derivados de piperazina, piperidina y tetrahidropiridina como antagonistas de 5-HT1 D-alfa. La patente de Estados Unidos 5.389.635 (E.I. Du Pont de Nemours and Company) describe ciertos imidazoles sustituidos como antagonistas de angiotensina-II. La publicación de la solicitud de patente europea número 0 306 440 (Schering Aktiengesellschaft) describe ciertos derivados de imidazol como agentes cardiovasculares.

Ahora se ha encontrado un nuevo compuesto que es un antagonista de CCR-3. Este compuesto bloquea la migración/quimiotaxis de los eosinófilos y, de esta forma, posee propiedades antiinflamatorias. Por lo tanto, este compuesto puede tener un efecto terapéutico beneficioso, especialmente para proporcionar protección frente a las lesiones tisulares inducidas por eosinófilos, basófilos y células Th2 en enfermedades en las que están implicados tales tipos celulares, particularmente en enfermedades alérgicas, incluyendo, pero sin limitación, asma bronquial, rinitis alérgica y dermatitis atópica.

De esta forma, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I):



que es; N-{[(2S)-4-(3,4-difluorobencil)morfolin-2-il]metil}-2-{3-[(metilsulfonyl)amino]fenil}acetamida;

y sales y solvatos del mismo.

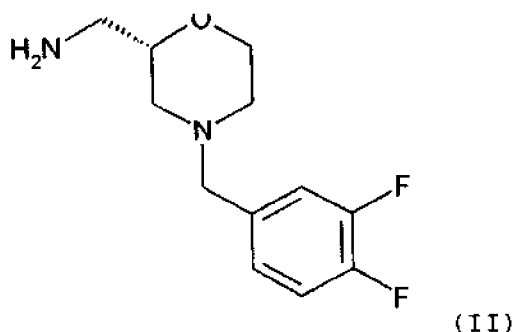
Las sales adecuadas de los compuestos de fórmula (I) incluyen sales fisiológicamente aceptables y sales que pueden no ser fisiológicamente aceptables pero que pueden ser útiles en la preparación de compuestos de fórmula (I) y sales fisiológicamente aceptables de los mismos. Si es apropiado, las sales de adición de ácidos pueden derivarse de ácidos orgánicos o inorgánicos, por ejemplo clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, fosfatos, acetatos, benzoatos, citratos, succinatos, lactatos, tartratos, fumaratos, maleatos, l-hidroxi-2-naftoatos, pamoatos, metanosulfonatos, formiatos o trifluoroacetatos.

Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos.

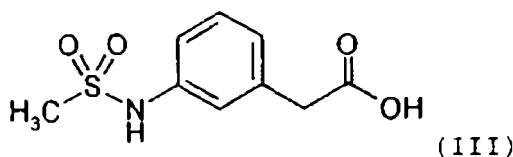
El compuesto de fórmula (I) y las sales y solvatos del mismo puede prepararse por la metodología descrita más adelante en este documento, constituyendo un aspecto adicional de la presente invención.

ES 2 339 436 T3

Un procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación del compuesto de fórmula (I) que comprende el acoplamiento de un compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo;



con un compuesto de fórmula (III):



y posteriormente, si se requiere, la realización de una o más de las siguientes etapas opcionales:

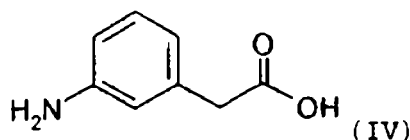
- (i) retirar cualquier grupo protector;
- (ii) preparar una sal o solvato apropiado del compuesto formado.

El acoplamiento de los compuestos de fórmulas (II) y (III) se realiza en cualquier disolvente adecuado, por ejemplo un disolvente orgánico polar tal como N,N-dimetilformamida, en presencia de un agente de deshidratación adecuado tal como un reactivo carbodiimida, por ejemplo clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida y opcionalmente un agente de activación, por ejemplo un compuesto hidroxilado tal como 1-hidroxibenzotriazol, y opcionalmente en presencia de una amina terciaria, por ejemplo N,N-diisopropiletilamina, en condiciones de acoplamiento convencionales a cualquier temperatura que proporcione un intervalo adecuado de formación del producto requerido, durante un tiempo de duración adecuado, por ejemplo 12-24 horas.

Las temperaturas de reacción adecuadas incluyen las que están en el intervalo de 18°C a 25°C.

Los productos de reacción se aíslan y se purifican usando procedimientos convencionales.

El compuesto de fórmula (III) puede prepararse por sulfonilación del compuesto de fórmula (IV):



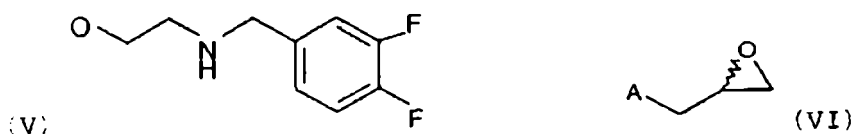
La sulfonilación puede realizarse usando un agente de sulfonilación convencional, por ejemplo un cloruro de sulfonilo tal como cloruro de metanosulfonilo, en presencia de una base adecuada, por ejemplo carbonato sódico acuoso.

El compuesto de fórmula (II) puede prepararse mediante la Reacción (a), la Reacción (b) o la reacción (c).

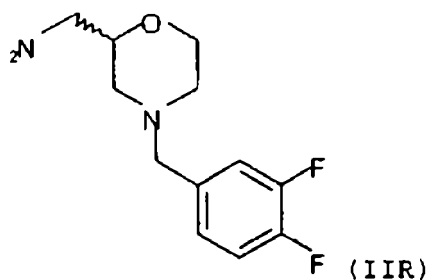
ES 2 339 436 T3

Reacción (a)

Reacción de un compuesto de fórmula (V) con un compuesto de fórmula (VI).



en la que A es un grupo amino protegido, adecuadamente ftalimido, seguido de la desprotección del grupo amino para dar un compuesto de fórmula (MR)



seguido de la resolución de los enantiómeros resultantes del compuesto de fórmula (MR); o;

Reacción (b)

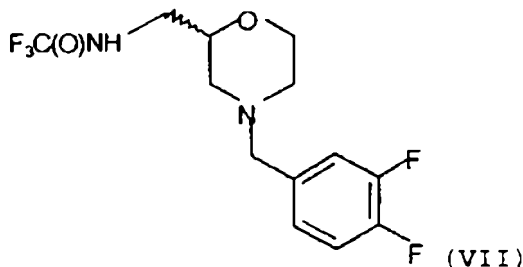
Reacción de un compuesto de fórmula (V) como se ha definido anteriormente con un compuesto de fórmula (VIA)



en la que A es como se ha definido anteriormente para la fórmula (VI), seguido de la desprotección del grupo amino para dar el compuesto de fórmula (II).

Reacción (c)

Hidrólisis de un compuesto de fórmula (VII)



seguido de la resolución de los enantiómeros resultantes de un compuesto de fórmula (MR).

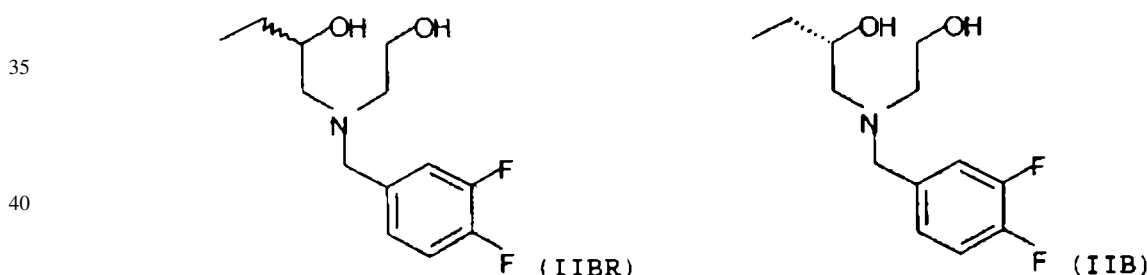
Para ambas reacciones (a) y (b), la ciclación de los dioles intermedios (IIBR) y (IIB) en la reacción entre el compuesto de fórmula (V) y un compuesto de fórmula (VI) o (VIA) se realiza típicamente en las condiciones de Mitsunobu como se indica a continuación:

Típicamente, una mezcla del compuesto de fórmula (V) y del compuesto de fórmula (VI) o de fórmula (VIA) en un disolvente adecuado, tal como tetrahidrofurano, se agita, adecuadamente durante 20-24 horas a una temperatura

adecuada, adecuadamente a la temperatura de reflujo del disolvente, en una atmósfera inerte, adecuadamente una atmósfera de nitrógeno. Después, se añade el disolvente y la mezcla se enfría, adecuadamente a 0-5°C. Se añade una fosfina adecuada, tal como trifenilfosfina, y la mezcla se agita hasta que se disuelve todo el sólido. Después se añade un compuesto azo adecuado, adecuadamente azodicarboxilato de diisopropilo, durante un período de tiempo, adecuadamente de 10-15 minutos, durante el cual se mantiene la temperatura a <7°C. La mezcla se deja en reposo durante un período de tiempo, adecuadamente de 2-3 horas y después se deja calentar, adecuadamente a 20-25°C. Después de un período adicional de reposo, adecuadamente 4-6 horas, se añaden más compuestos de fosfina y azo. Después de un período adicional de reposo, adecuadamente 20-24 horas, la mezcla de reacción se concentra casi a sequedad. Se añade un alcohol adecuado, adecuadamente propan-2-ol, y se repite la etapa de concentración; después se repite la adición de alcohol y la etapa de concentración. Después se añade más alcohol y la mezcla se calienta, adecuadamente a una temperatura entre 65 y 75°C. Después de un período adecuado, adecuadamente 20-45 minutos, la suspensión resultante se enfría, adecuadamente a 20-25°C y después se deja en reposo, adecuadamente durante 1,5-3 horas, tiempo después del cual el producto se aísla por filtración. El lecho de filtro se lava con más alcohol y después se seca al vacío a 35-45°C para producir la forma protegida del compuesto de fórmula (IIR) o de fórmula (II) respectivamente.

La retirada del grupo protector del producto típicamente se realiza como se indica a continuación. Una suspensión de la forma protegida del compuesto de fórmula (MR) o de fórmula (II) en un disolvente polar apropiado, adecuadamente agua, se calienta a una temperatura elevada, adecuadamente de 70-75°C y después se trata gota a gota con un ácido mineral concentrado, adecuadamente ácido sulfúrico concentrado. La mezcla después se calienta a una temperatura elevada, adecuadamente a la temperatura de reflujo del disolvente, durante un período adecuado de tiempo, adecuadamente de 20 a 24 horas, tiempo después del cual la mezcla de reacción se enfría a 20-25°C y después se trata con un disolvente apolar adecuado, adecuadamente diclorometano. Después se añade gota a gota una base, adecuadamente una solución de amoníaco 0,880, manteniendo la temperatura entre 20 y 25°C. Después se añade más disolvente apolar, después la fase acuosa se separa y se extrae con un disolvente apolar adecuado. La fase orgánica combinada se lava con agua y después se evapora a sequedad. El residuo se vuelve a disolver y el disolvente apolar se evapora el compuesto de fórmula (IIR) o de fórmula (II).

El procedimiento para la preparación de la forma protegida del compuesto de fórmula (IIR) o de la fórmula (II) descrito anteriormente también puede realizarse en dos etapas, en las cuales se aísla un compuesto intermedio de fórmula (IIBR) o de fórmula (IIB) respectivamente;



en las que A es como se ha definido anteriormente para las fórmulas (VI) y (VIA).

Típicamente, una mezcla del compuesto de fórmula (V) y un compuesto de fórmula (VI) o de fórmula (VIA) en un disolvente adecuado, tal como tetrahidrofurano, se agita, adecuadamente durante 20-24 horas, a una temperatura adecuada, adecuadamente la temperatura de reflujo del disolvente, en una atmósfera inerte, adecuadamente una atmósfera de nitrógeno. Se añade más compuesto de fórmula (V) y la mezcla se calienta a una temperatura adecuada, adecuadamente la temperatura de reflujo del disolvente, en una atmósfera inerte, adecuadamente una atmósfera de nitrógeno, durante un período adecuado de tiempo, adecuadamente de 3-6 horas. La mezcla de reacción después se enfría, adecuadamente a 20-25°C y el compuesto se precipita por medio de la adición de un co-disolvente adecuado, adecuadamente éter diisopropílico. El compuesto de fórmula (IIBR) o de fórmula (IIB), respectivamente, se aísla por filtración, se lava con más co-disolvente y se seca al vacío.

Después, puede prepararse una forma protegida del compuesto de fórmula (IIR) o de fórmula (II) a partir de un compuesto de fórmula (IIBR) o de fórmula (IIB) en condiciones similares a las de la reacción entre un compuesto de fórmula (V) y fórmulas (VI) o (VIA) como se ha descrito anteriormente, pero omitiendo el período de reflujo antes de la adición de los compuestos de fosfina y azo.

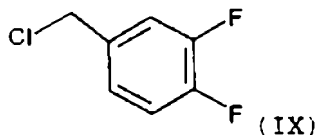
La reacción (c) típicamente se realiza agitando una solución del compuesto de fórmula (VII) en un disolvente adecuado, por ejemplo una mezcla de metanol y agua, y añadiendo una base adecuada, por ejemplo carbonato potásico. La mezcla se agita a una temperatura adecuada, por ejemplo en el intervalo de 20-25°C durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo de 16-20 horas, seguido de la retirada del disolvente orgánico, al vacío. Después se añade agua y la mezcla se extrae con un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua y una solución acuosa saturada de cloruro sódico antes de secarse sobre un agente

ES 2 339 436 T3

de secado adecuado, por ejemplo sulfato sódico, de filtrarse y de evaporar el disolvente, al vacío. El producto bruto después se purifica por cromatografía ultrarrápida.

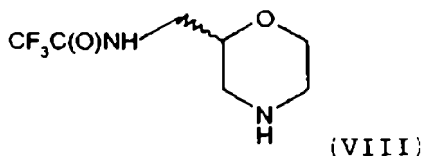
La resolución del compuesto de fórmula (II) a partir del producto racémico, es decir el compuesto de fórmula (IIR), puede realizarse usando técnicas bien conocidas para los especialistas en la técnica, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución quiral preparativa (HPLC quiral) o por cristalización fraccional de sales diastereoisoméricas.

El compuesto de fórmula (V) puede prepararse a partir del compuesto de fórmula (IX)



por reacción con etanolamina. Adecuadamente, la reacción se realiza a temperatura elevada, por ejemplo 40-60°C, en ausencia del disolvente.

El compuesto de fórmula (VII) puede prepararse por reacción del compuesto de fórmula (VIII)



con cloruro de 3,4-difluorobencilo.

La reacción entre un compuesto de fórmula (VIII) y cloruro de 3,4-difluorobencilo típicamente se realiza en un disolvente adecuado, por ejemplo N,N-dimetilformamida, en una atmósfera inerte, por ejemplo una atmósfera de nitrógeno, con la adición de una base adecuada, por ejemplo carbonato potásico, y un agente de activación adecuado, tal como yoduro sódico. Después, la mezcla se agita a una temperatura adecuada, por ejemplo a una temperatura en el intervalo de 20-25°C, durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo de 16-20 horas, antes de retirar los componentes volátiles, al vacío.

El compuesto de fórmula (VIII) se prepara tratando una solución de morfolin-2-ilmetilamina en un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo metanol, en una atmósfera inerte, por ejemplo una atmósfera de nitrógeno, con una solución de a,a,a-trifluoroacetato de etilo en un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo éter. Después, la mezcla se agita durante un periodo de tiempo adecuada, por ejemplo 20-40 minutos a una temperatura adecuada, por ejemplo a una temperatura en el intervalo de 20-25°C y los componentes volátiles se retiran, al vacío. Después, el residuo se disuelve en un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo metano, y los componentes volátiles se retiran, al vacío.

Los compuestos de fórmulas (IV) y (VI) están disponibles en el mercado y pueden prepararse por procedimientos análogos a los conocidos, por ejemplo, los descritos en los textos de referencia convencionales de metodología sintética, tales como J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Edition (1985), Wiley Interscience.

Los compuestos de fórmulas (II), (IIBR), (IIB) y (V) son considerados nuevos.

Por consiguiente, se proporciona un compuesto de fórmula (II).

También se proporciona un compuesto de fórmula (IIBR).

También se proporciona un compuesto de fórmula (IIB).

También se proporciona un compuesto de fórmula (V).

Los grupos protectores adecuados en cualquiera de las reacciones mencionadas anteriormente son los utilizados convencionalmente en la técnica. Los procedimientos de formación y retirada de tales grupos protectores son los procedimientos convencionales apropiados para la molécula a proteger, por ejemplo, los descritos en textos de referencia convencionales de Metodología Sintética como *P J Kocienski, Protecting Groups (1994) Thieme*.

Para cualquiera de las reacciones o procedimientos mencionados, pueden emplearse procedimientos convencionales de calentamiento y refrigeración, por ejemplo camisas calefactoras eléctricas y baños de hielo/sal respectivamente. También pueden usarse, según se requieran, procedimientos convencionales de purificación, por ejemplo cristalización y cromatografía en columna.

ES 2 339 436 T3

Las sales y solvatos de los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse a partir del compuesto de fórmula (I) o de las sales y solvatos del mismo y aislarse de acuerdo con procedimientos convencionales.

Los compuestos de la invención pueden ensayarse para la actividad biológica *in vitro* de acuerdo con los siguientes ensayos:

(a) Ensayo de Unión a CCR-3

Se usó SPA de unión competitiva a CCR-3 (ensayo de proximidad de centelleo) para evaluar la afinidad de nuevos compuestos por CCR-3. Se mezclaron membranas preparadas a partir de células K562 que expresaban de forma estable CCR-3 (2,5 µg/pocillo) con 0,25 mg/pocillo de perlas de SPA con aglutinina de germen de trigo (Amersham) y se incubaron en tampón de fijación (HEPES 50 mM, CaCl 1 mM, MgCl 5 mM, BSA al 0,5%) a 4°C durante 1,5 horas. Tras la incubación, se añadieron 20 pM de [¹²⁵I] eotaxina (Amersham) y concentraciones crecientes de compuesto (de 1 pM a 30 µM) y se incubaron en una placa de 96 pocillos durante un período de 2 horas a 22°C, y después se contaron en un contador de placas Microbeta. El volumen total de ensayo fue de 100 µ. Los datos de unión competitiva se analizaron ajustando los datos con una ecuación logística de cuatro parámetros. Los datos se presentan como los valores de pCI₅₀ medios (logaritmo negativo de la concentración de compuesto que inhibe la unión de [¹²⁵I]eotaxina en un 50%) de al menos dos experimentos.

(b) Ensayo de Quimiotaxis de Eosinófilos

Los compuestos se evaluaron para comprobar su efecto inhibidor sobre la quimiotaxis de eosinófilos. Se purificaron eosinófilos a partir de sangre periférica humana por reducción convencional de células CD16 usando un columna de separación de células Miltenyi y un electroimán Super Macs como se ha descrito previamente (Motegi & Kita, 1998; J. Immunology. 161:4340-6). Las células se resuspendieron en RPMI 1640/solución de FCS al 10% y se incubaron con calceína-AM (Molecular Probes) a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación, los eosinófilos se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos y se resuspendieron en RPMI/FCS a 2,2 millones/ml. Después, las células se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de compuestos (de 1 pM a 30 µM) a 37°C durante 30 minutos. Para las respuestas de control, las células se incubaron sólo con RPMI/FCS. El agonista eotaxina (una concentración CE₃₀) se añadió a la cámara inferior de una placa de quimiotaxis de 96 pocillos (filtro de 5 nm: Receptor Technologies). Se añadieron eosinófilos (50 ni de 2 millones de células/ml a la cámara superior de la placa de filtro y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Las células que quedaban encima del filtro de quimiotaxis se retiraron y se cuantificó el número de eosinófilos que habían migrado por medio de la lectura de la placa en un lector de placas fluorescentes. Las curvas de inhibición para el efecto de los compuestos sobre la quimiotaxis de eosinófilos se analizaron ajustando los datos con una ecuación logística de cuatro parámetros. Se generaron valores funcionales de pKi (fpKi) usando la siguiente ecuación (Lazareno & Birdsall, 1990. Br. J. Pharmacol 109:1110-9).

$$fpKi = \frac{CI_{50}}{1 + \frac{[Agonista]}{CE_{50}}}$$

El compuesto de los Ejemplos se ensayó en los ensayos de unión a CCR-3 y/o de quimiotaxis de eosinófilos ensayos (a) y (b)). El compuesto de los Ejemplos ensayado en el ensayo de unión a CCR-3 típicamente poseían valores de pCI₅₀ de 8,0. El compuesto de la invención ensayado en el ensayo de quimiotaxis de eosinófilos de CCR-3 poseía un valor de fpKi de 8,4.

Los ejemplos de estados de enfermedad en los que el compuesto de la invención tiene efectos antiinflamatorios potencialmente beneficiosos incluyen enfermedades del tracto respiratorio tales como bronquitis (incluyendo bronquitis crónicas, bronquiectasis, asma (incluyendo reacciones asmáticas inducidas por alérgenos), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis quística, sinusitis y rinitis.

También se incluyen enfermedades del tracto gastrointestinal tales como enfermedades inflamatorias intestinales, incluyendo enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), y enfermedades inflamatorias intestinales secundarias a la exposición a una radiación o a la exposición a alérgenos.

Además, el compuesto de la invención puede usarse para tratar nefritis, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, eccema, dermatitis alérgica y reacciones de hipersensibilidad y enfermedades del sistema nervioso central que tienen un componente inflamatorio (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, meningitis, esclerosis múltiple) VIH y demencia inducida por el SIDA.

Los compuestos de la presente invención también pueden ser de utilidad en el tratamiento de la poliposis nasal, conjuntivitis o pruritis.

Otros ejemplos de estados de enfermedad en los que el compuesto de la invención tiene efectos potencialmente beneficiosos incluyen afecciones cardiovasculares tales como aterosclerosis, enfermedad vascular periférica y síndrome de hipereosinofilia idiopática.

Los compuestos de la invención pueden ser útiles como agentes inmunosupresores y, de esta manera, tener utilidad en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como el rechazo de tejidos de aloinjerto después de un trasplante, la artritis reumatoide y la diabetes. El compuesto de la invención también puede ser útil en la inhibición de metástasis. Las enfermedades de principal interés incluyen asma, COPD y enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio superior, incluyendo la rinitis estacional y perenne.

Los especialistas en la técnica apreciarán que las referencias de este documento al tratamiento o terapia incluyen la profilaxis así como el tratamiento de afecciones establecidas.

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos de fórmula (I) son útiles como agentes terapéuticos.

De esta forma, como aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato fisiológicamente aceptable del mismo para uso como un agente terapéutico activo.

Por lo tanto, también se proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias, por ejemplo, asma o rinitis.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o de una sal o solvato fisiológicamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de pacientes con afecciones inflamatorias, por ejemplo asma o rinitis.

En un aspecto adicional o alternativo, se divulga un procedimiento para el tratamiento de un ser humano o un animal con una afección inflamatoria, por ejemplo, asma o rinitis, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o de una sal o solvato fisiológicamente aceptable del mismo.

El compuesto de acuerdo con la invención puede formularse para administración en cualquier forma conveniente. De esta manera, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I), o una sal o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, y opcionalmente uno o más diluyentes o vehículos fisiológicamente aceptables.

También se proporciona un procedimiento para preparar tal formulación farmacéutica que comprende mezclar el compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato fisiológicamente aceptable del mismo con uno o más diluyentes o vehículos fisiológicamente aceptables.

El compuesto de acuerdo con la invención puede formularse, por ejemplo, para administración oral, inhalada, intranasal, bucal, parenteral o rectal, preferiblemente para administración oral.

Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón, celulosa o polivinil pirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico o sorbitol; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo, almidón de patata, croscarmelosa sódica o almidón glicolato sódico; o agentes humectantes tales como lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo, jarabe de sorbitol, metil celulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroximetil celulosa, carboximetil celulosa, gel de estearato de aluminio, o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, esteres oleosos, propolenglicol o alcohol etílico; o conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico. Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, agentes aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes (por ejemplo, manitol) cuando sea apropiado.

Para la administración oral, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o grageas formuladas de una manera convencional.

El compuesto también puede formularse como supositorios, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

El compuesto de acuerdo con la invención también puede formularse para administración parenteral por inyección en embolada o infusión continua, y puede presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como ampollas, viales, infusiones de pequeño volumen o jeringas rellenas previamente, o en recipientes de múltiples dosis con

un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como soluciones, suspensiones o emulsiones en vehículos acuosos o no acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como antioxidantes, tampones, agentes antimicrobianos y/o agentes para ajustar la tonicidad. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituirse con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

La presentación sólida seca puede prepararse introduciendo un polvo estéril asépticamente en recipientes estériles individuales o introduciendo una solución estéril asépticamente en cada recipiente y liofilizándolos.

El compuesto y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes antihistamínicos, agentes anticolinérgicos, agentes antiinflamatorios tales como corticosteroides, por ejemplo, propionato de fluticasona, dipropionato de beclometasona, furoato de mometasona, triamcinolona acetónida o budesonida; o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), por ejemplo, cromoglicato sódico, nedocromil sódico, inhibidores de PDE-4, antagonistas de leucotrieno, inhibidores de iNOS, inhibidores de triptasa y elastasa, antagonistas de beta-2 integrina y agonistas de adenosina 2a; o agentes beta adrenérgicos tales como salmeterol, salbutamol, formoterol, fenoterol o terbutalina y sales de los mismos; o agentes antiinfecciosos, por ejemplo, agentes antibióticos y agentes antivirales. Se apreciará que cuando el compuesto de la presente invención se administra en combinación con otros agentes terapéuticos administrados normalmente por la vía inhalada o intranasal, la composición farmacéutica resultante puede administrarse por la vía inhalada o intranasal.

Los compuestos de la invención pueden administrarse convenientemente en cantidades de, por ejemplo, 0,001 a 500 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,01 a 500 mg/kg, más preferiblemente de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal, y a cualquier frecuencia apropiada, por ejemplo, de 1 a 4 veces al día. Por supuesto, el régimen de dosificación preciso dependerá de factores tales como la indicación terapéutica, la edad y el estado del paciente, y la vía de administración particular elegida.

En la descripción y las reivindicaciones que se presentan a continuación, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la expresión comprender y variaciones tales como “comprende” y “que comprende” implican la inclusión del número entero, etapa o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa o grupo de números enteros o etapas.

Detalles experimentales generales

Sistema de Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS)

Se usó el siguiente sistema (LC/MS):

Una columna de 3 μ m ABZ+PLUS (3,3 cm x 4,6 mm de 5 diámetro interno) eluyendo con los siguientes disolventes: A ácido fórmico al 0,1% v/v + acetato amónico al 0,077% p/v en agua; y B 95:5 de acetonitrilo:agua + ácido fórmico al 0,05% v/v, a un caudal de 3 ml por minuto. Se usó el siguiente protocolo de gradiente: 100% de A durante 0,7 minutos; mezclas de A+B, perfil de gradientes 0-100% de B durante 3,5 minutos; mantenimiento con B al 100% durante 1,1 minutos; vuelta a A al 100% durante 0,2 minutos.

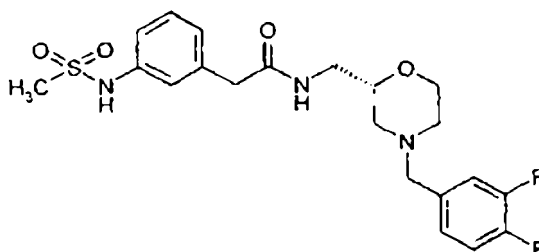
Extracción en fase sólida (intercambio iónico)

“SCX” se refiere a cartuchos de extracción de fase sólida de ácido sulfónico Isolute Flash SCX-2.

Todas las temperaturas están en °C.

Ejemplo 1

N-{*m*[2*S*]-4-(3,4-difluorobencil)morfolin-2-il]metil}>-2-{3-[*K*(metilsulfonyl)aminol]feni}acetamida



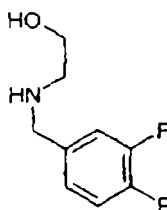
A una solución agitada de la Descripción 4 (0,0242 g) en N,N-dimetilformamida (1 ml) se le añadió una solución de clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,0304 g), 1-hidroxibenzotriazol (0,0171 g) y la Descripción 3 (0,0243 g) en N,N-dimetilformamida (1 ml) a 22°. A la mezcla se le añadió N,N-diisopropiletilamina

ES 2 339 436 T3

(0,0368 ml), que después se agitó a 22°C durante 18 horas. La mezcla se aplicó a un cartucho de intercambio iónico SCX de 2g (IST Isolute Flash SCX-2) acondicionado previamente con metanol. El cartucho se eluyó con metanol y una solución de amoníaco 0,880 al 10% en metanol. La primera fracción de amoníaco se evaporó al vacío y el residuo se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida Biotage™ sobre gel de sílice, eluyendo con 200:8:1 de diclorometano/etanol/solución de amoníaco 0,880. Las fracciones requeridas se combinaron y el disolvente se evaporó al vacío, dando el *compuesto del título* (0,0353 g) en forma de un vidrio incoloro. LC/MS : $R_t = 2,16$ min, m/z 454 $[MH^+]$.

Descripción 1

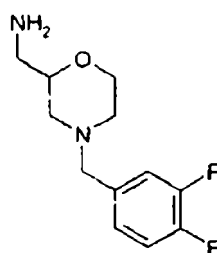
2-(3,4-Difluorobencilamino)-etanol



Se añadió gota a gota 4-clorometil-1, 2-difluorobenceno (90,0 g) (Fluorochem Chemicals/Journal of Organic Chemistry, 1961, (26), 2353-2355), a etanolamina (325,8 ml) a 40°C, con agitación en una atmósfera de nitrógeno y se enfrió para mantener la temperatura de reacción. La mezcla se agitó durante 3 h mientras se calentaba a aproximadamente 50°C antes de enfriarse a temperatura ambiente. La mezcla se repartió entre acetato de etilo y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con más solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (100 ml). Las fases acuosas combinadas se extrajeron adicionalmente con una porción de acetato de etilo (100 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 500 ml), y una solución acuosa saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se concentró al vacío y se concentró de nuevo después de la adición de tolueno, dando el *compuesto del título* en forma de un sólido blanco (92,5 g) Espectro de masas m/z 188 $[MH^+]$.

Descripción 2

[4-(3,4-Difluorobencil)morfolin-2-il]metilamina

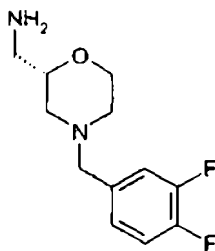


Se añadió en porciones 2 (oxiran-2-ilmetil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (166,8 g) al compuesto agitado de la Descripción 1 (128,12 g) a 80-90°C en una atmósfera de nitrógeno durante 50 minutos. La mezcla se agitó a 80-90°C durante 3 horas más antes de añadir gota a gota ácido sulfúrico concentrado (200 ml) durante 40 minutos. La mezcla se calentó a 150°C y se agitó durante una noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se lavó con acetato de etilo (2 x 400 ml). La fase acuosa se enfrió a 10°C y se añadió cuidadosamente durante 30 minutos cloruro sódico acuoso saturado (400 ml). A la fase acuosa se le añadió más cloruro sódico acuoso saturado (400 ml) y la mezcla se lavó con porciones adicionales de acetato de etilo (3 x 500 ml). La fase acuosa se enfrió a 10°C y se ajustó a pH 12-13 con hidróxido sódico acuoso 10N. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml) y las fases orgánicas combinadas se filtraron a través de un adyuvante de filtro "Hyflo". Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (3 x 500 ml) y cloruro sódico acuoso saturado. La fase orgánica se concentró al vacío y se concentró de nuevo (x 3) después de la adición de tolueno (3 x 150 ml), dando el *compuesto del título* en forma de un aceite ámbar (94 g). Espectro de masas m/z 243 $[MH^+]$.

ES 2 339 436 T3

Descripción 3

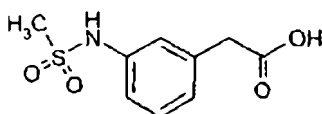
1-[f(2S)-4-(3,4-Difluorobencil)morfolin-2-il]metilamina



Se separó la Descripción 2 (4,5 g) (mezcla racémica) en sus dos enantiómeros individuales por HPLC-quiral preparativa. La separación se realizó usando una columna Chiralpak AD 20 μ m de 5,08 cm x 22 cm, sistema Merck self pack DAC, eluyendo con 95:5:0,1 (v/v) de heptano:etanol absoluto:dietilamina (caudal: 50 ml/min durante 40 min, detección UV 220 nm); preparación de la carga de muestra: muestra de 300 mg en 10 ml de 1:1 (v/v) de etanol absoluto/eluyente del sistema. El disolvente se retiró de las fracciones requeridas al vacío y el producto se repartió entre diclorometano y ácido clorhídrico acuoso 2 N, las fases se separaron y la fase orgánica se extrajo con más ácido clorhídrico acuoso 2 N (x2). Los estratos acuosos combinados se ajustaron a pH 12 por la adición de carbonato potásico sólido y la solución se saturó con cloruro sódico sólido. La solución se extrajo con diclorometano (x3) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y el disolvente se retiró al vacío, dando el *compuesto del título* (1,84 g) en forma de un aceite amarillo. Tiempo de retención de la HPLC preparativa 28,5 min.

Descripción 4

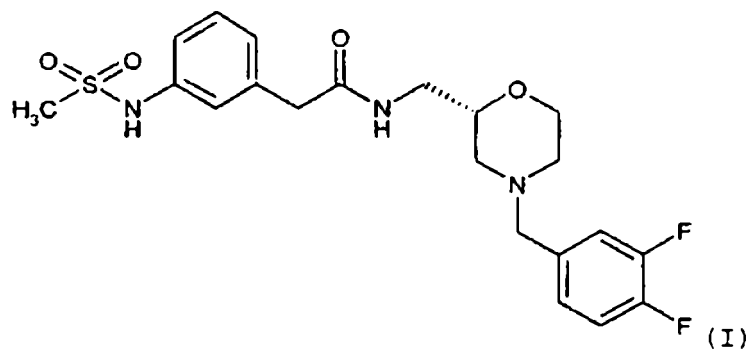
Ácido 3-f(metilsulfonyl)aminoIfenilacético



A una solución de ácido 3-aminofenilacético (3,2 g) y carbonato sódico (5,44 g) en agua desionizada (36 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonylo (1,7 ml). La mezcla se calentó con agitación a 85° durante 4 horas antes de dejarse enfriar a temperatura ambiente, se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico concentrado y se dejó en reposo en un frigorífico a 4° durante una noche. El sólido precipitado se filtró se lavó con agua y éter y el filtrado y los lavados combinados se evaporaron a sequedad al vacío. El residuo resultante se disolvió en agua caliente y se recristalizó durante una noche mientras se mantenía en reposo en el frigorífico a 4°C. Los cristales se filtraron, se elevaron con una pequeña cantidad de agua fría y se secaron al vacío, dando el *compuesto del título* (0,417 g) en forma de cristales incoloros. LC/MS: R_t = 2,00 min, m/z 228 $[MH^+]$, m/z 247 $[MNH^-]$.

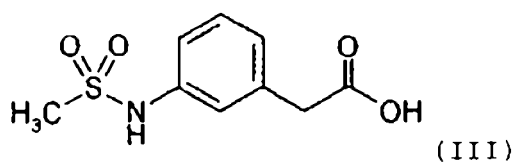
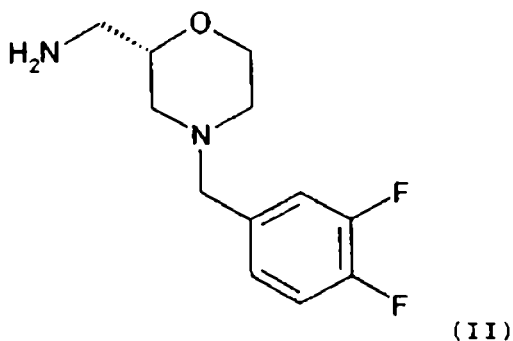
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



y sales y solvatos del mismo.

2. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I), o una sal o solvato del mismo, que comprende acoplar un compuesto de fórmula (II), o una sal del mismo, con un compuesto de fórmula (III)

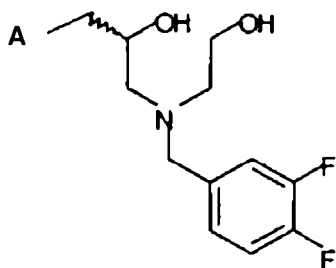


3. Un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1 para su uso como un agente terapéutico.

4. El uso de un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un ser humano o un animal que padecen o son susceptibles de padecer una afección inflamatoria.

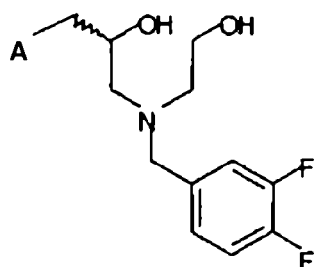
5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1 y un vehículo fisiológicamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de fórmula (IIBR)



en el que A es un grupo amino protegido.

7. Un compuesto de fórmula (IIB)



(IIB)

en la que A es un grupo amino protegido.

8. Un compuesto de fórmula (V)

