



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 673**

51 Int. Cl.:  
**C07D 451/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06772173 .8**

96 Fecha de presentación : **06.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1902053**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

54 Título: **Compuestos de benzoimidazolona-carboxamida como agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>.**

30 Prioridad: **07.06.2005 US 688048 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.05.2011**

73 Titular/es: **THERAVANCE, Inc.**  
**901 Gateway Boulevard**  
**South San Francisco, California 94080, US**

72 Inventor/es: **Gendron, Roland;**  
**Choi, Seok-Ki;**  
**Fatheree, Paul R.;**  
**Goldblum, Adam, A.;**  
**Long, Daniel, D.;**  
**Marquess, Daniel y**  
**Turner, S. Derek**

74 Agente: **Blanco Jiménez, Araceli**

ES 2 359 673 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

Compuestos de benzoimidazolona-carboxamida como agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La invención se dirige a compuestos de benzoimidazolona-carboxamida que sirven como agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub>. La invención también se dirige a composiciones farmacéuticas comprendiendo tales compuestos y encuentra utilidad en métodos para utilizar tales compuestos para tratar o prevenir condiciones médicas mediadas por la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>. También se proporcionan los procesos e intermediarios útiles para preparar tales compuestos.

**Estado de la técnica**

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es un neurotransmisor ampliamente distribuido por todo el cuerpo, tanto en el sistema nervioso central como en los sistemas periféricos. Al menos siete subtipos de receptores de serotonina han sido identificados y la interacción de la serotonina con estos receptores diferentes está vinculada a una amplia variedad de funciones fisiológicas. Existe, por lo tanto, un interés sustancial en el desarrollo de agentes terapéuticos que se dirijan a los subtipos específicos de los receptores 5-HT.

En particular la caracterización de los receptores 5-HT<sub>4</sub> y la identificación de los agentes farmacéuticos que interactúan con ellos ha sido el foco de importantes actividades recientes. (Véase, por ejemplo, la revisión realizada por Langlois y Fischmeister, *J. Med. Chem.* 2003, 46, 319-344). Los agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> son útiles para el tratamiento de los trastornos de la motilidad reducida del tracto gastrointestinal. Estos trastornos incluyen el síndrome de intestino irritable (SII), el estreñimiento crónico, la dispepsia funcional, el retraso en el vaciamiento gástrico, la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), la gastroparesia, el íleo postoperatorio, la pseudoobstrucción intestinal y el tránsito retardado inducido por medicamentos. Además, se ha sugerido que algunos compuestos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> pueden utilizarse en el tratamiento de desórdenes del sistema nervioso, incluyendo los trastornos cognitivos, trastornos de conducta, trastornos del estado de ánimo y los trastornos del control de la función autonómica.

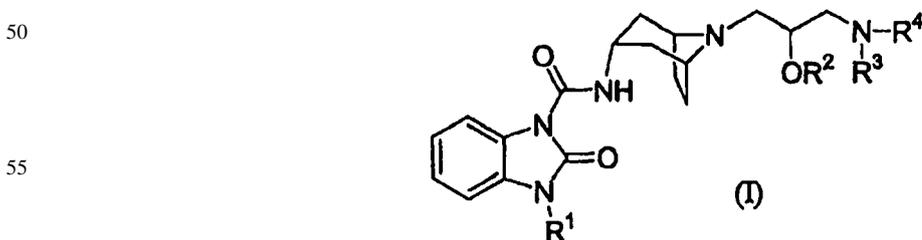
A pesar de la amplia utilidad de los agentes farmacéuticos que modulan la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>, en la actualidad se utilizan pocos compuestos de agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub>. La patente EP 908 459 A describe una serie de indazol- y 2-oxobenzamidadol-3-carboxamidas que son antagonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> de la serotonina.

Por consiguiente, hay una demanda de nuevos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> que logren los efectos deseados con efectos secundarios mínimos. Los agentes preferidos pueden poseer, entre otras propiedades, una selectividad, potencia, propiedades farmacocinéticas y/o duración de la acción mejoradas.

40 **Sumario de la invención**

La invención provee nuevos compuestos que poseen actividad agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>. Se ha descubierto que, entre otras propiedades, los compuestos de la invención son agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> potentes y selectivos. Además, se ha descubierto que los compuestos de la invención presentan propiedades farmacocinéticas favorables que son predictivas de una buena biodisponibilidad en la administración oral.

Por consiguiente, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I):



60 donde:

R<sup>1</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;

R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;

65 R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>;

## ES 2 359 673 T3

R<sup>4</sup> es -C(O)R<sup>5</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>6</sup>,

5



o R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que se unen forman

10



15

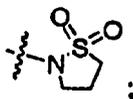
R<sup>5</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub>, o piridinilo, donde el alquilo C<sub>1-3</sub> es opcionalmente sustituido con hidroxilo;

R<sup>6</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub>, o imidazolilo, donde el imidazolilo es opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-3</sub>;

20

R<sup>7</sup> es -NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>alquilo C<sub>1-3</sub>, -NR<sup>10</sup>C(O)R<sup>11</sup>, o

25



R<sup>8</sup> es -S(O)<sub>2</sub>alquiloC<sub>1-3</sub> o -C(O)R<sup>12</sup>;

30

R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> son cada uno independientemente alquilo C<sub>1-3</sub> y

R<sup>12</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub> o tetrahydrofurano, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato o estereoisómero de los mismos.

35

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

40

La invención encuentra utilidad en un método para tratar una enfermedad o condición asociada con la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>, por ejemplo, un trastorno de la motilidad reducida del tracto gastrointestinal, el método comprendiendo administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención.

45

Además, la invención encuentra utilidad en un método para tratar una enfermedad o condición asociada con la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub> en un mamífero, el método comprendiendo administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

50

Los compuestos de la invención también pueden utilizarse como herramientas de investigación, es decir, para estudiar sistemas biológicos o muestras, o para el estudio de la actividad de otros compuestos químicos. En consecuencia, en otro de los aspectos de su método, la invención proporciona un método para usar un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato o estereoisómero del mismo, como herramienta de investigación para el estudio de un sistema biológico o muestra *in vitro* o para descubrir nuevos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub>, el método comprendiendo poner en contacto un sistema biológico o muestra *in vitro* con un compuesto de la invención y la determinación de los efectos causados por el compuesto en el sistema biológico o muestra.

55

En aspectos separados y distintos, la invención también proporciona procesos de síntesis y productos intermedios descritos en la presente memoria, que son útiles para preparar los compuestos de la invención.

60

La invención también proporciona un compuesto de la invención tal como se describe en la presente memoria para su uso en terapia médica, así como el uso de un compuesto de la invención en la elaboración de una fórmula o medicamento para tratar una enfermedad o condición asociada con la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>, por ejemplo, un trastorno de la motilidad reducida del tracto gastrointestinal, en un mamífero.

### Descripción breve de los dibujos

65

La figura muestra un polvo de difracción de rayos X (PXRD) patrón de una sal de hidrocloreto cristalina de {(1S,3R,SR)-8-[(R)-3-(acetilnietilamino)-2-hidroxiopropil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il]amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico de la invención.

**Descripción detallada de la invención**

La invención proporciona nuevos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> de benzoimidazolona-carboxamida de la fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables o solvatos o estereoisómeros de la misma. Los sustituyentes y valores siguientes están destinados a proporcionar ejemplos representativos de los diversos aspectos de esta invención. Estos valores representativos pretenden definir mejor tales aspectos y no pretenden excluir otros valores o limitar el alcance de la invención.

En los aspectos específicos de la invención, R<sup>1</sup> es etilo, propilo o isopropilo, o R<sup>1</sup> es etilo o isopropilo.

En otro aspecto específico, R<sup>1</sup> es isopropilo.

En un aspecto específico, R<sup>2</sup> es hidrógeno, metilo o etilo.

En otro aspecto específico, R<sup>2</sup> es hidrógeno.

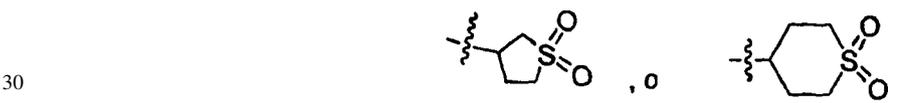
En un aspecto específico, R<sup>1</sup> es etilo o isopropilo y R<sup>2</sup> es hidrógeno.

En unos aspectos específicos, R<sup>3</sup> es metilo o etilo, o R<sup>3</sup> es metilo.

En un aspecto específico, R<sup>4</sup> es -C(O)R<sup>5</sup>.

En otro aspecto específico, R<sup>4</sup> es -S(O)2R<sup>6</sup>.

En otro aspecto específico, R<sup>4</sup> es



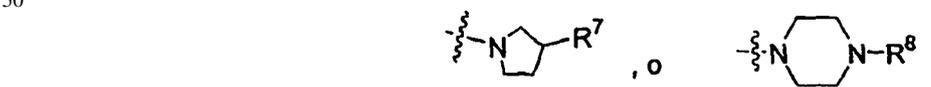
En otro aspecto específico, R<sup>4</sup> es



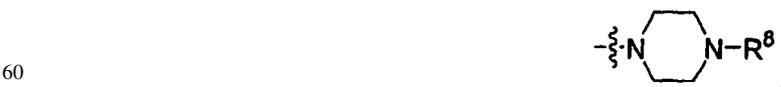
40 En otro aspecto específico, R<sup>4</sup> es -C(O)H, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)2CH<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-1-metilimidazol-4-il, o



En un aspecto específico R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos forman



55 En otro aspecto específico R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos forman



En un aspecto específico, R<sup>5</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub> o piridinilo. En unos aspectos específicos, R<sup>5</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>, o R<sup>5</sup> es hidrógeno o metilo.

65 En un aspecto específico, R<sup>6</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub> o imidazolilo, donde el imidazolilo es sustituido con alquilo C<sub>1-3</sub>. En otro aspecto específico, R<sup>6</sup> es metilo o 1-metilimidazol-4-ilo.

## ES 2 359 673 T3

En otro aspecto específico más, R<sup>6</sup> es 1-metilimidazol-4-ilo.

En unos aspectos específicos, R<sup>7</sup> es -NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o -NR<sup>10</sup>C(O)CH<sub>3</sub>, o R<sup>7</sup> es -NR<sup>10</sup>C(O)CH<sub>3</sub>.

5 En un aspecto específico, R<sup>8</sup> es -S(O)<sub>2</sub>alquilo C<sub>1-3</sub>, tal como -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

En otro aspecto específico, R<sup>8</sup> es -C(O)R<sup>12</sup>, tal como R<sup>8</sup> es -C(O)H, -C(O)CH<sub>3</sub> o -C(O)-tetrahidrofuran-2-ilo.

10 En un aspecto específico, R<sup>8</sup> es -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>3</sub>, o -C(O)-tetrahidrofuran-2-ilo.

En unos aspectos específicos, R<sup>9</sup> es metilo o etilo, o R<sup>9</sup> es metilo.

En unos aspectos específicos, R<sup>10</sup> es metilo o etilo, o R<sup>10</sup> es metilo.

15 En unos aspectos específicos, R<sup>11</sup> es metilo o etilo, o R<sup>11</sup> es metilo.

En un aspecto específico, R<sup>12</sup> es metilo o tetrahidrofurano.

En otro aspecto más, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I) donde:

20 R<sup>1</sup> es etilo o isopropilo;

R<sup>2</sup> es hidrógeno;

25 R<sup>3</sup> es metilo;

R<sup>4</sup> es -C(O)H, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-1-metilimidazol-4-ilo, o



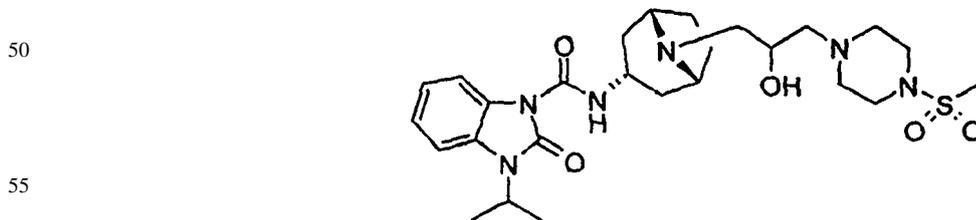
35 o R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman



y

45 R<sup>8</sup> es -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>3</sub> o -C(O)-tetrahidrofurano-2-ilo.

Las nomenclaturas químicas utilizadas en la presente memoria se ilustran para el compuesto del Ejemplo 1:



55 que es designado {(1S,3R,5R)-8-[2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico, según el software de AutoNom, suministrado por MDL Information Systems, GmbH (Frankfurt am Main, Alemania). La designación (1S,3R,5R) describe la orientación relativa de los enlaces relacionados con el sistema de anillos bicíclicos que se representan como cuñas continuas y discontinuas. El compuesto es alternativamente denominado ácido N-[(3-endo)-8-[2-hidroxi-3-(4-metanosulfonil-piperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il]-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico. En todos los compuestos de la invención representados en la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, la benzoimidazolona-carboxamida es endo al grupo azabicyclooctano.

## ES 2 359 673 T3

Se debe mencionar en particular los siguientes compuestos:

{(1S,3R,5R)-8-[2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)1-propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-{2-hidroxi-3-[4-(tetrahidrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil}-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-[3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxi]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-{3-[(1,1-dioxotetrahydro-1,6-tiofen-3-il)metilamino]-2-hidroxi]propil}-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(S)-2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(S)-3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxi]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxi]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-((S)-2-hidroxi-3-[4((R)-tetrahidrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-((S)-2-hidroxi-3-[4((S)-tetrahidrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-3-(acetilmetilamino)-2-hidroxi]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-((R)-2-hidroxi-3-[metil-(1-metil-1H-imidazol-4-sulfonil)amino]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(1-metilureido)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-{2-hidroxi-3-[metil-(1-metil-1H-imidazol-4-sulfonil)amino]propil}-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[2-hidroxi-3-(1-metilureido)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico; y

{(1S,3R,5R)-8-[3-(formilmetilamino)-2-hidroxi]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico.

Otras realizaciones de la invención incluyen compuestos de la fórmula (I) ejemplificados en la presente memoria, tal como un compuesto de la fórmula (I), donde el compuesto es {(1S,3R,5R)-8-[(R)-3-(acetilmetilamino)-2-hidroxi]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico.

Como ilustran los compuestos particulares que aparecen arriba, los compuestos de la invención puede contener uno o más centros quirales. Por ejemplo, el átomo de carbono en la fórmula (I) que lleva el sustituyente -OR<sup>2</sup> es opcionalmente un centro quiral. En consecuencia, la invención incluye mezclas racémicas, estereoisómeros puros y mezclas enriquecidas con estereoisómero de tales isómeros, a menos que se indique lo contrario. Cuando se muestra un estereoisómero particular, los expertos en la materia entenderán que pequeñas cantidades de otros estereoisómeros pueden estar presentes en las composiciones de la invención, a menos que se indique lo contrario, siempre que la utilidad de la composición en su conjunto no sea eliminada por la presencia de estos otros isómeros.

### Definiciones

En la descripción de los compuestos, composiciones y métodos de la invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario.

## ES 2 359 673 T3

El término “alquilo” significa un grupo hidrocarbano saturado monovalente que puede ser lineal o ramificado o combinaciones de los mismos. Los grupos alquilo representativos incluyen, a título de ejemplo, metilo, etilo, n-propilo (n-Pr), isopropilo (i-Pr), n-butilo (n-Bu), sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, y similares.

5 El término “halo” significa flúor, cloro, bromo o yodo.

El término “compuesto” significa un compuesto que se preparó de forma sintética o se produjo de otra manera, como por metabolismo.

10 El término “compuesto de la invención” o “compuesto de la fórmula I” o “compuesto de la fórmula I-a” como se usa aquí incluye las sales farmacéuticamente aceptables o solvatos o estereoisómeros de tales compuestos, a menos que se indique lo contrario.

15 El término “cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un paciente con necesidad de tratamiento.

El término “tratamiento” como se usa en la presente memoria, significa el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición médica de un paciente, como un mamífero (particularmente un humano) que incluye:

20 (a) evitar que se produzca la enfermedad, trastorno o estado médico, es decir, el tratamiento profiláctico de un paciente;

(b) mejorar la enfermedad, trastorno o condición médica, es decir, eliminar o causar la regresión de la enfermedad, trastorno o condición médica en un paciente;

25 (c) suprimir la enfermedad, trastorno o condición médica, es decir, retardar o detener el desarrollo de la enfermedad, trastorno o condición médica de un paciente; o

(d) aliviar los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la condición médica de un paciente.

30

El término “sal farmacéuticamente aceptable” significa una sal preparada a partir de un ácido o base que sea aceptable para la administración a un paciente, como un mamífero. Estas sales se pueden derivar de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables y de bases farmacéuticamente aceptables. Por lo general, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención son preparadas a partir de ácidos.

35

Las sales derivadas de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no exclusivamente, ácido acético, adípico, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, láctico, maléico, málico, mandélico, metanosulfónico, múcico, nítrico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico, xinafoico (ácido 1-hidroxi-2-naftoico), naftaleno-1,5-disulfónico y similares.

40

El término “sal del mismo” significa un compuesto formado cuando el hidrógeno de un ácido es reemplazado por un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico y similares. En la presente invención, el catión comprende típicamente una forma protonada de un compuesto de fórmula I, es decir, cuando uno o más grupos amino han sido protonados por un ácido. Preferiblemente, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario para las sales de compuestos intermedios que no están destinadas a la administración a un paciente.

45

El término “solvato” significa un complejo o agregado formado por una o más moléculas de un soluto, es decir, un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una o más moléculas de un solvente. Tales solvatos suelen ser sólidos cristalinos teniendo una relación molar sustancialmente fija de soluto y solvente. Los solventes representativos incluyen, a título de ejemplo, agua, metanol, etanol, isopropanol, ácido acético y similares. Cuando el solvente es agua, el solvato formado es un hidrato.

50

55 Se entenderá que la expresión “o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato o estereoisómero del mismo” pretende incluir todas las permutaciones de las sales, solvatos y estereoisómeros, tal como un solvato de una sal farmacéuticamente de un estereoisómero de un compuesto de la fórmula (I).

55

El término “grupo saliente” significa un grupo funcional o átomo que puede ser desplazado por otro grupo funcional o átomo en una reacción de sustitución tal como una reacción de sustitución nucleofílica. A modo de ejemplo, los grupos salientes representativos incluyen grupos de cloro, bromo y yodo, grupos de éster sulfónico, tales como mesilato, tosilato, brosilato, nosilato y similares y grupos aciloxi, tales como acetoxi, trifluoroacetoxi y similares.

60

El término “derivado protegido del mismo” significa un derivado de un compuesto específico en el que uno o más grupos funcionales del compuesto están protegidos de reacciones no deseadas con un grupo protector o bloqueador. Los grupos funcionales que pueden ser protegidos incluyen, a título de ejemplo, grupos de ácido carboxílico, grupos amino, grupos hidróxilo, grupos tiol, grupos carbonilo y similares. Los grupos protectores representativos para ácidos carboxílicos incluyen ésteres (tales como un éster p-metoxibencilico), amidas e hidracidas; para grupos amino, carba-

65

matos (tales como terc-butoxicarbonilo) y amidas; para grupos hidróxilos, éteres y ésteres; para grupos tioles, tioéteres y tioésteres; para grupos carbonilo, acetales y cetales; y similares. Tales grupos protectores son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en T.W. Greene y GM Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, tercera edición, Wiley, Nueva York, 1999, y referencias allí citadas.

5 El término "grupo protector de amino" significa un grupo protector adecuado para prevenir reacciones no deseadas en un nitrógeno amino. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, aunque no exclusivamente, formilo, grupos acilo, por ejemplo grupos alcanilo, como acetilo, grupos alcoxicarbonilo, como terc-butoxicarbonilo (Boc), grupos arilmetoxicarbonilo, como benciloxicarbonilo (Cbz) y 9-fluoronilmetoxicarbonilo (Fmoc); grupos arilmetilo, tal como bencilo (Bn), tritilo (Tr) y 1,1-di-(4'-metoxifenil)metilo, grupos sililo, como trimetilsililo (TMS) y tertbutildimetilsililo (TBDMS), y similares.

#### *Procedimientos sintéticos generales*

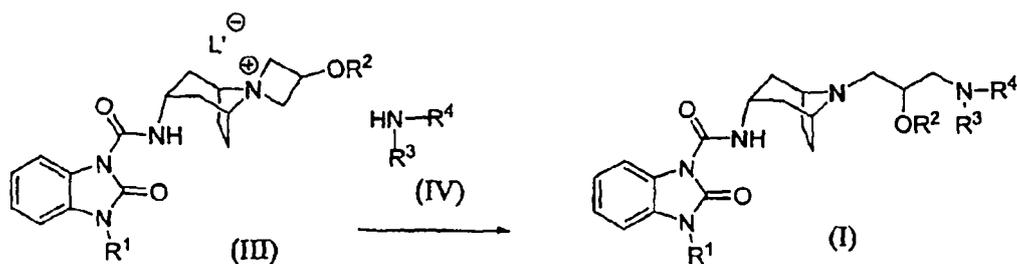
15 Los compuestos de la invención pueden ser preparados a partir de materias primas disponibles utilizando los siguientes métodos y procedimientos generales. Aunque en los esquemas que siguen se ilustra un aspecto particular de la presente invención, los expertos en la técnica reconocerán que todos los aspectos de la presente invención pueden prepararse utilizando los métodos que se describen aquí o utilizando otros métodos, reactivos y materiales iniciales conocidos por los expertos en la materia. También se apreciará que cuando se den condiciones típicas o preferidas del proceso (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.) también se pueden utilizar otras condiciones de proceso a no ser que se indique otra cosa. Las condiciones óptimas de reacción pueden variar dependiendo de los reactivos particulares o solventes utilizados, pero tales condiciones pueden ser determinadas por un experto en la técnica mediante procedimientos de optimización rutinarios.

25 Además, como resultará obvio para los expertos en la técnica, puede que se necesiten grupos protectores convencionales para evitar que algunos grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo adecuado para la protección de un grupo funcional particular, así como las condiciones adecuadas para la protección y desprotección, son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, se describen numerosos grupos protectores y su introducción y eliminación en T. W. Greene y G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, tercera edición, Wiley, Nueva York, 1999, y las referencias citadas en el mismo.

Los sustituyentes y las variables que se muestran en los esquemas siguientes tienen las definiciones proporcionadas en la presente memoria a menos que se indique lo contrario.

35 En un método de síntesis, los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar como se ilustra en el Esquema A.

Esquema A



55 Se hace reaccionar un intermediario de acetidina (III) con el intermediario (IV), una amina secundaria o un derivado de una amina primaria, para proporcionar un compuesto de la fórmula (I). En el Esquema A, L' representa un contraión, tal como haluro, por ejemplo, Cl-, Br-, o trifluoroacetato. Normalmente, el intermediario de acetidina (III) se disuelve en un diluyente inerte, tal como etanol, y se pone en contacto con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8 equivalentes de la amina secundaria (IV), en presencia de una base, tal como N,N-diisopropiletilamina. Esta reacción se suele realizar a una temperatura de aproximadamente 0°C a 100°C durante entre cerca de 2 y 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada.

60 El producto de la fórmula (I) es aislado y purificado por métodos convencionales. Por ejemplo, el producto se puede concentrar hasta secarse bajo presión reducida, recoger en una solución acuosa de ácido débil y purificar por cromatografía HPLC.

65

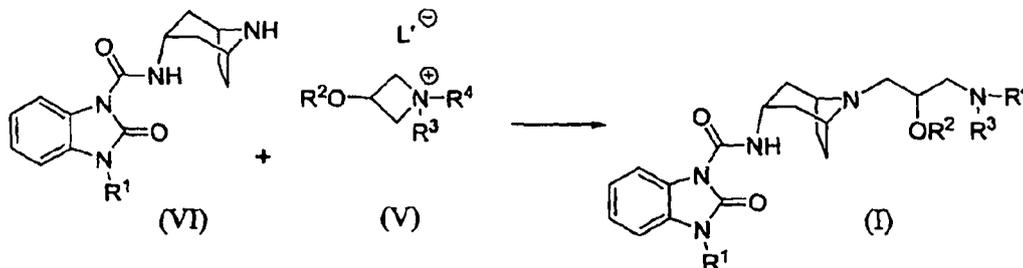
En otro método de síntesis, los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar como se ilustra en el Esquema B.

5

Esquema B

10

15



20

En el esquema B, se hace reaccionar un intermediario de acetidina diferente (V) con un intermediario de benzoimidazolona-carboxamida tropano (VI) para proporcionar un compuesto de la fórmula (I). En el esquema B, L' es un contraión, tal como haluro, por ejemplo, Cl-, Br-, o trifluoroacetato. En este proceso, el intermediario (V) se disuelve en un diluyente inerte, tal como etanol, y se pone en contacto con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8 equivalentes del benzoimidazolona-carboxamida tropano (VI). Esta reacción se suele realizar a una temperatura de aproximadamente 0°C a 100°C durante entre cerca de 2 y 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada.

25

30

Se entenderá que en el proceso del Esquema B y en otros procesos descritos en esta memoria utilizando el intermediario (VI), el intermediario (VI) puede ser suministrado en forma de base libre o en forma de sal, con un ajuste apropiado de la condiciones de reacción, según sea necesario, como conocen los expertos en la materia.

35

Los esquemas C y D a continuación son útiles para la preparación de compuestos de la fórmula (I) en el que la estereoquímica en el centro marcado por el asterisco es específicamente (R) o (S), así como para la preparación de compuestos no quirales de la fórmula (I).

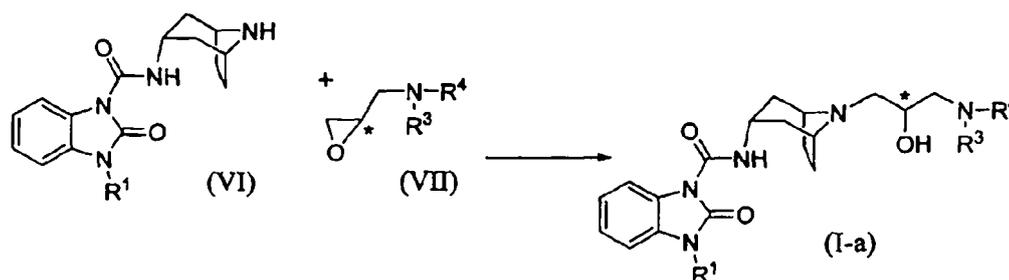
40

En otro método alternativo de síntesis, los compuestos de la fórmula (I-a), donde R<sup>2</sup> es hidrógeno, y el átomo de carbono unido a -OR<sup>2</sup> es opcionalmente quiral, se pueden preparar como se ilustra en el Esquema C.

45

Esquema C

50



55

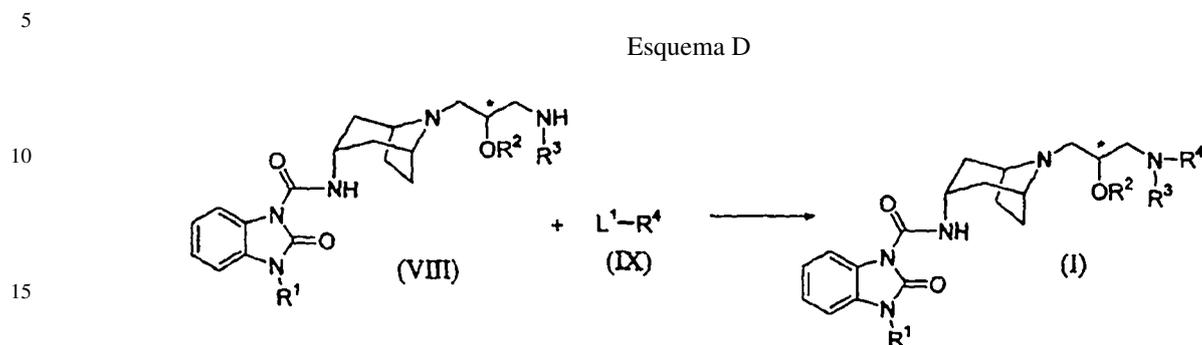
60

Se hace reaccionar un intermediario de benzoimidazolona-carboxamida tropano (VI) con un intermediario de oxirano-amina (VII), donde el \* indica un centro quiral, para proporcionar un compuesto de la fórmula (I-a). Como se muestra en el Esquema C, la benzoimidazolona-carboxamida tropano (VI) se pone en contacto con al menos un equivalente de una oxirano-amina (VII) en un diluyente inerte, como el tolueno, hexano o etanol, para formar un compuesto de la fórmula (I-a). La reacción se suele realizar a una temperatura de aproximadamente 0°C a 100°C durante entre 12 y cerca de 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada.

65

## ES 2 359 673 T3

En otro método más de síntesis, se pueden preparar los compuestos de la fórmula (I), en los que el átomo de carbono unido a -OR<sup>2</sup> es opcionalmente quiral, como se ilustra en el Esquema D.



20 En el esquema D, un intermediario (VIII), donde el \* indica un centro quiral, se hace reaccionar con el intermediario (IX), donde L<sup>1</sup> representa un grupo saliente, tal como cloro, bromo, yodo, o etoxi, y R<sup>4</sup> es tal como se define en esta memoria.

25 Las condiciones de reacción óptimas para la reacción del esquema D pueden variar dependiendo de las propiedades químicas de los reactivos L<sup>1</sup>-R<sup>4</sup>, como saben bien los expertos en la materia.

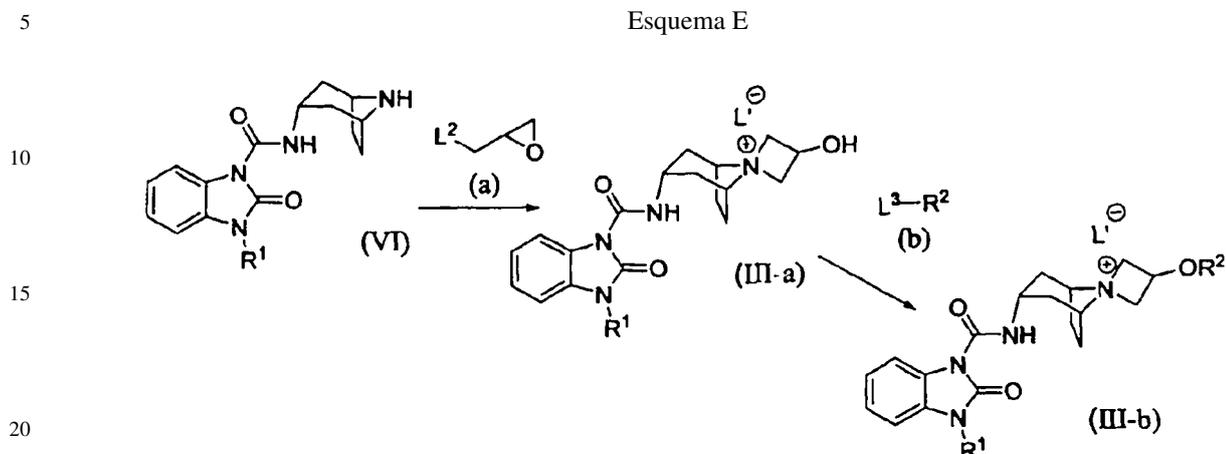
30 Por ejemplo, cuando L<sup>1</sup> es un grupo saliente, como el cloro, la reacción suele ser llevada a cabo poniendo en contacto el intermediario (VII) con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 equivalentes de intermediario (IX) en un diluyente inerte, tal como diclorometano o dimetilformamida, en presencia de un exceso de base, por ejemplo, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6 equivalentes de base, tales como *N,N*-diisopropiletilamina o 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). Los diluyentes inertes adecuados también incluyen *N,N*-dimetilformamida, triclorometano, 1,1,2,2-tetracloroetano, tetrahidrofurano y similares. La reacción se suele realizar a una temperatura en el rango de aproximadamente -10°C a aproximadamente 35°C durante entre cerca de un cuarto de hora hasta 2 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada. Los reactivos ejemplares L<sup>1</sup>-R<sup>4</sup> en los que L<sup>1</sup> es halo incluyen metanosulfonilcloruro y acetilcloruro.

40 Cuando L<sup>1</sup> es un grupo saliente, tal como etoxi, por ejemplo, cuando L<sup>1</sup>-R<sup>4</sup> es formato de etilo, la reacción suele ser llevada a cabo poniendo en contacto el intermediario (VIII) con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 equivalentes del intermediario (IX) en un diluyente inerte, como la dimetilformamida, en presencia de un exceso de base, por ejemplo, entre aproximadamente 3 y 6 equivalentes de base, tal como *N,N*-diisopropiletilamina. La reacción suele ser llevada a cabo a una temperatura en el rango de cerca de 50°C a 100°C durante unas 22 a 24 horas, o hasta que la reacción está sustancialmente completada.

45 Por otra parte, puede hacerse reaccionar el intermediario (VIII) con un isocianato protegido, tal como O=C=NP<sup>1</sup>, donde P<sup>1</sup> es un grupo amino-protector, como trimetilsililo (TMS), para proporcionar un compuesto de la fórmula (I) donde el átomo de carbono unido a -OR<sup>2</sup> es opcionalmente quiral. La reacción suele ser llevada a cabo poniendo en contacto el intermediario (VIII) con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 equivalentes de un isocianato protegido en un diluyente inerte, como la dimetilformamida, en presencia de un exceso de base, por ejemplo, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6 equivalentes de base, tal como *N,N*-diisopropil-etilamina. La reacción se suele realizar a una temperatura en el rango de aproximadamente 0°C a aproximadamente 35°C durante entre cerca de un cuarto de hora hasta 2 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada. El grupo protector de amino se puede quitar fácilmente como saben los expertos en la materia. Por ejemplo, la extinción de la mezcla de reacción con ácido acético y agua hidrolizará el grupo trimetilsililo (TMS) para producir una urea primaria.

55 Los compuestos intermedios de la fórmula (VIII) se pueden hacer a partir de compuestos disponibles. Por ejemplo, puede prepararse un compuesto intermedio de la fórmula (VIII) a partir de la reacción de un compuesto de la fórmula (III) y R<sup>3</sup>NH<sub>2</sub>. También se explica una forma alternativa de preparar compuestos de la fórmula (III) en el Esquema G de la presente memoria.

Se puede preparar un intermediario de azetidina (III) por el procedimiento ilustrado en el Esquema E.



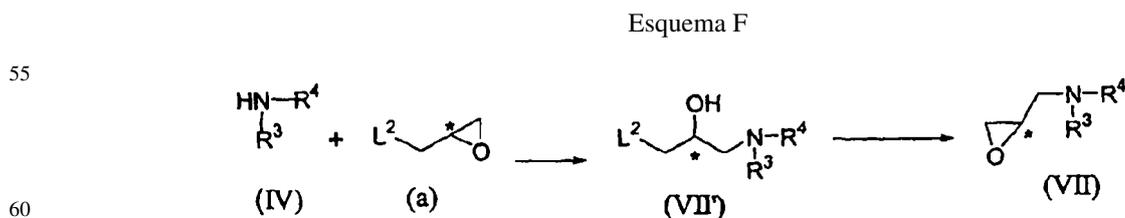
25 En el esquema E, L' es un contraión, tal como haluro, por ejemplo, Cl- o Br-, o trifluoroacetato.

30 En primer lugar, se hace reaccionar un intermediario de la fórmula (VI) con el intermediario (a), donde L<sup>2</sup> representa un grupo saliente, como el bromo, para formar una sal de azetidina de fórmula (III-a) en la que R<sup>2</sup> es hidrógeno. El intermediario (a) puede ser, por ejemplo, 2-bromometiloxirano (comúnmente epibromohidrina). Esta reacción suele ser llevada a cabo poniendo en contacto el intermediario (VI) con entre aproximadamente 2 y 4 equivalentes del oxirano en un diluyente polar, como el etanol. La reacción se suele realizar a una temperatura ambiente durante cerca de entre 24 y 48 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada.

35 Se puede preparar un intermediario de la fórmula (III-b) en el que R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub> poniendo en contacto los intermediarios (III-a) con desde algo menos de un equivalente hasta aproximadamente un equivalente de un compuesto de la fórmula L<sup>3</sup>-R<sup>2</sup>, donde L<sup>3</sup> es un grupo saliente, tal como halo, y R<sup>2</sup> es como se define aquí, en un diluyente inerte en la presencia de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 equivalentes de una base fuerte, tal como terc-butóxido de potasio o hidruro de sodio. La reacción se suele realizar a una temperatura ambiente durante cerca de un cuarto hasta una hora o hasta que la reacción está sustancialmente completada. Los diluyentes inertes adecuados incluyen diclorometano, triclorometano, 1,1,2,2-tetracloroetano y similares.

40 Del mismo modo, se puede preparar un intermediario de azetidina de la fórmula (V) haciendo reaccionar un intermediario de amina secundaria (IV) con un intermediario de oxirano (a), como epibromohidrina, para proporcionar el intermediario (V) en el que R<sup>2</sup> es hidrógeno (denominado (Va)), en las condiciones descritas para el Esquema E. Se puede preparar un intermediario de la fórmula (V) en el que R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub> (denominado (Vb)), poniendo en contacto el intermediario (Va) con un compuesto de fórmula L<sup>3</sup>-R<sup>2</sup>, intermediario (b), tal como se describe en el esquema E. En el ejemplo 5 de la presente memoria se describe un método representativo para preparar el intermediario (V).

50 Se puede preparar un compuesto intermediario de la fórmula (VII) como se describe en el Esquema F.



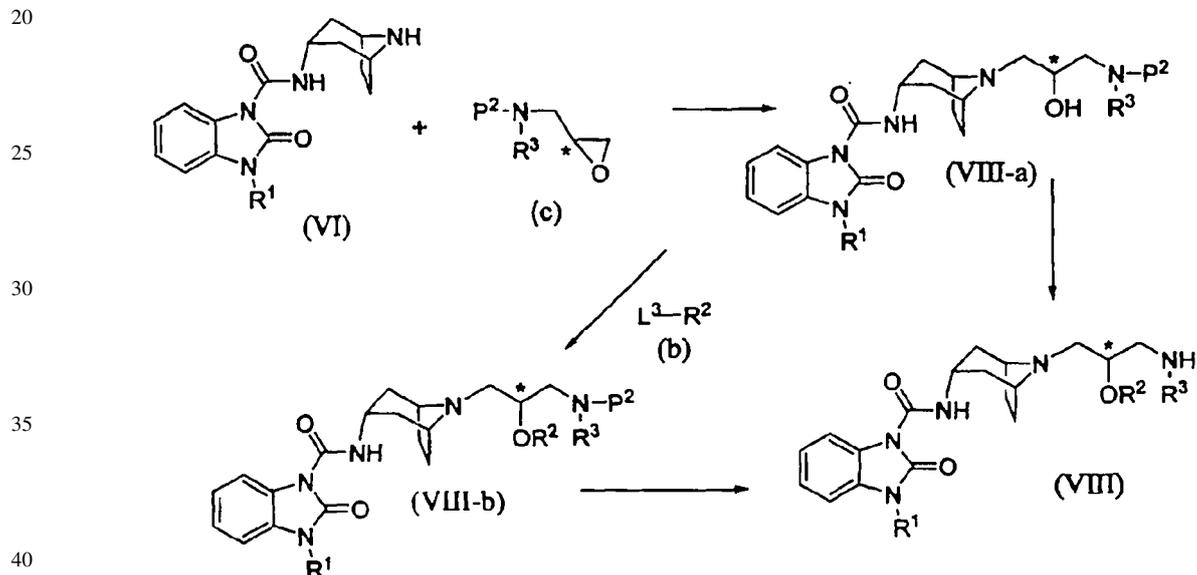
65 Los compuestos intermedios de la fórmula (VII) son típicamente preparados haciendo reaccionar el intermediario (IV) con el intermediario (a), donde L<sup>2</sup> es un grupo saliente, como el cloro, y el \* indica quiralidad R o S opcional, para proporcionar un intermediario de propanol (VII), que luego se cicla para proporcionar un compuesto de la fórmula (VII).

Por lo general, un compuesto de amina de la fórmula (IV) se disuelve en un diluyente inerte, tal como etanol, y se pone en contacto con entre aproximadamente 1 y 8 equivalentes de un intermediario de oxirano (a), tal como la epiclorhidrina, para proporcionar un intermediario de propanol de la fórmula (VII). El intermediario (VII), disuelto en un disolvente inerte, tal como tetrahidrofurano, en presencia de una base fuerte, como el hidróxido de sodio, se cicla para formar el intermediario (VII). Cada etapa de esta reacción se suele realizar a una temperatura de aproximadamente 0°C a 80°C durante entre cerca de 2 y 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada.

Alternativamente, se puede hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VII') con un compuesto de la fórmula (VI) para formar un compuesto de la fórmula (I-a). Esta reacción suele ser llevada a cabo poniendo en contacto un compuesto de la fórmula (VI) con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 equivalentes de un compuesto de la fórmula (VII) en un diluyente inerte, como el metanol o el etanol, en presencia de un exceso de una base, tal como N,N-diisopropil-etilamina, para proporcionar un compuesto de la fórmula (I-a).

Se puede preparar un compuesto intermediario de la fórmula (VII) como se muestra abajo en el Esquema G.

Esquema G



En el Esquema G, se hace reaccionar un compuesto de la fórmula (VI) con el intermediario (c), donde P<sup>2</sup> es un grupo protector de amino, tal como Boc, y el \* indica quiralidad R o S opcional, para producir un compuesto protegido (VIII-a) donde R<sup>2</sup> es hidrógeno. Para preparar un compuesto de la fórmula (VIII-b) en el que R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>, se hace reaccionar el intermediario (VIII-a) con un compuesto de la fórmula L<sup>3</sup>-R<sup>2</sup>, donde L<sup>3</sup> es un grupo saliente y R<sup>2</sup> es como se define, para proporcionar un compuesto de la fórmula (VIII-b). El grupo protector de amino es eliminado del intermediario (VIII-a) o (VIII-b) para proporcionar un compuesto de la fórmula (VII). En el Ejemplo 12 se describe con más detalle un método representativo de la preparación de un compuesto de fórmula (VII) utilizando el esquema G, y también un método representativo de la preparación del intermediario (c).

Se puede preparar un compuesto de la fórmula (VI) como se muestra abajo en el Esquema H.

Esquema H

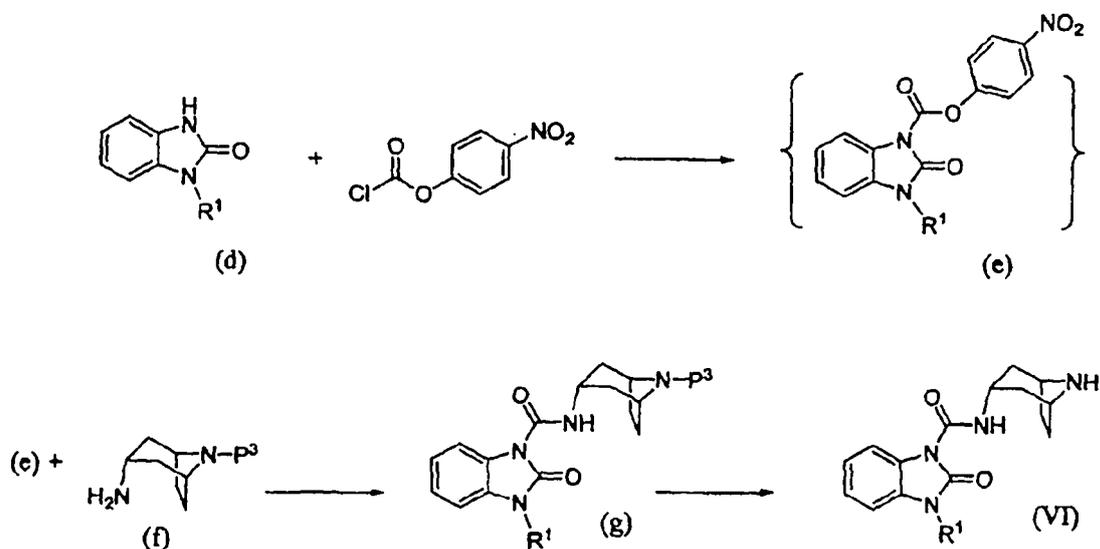
5

10

15

20

25



En el esquema H, se disuelve el intermediario (d), una 1,3-dihidrobenzoimidazol-2-ona, en un diluyente inerte, tal como tetrahidrofurano, en presencia de una base fuerte, tal como hidruro de sodio, y se hace reaccionar con cloruro de 4-nitrofenilo. La mezcla se agita a aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  hasta aproximadamente  $40^\circ\text{C}$  durante entre unas 12 y 24 horas o hasta que la reacción está completa para formar un éster activo, el intermediario (e), que se hace reaccionar, *in situ*, con un aminotropano protegido, el intermediario (f), donde  $P^3$  representa un grupo protector de amino, tal como Boc, en presencia de un diluyente inerte, tal como tetrahidrofurano, a una temperatura de aproximadamente  $30^\circ\text{C}$  a  $90^\circ\text{C}$  durante entre cerca de 10 y 24 horas para proporcionar un intermediario protegido (g). Utilizando métodos convencionales, se elimina el grupo protector de amino,  $P^3$ , del intermediario (g) para proporcionar un compuesto de benzoimidazolona-carboxamida tropano de la fórmula (VI). En los pasos (a)-(h) del Ejemplo 1 se describe con más detalle un método representativo para preparar el intermediario (VI).

Se puede preparar el compuesto de benzoimidazolona del intermediario (d) como se muestra abajo en el Esquema I.

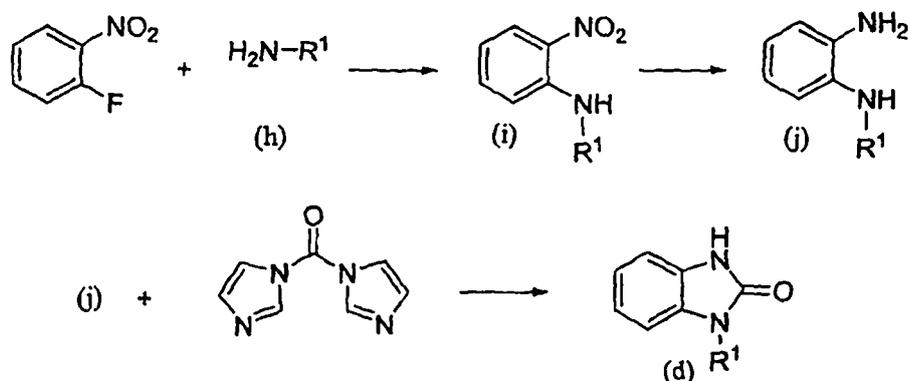
Esquema I

45

50

55

60



En el Esquema I, se hace reaccionar 2-fluoro-nitrobenzamina con un intermediario de una amina primaria (h), donde  $R^1$  es como se describe en esta memoria, para proporcionar el intermediario (i), que se reduce a un diaminofenilo, intermediario (j). El diaminofenilo se hace reaccionar con carbonildiimidazol en presencia de un diluyente inerte, tal como tetrahidrofurano, a una temperatura de aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  a  $40^\circ\text{C}$  durante entre unas 12 y 30 horas, para proporcionar un compuesto de benzoimidazolona del intermediario (d). En los pasos (a)-(c) del Ejemplo 1 se describe con más detalle una síntesis representativa de un compuesto del intermediario (d).

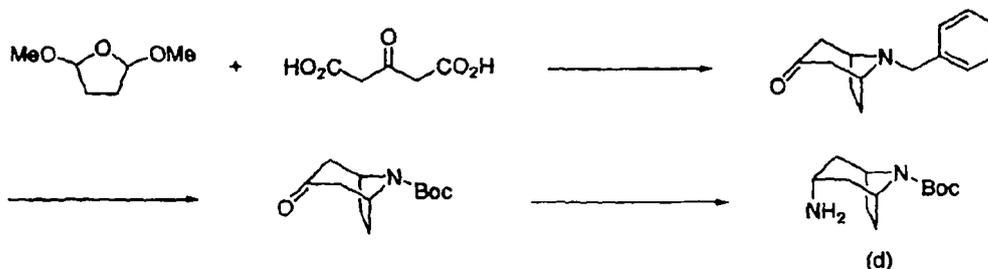
## ES 2 359 673 T3

El aminotropano protegido, intermediario (f), empleado en las reacciones descritas en esta solicitud es preparado a partir de materias primas disponibles. Por ejemplo, cuando el grupo protector de amino P3 es Boc, el aminotropano protegido se puede preparar como se muestra en el Esquema J, y como se describe en los pasos (d)-(f) del Ejemplo 1.

5

Esquema J

10



15

20

25

Para preparar el intermediario protegido (d), se pone en contacto 2,5-dimetoxi tetrahidrofurano con entre 1 y 2 equivalentes de bencilamina y un ligero exceso, por ejemplo, alrededor de 1,1 equivalentes de ácido 1,3-acetonadicarboxílico en una solución acuosa ácida en presencia de un agente tampón como el fosfato de hidrógeno de sodio. La mezcla de reacción se calienta a entre unos 60°C y 100°C para garantizar la descarboxilación de cualquier intermediario carboxilado en el producto, 8-bencil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-3-ona, comúnmente *N*-benciltropanona.

30

35

40

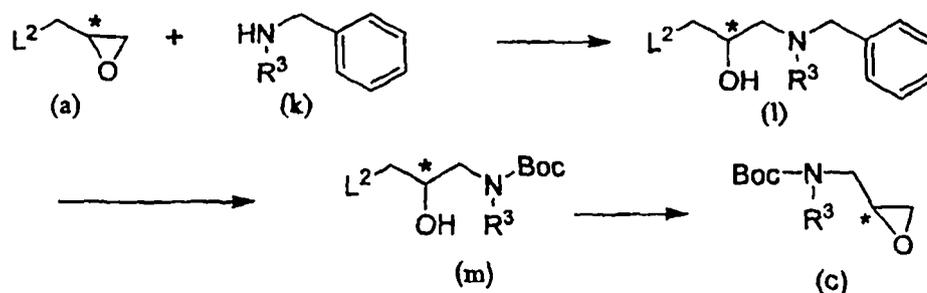
El intermediario de *N*-benciltropanona suele reaccionar con un ligero exceso de dicarbonato di-*tert*-butílico (comúnmente (Boc)<sub>2</sub>O), por ejemplo, alrededor de 1,1 equivalentes, bajo una atmósfera de hidrógeno en presencia de un catalizador de metal de transición para proporcionar éster *tert*-butílico del ácido 3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico. La reacción suele llevarse a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 hasta aproximadamente 72 horas. Por último, el éster *tert*-butílico del ácido 3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico es puesto en contacto con un gran exceso, por ejemplo, por lo menos unos 25 equivalentes, de formiato de amonio en un diluyente inerte, como el metanol en presencia de un catalizador de metales de transición para proporcionar el producto, el intermediario (d), en la configuración endo con estereoespecificidad alta, por ejemplo con una relación endo a exo de > 99:1. La reacción se suele realizar a una temperatura ambiente durante cerca de entre 12 y 72 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada. Es ventajoso añadir el reactivo de formiato de amonio en porciones. Por ejemplo, el éster *tert*-butílico del ácido 3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico es puesto en contacto con una porción inicial de formiato de amonio de aproximadamente 15 a 25 equivalentes. Después de un intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 36 horas, se añade una porción adicional de 5 a 10 equivalentes de formiato de amonio. La adición posterior se puede repetir después de un intervalo similar. El producto, el intermediario (f), puede purificarse por procedimientos convencionales, como la extracción alcalina.

Se puede preparar un compuesto de oxirano del intermediario (c) como se muestra abajo en el Esquema K.

45

Esquema K

50



55

60

65

Una bencilamina, intermediario (k), como la *N*-bencilmetilamina, se pone en contacto con al menos un equivalente de un oxirano quiral, intermediario (a), tal como la epiclorigidrina, en un diluyente no polar, como el hexano o tolueno, para formar una 2-hidroxiopropilamina, intermediario (l). La reacción se suele realizar a una temperatura ambiente durante cerca de entre 12 y 24 horas o hasta que la reacción está sustancialmente completada. El intermediario (l) suele reaccionar con un ligero exceso de dicarbonato de di-*tert*-butílico (comúnmente (Boc)<sub>2</sub>O), por ejemplo, alrededor de 1,1 equivalentes, bajo una atmósfera de hidrógeno en presencia de un catalizador de metales de transición para

## ES 2 359 673 T3

proporcionar el intermediario (m) protegido de Boc. La reacción suele llevarse a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente entre 8 y 24 horas. El intermediario (m) se convierte entonces en una forma ciclada disolviendo el intermediario (m) en un diluyente inerte, por ejemplo, tetrahidrofurano, en presencia de una base, por ejemplo, hidróxido de sodio, para proporcionar el intermediario (c).

5

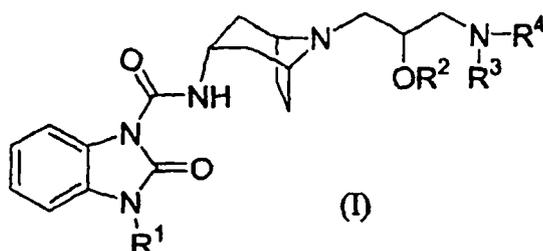
Los reactivos L<sup>1</sup>-R<sup>4</sup>, L<sup>3</sup>-R<sup>2</sup>, HNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> y el intermediario de oxirano (a) están disponibles comercialmente o se preparan fácilmente mediante procedimientos estándares con materias primas comunes.

Se describen otros detalles respecto a las condiciones de reacción específicas y otros procedimientos para preparar compuestos representativos de la invención o intermediarios de los mismos en los ejemplos expuestos abajo.

10

Por consiguiente, en un aspecto del método, la invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I):

15



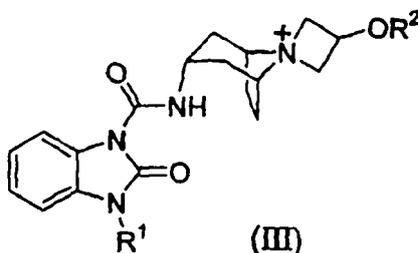
25

donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son tal como se define en esta memoria, o una sal o un estereoisómero del mismo, el proceso comprendiendo:

30

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (III):

35

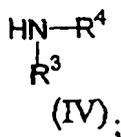


40

45

con un compuesto de la fórmula (IV):

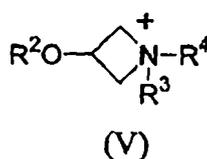
50



55

(b) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (V):

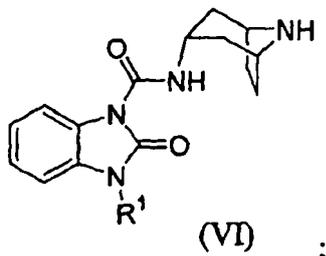
60



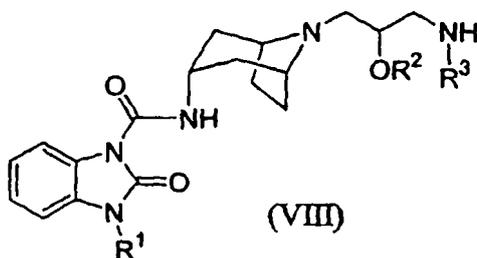
65

ES 2 359 673 T3

con un compuesto de la fórmula (VI):



15 (c) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VIII):



con un compuesto de la fórmula (IX):

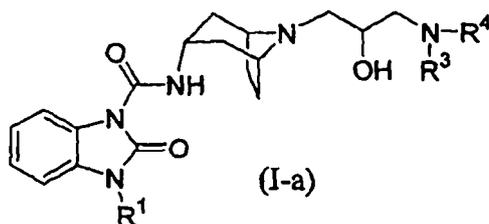


donde  $L^1$  es un grupo saliente y  $R^4$  es como se define en esta memoria, o

35 (d) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VIII) con  $O=C=NP^1$ , donde  $P^1$  es un grupo protector de amino, y luego quitar el grupo protector de amino  $P^1$ ,

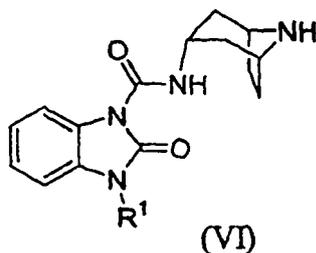
para proporcionar un compuesto de la fórmula (I), o una sal o estereoisómero del mismo.

40 La invención también proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I-a):



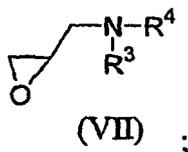
55 donde  $R^1$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son tal como se define en esta memoria, o una sal o un estereoisómero de los mismos, el proceso comprendiendo:

hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI):



con un compuesto de la fórmula (VII):

5

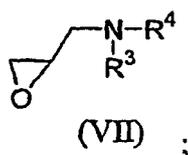


10

o

hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI), con un compuesto de la fórmula (VII'):

15



20

donde L<sup>2</sup> es un grupo saliente,

25

para proporcionar un compuesto de fórmula (I), o una sal o un estereoisómero del mismo.

30

En otras formas de realización, esta invención se dirige a cualquiera de los procesos descritos en esta memoria y a los productos elaborados por dichos procesos.

La invención también proporciona un compuesto de la fórmula (VIII), donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son tal como se define en esta memoria para un compuesto de la fórmula (I), o una sal o estereoisómero o derivado protegido del mismo.

35

La invención también proporciona un compuesto de la fórmula (I), donde el compuesto se prepara mediante un proceso que comprende:

40

- (a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (III) con un compuesto de la fórmula (IV);
- (b) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (V) con un compuesto de la fórmula (VI);
- (c) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VIII) con un compuesto de la fórmula (IX), donde L<sup>1</sup> es un grupo saliente y R<sup>4</sup> es como se define en esta memoria;
- (d) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VIII) con O=C=NP<sup>1</sup>, donde P<sup>1</sup> es un grupo protector de amino, y luego quitar el grupo protector de amino P<sup>1</sup>;
- (e) cuando R<sup>2</sup> es hidrógeno, hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI) con un compuesto de la fórmula (VII); o
- (f) cuando R<sup>2</sup> es hidrógeno, hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI) con un compuesto de la fórmula (VII), donde L<sup>2</sup> es un grupo saliente, para proporcionar un compuesto de la fórmula (I).

50

#### Composiciones farmacéuticas

55

Los compuestos de benzoimidazolona-carboxamida suelen ser administrados a un paciente en forma de una composición farmacéutica. Tales composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente por cualquier vía de administración aceptable incluyendo, aunque no exclusivamente, modos de administración oral, rectal, vaginal, nasal, por inhalación, tópica (incluyendo transdérmica) y parenteral.

60

Por consiguiente, en uno de los aspectos de sus composiciones, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Opcionalmente, tales composiciones farmacéuticas pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación, si se desea.

65

Las composiciones farmacéuticas de la invención, normalmente contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Normalmente, tales composiciones farmacéuticas contendrán desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 95% en peso del principio activo,

## ES 2 359 673 T3

preferiblemente, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 70% en peso, y más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 60% en peso del principio activo.

Se puede usar cualquier soporte o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas de la invención. La elección de un soporte o excipiente particular o combinaciones de soportes y excipientes, dependerá del modo de administración que se esté utilizando para tratar a un paciente o tipo de condición médica o estado de enfermedad particular. A este respecto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo particular de administración entra en la competencia de los expertos en técnicas farmacéuticas. Además, los ingredientes para tales composiciones están comercialmente disponibles en, por ejemplo, Sigma, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178. Para mayor ilustración, se describen las técnicas de formulación convencionales en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); and H.C. Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Ejemplos representativos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: (1) azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa, (2) almidones, como el almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa, como la celulosa microcristalina, y sus derivados, tales como la carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa, (4) tragacanto en polvo, (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como la manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, como el aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12), ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón, como el hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato, y (21) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en las composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención suelen prepararse mezclando o combinando cuidadosamente y a fondo un compuesto de la invención con un soporte farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. Si se necesita o desea, la mezcla uniformemente combinada resultante puede ser formada o cargada en comprimidos, cápsulas, píldoras y similares utilizando procedimientos y equipos convencionales.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferiblemente envasadas en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" significa una unidad físicamente diferenciada adecuada para la dosificación a un paciente, es decir, cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea solo o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, tales formas de dosificación unitarias pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares.

En una forma de realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, sellos, grageas, polvos, gránulos; o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe; y similares; cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como principio activo.

Cuando están destinadas a la administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, en forma de cápsulas, tabletas, píldoras y similares), las composiciones farmacéuticas de la invención normalmente comprenden un compuesto de la invención como principio activo y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables, como el citrato sódico o fosfato dicálcico. Opcional o alternativamente, tales formas de dosificación sólidas pueden comprender también: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinipirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, algunos silicatos y/o carbonato sódico; (5) agentes retardadores de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y/o arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, y/o mezclas de los mismos (10); agentes colorantes y (11) agentes de tamponación.

En las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden presentarse agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Los agentes de revestimiento para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, incluyen aquellos utilizados para revestimientos entéricos, tales como acetato ftalato de celulosa (CAP), acetato ftalato de polivinilo (PVAP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico, acetato trimelitato de celulosa (CAT), carboximetilcelulosa (CMEC), acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), y similares.

## ES 2 359 673 T3

Si se desea, las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden ser formuladas para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo utilizando, a modo de ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables, o matrices de otros polímeros, liposomas y/o microesferas.

5 Además, las composiciones farmacéuticas de la invención, opcionalmente, puede contener agentes opacificantes y pueden ser formuladas de manera que liberen el principio activo sólo, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si fuera apropiado, con uno o más de los excipientes descritos arriba.

10 Las formas adecuadas de dosificación líquida para la administración oral incluyen, a título ilustrativo, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, elixires y jarabes farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación líquidas suelen comprender el principio activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulgentes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato etílico, acetato etílico, alcohol bencílico, benzoato bencílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (por ej., aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Las suspensiones, además del principio activo, pueden contener agentes de suspensión, tales como, por ejemplo, alcoholes isostearílicos etoxilados, ésteres de polioxietileno sorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

15 Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para la administración por inhalación. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por inhalación estarán normalmente en forma de un aerosol o polvo. Tales composiciones se administran generalmente utilizando dispositivos de administración muy conocidos, tales como un inhalador dosificador (MDI), un inhalador de polvo seco, un nebulizador o un dispositivo de administración similar.

20 Cuando se administra por inhalación utilizando un recipiente a presión, las composiciones farmacéuticas de la invención normalmente incluyen el principio activo y un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado.

Además, la composición farmacéutica puede estar en forma de cápsula o cartucho (hecho, por ejemplo, de gelatina) que comprenda un compuesto de la invención y un polvo adecuado para usar en un inhalador de polvo. Las bases adecuadas en polvo incluyen, a modo de ejemplo, la lactosa o el almidón.

35 Los compuestos de la invención también pueden administrarse transdérmicamente utilizando sistemas y excipientes de administración transdérmica. Por ejemplo, se puede mezclar un compuesto de esta invención con potenciadores de permeación, tales como propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacloalcan-2-onas y similares, e incorporarlos en un parche o sistema de administración similar. Se pueden utilizar otros excipientes, incluyendo agentes gelificantes, emulgentes y tampones en tales composiciones transdérmicas si se desea.

Las siguientes formulaciones ilustran las composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención:

### Ejemplo de formulación A

45 Se preparan cápsulas de gelatina dura para la administración oral de la siguiente manera:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto de la invención	50 mg
Lactosa (secada por aspersion)	200 mg
Estearato de magnesio	10 mg

60 *Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes cuidadosamente y se cargan en una cápsula de gelatina dura (260 mg de composición por cápsula).

65

## ES 2 359 673 T3

### Ejemplo de Formulación B

Se preparan cápsulas de gelatina dura para la administración oral de la siguiente manera:

5	Ingredientes	Cantidad
	Compuesto de la invención	20 mg
10	Almidón	89 mg
	Celulosa microcristalina	89 mg
	Estearato de magnesio	2 mg

15  
*Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes cuidadosamente y se pasan luego por un tamiz de malla del nº 45 de EE.UU. y se carga en una cápsula de gelatina dura (200 mg de composición por cápsula).

### 20 Ejemplo de formulación C

Se preparan cápsulas para la administración oral de la siguiente manera:

25	Ingredientes	Cantidad
	Compuesto de la invención	10 mg
30	Monooleato de polioxietileno sorbitán	50 mg
	Almidón en polvo	250 mg

35  
*Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes cuidadosamente y se cargan en una cápsula de gelatina dura (310 mg de composición por cápsula).

### 40 Ejemplo de formulación D

Se preparan pastillas para la administración oral de la siguiente manera:

45	Ingredientes	Cantidad
	Compuesto de la invención	5 mg
	Almidón	50 mg
50	Celulosa microcristalina	35 mg
	Polivinilpirrolidona (10 % en peso en agua)	4 mg
	Carboximetilalmidón sódico	4,5 mg
55	Estearato de magnesio	0,5 mg
	Talco	1 mg

60  
*Procedimiento representativo:* El principio activo, el almidón y la celulosa se pasan por un tamiz de malla nº 45 de EE.UU. y se mezclan bien. La solución de polivinilpirrolidona se mezcla con el polvo resultante, y esta mezcla se pasa por un tamiz de malla nº 14 de EE.UU.. Los gránulos producidos de este modo se secan a 50-60°C y se pasan por un tamiz de malla nº 18 de EE.UU.. El carboximetilalmidón sódico, estearato de magnesio y talco (previamente pasados por un tamiz de malla nº 60 de EE.UU.) se añaden a los gránulos. Después de mezclar, la mezcla se comprime en máquina de comprimir pastillas para obtener una pastilla de 100 mg.

## ES 2 359 673 T3

### Ejemplo de formulación E

Se preparan pastillas para la administración oral de la siguiente manera:

5	<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
	Compuesto de la invención	25 mg
	Celulosa microcristalina	400 mg
10	Dióxido de sílice ahumado	10 mg
	Ácido esteárico	5 mg

15 *Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes cuidadosamente y se comprimen para formar pastillas (440 mg de composición por cápsula).

### Ejemplo de formulación F

Se preparan pastillas marcadas por una cara para la administración oral de la siguiente manera:

25	<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
	Compuesto de la invención	15 mg
	Almidón de maíz	50 mg
	Croscarmelosa sódica	25 mg
30	Lactosa	120 mg
	Estearato de magnesio	5 mg

35 *Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes cuidadosamente y se comprimen para formar pastillas marcadas por una cara (215 mg de composición por cápsula).

### Ejemplo de formulación G

Se prepara una suspensión para la administración oral de la siguiente manera:

45	<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
	Compuesto de la invención	0,1 mg
	Ácido fumárico	0,5 mg
	Cloruro de sodio	2,0 mg
50	Metilparabeno	0,15 mg
	Propilparabeno	0,05 mg
	Azúcar granulada	25,5 mg
55	Sorbitol (solución al 70%)	12,85 mg
	Veegum k (Vanderbilt Co.)	1,0 g
60	Saborizante	0.035 ml
	Colorantes	0,5 mg
	Agua destilada	cs hasta 100 ml

65 *Procedimiento representativo:* Se mezclan los ingredientes para formar una suspensión conteniendo 10 mg de principio activo por 10 ml de suspensión.

## ES 2 359 673 T3

### Ejemplo de formulación H

Se prepara un polvo seco para la administración por inhalación de la siguiente manera:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto de la invención	1,0 mg
Lactosa	25 mg

*Procedimiento representativo:* Se microniza el principio activo y luego se mezcla con lactosa. Entonces se carga esta mezcla combinada en un cartucho de inhalación de gelatina. Se administran los contenidos del cartucho utilizando un inhalador de polvo.

### Ejemplo de formulación I

Se prepara un polvo seco para la administración por inhalación en un inhalador dosificador de la siguiente manera:

*Procedimiento representativo:* Se prepara una suspensión conteniendo el 5% en peso de un compuesto de la invención y 0,1% en peso de lecitina dispersando 10 g del principio activo como partículas micronizadas con un tamaño medio inferior a 10  $\mu\text{m}$  en una solución formada por 0,2 g de lecitina disuelto en 200 ml de agua desmineralizada. Se seca la suspensión por pulverización y se microniza el material resultante a partículas con un diámetro medio inferior a 1,5  $\mu\text{m}$ . Se cargan las partículas en cartuchos con 1,1,1-2-tetrafluoroetano presurizado.

### Ejemplo de formulación J

Se prepara una formulación inyectable de la siguiente manera:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto de la invención	0,2 g
solución tampón de acetato de sodio (0,4 M)	40 ml
HCl (0,5 N) o NaOH (0,5 N)	cs para pH 4
Agua (destilada estéril)	c.s. para 20 ml

*Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes indicados arriba y se ajusta el pH a  $4 \pm 0,5$  utilizando 0,5 N de HCl ó 0,5 N de NaOH.

### Ejemplo de formulación K

Se preparan cápsulas para la administración oral de la siguiente manera:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto de la invención	4,05 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH 103)	259,2 mg
Estearato de magnesio	0,75 mg

*Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes cuidadosamente y se cargan en una cápsula de gelatina dura (Tamaño #1, blanca, opaca) (264 mg de composición por cápsula).

Ejemplo de formulación L

Se preparan cápsulas para la administración oral de la siguiente manera:

5	Ingredientes	Cantidad
	Compuesto de la invención	8,2 mg
10	Celulosa microcristalina (Avicel PH 103)	139,05 mg
	Estearato de magnesio	0,75 mg

15 *Procedimiento representativo:* Se combinan los ingredientes cuidadosamente y se cargan en una cápsula de gelatina dura (Tamaño #1, blanca, opaca) (148 mg de composición por cápsula).

20 Se entenderá que, en las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente, puede utilizarse cualquier forma de los compuestos de la invención, (es decir, la base libre, la sal farmacéutica, o solvato) que sea conveniente para el modo particular de administración.

#### *Utilidad*

25 Los compuestos de benzoimidazolona-carboxamida de la invención son agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> y, por tanto se espera que sean útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por los receptores 5-HT<sub>4</sub> o asociadas con la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>, es decir, condiciones médicas que mejoran con el tratamiento con un agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>. Estas condiciones médicas incluyen, aunque no exclusivamente, el síndrome de intestino irritable (SII), el estreñimiento crónico, la dispepsia funcional, el retraso en el vaciamiento gástrico, la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), la gastroparesia, el íleo postoperatorio, la pseudoobstrucción intestinal y el tránsito retardado  
30 inducido por medicamentos. Además, se ha sugerido que algunos compuestos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> pueden utilizarse en el tratamiento de desórdenes del sistema nervioso, incluyendo los trastornos cognitivos, trastornos de conducta, trastornos del estado de ánimo y trastornos del control de la función autonómica.

35 En particular, los compuestos de la invención aumentan la motilidad del tracto gastrointestinal (GI) y por lo tanto se espera que sean útiles para el tratamiento de los trastornos del tracto gastrointestinal causados por la movilidad reducida en los mamíferos, incluyendo seres humanos. Tales trastornos de la motilidad gastrointestinal incluyen, a modo de ejemplo, el estreñimiento crónico, el síndrome de intestino irritable con estreñimiento predominante (IBS-C), gastroparesia diabética e idiopática y dispepsia funcional.

40 En un aspecto, por lo tanto, la invención encuentra utilidad en un método para aumentar la motilidad del tracto gastrointestinal en un mamífero, el método comprendiendo administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

45 Cuando se usa para tratar los trastornos de la motilidad reducida del tracto gastrointestinal u otras condiciones mediadas por los receptores 5-HT<sub>4</sub>, los compuestos de la invención se administran normalmente por vía oral en una dosis única diaria o en varias dosis al día, aunque se pueden utilizar otras formas de administración. La cantidad de principio activo administrado por dosis o la cantidad total administrada por día la determinará normalmente un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes, incluida la condición que se trata, la vía de administración elegida,  
50 el compuesto que se esté administrando y su actividad relativa, la edad, peso, y la respuesta de cada paciente, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

55 Las dosis adecuadas para el tratamiento de los trastornos de la motilidad reducida del tracto gastrointestinal u otros trastornos mediados por los receptores 5-HT<sub>4</sub> variarán desde aproximadamente 0,0007 hasta aproximadamente 20 mg/kg/día del principio activo, incluyendo desde aproximadamente 0,0007 hasta aproximadamente 1 mg/kg/día. Para un humano medio de 70 kg, ascendería a desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 70 mg al día de principio activo.

60 En un aspecto de la invención, los compuestos de la invención se utilizan para tratar el estreñimiento crónico. Cuando se utilizan para tratar el estreñimiento crónico, los compuestos de la invención se administrarán, por lo general, por vía oral en una sola dosis diaria o en múltiples dosis al día. Preferiblemente, la dosis para tratar el estreñimiento crónico variará entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 70 mg al día.

65 En otro aspecto de la invención, los compuestos de la invención se utilizan para tratar el síndrome del intestino irritable. Cuando se utilizan para tratar el síndrome del intestino irritable con estreñimiento predominante, los compuestos de la invención se administrarán, por lo general, por vía oral en una sola dosis diaria o en múltiples dosis al día. Preferiblemente, la dosis para tratar el síndrome del intestino irritable con estreñimiento predominante variará entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 70 mg al día.

## ES 2 359 673 T3

En otro aspecto de la invención, los compuestos de la invención se utilizan para tratar la gastroparesia diabética. Cuando se utilizan para tratar la gastroparesia diabética, los compuestos de la invención se administrarán, por lo general, por vía oral en una sola dosis diaria o en múltiples dosis al día. Preferiblemente, la dosis para tratar la gastroparesia diabética variará entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 70 mg al día.

En otro aspecto más de la invención, los compuestos de la invención se utilizan para tratar la dispepsia funcional. Cuando se utilizan para tratar la dispepsia funcional, los compuestos de la invención se administrarán, por lo general, por vía oral en una sola dosis diaria o en múltiples dosis al día. Preferiblemente, la dosis para tratar la dispepsia funcional variará entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 70 mg al día.

La invención también encuentra utilidad en un método para tratar a un mamífero que tenga una enfermedad o condición asociada con la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>, el método comprendiendo administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o de una composición farmacéutica que comprenda un compuesto de la invención.

Puesto que los compuestos de la invención son agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub>, estos compuestos también son útiles como herramientas de investigación para la investigación o el estudio de sistemas biológicos o muestras que tengan receptores 5-HT<sub>4</sub>, o para descubrir nuevos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub>. Además, como los compuestos de la invención exhiben selectividad de unión de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en comparación con la unión a receptores de otros subtipos de 5-HT, en particular los receptores 5-HT<sub>3</sub>, estos compuestos son particularmente útiles para estudiar los efectos del agonismo selectivo de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en un sistema biológico o muestra. Se puede emplear cualquier muestra o sistema biológico que tenga receptores 5-HT<sub>4</sub> en tales estudios, los cuales pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*. Las muestras o sistemas biológicos representativos adecuados para tales estudios incluyen, pero no se limitan a, células, extractos celulares, membranas plasmáticas, muestras de tejidos, mamíferos (tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, cerdos, etc.) y similares.

En este aspecto de la invención se pone en contacto un sistema biológico o muestra comprendiendo un receptor 5-HT<sub>4</sub> con una cantidad agonizante del receptor 5-HT<sub>4</sub> de un compuesto de la invención. Por lo tanto, se pueden determinar los efectos de agonizar el receptor 5-HT<sub>4</sub> utilizando procedimientos y equipos convencionales, tales como ensayos de unión de radioligandos y ensayos funcionales. Tales ensayos funcionales incluyen cambios mediados por ligandos en monofosfato de adenosina cíclico intracelular (AMPC), cambios mediados por ligandos en la actividad de la enzima adenilato ciclasa (que sintetiza el AMPC), cambios mediados por ligandos en la incorporación de los análogos de la guanosina trifosfato (GTP), tales como [<sup>35</sup>S]GTPγS (guanósina 5'-O-(γ-tio)trifosfato) o GTP-Eu, en membranas aisladas a través del intercambio catalizado por receptores de los análogos de GTP por los análogos de GDP, cambios mediados por ligandos en iones libres de calcio intracelular (medido, por ejemplo, con un lector de placas de imágenes de fluorescencia o FLIPR<sup>®</sup> de Molecular Devices, Inc.), y la medición de la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Un compuesto de la invención puede agonizar o aumentar la activación de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en cualquiera de los ensayos relacionados arriba o ensayos de naturaleza similar. Una cantidad agonizante del receptor 5-HT<sub>4</sub> de un compuesto de la invención normalmente variará entre aproximadamente 1 nanomolar y aproximadamente 500 nanomolar.

Además, los compuestos de la invención pueden utilizarse como herramientas de investigación para descubrir nuevos agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub>. En esta realización se comparan los datos funcionales o de unión del receptor 5-HT<sub>4</sub> de un compuesto de ensayo o un grupo de compuestos de ensayo con los datos funcionales o de unión del receptor 5-HT<sub>4</sub> de un compuesto de la invención para identificar los compuestos del ensayo que tienen actividad funcional o de unión superior, si los hubiera. Este aspecto de la invención incluye, como formas de realización separadas, tanto la generación de datos de comparación (utilizando los ensayos apropiados) como el análisis de los datos de prueba para identificar los compuestos de ensayo de interés.

Por consiguiente, en otro de los aspectos de su método, esta invención se refiere a un método de evaluación de un compuesto de prueba en un ensayo biológico, el método comprendiendo: (a) realizar un ensayo biológico con un compuesto de ensayo para proporcionar un primer valor de ensayo, (b) realizar el ensayo biológico con un compuesto de la fórmula I para proporcionar un segundo valor de ensayo, donde el paso (a) se lleva a cabo antes, después o al mismo tiempo que el paso (b) y (c) comparar el primer valor de ensayo del paso (a) con el segundo valor de ensayo del paso (b).

Entre otras propiedades, se ha descubierto que los compuestos de la invención son potentes agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> y exhiben una selectividad sustancial para el subtipo del receptor 5-HT<sub>4</sub> sobre el subtipo del receptor 5-HT<sub>3</sub> en ensayos de unión de radioligandos. Además, los compuestos de la invención han demostrado mejores propiedades farmacocinéticas en un modelo de rata. Por lo tanto se espera que los compuestos de la invención demuestren buena biodisponibilidad tras su administración oral. Además, se ha demostrado que los compuestos representativos no presentan un nivel inaceptable de inhibición de la corriente de iones de potasio en un modelo de fijación de voltaje *in vitro* utilizando células completas aisladas que expresaban el canal de potasio cardíaco hERG. El ensayo de fijación de voltaje es un método preclínico aceptado para evaluar el potencial de los agentes farmacéuticos para cambiar el patrón de repolarización cardíaca, específicamente para provocar la denominada prolongación del intervalo QT que se ha asociado con la arritmia cardíaca. (Cavero *et al.*, Opinión on Pharmacotherapy, 2000, 1, 947-73, Fermini *et al.*, Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2, 439-447) En consecuencia, se espera que las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la invención tengan un perfil cardíaco aceptable.

## ES 2 359 673 T3

Estas propiedades, así como la utilidad de los compuestos de la invención pueden demostrarse utilizando varios ensayos *in vitro* e *in vivo* muy conocidos para los expertos en la materia. Se describen ensayos representativos con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

### 5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos sintéticos y biológicos se ofrecen para ilustrar la invención, y no debe interpretarse en modo alguno como limitación del alcance de la invención. En los ejemplos que siguen a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados, a no ser que se indique otra cosa. Las abreviaturas que no se definen a continuación tienen su significado generalmente aceptado.

	Boc =	terc-butoxicarbonilo
15	(Boc) <sub>2</sub> O =	dicarbonato di-terc-butílico
	DCM =	diclorometano
	DMF =	<i>N,N</i> -dimetilformamida
20	DMSO =	sulfóxido de dimetilo
	EtOAc =	acetato de etilo
25	LCMS =	cromatografía líquida de espectrometría de masas
	mCPBA =	ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
	MeCN =	acetonitrilo
30	MTBE =	éter metil terc-butílico
	PyBop =	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidino-fosfonio
35	R <sub>f</sub> =	factor de retención
	RT =	temperatura ambiente
	TFA =	ácido trifluoroacético
40	THF =	tetrahidrofurano

Los reactivos (incluyendo las aminas secundarias) y los solventes fueron adquiridos de proveedores comerciales (Aldrich, Fluka, Sigma, etc), y utilizados sin purificación adicional. Las reacciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno, a menos que se indique otra cosa. El progreso de las mezclas de reacción se controló por cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento analítica (HPLC anal.), y espectrometría de masas, cuyos detalles se indican a continuación y por separado en los ejemplos específicos de las reacciones. Las mezclas de reacción se desarrollaron conforme a lo indicado específicamente en cada reacción, se purificaron comúnmente por extracción y otros métodos de purificación tales como cristalización dependiente de la temperatura y del solvente y precipitación. Además, las mezclas de reacción se purificaron de la manera habitual por HPLC preparativa: abajo se describe un protocolo general. La caracterización de los productos de la reacción se llevó a cabo rutinariamente por espectrometría de masas y de <sup>1</sup>H-RMN. Para la medición de RMN se disolvieron las muestras en disolventes deuterados (CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub> o DMSO-d<sub>6</sub>), y los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se adquirieron con un instrumento Varian Gemini 2000 (300 MHz) en condiciones de observación estándares. La identificación espectrométrica de los compuestos se realizó por un método de ionización por electroespray (ESMS) con un instrumento Applied Biosystems (Foster City, CA), modelo API 150 EX o un instrumento Agilent (Palo Alto, CA) modelo 1100 LC/MSD.

*Protocolo general para HPLC analítica:* Se disolvió cada uno de los compuestos crudos en 50% de MeCN/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA) a 0,5-1,0 mg/ml, y se analizó utilizando HPLC anal.: 1) fase inversa anal. Columna: Zorbax Bonus-RP (3,5 mm de tamaño de partícula, 2,1 x 50 mm), 2) velocidad de flujo: 0,5 ml/min, 3) 5% de MeCN/H<sub>2</sub>O conteniendo 0,1% de TFA (isocrático; 0-0,5 min), 5% de MeCN/H<sub>2</sub>O conteniendo 0,1% de TFA hasta 75% de MeCN/H<sub>2</sub>O conteniendo 0,1% de TFA (gradiente lineal; 0,5-4 min), 4) detección: 214, 254 y 280 nm. Se indican otras condiciones utilizadas siempre que sea necesario.

*Protocolo general para purificación con HPLC preparativa:* Se disolvieron los compuestos crudos en 50% de ácido acético en agua a 50-100 mg/ml, se filtró y fraccionó mediante HPLC preparativa: 1) columna; YMC Pack-Pro C18 (50a x 20 mm; ID = 5 mm); 2) gradiente lineal: 10% A/90% B hasta 50%A/50% B durante 30 min; 3) velocidad de flujo: 40 ml/min, 4) detección: 214 nm.

## Preparación de aminas secundarias

A continuación se describe la preparación de varias aminas secundarias utilizadas como intermediarias en la síntesis de un compuesto de la fórmula (I).

Se prepararon los derivados de *N*-sulfonilo de piperazina a partir de *N*-Boc de piperazina por reacción con el respectivo cloruro de sulfonilo ( $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ ), y la desprotección del grupo *N*-Boc ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). 1-Metanosulfonilpiperazina:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; neutro):  $\delta$  (ppm) 3,1 (t, 4H), 2,9 (t, 4H), 2,7 (s, 3H). También se preparó metanosulfonilpiperazina por reacción de cloruro de metanosulfonilo con un exceso de piperazina (más de 2 equivalentes) en agua.

Se prepararon las formas isoméricas racémicas o con un solo centro quiral de 3-acetilaminopirrolidina tratando *N*<sup>1</sup>-Boc-*S*-aminopirrolidina (racemato, 3R o 3S) con cloruro de acetilo ( $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ ), y la desprotección del grupo *N*-Boc ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). 3-(Acetamido)pirrolidina:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ; sal de TFA):  $\delta$  (ppm) 4,2 (quin, 1H), 3,3-3,1 (m, 3H), 2,9 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 1,8 (brs, 4H);

Se preparó 3-((*R*)-2-hidroxiopropionamido)pirrolidina después de la amidación de *N*<sup>1</sup>-Boc-3-aminopirrolidina (ácido *L*-láctico, PyBOP, DMF, RT), y la desprotección del grupo *N*-Boc ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ : 159,11; hallado: 159,0.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; sal de TFA):  $\delta$  (ppm) 4,4 (quin, 1H), 4,1 (q, 1H), 3,5-3,4 (m, 2H), 3,3-3,2 (m, 2H), 2,3 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 1,3 (d, 3H).

Se obtuvieron los derivados de *N*<sup>3</sup>-alcanosulfonilo de (3*R*)-aminopirrolidina mediante el tratamiento de *N*<sup>1</sup>-Boc-(3*R*)-aminopirrolidina con cloruro de propionilsulfonilo o cloruro de ciclohexilmetilsulfonilo ( $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ ), y la desprotección del grupo *N*-Boc ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

Se prepararon derivados de tetrahidro-3-tiofenamino-1,1-dióxido siguiendo el protocolo de Loev, B. J. Org. Chem. 1961, 26, 4394-9 por reacción de 3-sulfoleno con una amina primaria necesaria en metanol (cat. KOH, RT). *N*-Metil-3-tetrahidrotiofeno-amino-1,1-dióxido (sal de TFA):  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,4 (br s, 2H), 4,0-3,8 (quin, 1H), 3,6-3,5 (dd, 1H), 3,4-3,3 (m, 1H), 3,2-3,1 (m, 2H), 2,5 (s, 3H), 2,4 (m, 1H), 2,1 (m, 1H).

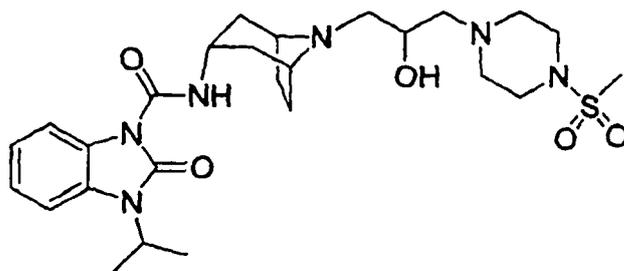
Se preparó (*S*)-1,1-dioxo-tetrahidro-1,λ<sup>6</sup>-tiofen-3-ilamina de la siguiente manera:

- 1) Protección de *N*-Boc de (*S*)-3-tetrahidrotiofenamina (Dehmlow, EV; Westerheide, R. Síntesis 1992, 10, 947-9) por tratamiento con  $(\text{Boc})_2\text{O}$  en metanol a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas, 2) oxidación por tratamiento con *m*CPBA en diclorometano a (*S*)-1,1-dioxo-tetrahidro-1,6-tiofeno-3-ilamina protegida con *N*-Boc a  $0^\circ\text{C}$  durante 5 h (lavado varias veces con una solución de sulfito de sodio saturado para extinguir las trazas de peróxidos), y 3) desprotección de *N*-Boc del derivado de sulfona con TFA en diclorometano a temperatura ambiente durante 1 hora a la amina libre que fue aislada como una sal de TFA. Se preparó (*R*)-1,1-dioxo-tetrahidro-1,6-tiofeno-3-ilamina utilizando el mismo método, pero sustituyendo la (*S*)-3-tetrahidrotiofenamina con (*R*)-3-tetrahidrotiofenamina.

Se preparó *N*-metil-tetrahidro-2*H*-tiopiran-4-amino-1,1-dióxido a partir de tetrahidro-4*H*-tiopiran-4-ona: i)  $\text{MeNH}_2$ ,  $\text{NaBH}_4$ , ii)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}$ ; iii) *m*CPBA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  (lavado varias veces con una solución de sulfito de sodio saturado para extinguir las trazas de peróxidos), iv)  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{S}$ : 164,07; hallado: 164,9.  $^1\text{HRMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; sal de TFA):  $\delta$  (ppm) 3,4-3,1 (m, 5H), 2,7 (s, 3H), 2,4 (brd, 2H), 2,1 (brm, 2H).

## Ejemplo 1

Síntesis de la  $\{(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il\}$ amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico (por el Esquema A)



## ES 2 359 673 T3

### a. Preparación de *N*-isopropil-*N*-(2-nitrofenil)amina

A una solución fría de 2-fluoro-nitrobenceno (31,8 g, 0,225 mol) en etanol (300 ml) enfriada en un baño de hielo se añadió isopropilamina (54,0 ml, 0,634 mol), seguido de la adición de una solución de carbonato de potasio (31,1 g, 0,225 mol) en agua (120 ml). La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h, a continuación, a reflujo durante 6 h. La reacción se extinguió enfriando la mezcla a temperatura ambiente y evaporándola bajo presión reducida dando un residuo naranja. El residuo se repartió entre éter de etilo (800 ml) y una solución de salmuera (300 ml). La capa orgánica se secó y se filtró para proporcionar el intermediario del título (39 g) como un líquido naranja. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 8,06 (d, 1H), 7,30 (t, 1H), 6,74 (d, 1H), 6,48 (t, 1H), 3,73 (hept, 1H), 1,20 (d, 6H).

### b. Preparación de *N*-(2-aminofenil)-*N*-isopropilamina

A una mezcla de etanol (600 ml) y 2 M de solución de hidróxido de sodio (320 ml) enfriada en un baño de hielo se añadió polvo de zinc (59,5 g) lentamente. Mientras se agitaba la mezcla de Zn se añadió *N*-isopropil-*N*-(2-nitrofenil)amina (41 g, 0,228 mol) disuelto en etanol (50 ml). La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min, luego se calentó a 85°C. La mezcla se agitó a 85°C durante 12 h hasta que el reflujo de la solución de la mezcla se convirtió en una solución incolora. La mezcla se enfrió a 0°C y se filtró. El sólido recogido se lavó con acetato de etilo (200 ml). La solución filtrada y lavada se combinó y se evaporó al vacío para eliminar el exceso de solventes volátiles. Durante la concentración, la mezcla se volvió marrón pálido/amarilla. El concentrado acuoso se extrajo con acetato de etilo (800 ml). La solución orgánica se concentró hasta secarse para proporcionar el intermediario del título (33 g) como un aceite de color marrón-rosado que se utilizó en el paso siguiente sin ningún 3,55 (hept, 1H), 1,2 (d, 6H). tratamiento adicional. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 6,73-6,5 (m, 4H), 3,58-3,55 (hept, 1H), 1,2 (d, 6H).

### c. Preparación de 1-isopropil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona

A una solución del producto del paso (b), *N*-(2-aminofenil)-*N*-isopropilamina (34 g, 0,226 mol), en tetrahidrofurano (500 ml) se añadió carbonildiimidazol (36,7 g, 0,226 mol) como un sólido. La mezcla se agitó bajo una atmósfera de gas nitrógeno a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla se concentró al vacío, y un residuo resultante de color marrón oscuro se distribuyó entre acetato de etilo (700 ml) y solución de salmuera (300 ml). La capa orgánica se lavó con 1 M de ácido fosfórico varias veces (~ 3 x 300 ml) hasta que el color de la capa orgánica se volvió de color marrón oscuro a amarillo pálido. La solución orgánica se evaporó hasta secarse para dar el intermediario del título (34 g) como un aceite de color amarillo pálido que se solidificó poco en reposo. La pureza del material fue evaluado por <sup>1</sup>H-RMN que no indicó ninguna impureza detectable: <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ (ppm) 7,2 (m, 1H), 7,0 (m, 3H), 4,6 (hept, 1H), 1,46 (d, 6H). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O: 177,09; hallado: 177,2.

HPLC anal.: tiempo de retención = 2,7 min (99% de pureza): 1) columna: Zorbax, Bonus-RP, tamaño de partícula de 3,5 mm, 2,1 x 50 mm; 2) velocidad de flujo: 0,5 ml/min, 3) condición isocrática (10% de disolvente B/90% de disolvente A) de 0 a 0,5 min, y luego gradiente lineal hasta 50% de disolvente B/50% de disolvente A durante 5 minutos (disolvente A = 98% de agua/2% de MeCN/0,1% de TFA, disolvente B = 90% de MeCN/10% de agua/0,1% de TFA). Análisis de TLC (placa de gel de sílice): R<sub>f</sub> = 0,5 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). (m/z): [M + H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O: 177,09, hallado: 177,3.

### d. Preparación de 8-bencil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ona

Se añadió ácido clorhídrico concentrado (30 ml) a una solución heterogénea de 2,5-dimetoxi-tetrahidrofurano (82,2 g, 0,622 mol) en agua (170 ml) mientras se agitaba. En un frasco separado enfriado a 0°C (baño de hielo), se añadió ácido clorhídrico concentrado (92 ml) lentamente a una solución de bencilamina (100 g, 0,933 mol) en agua (350 ml). La solución de 2,5-dimetoxitetrahidrofurano se agitó durante unos 20 minutos, se diluyó con agua (250 ml), y entonces se añadió la solución de bencilamina, seguido de la adición de una solución de ácido 1,3-acetonadicarboxílico (100 g, 0,684 mol) en agua (400 ml) y la adición de fosfato de hidrógeno de sodio (44 g, 0,31 mol) en agua (200 ml). El pH se ajustó de pH 1 a pH ~ 4,5 utilizando NaOH al 40%. La solución resultante se agitó durante la noche. La solución se acidificó a pH 3 de pH 7,5 con 50% de ácido clorhídrico, se calentó a 85°C y se agitó durante 2 horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se basificó a pH 12 con NaOH al 40%, y se extrajo con DCM (3 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir el intermediario crudo del título como un aceite viscoso marrón (52 g).

A una solución del intermediario crudo en metanol (1000 ml) se añadió dicarbonato di-terc-butílico (74,6 g, 0,342 mol) a 0°C. La solución se dejó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El metanol se eliminó a presión reducida y el aceite resultante se disolvió en diclorometano (1000 ml). El intermediario se extrajo en 1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1000 ml) y se lavó con diclorometano (3 x 250 ml). La capa acuosa se basificó a pH 12 utilizando NaOH acuoso y se extrajo con diclorometano (3 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el intermediario del título como un aceite viscoso, de color marrón claro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) de 7,5 a 7,2 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) 3,7, 3,45 (s amplio, 2H, CH-NBN), 2,7-2,6 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2,2-2,1 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2,1-2,0 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). (m/z): [M + H]<sup>+</sup> Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO: 216,14, hallado: 216,0.

## ES 2 359 673 T3

### e. Preparación de éster terc-butílico del ácido 3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico

A una solución de 8-bencil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ona (75 g, 0,348 mol) en EtOAc (300 ml) se añadió una solución de dicarbonato di-terc-butílico (83,6 g, 0,383 mol, 1,1 eq) en EtOAc (300 ml). La solución resultante y de lavado (100 ml de EtOAc) se introdujo en un recipiente de 1 litro de hidrogenación Parr conteniendo 23 g de hidróxido de paladio (20% en peso de paladio, base seca, sobre carbón, ~ 50% humedecido con agua; por ejemplo catalizador Pearlman) en una corriente de nitrógeno. El recipiente de reacción fue desgasificado (alternancia de vacío y N<sub>2</sub> cinco veces) y presurizado a 60 psi de gas H<sub>2</sub>. La solución de reacción se agitó durante dos días y se recargó con H<sub>2</sub> según la necesidad para mantener la presión de H<sub>2</sub> a 60 psi hasta que la reacción se completó según se controló por cromatografía en capa fina de sílice. La solución negra se filtró a través de una capa de Celite® y se concentró a presión reducida para dar el intermediario del título como un aceite viscoso amarillo a naranja que se utilizó en el paso siguiente sin ningún tratamiento adicional. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4,5 (amplio, 2H, CH-NBoc), 2,7 (amplio, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2,4-2,3 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,1 (m amplio, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 1,7-1,6 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,5 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCON)).

### f. Preparación de éster terc-butílico del ácido (1S,3R,5R)-3-amino-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico

A una solución del producto del paso anterior (75,4 g, 0,335 mol) en metanol (1L) se añadió formiato de amonio (422,5 g, 6,7 mol), agua (115 ml) y 65 g de paladio en carbón activo (10% en base seca, ~ 50% humedecido con agua; Degussa tipo E101NE/W) bajo una corriente de N<sub>2</sub> mientras se agitaba a través del agitador mecánico. Después de 24 y 48 horas, se añadieron porciones adicionales de formiato de amonio (132 g, 2,1 mol). Una vez que la progresión de la reacción cesó, según se verificó por HPLC anal., se añadió Celite® (> 500 g) y la suspensión espesa resultante se filtró y a continuación el sólido recogido se lavó con metanol (~ 500 ml). Los filtrados se combinaron y se concentraron bajo presión reducida. La solución turbia bifásica resultante se diluyó entonces con 1M de ácido fosfórico hasta un volumen final de ~ 1,5 a 2,0 l a pH 2 y se lavó con diclorometano (3 x 700 ml). La capa acuosa se basificó a pH 12 utilizando 40% de NaOH acuoso, y se extrajo con diclorometano (3 x 700 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron por evaporación giratoria y después alto vacío para dar el intermediario del título (52 g), comúnmente *N*-Boc-endo-3-aminopropano, como un sólido entre blanco y amarillo pálido. La proporción de isómeros de endo a exo amina del producto fue > 99:1 basada en el análisis de <sup>1</sup>H-RMN (pureza > 96% por HPLC analítica). <sup>1</sup>H = RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4,2-4,0 (d amplio, 2H, CHNBOC), 3,25 (t, 1H, CHNH<sub>2</sub>), 2,1-2,05 (m, 4H), 1,9 (m, 2H), 1,4 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCON), 1,2-1,1 (amplio, 2H). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>12</sub>N<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 227,18; hallado: 227,2. HPLC analítica (método isocrático; 2,98 (A:B) a 90:10 (A:B) durante 5 min): tiempo de retención = 3,68 min.

### g. Preparación de éster terc-butílico del ácido (1S,3R,5R)-3-[(3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carbonil)amino]-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico

A una suspensión fría de hidruro de sodio (9,25 g, 231,4 mmol, 60% de dispersión en aceite mineral) en THF seco (1000 l) en un baño de hielo se añadió 1-isopropil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona (27,2 g, 154,2 mmol) en THF (50 ml) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a ~ 0-5°C durante 30 minutos, a continuación se añadió clorofornio de 4-nitrofenilo (34,2 g, 170 mmol) en THF (50 ml). La mezcla se agitó durante la noche mientras se dejaba calentar la mezcla gradualmente a la temperatura ambiente. Al éster activado formado se añadió a continuación éster terc-butílico del ácido (1S,3R,5R)-3-amino-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico (36,7 g, 162 mmol) en THF (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 h, y a cerca de 75°C durante unas 3 h, momento en el que un LCMS de la muestra de reacción indicó la finalización de la reacción de acoplamiento. La mezcla se concentró al vacío, se disolvió en diclorometano (1 l), y se lavó primero con 1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y luego con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Después del secado, la solución orgánica se evaporó para proporcionar el intermediario del título como un residuo de color amarillo pálido que se utilizó en el paso siguiente sin ningún tratamiento adicional.

### h. Preparación de (8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido *N*[(1S,3R,5R)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carboxílico

A una solución fría de éster terc-butílico del ácido (1S,3R,5R)-3-[(3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carbonil)amino]-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico en 200 ml de diclorometano en un baño de hielo se añadió ácido trifluoroacético (200 ml). La mezcla se agitó durante unos 30 minutos a ~ 5°C, y a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la evaporación de la mezcla se añadió éter etílico, (~ 500 ml) al residuo aceitoso, causando la solidificación de los residuos. Se recogió el precipitado, se enjuagó con abundante cantidad de éter etílico y se secó al vacío para proporcionar el intermediario del título (47 g) como una sal de TFA. Al intermediario del título también se le conoce comúnmente como endo-*N*-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carboxamida.

### i. Preparación de [3-hidroxi-3'-[[3-isopropil-2-2-3-oxo-dihidrobencimidazolilcarbonil]amino]espiro[azetidina-1,8'-(1S,3R,5R)-8-azabicyclo[3.2.1]octano]

A una solución de (8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido *N*[(1S,3R,5R)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carboxílico (0,884 g, 2 mmol, sal de TFA) en etanol (10 ml) se añadió primero *N,N*-diisopropiletilamina (0,348 ml, 2 mmol) seguido de epibromohidrina (0,274 g, 4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y el producto de espiro se precipitó, recogió por filtración, se lavó con etanol frío y se utilizó en el próximo paso sin ningún tratamiento adicional.

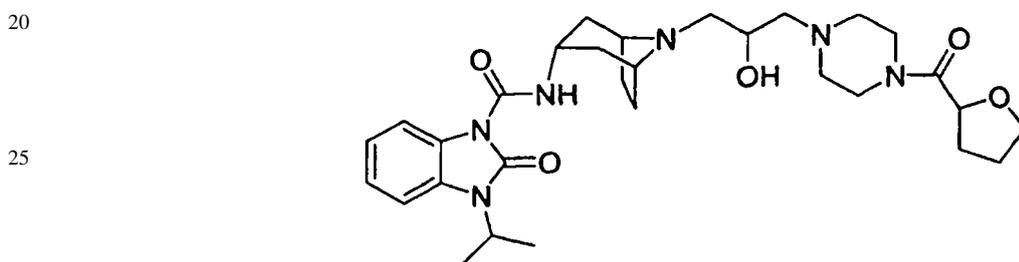
## ES 2 359 673 T3

j. Síntesis de *{(1S,3R,5R)-8-[-2-hidroxi-3-(4-metanosulfonylpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico*

A una solución de 3-hidroxi-3'-*{[3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazolil-carbonil]amino}espiro[azetidina-1,8'-(1S,3R,5R)-8-azabicyclo[3.2.1]octano]* (0,135 g, 0,35 mmol) en etanol (10 ml) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (0,24 ml, 1,4 mmol) y *N*-metilsulfonylpiperazina/sal de TFA (0,195 g, 0,7 mmol). La mezcla se agitó a 80°C durante 12 h, y se concentró al vacío, obteniéndose un residuo aceitoso amarillo pálido. El producto crudo se disolvió en solución acuosa de ácido acético al 50%, luego se purificó por cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa para proporcionar el compuesto del título (30,1 mg) como una sal de TFA. (m/z):  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{26}H_{40}N_6O_5S$ : 549,28; hallado: 549,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-40% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 2,13 min.

### Ejemplo 2

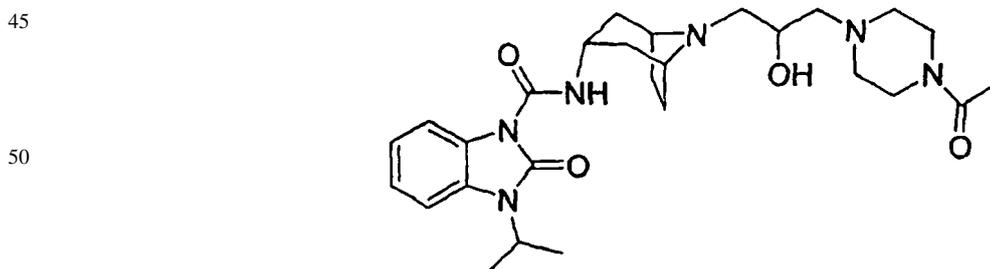
15 Síntesis de *((1S,3R,5R)-8-[2-hidroxi-3-[4-(tetrahidrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil]-8-azabicyclo-[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico*



Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 1, excepto en el paso (j) que sustituye la *N*-metilsulfonylpiperazina con *N*-(tetrahidro-2-furoil)piperazina, se preparó el compuesto del título (23,7 mg) como una sal de TFA. (m/z):  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{30}H_{44}N_6O_5$ : 569,34; hallado: 569,4. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-40% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 2,19 min.

### Ejemplo 3

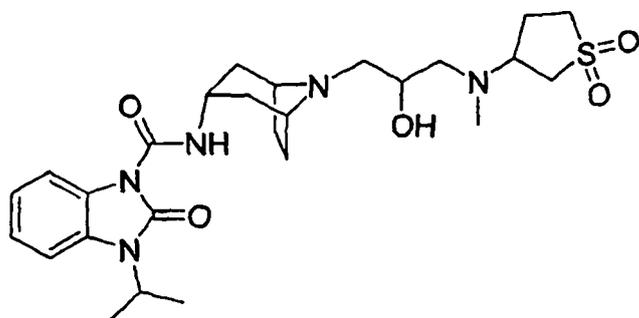
40 Síntesis de *{(1S,3R,5R)-8-[3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxipropil]-8-azabicyclo-[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico*



Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 1, excepto en el paso (j) que substituye la *N*-metilsulfonylpiperazina con *N*-acetilpiperazina, se preparó el compuesto del título (23,1 mg) como una sal de TFA. (m/z):  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{27}H_{40}N_6O_4$ : 513,31; hallado: 513,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-40% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 2,12 min.

## Ejemplo 4

Síntesis de ((1*S*,3*R*,5*R*)-8{3-[(1,1-dioxotetrahidro-1,6-tiofen-3-il)metilamino]-2-hidroxiopropil}-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico



Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 1, excepto en el paso (j) que sustituye la *N*-metilsulfonilpiperazina con *N*-metiltetrahidro-3-tiofenamino-1,1-dióxido, se preparó el compuesto del título (16,3 mg) como una sal de TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S: 534,27; hallado: 534,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-40% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 2,18 min.

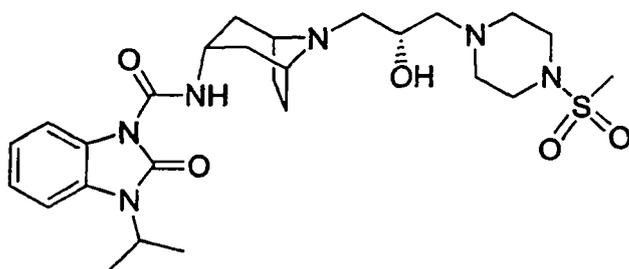
## Ejemplo 5

Síntesis alternativa de la ((1*S*,3*R*,5*R*)-8-[2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico (por el Esquema B)

El compuesto del título se preparó haciendo reaccionar la *N*-metilsulfonilpiperazina/sal de TFA (0,6 g, 2,16 mmol) con epibromohidrina (0,591 g, 4,31 mmol) en etanol (9 ml) conteniendo *N,N*-diisopropiletilamina (0,375 ml, 2,16 mmol) a temperatura ambiente durante 12 h. El precipitado, 2-hidroxi-7-metilsulfonil-7-aza-4-azoniaespiro[3.5]nonano, se hizo reaccionar luego con endo-*N*-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxamida (preparado como se describe en el Ejemplo 1, paso (h)), en etanol a 80°C durante 12 h, para dar el compuesto del título como una sal de TFA. El análisis por LCMS y por HPLC anal, del producto indicó que el compuesto preparado por este proceso era idéntico al compuesto preparado en el Ejemplo 1 por el Esquema A.

## Ejemplo 6

Síntesis de la ((1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*S*)-2-hidroxi-3-(4-metanosulfonil-piperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico (por el Esquema C)



a. Preparación de (*S*)-1-cloro-3-(4-metilsulfonil-1-piperazinil)-2-propanol

Se añadió (*S*)-epiclorhidrina (48,0 ml, 0,612 mol) a una solución agitada de *N*-metilsulfonamida de piperazina (87,3 g, 0,532 mol) en etanol (1,33 l) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas y el precipitado sólido blanco que se formó se recogió por filtración y se lavó con etanol para proporcionar el intermediario del título (107,7 g) como un sólido blanco que se utilizó sin purificación adicional, (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 257,07; hallado: 257,2. <sup>1</sup>H-RMN (DMSO): δ (ppm) 5,09 (d, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,65 (dd, 1H), 3,55 (dd, 1H), 3,09 (m, 4H), 2,37 (dd, 1H), 2,86 (s, 3H), 2,50-2,58 (m, 4H), 2,45 (dd, 1H).

## ES 2 359 673 T3

### b. Preparación de (S)-1-metilsulfonyl-4-(oxiranilmetil)-piperazina

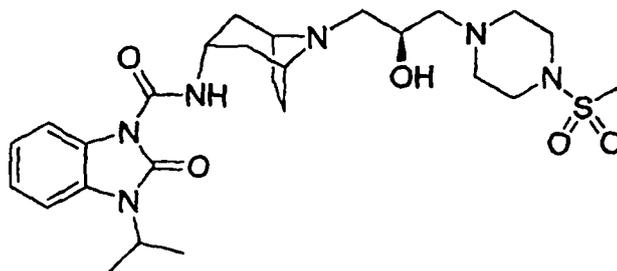
Se añadió hidróxido de sodio (22,15 g, 0,534 mol) a una solución bien agitada del producto del paso anterior (118,13 g, 0,461 mol) en 80% de THF en agua (1500 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 90 minutos y se separaron las capas. La capa orgánica se concentró al vacío, se diluyó con diclorometano (1500 ml), y se lavó con una mezcla de la capa acuosa previamente separada y 1M de NaOH (500 ml). La capa orgánica se lavó adicionalmente con 1M de NaOH (500 ml) y salmuera (500 ml), se secó, filtró y concentró al vacío para proporcionar un sólido cristalino blanco (90,8 g). El sólido cristalino se recrystalizó en una mezcla caliente 1:01 de EtOAc y hexano (800 ml) para obtener 43,33 g del intermediario del título, (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 221,10; hallado: 221,3. <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 3,11 (m, 4H), 3,02 (m, 1H), 2,87 (s, 3H), 2,69-2,75 (m, 2H), 2,45-2,60 (m, 5H), 2,22 (dd, 1H).

### c. Síntesis de la {(1S,3R,5R)-8-[(S)-hidroxi-3-(4-metanosulfonylpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico

A una solución de endo-N-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxamida (preparado como se describe en el Ejemplo 1, paso (h)), (0,3 g, 0,914 mmol) en tolueno (3 ml) se añadió (S)-1-metilsulfonyl-4-(oxiranilmetil)-piperazina (0,201 g, 0,913 mmol). La mezcla se agitó a 100°C durante 18 h, y se concentró al vacío, obteniéndose un residuo aceitoso. El residuo se disolvió en solución acuosa de ácido acético al 50%, y se purificó por HPLC preparativa, para proporcionar el compuesto del título (0,135 g) como una sal de TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S: 549,28; hallado: 549,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-40% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 2,13 min.

### Ejemplo 7

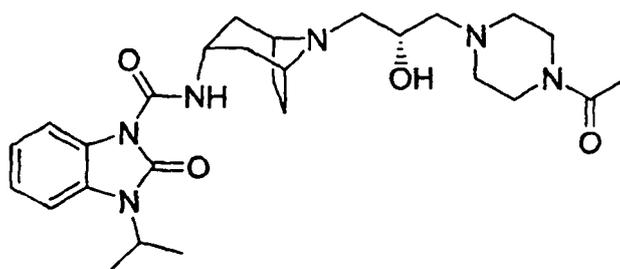
#### Síntesis de la {(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(4-metanosulfonylpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico



Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 6, excepto por la sustitución de (S)-1-metilsulfonyl-4-(oxiranilmetil)-piperazina con (R)-1-metilsulfonyl-4-(oxiranilmetil)-piperazina, se preparó el compuesto del título (0,110 g) como una sal de TFA. Los perfiles del LCMS y de la HPLC analítica del isómero (S) y (R) de los compuestos del Ejemplo 6 y 7 eran idénticos.

### Ejemplo 8

#### Síntesis de la {(1S,3R,5R)-8-[(S)-3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxipropil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico



A una solución de endo-N-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxamida (preparado como se describe en el Ejemplo 1, paso (h)), (0,658 g, 2,0 mmol) en etanol (10 ml) se añadió (S)-1-



## ES 2 359 673 T3

### c. Preparación de (S)-1-cloro-3-(4-[(R)-tetrahidro-2-furoil]-1-piperazinil)-2-propanol

A una solución de 1-[(R)-tetrahidro-2-furoil]piperazina (1,89 g, 10,26 mmol) en etanol (25 ml) se añadió epiclo-  
rohadrina (1,09 g, 11,8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se concentró al vacío,  
5 obteniéndose un aceite amarillo pálido. El aceite se disolvió en diclorometano (100 ml), y se lavó con 1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,  
se secó y se evaporó para proporcionar el intermediario del título.

### d. Preparación de 1-[(R)-tetrahidro-2-furoil]-4-((S)-oxiranilmetil)-piperazina

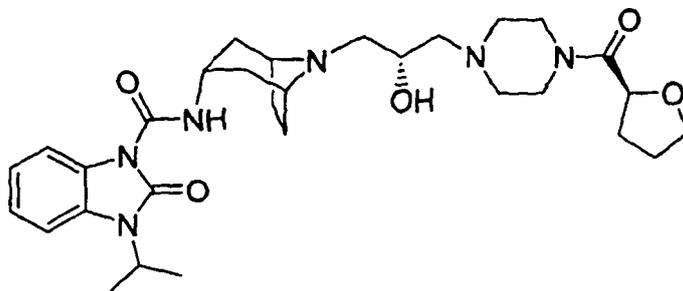
A una solución fría de (S)-1-cloro-3-(4-[(R)-tetrahidro-2-furoil]-1-piperazinil)-2-propanol (2,4 g, 8,67 mmol) en  
THF (25 ml) en un baño de hielo se añadió agua (7 ml) y luego hidróxido de sodio (0,416 g, 10,41 mmol) en forma de  
gránulos sólidos. La mezcla se agitó vigorosamente a la misma temperatura durante 1 h y se diluyó con diclorometano  
(200 ml). La mezcla se lavó con 1M de hidróxido de sodio y solución de salmuera, después se secó y se concentró  
15 para proporcionar el intermediario del título.

### e. Síntesis de la ((1S,3R,5R)-8-((S)-2-hidroxi-3-[4-((R)-tetrahidrofurano-2-carbonil)propil]piperazinil-1-il)-8-aza- biciclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico

A una solución de endo-N-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxami-  
da (preparado como se describe en el Ejemplo 1, paso (h)), (0,37 g, 1,128 mmol) en etanol (6 ml) se añadió 1-[(R)-  
tetrahidro-2-furoil]-4-((S)-oxiranilmetil)-piperazina (0,298 g, 1,241 mmol). La mezcla se agitó a 80°C durante 18 h,  
y se concentró al vacío, obteniéndose un residuo aceitoso. El residuo se disolvió en solución acuosa de ácido acético  
al 50%, luego se purificó por HPLC preparativa, para proporcionar el compuesto del título (0,15 g) como una sal de  
25 TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 569,34; hallado: 569,4. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-40%  
MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 2,19 min.

### Ejemplo 11

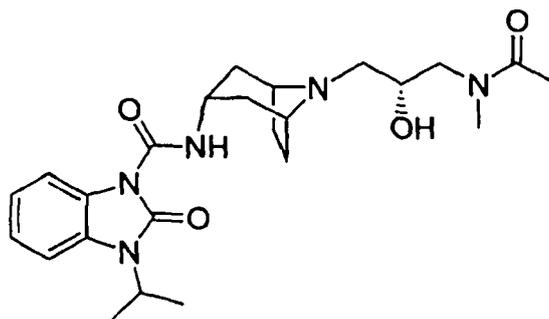
### Síntesis de ((1S,3R,5R)-8-((S)-2-hidroxi-3-[4-((S)-tetrahidrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil]-8-azabicyclo- [3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico



Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 10, excepto en el paso (a) que substituye el reactivo de ácido (R)-  
tetrahidro-2-furónico con ácido (S)-tetrahidro-2-furónico, se preparó el compuesto del título (0,133 g) como una sal de  
TFA. Los perfiles del LCMS y de la HPLC analítica de los isómeros (S) y (R) de los Ejemplo 10 y 11 fueron idénticos.

### Ejemplo 12

### Síntesis de la ((1S,3R,5R)-8-((R)-3-(acetilmetilamino)-2-hidroxi-3-propil)-8-azabicyclo-[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico (por el Esquema D)



## ES 2 359 673 T3

### a. Preparación de *N*-[*(1S,3R,5R)*-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il]-1-isopropil-2-oxo-1,2-dihidroquinolino-3-carboxamida

A una suspensión de sal de TFA endo-*N*-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxamida, (preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1, paso (h)), (15 g, 33,9 mmol) en diclorometano (500 ml) se añadió agua (500 ml) y bastante *N,N*-diisopropiletilamina (~ 20 ml) para llevar la capa acuosa a un pH de 9,8. Se separaron las capas, conservando la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo luego una segunda vez con diclorometano (100 ml). Las dos capas orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera. El secado y la evaporación de la fase orgánica proporcionó la base libre del intermediario del título (9,7 g, 87% de rendimiento) en forma de polvo amarillo, (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 329,20; hallado: 329,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 2-50% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 3,67 min. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 9,31 (d, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,21 (m, 2H), 4,69 (septeto, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,53 (m, 2H), 1,40-2,00 (m, 8H), 1,48 (d, 6H).

### b. Preparación de *(S)*-1-(bencilmetilamino)-3-cloropropan-2-ol

Se añadió *(S)*-epiclorhidrina (10 ml, 127 mmol) a una solución de *N*-bencilmetilamina (16,4 ml, 127 mmol) en hexano (60 ml). Se agitó la mezcla durante 16 h a temperatura ambiente. Los volátiles se retiraron dando un residuo aceitoso. El producto se recuperó mediante cromatografía de columna utilizando metanol SiO<sub>2</sub>/diclorometano (10:90) con el último eluyendo el producto al máximo. Después del secado y filtración, se eliminó el disolvente para proporcionar el intermediario del título (19,2 g, 71% de rendimiento) como un aceite incoloro, (m/z): [M + H]<sup>+</sup> Calculado para C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>ClNO: 214,10, hallado: 214,2.

### c. Preparación de éster *terc*-butílico del ácido (*(S)*-3-cloro-2-hidroxiopropil)metil-carbámico

Se disolvió *(S)*-1-(bencilmetilamino)-3-cloropropan-2-ol (9,1 g, 47,2 mmol) en acetato de etilo (75 ml). Luego se añadió anhídrido de Boc (10,1 g, 51,9 mmol), seguido de 10% de Pd(OH)<sub>2</sub> en carbón y se puso la mezcla bajo hidrógeno a 60 psi durante 16 h. La mezcla se filtró a través de celita y se eliminaron los volátiles produciendo un residuo aceitoso. El producto se recuperó mediante cromatografía en columna. Después del secado y filtración, se eliminó el disolvente para proporcionar el intermediario del título (8,3 g, 87% de rendimiento) como un aceite incoloro.

### d. Preparación de éster *terc*-butílico del ácido metil-*(S)*-1-oxiranilmetil-carbámico

Se disolvió éster *terc*-butílico del ácido (*(S)*-3-cloro-2-hidroxiopropil)metil-carbámico (3,23 g, 14,4 mmol) en 40 ml de una mezcla de THF/H<sub>2</sub>O (4:1). Se añadió hidróxido de sodio (0,700 g, 17,3 mmol) como una solución de 10 ml en agua y la reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El producto se recogió en acetato de etilo (200 ml), se lavó con salmuera (2 x 100 ml), se secó y se filtró para proporcionar el intermediario del título (2,5 g, 94% de rendimiento) de un aceite incoloro, (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>: 188,03; hallado: 210,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 2-50% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 4,18 min. <sup>1</sup>H RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 3,43 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 2,83 (m, 1H), 2,82 (s, 3H), 2,72 (m, 1H), 2,50 (m, 1H), 1,40 (s, 12H).

### e. Preparación de éster *terc*-butílico del ácido (*(R)*-2-hidroxi-3-*(1S,3R,5R)*-3-[(3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carbonil)amino]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-il)propil)metilcarbámico

Se disolvieron éster *terc*-butílico del ácido metil-*(S)*-1-oxiranilmetil-carbámico (3,1 g, 20,1 mmol) y endo-*N*-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)-3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxamida (preparado como se describe en el ejemplo 12, paso (a)), (2,2 g, 6,7 mmol) en etanol seco (100 ml) y se calentó a 80°C durante 16 h. Los volátiles se retiraron dando un residuo aceitoso. El producto se recuperó mediante cromatografía en columna para proporcionar el intermediario del título (3,0 g, 87% de rendimiento) como un sólido amarillo claro, (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 516,32; hallado: 516,5. Tiempo de retención (HPLC anal.: 20-50% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 4,66 min.

### f. Preparación de *(1S,3R,5R)*-8-*(S)*-2-hidroxi-3-metilamino-propil)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il-amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico

Se disolvió éster *terc*-butílico del ácido (*(R)*-2-hidroxi-3-*(1S,3R,5R)*-3-[(3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carbonil)amino]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-il)propil)metil-carbámico (3,0 g, 5,8 mmol) en diclorometano (30 ml) a temperatura ambiente y se añadió ácido trifluoroacético (25 ml) gota a gota. Después de unos 20 minutos la reacción se completó, todos los volátiles fueron eliminados y el residuo aceitoso se trituró con éter etílico. Los sólidos de color blanquecino se recogieron por filtración y se secaron para proporcionar el intermediario del título (3,1 g, 84% de rendimiento) como una sal de TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 416,27; hallado: 416,6. Tiempo de retención (HPLC anal.: 20-50% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 3,17 min.

### g. Síntesis de *(1S,3R,5R)*-8-*(R)*-3-(acetilmetilamino)-2-hidroxiopropil)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico

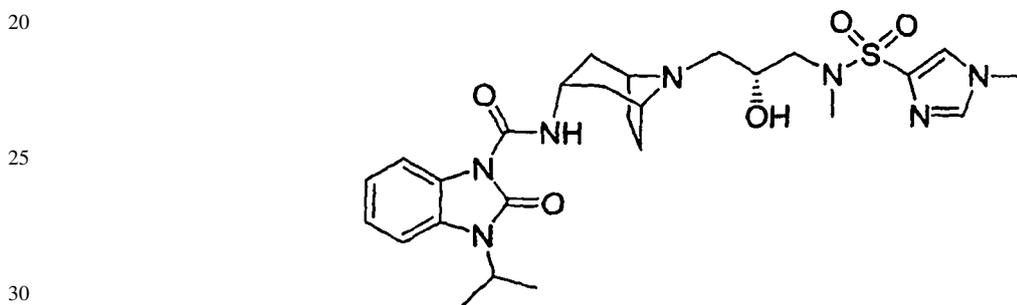
Se suspendió [*(1S,3R,5R)*-8-*(S)*-2-hidroxi-3-metilaminopropil)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzimidazol-1-carboxílico en diclorometano (10 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió *N,N*-

## ES 2 359 673 T3

diisopropiletilamina (2,84 ml, 16,3 mmol), seguido de cloruro de acetilo (284 ml, 3,9 mmol). La reacción se dejó a temperatura ambiente y se completó al cabo de 1 h. La mezcla de reacción cruda se evaporó para dar un sólido amarillo. Se realizó una purificación adicional a través de HPLC preparatoria (fase inversa) en un gradiente de 5-10-60% (5-10% durante 10 minutos, 10-60% durante 50 min); velocidad de flujo de 15 ml/min; detección a 280 nm. Las fracciones purificadas se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título en forma de una sal de TFA. Entonces se añadió una mezcla de 1:1 de 1N de hidróxido de sodio y diclorometano (200 ml) a la sal de TFA liofilizada. La capa orgánica se secó, se filtró y se evaporó, y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (1,05 g, 57% de rendimiento) como una base libre, (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 458,28; hallado: 458,5. Tiempo de retención (HPLC anal.: 2-50% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 6 min) = 3,72 min. <sup>1</sup>H RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): 9,28 (d, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,17 (m, 2H), 4,50-4,90 (m, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,40-3,60 (m, 1H), 3,33 (s, 1H), 3,23 (m, 2H), 3,02 (s, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,24 (m, 2H), 2,11 (m, 2H), 2,03 (s, 3H), 1,80-2,00 (m, 4H), 1,63 (m, 2H), 1,48 (d, 6H).

### 15 Ejemplo 13

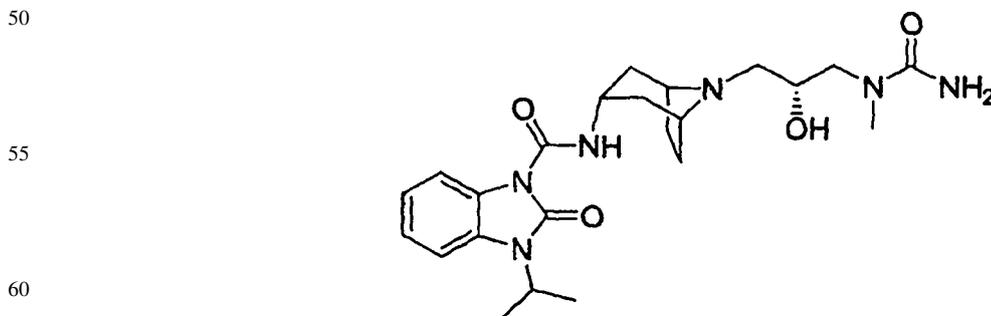
*Síntesis de ((1S,3R,5R)-8-((R)2-hidroxi-3-[metil-(1-metil-1H-imidazol-4-sulfonyl)amino]propil)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico*



Se suspendió la sal de TFA de ((1S,3R,5R)-8-((S)-2-hidroxi-3-metilaminopropil)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico (preparado como se describe en el Ejemplo 12, paso (f)), (0,050 g, 0,078 mmol) en dimetilformamida (5 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (0,43 ml, 24,6 mmol), seguido de cloruro de sulfonilo de 1-metil-1H-imidazol (0,017 g, 0,094 mmol). La reacción se dejó a temperatura ambiente y se consideró que se había completado al cabo de 1 hora. La reacción se paró con ácido acético y agua (1:1). Los volátiles fueron retirados y se realizó la purificación por HPLC preparatoria (fase inversa) en un gradiente de 15-45% durante 50 min, velocidad de flujo de 20 ml/min, para proporcionar el compuesto del título (0,030 g, 56%) como una sal de TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S: 560,27; hallado: 560,5. Tiempo de retención (HPLC anal.: 2-50% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 4 min) = 4,05 min. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 9,28 (d, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,79 (d, 2H), 7,45 (d, 1H), 7,21 (m, 2H), 4,75 (br m, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,71 (br s, 4H), 3,23 (m, 3H), 2,88 (m, 1H), 2,77 (s, 2H), 2,29 (m, 2H), 2,08 (m, 2H), 1,93 (m, 4H), 1,59 (m, 2H), 1,48 (d, 6H).

### 45 Ejemplo 14

*Síntesis de la ((1S,3R,5R)-8-((R)2-hidroxi-3-(1-metilureido)propil)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico*

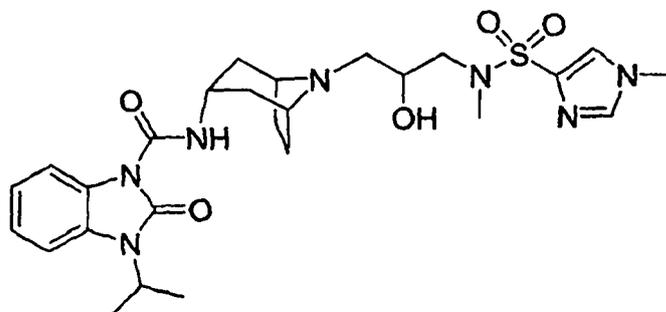


Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 13, excepto por la sustitución de cloruro de sulfonilo de 1-metil-1H-imidazol con isocianato de trimetilsililo (0,011 g, 0,094 mmol), se preparó el compuesto del título (0,025 g, 56%) como una sal de TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 459,27; hallado: 459,1. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-75% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 4 min) = 2,38 min.

## ES 2 359 673 T3

### Ejemplo 15

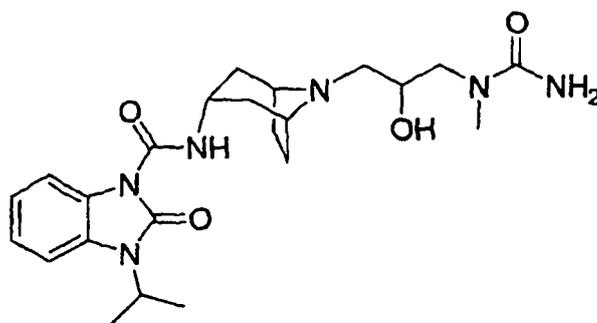
Síntesis de la ((1*S*,3*R*,5*R*)-8-{2-hidroxi-3-[metil-(1-metil-1*H*-imidazol-4-sulfonil)amino]propil}-8-azabicyclo-[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico



Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 12, pasos (a)-(f) y Ejemplo 13, excepto en el Ejemplo 12, fase (b) sustituyendo (*S*)-epiclorohidrina con epiclorohidrina racémica, se preparó el compuesto del título (0,060 g) como una sal de TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S: 560,27; hallado: 560,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 2-65% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 4 min) = 2,76 min.

### Ejemplo 16

Síntesis de la ((1*S*,3*R*,5*R*)-8-[2-hidroxi-3-(1-metilureido)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico

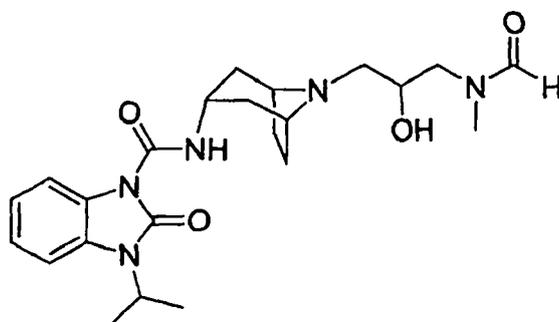


Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 12, pasos (a)-(f) y Ejemplo 14, excepto en el Ejemplo 12, fase (b) sustituyendo (*S*)-epiclorohidrina con epiclorohidrina racémica, se preparó el compuesto del título (0,027 g) como una sal de TFA. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 459,27; hallado: 459,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-75% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 4 min) = 2,38 min.

## ES 2 359 673 T3

### Ejemplo 17

Síntesis de la  $\{(1S,3R,5R)\text{-}8\text{-}[3\text{-}(\text{formilmetilamino})\text{-}2\text{-hidroxipropil}]\text{-}8\text{-azabicyclo-[3.2.1]oct-3-il)}\text{-}amida$  del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico



Utilizando los procesos descritos en el Ejemplo 12, pasos (a)-(f), salvo la sustitución de (*S*)-epiclorhidrina con una mezcla racémica de epiclorhidrina en el Ejemplo 12, paso (a), se preparó  $\{(1S,3R,5R)\text{-}8\text{-}(-2\text{-hidroxi-3-metilaminopropil})\text{-}8\text{-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)}\text{-}amida$  del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico como un sal de TFA.

Entonces se suspendió la  $\{(1S,3R,5R)\text{-}8\text{-}(-2\text{-hidroxi-3-metilaminopropil})\text{-}8\text{-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)}\text{-}amida$  del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico (0,050 g, 0,078 mmol) en dimetil-formamida (10 ml) y se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (0,43 ml, 24,6 mmol). Se añadió un exceso de formato de etilo (0,59 g, 7,8 mmol) y la mezcla se calentó a 80°C durante 16 h. Los volátiles fueron retirados y se realizó la purificación a través de HPLC preparatoria (fase inversa) en un gradiente de 15-45% durante 50 min, velocidad de flujo 20 ml/min para proporcionar el compuesto del título (0,027 g, 61% de rendimiento) como una sal de TFA (*m/z*):  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{23}H_{33}N_5O_4$ : 444,26; hallado: 444,2. Tiempo de retención (HPLC anal.: 10-75% MeCN/H<sub>2</sub>O durante 4 min) = 2,38 min.

### Ejemplo 18

Síntesis de sales de sales ácidas de  $\{(1S,3R,5R)\text{-}8\text{-}[(R)\text{-}3\text{-}(\text{acetilmetilamino})\text{-}2\text{-hidroxipropil}]\text{-}8\text{-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)}\text{-}amida$  del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico

#### Ejemplo 18-1

Síntesis de una sal de hidrocioruro

A una mezcla de  $\{(1S,3R,5R)\text{-}8\text{-}[(R)\text{-}3\text{-}(\text{acetilmetil-amino})\text{-}2\text{-hidroxipropil}]\text{-}8\text{-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il)}\text{-}amida$  del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico liofilizado, producto del Ejemplo 12 (20 mg) dispersos en 1 ml de agua desionizada, se le añadió 4 ml de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se calentó a 50°C y se añadió 180  $\mu$ l de metanol (hasta su completa disolución). La solución se filtró con un filtro de jeringa de 0,2 micras, se tapó en un vial limpio y se enfrió a 4°C. Se dejó equilibrar el vial a temperatura ambiente y destapado para evaporar lentamente el exceso de solvente durante la noche. A la mañana siguiente se recuperaron grupos de cristales grandes en forma de aguja y de estrellas reventadas.

El patrón de difracción de rayos x del polvo del producto, que se muestra en la Figura 1 se obtuvo con un difractómetro Rigaku utilizando radiación de Cu K $\alpha$  (30,0 kV, 15,0 mA). El análisis se realizó con el goniómetro funcionando en modo de escaneo continuo de 2° por minuto con un tamaño de paso de 0,03° en un rango de 2 a 40°. Las muestras se prepararon en muestras de cuarzo como una capa fina de material en polvo. El instrumento fue calibrado con un estándar de metal de silicio.

Como se muestra en la Figura 1, el espectro comprende picos prominentes en valores  $2\theta$  de 6,17; 15,68; 17,1; 18,68; 21,86; 25,01; 28,16; 31,48 y 37,97 grados.

## ES 2 359 673 T3

### Ejemplo 18-2

#### *Síntesis alternativa de una sal de hidrocioruro*

5 Se compuso polvo amorfo de {(1S,3R,5R)-8-[(R)3-(acetilmetil-amino)-2-hidroxiopropil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carboxílico, producto del ejemplo 12, (20 mg) dispersos en metanol (1 ml), como una solución de base libre (Solución A, 0,044M), y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 micras.

10 Se preparó una solución madre (Solución B, concentración de 0,046 M) a partir de ácido clorhídrico concentrado (40  $\mu$ l) y metanol (10 ml).

15 La detección de cristalización se realizó mezclando una gota de 20  $\mu$ l de la solución A con diferentes volúmenes de la solución B (0, 10, 20 y 40  $\mu$ l, correspondientes respectivamente a 0, 0,5, 1,0 y 2,0 equivalentes mol de ácido) y dejando que cada mezcla se evapore lentamente en un vial abierto durante la noche. Al día siguiente, los sólidos restantes en la pared o la base de cada vial se observaron mediante microscopia de luz polarizada (un microscopio estereoscópico Olympus SZX con filtros polarizadores cruzados).

20 Se observaron partículas birrefringentes, sobre todo cristales en forma de aguja o grupos policristalinos, en los sólidos que residían en las paredes o la base de los viales de vidrio de los viales de 0,5 y 2,0 equivalentes mol de ácido hidrociorhídrico.

25 El vial de prueba con 0 ml de solución B fue un experimento de control para determinar la cristalinidad de la base libre. No se observó ningún sólido de base libre cristalino o birrefringente en los sólidos que residían en las paredes o la base del vial de vidrio de base libre, incluso después de un período de varias semanas.

### Ejemplo 18-3 a 18-6

#### *Síntesis de otras sales ácidas*

30 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 18-2, se prepararon formas cristalinas de las sales de {(1S,3R,5R)-8-[(R)-3-(acetilmetilamino)-2-hidroxiopropil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carboxílico utilizando los equivalentes de ácido indicados:

35 Ejemplo 18-3 ácido bromhídrico (0,5, 1,0 y 1,5 M);

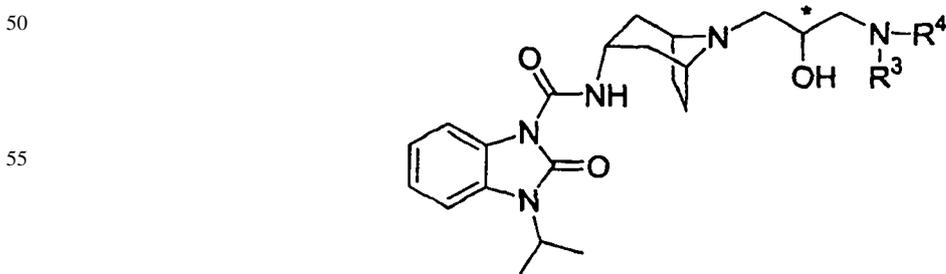
Ejemplo 18-4 ácido fosfórico (0,25, 0,75 y 1,5 M);

40 Ejemplo 18-5 ácido sulfúrico (0,25, 0,75 y 1,5 M), y

Ejemplo 18-6 ácido nítrico (0,5, 1,0 y 2,0 M).

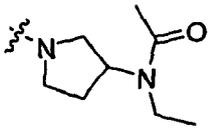
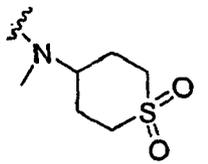
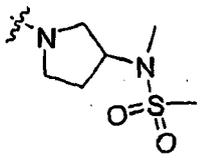
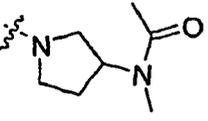
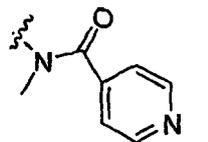
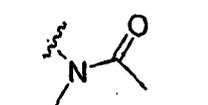
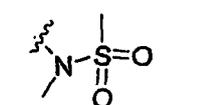
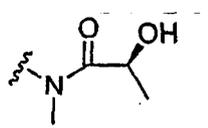
### Ejemplos 19-37

45 Utilizando procesos similares a los descritos anteriormente se prepararon los compuestos de los ejemplos 19-37.



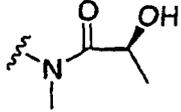
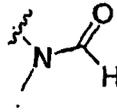
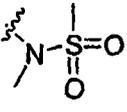
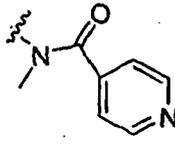
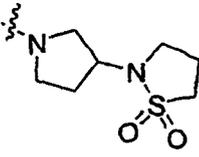
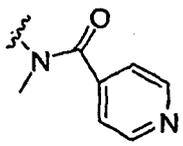
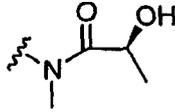
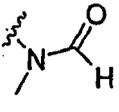
65

ES 2 359 673 T3

#	-NR <sup>3</sup> R <sup>4</sup>	*	Fórmula	Calc. [M+H] <sup>+</sup>	Obs. [M+H] <sup>+</sup>
19		-	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	541,34	541,4
20		-	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	548,28	548,2
21		-	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	563,29	563,2
22		-	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	527,33	527,2
23		-	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	521,28	521,2
24		-	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	458,27	458,2
25		-	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	494,24	494,5
26		-	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	488,28	488,2

ES 2 359 673 T3

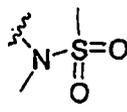
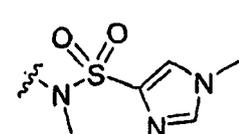
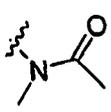
(Continuación)

	$-NR^3R^4$	*	Fórmula	Calc. $[M+H]^+$	Obs. $[M+H]^+$
5					
10		R	$C_{25}H_{37}N_5O_5$	488,28	488,2
15		R	$C_{23}H_{33}N_5O_4$	444,25	444,2
20		R	$C_{23}H_{35}N_5O_5S$	494,24	494,2
25					
30		R	$C_{28}H_{36}N_6O_4$	521,28	521,2
35		-	$C_{28}H_{42}N_6O_5S$	575,29	575,3
40					
45		S	$C_{28}H_{36}N_6O_4$	521,28	521,2
50		S	$C_{25}H_{37}N_5O_5$	488,28	488,2
55		S	$C_{23}H_{33}N_5O_4$	444,25	444,2
60					

65

# ES 2 359 673 T3

(Continuación)

5	-NR <sup>3</sup> R <sup>4</sup>	*	Fórmula	Calc. [M+H] <sup>+</sup>	Obs. [M+H] <sup>+</sup>
10		S	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	494,24	494,2
15		S	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> S	560,26	560,2
20		S	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	458,27	458,2
25					

## Ensayo 1

### Ensayo de unión de radioligandos en receptores humanos 5-HT<sub>4(c)</sub>

#### a. Preparación de la membrana de 5-HT<sub>4(c)</sub>

Se cultivaron células HEK-293 (riñón embrionario humano) establemente transfectadas con ADNc del receptor 5-HT<sub>4(c)</sub> humano (B<sub>max</sub> = ~ 6,0 pmol/mg de proteína, según lo determinado utilizando un ensayo de unión de radioligandos de membrana [<sup>3</sup>H]-GR113808) en frascos T-225 de medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM) conteniendo 4.500 mg/l de D-glucosa e hidrocloreuro de piridoxina (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad CA: Cat # 11965) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) (Gibco-Invitrogen Corp.: Cat # 10437), 2 mM de L-glutamina y (100 unidades) penicilina (100 mg) estreptomycin/ml (Gibco-Invitrogen Corp.: Cat # 15140) en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Las células fueron cultivadas bajo presión de selección continua por la adición de 800 mg/ml de geneticina (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat # 10131) al medio.

Las células fueron cultivadas hasta la confluencia alrededor de 60-80% (<35 pasajes de subcultivo). A las 20-22 horas antes de la cosecha, las células se lavaron dos veces y se alimentaron con DMEM sin suero. Todos los pasos para la preparación de membranas se realizaron en hielo. La monocapa celular se suprimió por agitación mecánica suave y trituración con una pipeta de 25 ml. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm (5 minutos).

Para la preparación de la membrana, se resuspendieron los sedimentos celulares en 50 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES) enfriado en hielo, pH 7,4 (tampón de preparación de membranas) (40 ml/célula total produjo de 30-40 frascos T225) y se homogeneizó utilizando un disruptor politrón (configurado a 19,2 x 10 s) en hielo. Los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 1200 g durante 5 min a 4°C. El sedimento se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 40.000 g (20 min). El sedimento se lavó una vez por resuspensión con el tampón de preparación de membranas y centrifugación a 40.000 g (20 min). El sedimento final se resuspendió en 50 mM de HEPES, pH 7,4 (tampón de ensayo) (equivalente a 1 frasco T225/1 ml). La concentración de proteínas de la suspensión de membranas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las membranas fueron congeladas en alícuotas a -80°C.

#### b. Ensayos de unión de radioligandos

Se realizaron ensayos de unión de radioligandos en placas de ensayo de polipropileno de 96 pocillos con una profundidad de 1,1 ml (Axygen) en un volumen total del ensayo de 400 μl conteniendo 2 μg de proteína de membrana en 50 mM de HEPES, pH 7,4, conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) al 0,025%. Los estudios de unión de saturación para la determinación de los valores K<sub>d</sub> del radioligando se realizaron utilizando [<sup>3</sup>H]-GR113808 (Amersham Inc., Bucks, Reino Unido: Cat # TRK944; actividad específica ~ 82 Ci/mmol) a las 8-12 concentraciones diferentes que van desde 0,001 nM-5,0 nM. Se realizaron ensayos de desplazamiento para la determinación de los valores pK<sub>i</sub> de los compuestos con [<sup>3</sup>H]-GR113808 a 0,15 nM y once concentraciones diferentes de compuestos que van desde 10 pM-100 μM.

## ES 2 359 673 T3

Los compuestos de ensayo fueron recibidos como 10 mM de soluciones madre en DMSO y diluidos a 400  $\mu$ M en 50 mM de HEPES, pH 7,4 a 25°C, conteniendo BSA al 0,1%, y se hicieron diluciones en serie (1:5) en el mismo tampón. La unión no específica se determinó en presencia de 1  $\mu$ M de GR113808 sin etiqueta. Los ensayos se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente y luego se determinaron las reacciones de unión por radiofiltración en placas de filtración de 96 pocillos GF/B de fibra de vidrio (Packard BioScience Co., Meriden, CT) previamente mojadas en polietilenimina al 0,3%. Las placas de filtración se lavaron tres veces con tampón de filtración (50 mM de HEPES enfriado en hielo, pH 7,4) para eliminar la radioactividad no unida. Las placas se secaron, se añadió 35  $\mu$ l de líquido de centelleo Microscint-20 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) a cada pocillo y se contaron las placas en un contador de centelleo líquido Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT).

Se analizaron los datos de unión por análisis de regresión no lineal con el paquete GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo de 3 parámetros para la competencia de un sitio. Se estableció el valor inferior (mínimo de la curva) en el valor de la unión no específica determinada en presencia de 1  $\mu$ M de GR113808. Se calcularon los valores  $K_i$  para los compuestos de ensayo en Prism de los valores  $IC_{50}$  que mejor se ajustaban, y el valor  $K_d$  del radioligando, usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng y Prusoff, Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 3099-108):  $K_i = IC_{50}/(1 + [L]/K_d)$  donde [L] = concentración de [<sup>3</sup>H]-GR113808. Los resultados se expresan como el logaritmo negativo decimal de los valores  $K_i$ ,  $PK_i$ .

Los compuestos de ensayo que tienen un valor más alto de  $PK_i$  en este ensayo tienen una mayor afinidad para el receptor 5-HT<sub>4</sub>. Los compuestos de la invención que se analizaron en este ensayo tenían un valor  $pK_i$  que variaba entre aproximadamente 6,7 hasta aproximadamente 8,3, variando por lo general desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,0.

### Ensayo 2

*Ensayo de unión de radioligandos en receptores humanos 5-HT<sub>3A</sub>: Determinación de la selectividad del subtipo*

#### *a. Preparación de membranas de 5-HT<sub>3A</sub>*

Se obtuvieron células HEK-293 (riñón embrionario humano) establemente transfectadas con ADNc del receptor 5-HT<sub>3A</sub> humano del Dr. Michael Bruess (Universidad de Bonn, República Democrática Alemana) ( $B_{max} = \sim 9,0$  pmol/mg de proteína, determinado utilizando ensayo de unión de radioligandos a la membrana con [<sup>3</sup>H]-GR65630). Se cultivaron las células en frascos T-225 o fábricas de células en medio Eagles modificado de Dulbecco al 50% (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA: Cat # 11965) y medio de Ham F12 al 50% (Gibco-Invitrogen Corp.: Cat # 11765) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (FBS) (Hyclone, Logan, UT: Cat #SH30070.03), y (50 unidades) penicilina (50 mg) estreptomycin/ml (Gibco-Invitrogen Corp.: Cat # 15140) en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

Las células fueron cultivadas hasta la confluencia alrededor de 70-80% (<35 pasajes de subcultivo). Todos los pasos para la preparación de membranas se realizaron en hielo. Para cosechar las células, se aspiraron los medios y se enjuagaron las células con Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> solución salina tamponada con fosfato libre de Dulbecco (DPBS). La monocapa celular se eliminó por agitación mecánica suave. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm (5 minutos). Los pasos siguientes para la preparación de membranas siguió el protocolo descrito anteriormente para las membranas que expresan receptores 5-HT<sub>4(c)</sub>.

#### *b. Ensayos de unión de radioligandos*

Se realizaron ensayos de unión de radioligandos en placas de ensayo de polipropileno de 96 pocillos en un volumen total del ensayo de 200  $\mu$ l conteniendo 1,5-2  $\mu$ g de proteína de membrana en 50 mM de HEPES, pH 7,4, conteniendo tampón de ensayo BSA al 0,025%. Los estudios de unión por saturación para la determinación de los valores  $K_d$  del radioligando se realizaron utilizando [<sup>3</sup>H]-G65630 (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA: Cat# NET1011; actividad específica  $\sim 85$  Ci/mmol) a doce concentraciones diferentes que van desde 0,005 nM a 20 nM. Se realizaron ensayos de desplazamiento para la determinación de los valores  $pK_i$  de los compuestos con [<sup>3</sup>H]-GRGR65630 a 0,50 nM y once concentraciones diferentes de compuestos que van desde 10 pM a 100  $\mu$ M. Los compuestos fueron recibidos como 10 mM de soluciones madre en DMSO (ver sección 3.1), diluidos a 400  $\mu$ M en 50 mM de HEPES, pH 7,4 a 25°C, conteniendo BSA al 0,1% y entonces se hicieron diluciones en serie (01:05) en el mismo tampón. La unión no específica se determinó en presencia de 10  $\mu$ M de MDL72222 sin etiqueta. Los ensayos se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente y luego se determinaron las reacciones de unión por radiofiltración en placas de filtración de 96 pocillos GF/B de fibra de vidrio (Packard BioScience Co., Meriden, CT) previamente mojadas en polietilenimina al 0,3%. Las placas de filtración se lavaron tres veces con tampón de filtración (50 mM de HEPES enfriado en hielo, pH 7,4) para eliminar la radioactividad no unida. Las placas se secaron, se añadió 35  $\mu$ l de líquido de centelleo Microscint-20 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) a cada pocillo y se contaron las placas en un contador de centelleo líquido Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT).

Los datos de unión se analizaron utilizando el procedimiento de regresión no lineal descrito anteriormente para determinar los valores  $K_i$ . Se estableció el valor inferior (mínimo de la curva) en el valor de la unión no específica determinada en presencia de 10  $\mu$ M de MDL72222. La cantidad [L] en la ecuación de Cheng-Prusoff se definió como la concentración de [<sup>3</sup>H]-GR65630.

## ES 2 359 673 T3

La selectividad para el subtipo de receptor 5-HT<sub>4</sub> en relación con el subtipo de receptor 5-HT<sub>3</sub> se calculó como la relación  $K_i(5\text{-HT}_{3A})/K_i(5\text{-HT}_{4(c)})$ . Los compuestos de la invención que se analizaron en este ensayo tuvieron una selectividad del subtipo de receptor 5-HT<sub>4</sub>/5-HT<sub>3</sub> que variaba entre aproximadamente 20 hasta aproximadamente 5600, variando por lo general desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1700.

5

### Ensayo 3

10 *Ensayo en placas Flashplate de acumulación con AMPc (adenosín monofosfato cíclico) de células enteras con células HEK-293 que expresan receptores 5-HT<sub>4(c)</sub> humanos*

En este ensayo se determinó la potencia funcional de un compuesto de prueba midiendo la cantidad de AMP cíclico producido cuando las células HEK-293 que expresan receptores 5-HT<sub>4</sub> se pusieron en contacto con diferentes concentraciones del compuesto de prueba.

15

#### a. Cultivo celular

Se prepararon células HEK-293 (riñón embrionario humano) establemente transfectadas con ADNc de receptor 5-HT<sub>4(c)</sub> humano clonado que expresaban el receptor con dos densidades diferentes: (1) con una densidad de alrededor de 0,5-0,6 pmol/mg de proteína, determinado utilizando un ensayo de unión de radioligandos de membrana [<sup>3</sup>H]-GR113808, y (2) con una densidad de aproximadamente 6,0 pmol/mg de proteína. Las células fueron cultivadas en frascos T-225 en medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM) conteniendo 4.500 mg/L de D-glucosa (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat # 11965) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) (Gibco-Invitrogen Corp.: Cat #10437), y (100 unidades) penicilina (100 mg) estreptomycin/ml (Gibco-Invitrogen Corp.: Cat # 15140) en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Las células fueron cultivadas bajo presión de selección continua por la adición de geneticina (800 mg/ml: GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #10131) al medio.

25

#### b. Preparación de células

Las células fueron cultivadas hasta la confluencia alrededor de 60-80%. De veinte a veintidós horas antes del ensayo, las células se lavaron dos veces, y se alimentaron con DMEM libre de suero conteniendo 4.500 mg/l de D-glucosa (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #11965). Para cosechar las células se aspiraron los medios y se añadió 10 ml de Versene (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat # 15040) a cada frasco T-225. Las células fueron incubadas durante 5 min a temperatura ambiente y luego desprendidas del frasco por agitación mecánica. La suspensión celular se transfirió a un tubo de centrifuga conteniendo un volumen igual de dPBS previamente calentado (37°C) y se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en tampón de estimulación previamente calentado (37°C) (equivalente de 10 ml por 2-3 frascos T-225). Se anotó este tiempo y se marcó como tiempo cero. Las células se contaron con un contador Coulter (recuento de más de 8 µm, el rendimiento del frasco fue de 1-2 x 10<sup>7</sup> células/frasco). Las células fueron resuspendidas a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup> células/ml en tampón de estimulación previamente calentado (37°C) (conforme a lo dispuesto en el kit flashplate) y previamente incubadas a 37°C durante 10 min.

30

35

40

Se realizaron los ensayos con AMPc en un formato de radioinmunoensayo utilizando el sistema de ensayo de activación de la adenilil ciclasa en placas Flashplate con <sup>125</sup>I-AMPc (SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), según las instrucciones del fabricante.

45

Las células se cultivaron y prepararon como se ha descrito anteriormente. Las concentraciones finales de células en el ensayo fueron de 25 x 10<sup>3</sup> células/pocillo y el volumen de ensayo final de 100 µl. Los compuestos de ensayo fueron recibidos como 10 mM de soluciones madre en DMSO, diluidos a 400 µM en 50 mM de HEPES, pH 7,4 a 25°C, conteniendo BSA al 0,1% y entonces se hicieron diluciones consecutivas (1:5) en el mismo tampón. Se realizaron los ensayos de acumulación con AMP cíclico con 11 concentraciones diferentes de compuesto que van desde 10 pM hasta 100 µM (concentración final del ensayo). Se incluyó una curva de concentración-respuesta de 5-HT (10 pM a 100 µM) en cada placa. Las células se incubaron con agitación a 37°C durante 15 min y la reacción se extinguió por la adición de 100 µl de tampón de detección enfriado en hielo (según lo dispuesto en el kit flashplate) a cada pocillo. Las placas se sellaron y se incubaron a 4°C durante la noche. La radiactividad de unión fue cuantificada por espectroscopia de proximidad con centelleo utilizando el Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT).

50

55

La cantidad de AMPc producido por ml de la reacción se extrapoló a partir de la curva estándar de AMPc, según las instrucciones proporcionadas en el manual de usuario del fabricante. Los datos fueron analizados mediante análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism utilizando el modelo sigmoide de 3 parámetros de dosis-respuesta (pendiente limitada a la unidad). Los datos de potencia se indican como valores pEC<sub>50</sub>, el logaritmo decimal negativo del valor EC<sub>50</sub>, donde EC<sub>50</sub> es la concentración efectiva para una respuesta máxima del 50%.

60

Los compuestos de prueba que exhiben un valor pEC<sub>50</sub> más alto en este ensayo tienen una mayor potencia para agonizar el receptor 5-HT<sub>4</sub>. Los compuestos de la invención que se analizaron en este ensayo, por ejemplo en la línea celular (1) que tenían una densidad de aproximadamente 0,5-0,6 pmol/mg de proteína, tuvieron un valor pEC<sub>50</sub> que variaba desde aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 9,0, variando por lo general desde aproximadamente 7,7 hasta aproximadamente 8,5.

65

## ES 2 359 673 T3

### Ensayo 4

*Ensayo de fijación de voltaje in vitro de la inhibición de la corriente de iones de potasio en células enteras que expresan el canal de potasio cardíaco hERG*

5 Se obtuvieron células CHO-K1 transfectadas establemente con ADNc de hERG de Gail Robertson de la Universidad de Wisconsin. Se mantuvieron las células en conservación criogénica hasta que se necesitaron. Las células se expandieron y pasaron en medio Eagles modificado de Dulbecco/F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y 200  $\mu\text{g/ml}$  de geneticina. Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-D-lisina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), en platos de 35  $\text{mm}^2$  (conteniendo 2 ml de medio) con una densidad que permitió seleccionar las células aisladas para los estudios de fijación de voltaje de células enteras: Los platos se mantuvieron en un ambiente humedecido, CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

15 Se preparó solución extracelular por lo menos cada 7 días y se conservó a 4°C cuando no se usaba. La solución extracelular contenía (mM): NaCl (137), KCl (4), CaCl<sub>2</sub> (1,8), MgCl<sub>2</sub> (1), glucosa (10), ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES) (10), pH 7,4 con NaOH. La solución extracelular, en ausencia o presencia de un compuesto de prueba, estaba contenida en depósitos, de los que fluía en la cámara de registro a aproximadamente 0,5 ml/min. La solución intracelular se preparó, se dividió en partes alícuotas y se conservó a -20°C hasta el día de uso. La solución intracelular contenía (mM): KCl (130), MgCl<sub>2</sub> (1), sal de ácido de etilenglicol-bis(éter beta-aminoetilico)N,N,N';N'-tetra-acético (EGTA) (5), MgATP (5), ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES) (10), pH 7,2 con KOH. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-22°C).

25 Los cubreobjetos sobre los que se sembraron las semillas fueron transferidos a una cámara de registro y perfundidos continuamente. Se formaron sellos de gigaohmios entre la célula y el electrodo de conexión. Una vez conseguida una conexión estable, comenzó el registro en el modo de fijación de voltaje, con el potencial de mantenimiento inicial a -80 mV. Después de conseguir una corriente estable de células enteras, se expusieron las células al compuesto de ensayo. El protocolo de voltaje estándar fue: pasar del potencial de mantenimiento de -80 mV a +20 mV durante 4,8 seg, repolarizar a -50 mV durante 5 segundos y luego volver al potencial de mantenimiento original (-80 mV). Este protocolo de voltaje se ejecutó una vez cada 15 seg (0,067 Hz). Las amplitudes pico de corriente durante la fase de repolarización se determinaron utilizando el software pCLAMP. Los compuestos de ensayo a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  fueron perfundidos sobre las células durante 5 minutos, seguido de un período de lavado de 5 minutos en ausencia del compuesto. Por último se añadió un control positivo (cisaprida, 20 nM) a la perfusión para probar la función de la célula. El paso de -80 mV a +20 mV activa el canal hERG, dando lugar a una corriente hacia el exterior. El paso de vuelta a -50 mV produce una corriente de cola hacia el exterior, pues el canal se recupera de la inactivación y se desactiva.

35 Las amplitudes pico de corriente durante la fase de repolarización se determinaron utilizando el software pCLAMP. Los artículos de control y de ensayo fueron exportados a Origin<sup>®</sup> (Origin Corp., Northampton MA), donde las amplitudes de corriente individuales se normalizaron a la amplitud de corriente inicial en ausencia del compuesto. Se calcularon las medias de las corrientes normalizadas y los errores estándares para cada condición y se representaron en un gráfico en función del transcurso de tiempo del experimento.

45 Se realizaron comparaciones entre las inhibiciones de corriente K<sup>+</sup> observadas después de la exposición de cinco minutos para controlar bien el artículo de ensayo o bien un vehículo de control (generalmente 0,3% DMSO). Las comparaciones estadísticas entre los grupos experimentales se realizaron utilizando una prueba t independiente con dos poblaciones (Microcal Origin v. 6.0). Las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0,05$ .

50 Cuanto menor es el porcentaje de inhibición de la corriente de iones de potasio en este ensayo, menor será el potencial de los compuestos de ensayo de cambiar el patrón de repolarización cardíaca en su uso como agentes terapéuticos. Los compuestos de la invención que se analizaron en este ensayo a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  normalmente exhibieron una inhibición de la corriente de iones de potasio de menos de aproximadamente 20%, más generalmente, menos de aproximadamente 15%.

### 55 Ensayo 5

*Modelo in vitro de biodisponibilidad oral: Ensayo de permeabilidad Caco-2*

60 El ensayo de permeabilidad Caco-2 se llevó a cabo para formar un modelo de la capacidad de los compuestos de ensayo para pasar a través del intestino y entrar en la corriente sanguínea después de la administración oral. Se determinó la velocidad a la que los compuestos de prueba en solución penetraban en una monocapa celular diseñada para imitar la unión estrecha de las monocapas del intestino delgado humano.

65 Se obtuvieron células de Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano) de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Para el estudio de permeabilidad, las células se sembraron con una densidad de 63.000 células/cm<sup>2</sup> en filtros de policarbonato Transwell previamente humedecidos (Costar, Cambridge, MA). Se formó una monocapa celular después de 21 días de cultivo. Después del cultivo celular en la placa Transwell, se separó la membrana que contenía la monocapa celular de la placa Transwell y se introdujo en la cámara de difusión (Costar, Cambridge,

## ES 2 359 673 T3

MA). La cámara de difusión se introdujo en el bloque de calentamiento al que se le suministró agua con circulación externa regulada termostáticamente a 37°C para el control de la temperatura. El colector de aire emitió 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a cada mitad de una cámara de difusión y creó un patrón de flujo laminar a través de la monocapa celular que fue eficaz en la reducción de la capa límite no agitada.

5 El estudio de permeabilidad se realizó con concentraciones del compuesto de ensayo de 100 μM y con <sup>14</sup>C-manitol para controlar la integridad de la monocapa. Todos los experimentos se realizaron a 37°C durante 60 min. Se tomaron muestras a los 0, 30 y 60 minutos de ambos lados, del donante y del receptor, de la cámara. Las muestras se analizaron por HPLC o recuento de centelleo líquido para el compuesto de ensayo y las concentraciones de manitol. Se calculó el coeficiente de permeabilidad (K<sub>p</sub>) en cm/seg.

10 En este ensayo, un valor K<sub>p</sub> mayor de aproximadamente 10 x 10<sup>-6</sup> cm/seg se considera indicativo de biodisponibilidad favorable. Los compuestos de la invención que se analizaron en este ensayo exhibieron por lo general valores K<sub>p</sub> de entre cerca de 5 x 10<sup>-6</sup> cm/seg y 55 x 10<sup>-6</sup> cm/seg, más generalmente entre cerca de 20 x 10<sup>-6</sup> cm/seg y 40 x 10<sup>-6</sup> cm/seg.

### Ensayo 6

#### 20 *Estudio farmacocinético en rata*

Se prepararon formulaciones en solución acuosa de los compuestos de prueba de ácido láctico al 0,1% a un pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6. Se trataron unas ratas Sprague-Dawley (variedad CD, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con los compuestos de prueba con administración intravenosa (IV) con una dosis de 2,5 mg/kg o por sonda oral (PO) con una dosis de 5 mg/kg. El volumen de dosificación fue de 1 ml/kg para la IV y 2 ml/kg para la administración por vía oral. Se tomaron muestras consecutivas de sangre de los animales antes de la dosis, y a los 2 (IV solamente), 5, 15 y 30 minutos, y a las 1, 2, 4, 8 y 24 horas posteriores a la dosis. Se determinaron las concentraciones de los compuestos de prueba en el plasma sanguíneo mediante análisis de espectrometría y cromatografía líquida de masas (LC-MS/MS) (MDS SCIEX, API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA) con un límite inferior de cuantificación de 1 ng/ml.

30 Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos estándares mediante un análisis no compartimental (Modelo 201 para IV y Modelo 200 para PO) con WinNonlin (Versión 4.0.1, Pharsight, Mountain View, CA). El máximo en la curva de concentración de los compuestos de ensayo en el plasma sanguíneo en función del tiempo se denomina C. El área bajo la curva de concentración en función del máximo de la curva de tiempo desde el momento de la dosificación hasta la última concentración mensurable (AUC(0-t)) se calculó por la regla trapezoidal lineal. La biodisponibilidad oral (F(%)), es decir, la relación de dosis normalizada de AUC(0-t) para la administración PO a AUC(0-t) para la administración IV, se puede calcular como:

$$40 \quad F(\%) = \frac{AUC_{PO}}{AUC_{IV}} \times \frac{Dosis_{IV}}{Dosis_{PO}} \times 100\%$$

Es de esperar que los compuestos de ensayo que exhibieron los valores mayores de los parámetros C<sub>max</sub>, AUC(0-t) y F(%) en este ensayo tengan una mayor biodisponibilidad cuando se administran por vía oral. Los compuestos de la invención que se probaron en este ensayo tuvieron valores C<sub>max</sub> que van por lo general desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,47 μg/ml y valores AUC(0-t) que van por lo general desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1,2 μg por h/ml. A modo de ejemplo, el compuesto del Ejemplo 2 tenía un valor C<sub>max</sub> de 0,11 μg/ml y un valor AUC(0-t) de 0,54 μg por h/ml.

#### 50 **Referencias citadas en la descripción**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante sirve sólo como ayuda al lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha prestado mucha atención en la compilación de las mismas, no se puede evitar incurrir en errores u omisiones declinando la OEP toda responsabilidad a este respecto.*

#### **Documentos de patente citados en la descripción**

- EP 908459 A [0004]

#### **Literatura no patente citada en la descripción**

- Langlois; Fischmeister. *J. Med. Chem.*, 2003, vol. 46, 319-344 [0003]
- T.W. Greene; G.M. Wuts. *Protecting Groups in Organic Synthesis*. Wiley, 1999 [0059]
- T. W. Greene; G. M. Wuts. *Protecting Groups in Organic Synthesis*. Wiley, 1999 [0062]

## ES 2 359 673 T3

• Remington: The Science and Practice of Pharmacy. *Lippincott Williams & White*, 2000 [0110]

• H.C. **Ansel** *et al.* Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. *Lippincott Williams & White*, 1999 [0110]

5

• **Cavero** *et al.* *Opinión on Pharmacotherapy*, 2000, vol. 1, 947-73 [0164]

• **Fermini** *et al.* *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, vol. 2, 439-447 [0164]

10

• **Dehmlow**, E. V.; **Westerheide**, R. *Synthesis*, 1992, vol. 10, 947-9 [0176]

• **Cheng**; **Prusoff**. *Biochemical Pharmacology*, 1973, vol. 22, 3099-108 [0250]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

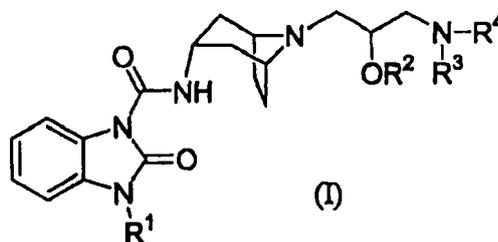
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula (I):

5

10

15



donde:

20

R<sup>1</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;

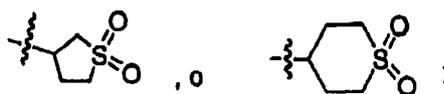
R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;

R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>;

25

R<sup>4</sup> es -C(O)R<sup>5</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>6</sup>,

30



o R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que se unen forman

35



40

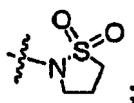
R<sup>5</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub>, o piridinilo, donde el alquilo C<sub>1-3</sub> es opcionalmente sustituido con hidroxilo;

R<sup>6</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub>, o imidazolilo, donde el imidazolilo es opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-3</sub>;

45

R<sup>7</sup> es -NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>alquilo C<sub>1-3</sub>, -NR<sup>10</sup>C(O)R<sup>11</sup>, o

50



R<sup>8</sup> es -S(O)<sub>2</sub>alquilo C<sub>1-3</sub> o C(O)R<sup>12</sup>;

55

R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> son cada uno independientemente alquilo C<sub>1-3</sub> y

R<sup>12</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub> o tetrahydrofurano, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato o estereoisómero del mismo.

60

2. Compuesto de la reivindicación 1, donde R<sup>1</sup> es etilo o isopropilo y R<sup>2</sup> es hidrógeno.

3. Compuesto de la reivindicación 1 o 2, donde R<sup>3</sup> es metilo.

65

4. Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R<sup>4</sup> es -C(O)R<sup>5</sup>.

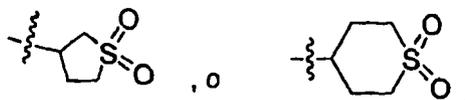
5. Compuesto de la reivindicación 4, donde R<sup>5</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>.

## ES 2 359 673 T3

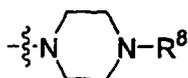
6. Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R<sup>4</sup> es -S(O)2R<sup>6</sup>.

7. Compuesto de la reivindicación 6, donde R<sup>6</sup> es metilo o 1-metilimidazol-4-ilo.

8. Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R<sup>4</sup> es



9. Compuesto de la reivindicación 1 o 2, donde R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos forman



10. Compuesto de la reivindicación 9, donde R<sup>8</sup> es -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>3</sub>, o -C(O)-tetrahydrofuran-2-ilo.

11. Compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de:

{(1S,3R,5R)-8-[2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-{2-hidroxi-3-[4-(tetrahydrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil}-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il) amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxi-3-propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-{3-[(1,1-dioxotetrahydro-1.6-tiofen-3-il)metilamino]-2-hidroxi-3-propil}-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il) amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(S)-2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(4-metanosulfonilpiperazin-1-il)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(S)-3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxi-3-propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-3-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-hidroxi-3-propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-((S)-2-hidroxi-3-[4((R)-tetrahydrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il) amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-((S)-2-hidroxi-3-[4((S)-tetrahydrofuran-2-carbonil)piperazin-1-il]propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il) amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-3-(acetilmetilamino)-2-hidroxi-3-propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-((R)-2-hidroxi-3-[metil-1H-imidazol-4-sulfonil]amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il) amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(1-metilureido)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

((1S,3R,5R)-8-{2-hidroxi-3-[metil-1H-imidazol-4-sulfonil]amino}propil)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il) amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico;

{(1S,3R,5R)-8-[2-hidroxi-3-(1-metilureido)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-carboxílico; y

## ES 2 359 673 T3

{(1S,3R,5R)-8-[3-(formilmetilamino)-2-hidroxiopropil]-8-azabicyclo-[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carboxílico.

5 12. Compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto es {(1S,3R,5R)-8-[(R)-3-(acetilmetilamino)-2-hidroxiopropil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il} amida del ácido 3-isopropil-2-oxo-2,3-dihidrobencimidazol-1-carboxílico.

13. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

10

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en terapia.

15. Compuesto según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de una condición médica en un mamífero asociada con la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>.

15

16. Compuesto según la reivindicación 15, donde la condición es un trastorno de motilidad reducida del tracto gastrointestinal.

17. Compuesto según la reivindicación 15, donde la condición médica se selecciona entre el síndrome del intestino irritable, estreñimiento crónico, dispepsia funcional, retraso en el vaciamiento gástrico, enfermedad por reflujo gastroesofágico, gastroparesia, íleo postoperatorio, pseudoobstrucción intestinal y tránsito retardado inducido por fármacos.

20

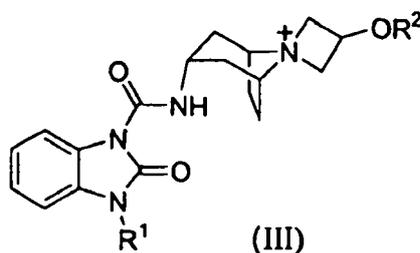
18. Uso de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición médica en un mamífero asociada con la actividad del receptor 5-HT<sub>4</sub>.

25

19. Proceso para preparar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el proceso comprendiendo:

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (III):

30

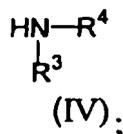


35

40

45 con un compuesto de la fórmula (IV):

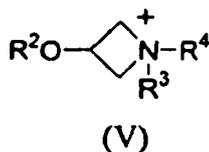
45



50

(b) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (V):

55

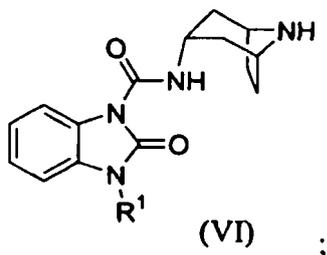


60

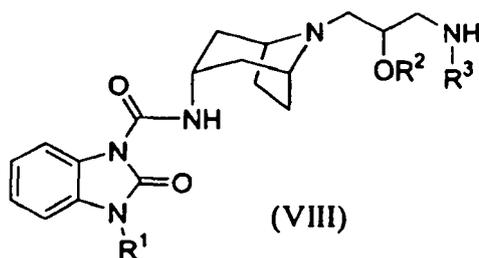
65

ES 2 359 673 T3

con un compuesto de la fórmula (VI):



15 (c) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VIII):



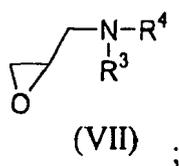
con un compuesto de la fórmula (IX):



donde  $L^1$  es un grupo saliente y  $R^4$  es como se define en esta memoria;

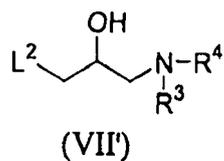
35 (d) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VIII) con  $O=C=NP^1$ , donde  $P^1$  es un grupo protector de amino, y luego quitar los grupos protectores de amino  $Ps^1$ ;

40 (e) cuando  $R^2$  es hidrógeno, hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI) con un compuesto de la fórmula (VII):



o

50 (f) cuando  $R^2$  es hidrógeno, hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI) con un compuesto de fórmula (VII')

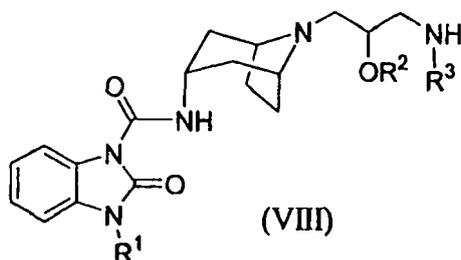


donde  $L^2$  es un grupo saliente.

20. Compuesto de la fórmula (VIII):

5

10



15

donde

R<sup>1</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;

20

R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub> y

R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>

o una sal o un estereoisómero o un derivado protegido del mismo.

25

21. Método de estudio de un sistema biológico o muestra *in vitro* que comprende un receptor 5-HT<sub>4</sub>, el método comprendiendo:

30

(a) poner en contacto el sistema biológico o la muestra *in vitro* con un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y

(b) determinar el efecto causado por el compuesto en el sistema biológico o muestra.

35

40

45

50

55

60

65

