



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 264**

51 Int. Cl.:  
**C07D 403/12** (2006.01)  
**C07D 207/273** (2006.01)  
**A61K 31/4025** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07813363 .4**  
96 Fecha de presentación : **26.07.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2046779**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

54 Título: **Moduladores de la actividad del receptor de quimiocina, formas cristalinas y procedimientos.**

30 Prioridad: **28.07.2006 US 834235 P**  
**21.03.2007 US 896026 P**  
**25.07.2007 US 782742**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.09.2011**

73 Titular/es: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**  
**Route 206 and Province Line Road**  
**P.O. Box 4000**  
**Princeton, New Jersey 08543-4000, US**

72 Inventor/es: **Carter, Percy, H.;**  
**Duncia, John, V.;**  
**Mudryk, Boguslaw, M.;**  
**Randazzo, Michael, E.;**  
**Xiao, Zili;**  
**Yang, Michael, G. y**  
**Zhao, Rulin**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 264 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

Moduladores de la actividad del receptor de quimiocina, formas cristalinas y procedimientos.

**Campo de la invención**

5 La presente invención proporciona N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pimlidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma, que tiene una combinación inesperada de características farmacológicas deseables. También se proporcionan las formas cristalinas de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y las mismas para su uso como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o enfermedades cardiovasculares también son un objetivo de la presente invención.

**Antecedentes de la invención**

15 Las quimiocinas son citoquinas quimiotácticas, de peso molecular 6–15 kDa, que se liberan mediante una gran variedad de células para atraer y activar, entre otros tipos celulares, macrófagos, linfocitos T y B, eosinófilos, basófilos y neutrófilos (revisado en: Charo y Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610–621; Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436–445 y Rollins, *Blood* 1997, 90, 909 – 928). Existen dos clases principales de quimiocinas. CXC y CC, dependiendo de si las dos primeras cisteínas en la secuencia de aminoácidos están separadas mediante un solo aminoácido (CXC) o son adyacentes (CC). Las quimiocinas CXC, tales como interleucina-8 (IL-8), la proteína activadora de neutrófilos-2 (NAP-2) y la proteína de actividad estimuladora del crecimiento de melanomas (MGSA) son quimiotácticas primariamente para neutrófilos y linfocitos T, mientras que las quimiocinas CC, tales como RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y MCP-5) y las eotaxinas (-1 y -2) son quimiotácticas para, entre otros tipos celulares, macrófagos, linfocitos T, eosinófilos, células dendríticas, y basófilos. También existen las quimiocinas linfotactina-1, linfotactina-2 (ambas quimiocinas C) y fractalquina (una quimiocina CX<sub>3</sub>C) que no se clasifican en ninguna de las subfamilias de quimiocinas principales.

25 Las quimiocinas se unen a receptores específicos de la superficie celular que pertenecen a la familia de proteínas de siete dominios transmembrana acopladas a proteínas G (revisado en: Horuk, *Trends Pharm. Sci.* 1994, 15, 159 – 165) que se denominan “receptores de quimiocinas”. En la unión a sus ligandos afines, los receptores de quimiocina transducen una señal intracelular aunque las proteínas G triméricas asociadas, que producen, entre otras respuestas, un rápido aumento en la concentración de calcio intracelular, cambios en la forma celular, expresión aumentada de moléculas de adhesión celular, desgranulación y promoción de la migración celular. Existen al menos diez receptores de quimiocinas humanos que se unen o responden a las quimiocinas CC con los siguientes patrones de características (revisado en Zlotnik y Oshie *Immunity* 2000, 12, 121): CCR-1 (o “CKR-1” o “CC-CKR-1”) [MIP-1 $\alpha$ , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch, y col., *Cell* 1993, 72, 415 – 425, y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436 – 445); CCR-2A y CCR-2B (o “CKR-2A7”/“CKR-2B” o “CC-CKR-2A7” “CC-CKR-2B”) [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 2752 – 2756, y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436 – 445); CCR-3 (o “CKR-3” o “CC-CKR-3”) [eotaxina-1, eotaxina-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere, y col., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 16491–16494, y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436 – 445); CCR-4 (o “CKR-4” o “CC-CKR-4”) [TARC, MDC] (Power, y col., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 19495 – 19500, y Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436 – 445); CCR-5 (o “CKR-5” o “CC-CKR-5”) [MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\beta$ ] (Sanson, y col., *Biochemistry* 1996, 35, 3362 – 3367); CCR-6 (o “CKR-6” o “CC-CKR-6”) [LARC] (Baba, y col., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 14893 – 14898); CCR-7 (o “CKR-7” o “CC-CKR-7”) [ELC] (Yoshie y col., *J. Leukoc. Biol.* 1997, 62, 634 – 644); CCR-8 (o “CKR-8” o “CC-CKR-8”) [1 – 309] (Napolitano y col., *J. Immunol.* 1996, 157, 2759 – 2763); CCR-10 (o “CKR-10” o “CC-CKR-10”) [MCP-1, MCP-3] (Bonini, y col., *DNA y Cell Biol.* 1997, 16, 1249 – 1256); y CCR-11 [MCP-1, MCP-2, y MCP-4] (Schweickert, y col., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 90550).

50 Además de los receptores de quimiocinas de mamíferos, los citomegalovirus de mamíferos, los herpesvirus y los poxvirus han mostrado que expresan, en células infectadas, proteínas con las propiedades de unión de los receptores de quimiocinas (revisado en: Wells y Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.* 1997, 8, 741 – 748). Las quimiocinas CC humanas, tales como RANTES y MCP-3, pueden producir movilización rápida del calcio mediante estos receptores codificados viralmente. La expresión de receptores puede ser permisiva para la infección teniendo en cuenta la subversión de la supervivencia y la respuesta normal del sistema inmune frente a la infección. Adicionalmente, los receptores de quimiocinas humanos, tales como CXCR4, CCR2, CCR3, CCR5 y CCR8, pueden actuar como correceptores para la infección de células de mamíferos mediante microbios como con, por ejemplo, los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

55 Las quimiocinas y sus receptores afines se han implicado como mediadores importantes de los trastornos y enfermedades inflamatorios, infecciosos e inmunorreguladores, incluyendo el asma y las enfermedades alérgicas;

así como patologías autoinmunes tales como artritis reumatoide y esclerosis múltiple y enfermedades metabólicas, tales como aterosclerosis y diabetes (revisado en: Charo y Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610 – 621; Z. Gao y W. A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3733; P. H. Carter, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6, 510; Trivedi, y col., *Ann. Reports Med. Chem.* 2000, 35, 191; Saunders y Tarby, *Drug Disc. Today* 1999, 4, 80; Prcmack y Schall, *Nature Medicine* 1996, 2, 1174). Por ejemplo, la quimiocina quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1) y su Receptor 2 de Quimiocina CC (CCR-2) desempeñan una función esencial en la atracción de leucocitos a sitios de inflamación y en la posterior activación de estas células. Cuando la quimiocina MCP-1 se une a CCR-2, esto induce un rápido aumento en la concentración de calcio intracelular, expresión aumentada de moléculas de adhesión celular y la promoción de la migración de leucocitos. La demostración de la importancia de la interacción MCP-1/CCR-2 se ha proporcionado mediante experimentos con ratones modificados genéticamente. Los ratones MCP-1 -/- fueron incapaces de reclutar monocitos en sitios de inflamación después de varios tipos diferentes de desafíos inmunes (Bao Lu, y col., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601). De la misma manera, los ratones CCR-2 -/ no fueron capaces de reclutar monocitos o producir interferón- cuando se les expuso a varios agentes exógenos; además, los leucocitos de ratones nulos para CCR-2 no migraron en respuesta a MCP-1 (Landin Boring, y col., *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2552), por tanto demostraron la especificidad de la interacción MCP-1/CCR-2. Otros dos grupos tuvieron resultados equivalentes indicados de manera independiente con diferentes cepas de ratones CCR-2 -/- (William A. Kuziel, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12053, y Takao Kurihara, y col., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1757). La viabilidad y generalmente la salud normal de animales MCP-1 -/- y CCR-2 -/- es digna de mención, ya que la alteración de la interacción MCP-1/CCR2 no induce la crisis fisiológica. En conjunto, estos datos conducen a la conclusión de que las moléculas que bloquean las acciones de MCP-1/CCR2 serían útiles en el tratamiento de varios trastornos inflamatorios y autoinmunes (revisado en: M. Fera y F. Diaz-Gonzalez, *Exp. Opin. Ther. Patents* 2006, 16, 49; y J. Dawson. W. Miltz, y C. Wiessner, *C. Exp. Opin. Ther. Targets* 2003, 7, 35). Esta hipótesis no se ha validado en varios modelos de enfermedad animales diferentes, como se divulga posteriormente.

Se sabe que MCP-1 está sobrerregulado en pacientes con artritis reumatoide (Alisa Koch, y col., *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 772 – 779). Además, varios estudios preclínicos han demostrado en valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la artritis reumatoide. Una vacuna de ADN que codifica MCP-1 se mostró recientemente que mejoraba la artritis crónica inducida por poliadyuvantes en ratas (Sawsan Youssef, y col., *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 361). De la misma manera, los síntomas de la enfermedad se podrían controlar mediante la administración directa de anticuerpos para MCP-1 para ratas con artritis inducida por colágeno (Hiroomi Ogata, y col., *J. Pathol.* 1997, 182, 106) o artritis inducida por la pared celular de estreptococos (Ralph C. Schimmer, y col., *J. Immunol.* 1998, 160, 1466). Quizás lo más significativo, un péptido antagonista de MCP-1, MCP-1 (9-76), mostró tanto prevenir el comienzo de la enfermedad como reducir los síntomas de la enfermedad (dependiendo del tiempo de administración) en el modelo de ratón MRL-lpr de artritis (Jiang-Hong Gong, y col., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 131). Además se ha demostrado que la administración de pequeñas moléculas antagonistas de CCR2 redujo la puntuación clínica en modelos de roedores de artritis (C. M. Brodmerkel, y col., *J. Immunol.* 2005, 175, 5370 y M. Xia, y col., *Solicitud de Patente de Estados Unidos* 0069123, 2006). La administración de un anticuerpo anti-CCR2 tiene efectos variables en CIA murina, dependiendo del tiempo de administración (H. Bruhl, y col., *J. Immunol.* 2004, 172, 890). Estudios recientes con ratones CCR2 -/- han sugerido que la eliminación de CCR2 puede exacerbar los modelos de artritis de roedores en circunstancias experimentales específicas (M. P. Quinones, y col., *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 856; M. P. Quinones, y col., *J. Mol. Med.* 2006, 84, 503).

Se sabe que MCP-1 está sobrerregulado en lesiones ateroscleróticas, y se ha mostrado que los niveles circulantes de MCP-1 se reducen a través del tratamiento con agentes terapéuticos (Abdolreza Rezaie-Majd, y col., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 1194 –1199). Varios estudios claves han demostrado el valor terapéutico potencial de los antagonistas de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la aterosclerosis. Por ejemplo, cuando los ratones MCP-1 -/- se cruzan con ratones deficientes en el receptor de LDL se observó una reducción del 83% en la deposición aórtica de lípidos (Long Gu, y col., *Mol. Cell* 1998, 2, 275). De manera similar, cuando MCP-1 se eliminó genéticamente de ratones que ya sobreexpresaban la apolipoproteína B humana, los ratones resultantes estaban protegidos frente a la formación de la lesión aterosclerótica en relación con ratones de control MCP-1 +/- apoB (Jennifa Gosling, y col., *J Clin. Invest.* 1999, 103, 773). De la misma manera, cuando los ratones CCR-2 -/- se cruzan con ratones apolipoproteína E -/-, se observó un descenso significativo en la incidencia de lesiones ateroscleróticas (Landin Boring, y col., *Nature* 1998, 394, 894; T. C. Dawson, y col., *Atherosclerosis* 1999, 143, 205). Finalmente, cuando se administra a ratones apolipoproteína E -/- un gen que codifica un péptido antagonista de CCR2, entonces el tamaño de lesión se disminuye y la estabilidad de la placa aumenta (W. Ni, y col., *Circulation* 2001, 103, 2096 – 2101). El trasplante de médula ósea de ratones CCR2 -/- en ratones ApoE3-Leiden inhibió la aterogénesis temprana (J. Guo, y col., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 447), pero tuvo efectos mínimos en las lesiones avanzadas (J. Guo, y col., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 1014).

Los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 típicamente exhiben resistencia a la insulina como una de las características distintivas de la enfermedad. La resistencia a la insulina también se asocia con el agrupamiento de anomalías conocidas como el “síndrome metabólico” o “síndrome X”, que incluye obesidad, aterosclerosis,

hipertensión y dislipidemia (revisado en: Eckel, y col., *Lancet* 2005, 365, 1415). Se reconoce ampliamente que la inflamación desempeña una función en la exacerbación del proceso de enfermedad en diabetes de tipo 2 y las patologías del "síndrome X" (revisado en: Chen, *Pharmacological Research* 2006, 53, 469; Neels y Olefsky, *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 33; Danadona y Aljada, *Am J Cardiol.* 2002 90, 27G–33G; Pickup y Crook, *Diabetologia* 1998, 41, 1241). Se reconoce que MCP–1 desempeña una función en la resistencia a la insulina inducida por obesidad. En cultivo, los preadipocitos humanos expresaron constitutivamente MCP–1 (Gerhardt, *Mol. Cell. Endocrinology* 2001, 175, 81). El CCR2 se expresa en los adipocitos; la adición de MCP–1 a los adipocitos diferenciados in vitro disminuye el consumo de glucosa estimulado por insulina y la expresión de varios genes adipogénicos (LpL, adiposina, GLU–4), aP2, el receptor adrenérgico  $\beta$ 3 y PPAR (P. Sartipy y D. Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1999, 96, 6902). Los pacientes con diabetes de tipo 2 tuvieron mayores niveles de MCP–1 circulante que los controles no diabéticos (S. Nomura, y col., *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 121, 437) y la liberación de MCP–1 del tejido adiposo se podría reducir mediante el tratamiento con terapias antidiabéticas tales como metformina o tiazolidinedionas (J. M. Bruun, y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 2282). De la misma manera, MCP–1 también se sobreexpresó en modelos experimentales murinos de obesidad y lo produjo de manera primaria el tejido adiposo (Sartipy y Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 7265).

En ratones obesos, la expresión de MCP–1 tanto precedió como ocurrió concurrentemente con el comienzo de las resistencias a la insulina (H. Xu, y col., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1821). Otro estudio mostró que la expresión de MCP–1 se correlacionaba positivamente con la masa corporal en el tejido adiposo perigonadal de ratones (Weisberg, y col., *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1796). Coherente con estos datos, el desarrollo de la resistencia a insulina en ratones db/db mejoró mediante la eliminación genética de MCP–1 o mediante la expresión inducida por genes de un péptido negativo dominante (H. Kanda, y col., *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 1494). La lógica inversa también se podría demostrar: la sobreexpresión de MCP–1 en el tejido adiposo promovió la resistencia a insulina (N. Kamei, y col., *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 26602). También ha aparecido un resultado conflictivo que muestra que la eliminación genética de MCP–1 no afecta a la resistencia a insulina en el ratón db/db (F. Y. Chow, y col., *Diabetologia* 2007, 50, 471). Coherente con el dato de MCP–1, los estudios directos con CCR2 (el receptor de MCP–1) han mostrado que desempeña una función en la formación de obesidad y en la resistencia a insulina inducida por obesidad. El mantenimiento de una dieta rica en grasas aumentó los números de monocitos inflamatorios CCR2+ circulantes tanto en ratones de tipo silvestre (C. L. Tsou, y col., *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 902) como en ratones ApoE–/– (F. Tacke, y col., *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 185). La eliminación genética de CCR2 redujo los números de los macrófagos activados en tejido adiposo murino (C. N. Lumeng, y col., *Diabetes* 2007, 56, 16), pero no afectó a la población de macrófagos adiposos M2 que se cree que mantienen el estado "delgado" (C. N. Lumeng, y col., *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 175). La eliminación genética de CCR2 redujo la obesidad inducida por la dieta y mejoró la sensibilidad a insulina en el modelo de obesidad inducida por la dieta (S. P. Weisberg, y col., *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 115; P Cornelius, RP Gladue, RS Sebastian, patente N° WO 2006/013427 A2), 2006), dependiendo de las condiciones experimentales (A. Chen, y col., *Obes. Res.* 2005, 13, 1311). La administración de pequeñas moléculas antagonistas de CCR2 también mejoró la sensibilidad a insulina en este mismo modelo (S. P. Weisberg, y col., *J. Clin. Invest.* 2006, 776, 115).

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

Se sabe que MCP–1 está sobrerregulado en la esclerosis múltiple humana, y ha mostrado que la terapia eficaz con interferón  $\beta$ –1b reduce la expresión de MCP–1 en las células mononucleares de sangre periférica, lo que sugiere que MCP–1 desempeña una función en el progreso de la enfermedad (Carla Iarlori, y col., *J. Neuroimmunol.* 2002,123,170 –179). Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP–1/CCR–2 en el tratamiento de la esclerosis múltiple; todos estos estudios se han demostrado en encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal convencional para la esclerosis múltiple. La administración de anticuerpos para MCP–1 para animales con EAE disminuyó significativamente la recaída de la enfermedad (K. J. Kennedy, y col., *J. Neuroimmunol.* 1998, 92, 98). Además, dos informes han mostrado que los ratones CCR–2–/– son resistentes a EAE (B. T. Fife, y col., *J. Exp. Med.* 2000, 192, 899; L. Izikson, y col., *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1075). Un informe posterior extendió estas observaciones iniciales examinando los efectos de la eliminación de CCR2 en ratones de diferentes cepas (S. Gaupp, y col., *Am. J. Pathol.* 2003, 162, 139). Notablemente, la administración de una pequeña molécula antagonista de CCR2 también mitigó el progreso de la enfermedad en ratones C57BL/6 (C. M. Brodmerkel, y col., *J. Immunol.* 2005, 175, 5370).

Se sabe que MCP–1 está sobrerregulado en pacientes que desarrollan el síndrome de la bronquiolitis bliterante después del trasplante de pulmón (Martine Reynaud–Gaubert, y col., *J. of Heart y Lung Transplant.*, 2002, 21, 721 – 730; John Belperio, y col., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547 – 556). En un modelo murino del síndrome de la bronquiolitis obliterante, la administración de un anticuerpo frente a MCP–1 condujo a la atenuación de la obliteración de las vías respiratorias; de la misma manera, los ratones CCR2 –/– fueron resistentes a la obliteración de las vías respiratorias en este mismo modelo (John Belperio, y col., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547 – 556). Estos

datos sugieren que el antagonismo de MCP-1/CCR2 puede ser beneficioso en el tratamiento del rechazo de órganos después del trasplante. Además, los estudios han mostrado que la alteración del eje MCP-1/CCR2 fue capaz de prolongar la supervivencia del trasplante de isletas (I Lee y col., *J. Immunol* 2003, 171, 6929; R Abdi y col., *J Immunol* 2004,172, 767). En modelos de injerto en ratas, CCR2 y MCP-1 mostraron que estaban aumentados en injertos que desarrollan vasculopatía de injerto (K Horiguchi y col., *J Heart Lung Transplant*. 2002, 21, 1090). En otro estudio, la terapia génica anti-MCP-1 atenuó la vasculopatía de injerto (A Saiura y col., *Artheroscler Thromb Vase Biol* 2004, 24, 1886). Un estudio describió la inhibición de formación neointimal de injerto venoso mediante el bloqueo de MCP-1 (H Tatewaki y col., *J Vasc Surg*. 2007, 45, 1236).

Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento del asma. El secuestro de MCP-1 con un anticuerpo neutralizante en ratones expuestos a ovalbúmina dio como resultado una disminución notable en la hiperresponsividad e inflamación bronquial (Jose-Angel Gonzalo, y col., *J. Exp. Med.* 1998, 188, 157). Esto probó que era posible reducir la inflamación de las vías respiratorias alérgica en ratones expuestos a huevos de *Schistosoma mansoni* a través de la administración de anticuerpos contra MCP-1 (NicholasW. Lukacs, y col., *J. Immunol.* 1997, 158, 4398). Coherente con esto, los ratones MCP-1 -/- presentaron una respuesta reducida a la exposición a huevos de *Schistosoma mansoni* (Bao Lu, y col., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601).

Otros estudios han demostrado que valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la enfermedad renal. La administración de anticuerpos contra MCP-1 en un modelo murino de glomerulonefritis dio como resultado una disminución notable de la formación de la media luna glomerular y la deposición del colágeno de tipo I (Clare M. Lloyd, y col., *J. Exp. Med.* 1997, 185, 1371). Además, los ratones MCP-1 -/- con nefritis por suero nefrotóxico inducida mostraron un daño tubular significativamente menor que sus equivalentes MCP-1+/+ (Gregory H. Tesch. y col., *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 73).

Varios estudios han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento del lupus sistémico eritematoso. Los ratones CCR2 -/- exhibieron supervivencia prolongada y enfermedad renal reducida en relación con sus equivalentes TS en un modelo murino de lupus sistémico eritematoso (G. Perez de Lema, y col., *J. Am. Soc. Neph.* 2005, 16, 3592). Estos datos son coherentes con la actividad modificadora de la enfermedad encontrada en estudios recientes en la eliminación genética de MCP-1 (S. Shimizu, y col., *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch, y col., *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1813) o la administración de un péptido antagonista de CCR2 (H. Hasegawa, y col., *Arthritis & Rheumatism* 2003, 48, 2555) en modelos de roedores de lupus.

Un aumento notable de 30 veces en linfocitos de la lámina propia CCR2+ se observó en los intestinos delgados de pacientes de Crohn en relación con íleos no enfermos (S. J. Connor, y col., *Gut* 2004, 53, 1287). También cabe destacar, que había una expansión en el subconjunto de monocitos CCR2+/CD14+/CD56+ circulantes en pacientes con enfermedad de Crohn activa en relación con los controles. Varios estudios de roedores han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la enfermedad de Crohn/colitis. Se protegieron los ratones CCR-2-/- de los efectos de la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (Pietro G. Andres, y col., *J. Immunol.* 2000, 164, 6303). La administración de pequeñas moléculas antagonistas de CCR2, CCR5 y CXCR3 (afinidades de unión murinas = 24, 236 y 369 nM, respectivamente) también protegidas frente a la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (H. Tokuyama, y col., *Int. Immunol.* 2005, 17, 1023). Finalmente, los ratones MCP-1 -/- mostraron daño colónico sustancialmente reducido (tanto macroscópico como histológico) en un modelo de colitis inducida por haptenos (W. I. Khan, y col., *Ant. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006, 291, G803).

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

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

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

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

Múltiples estudios han descrito el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la reestenosis. En seres humanos, los niveles de MCP-1 se relacionan directamente con el riesgo de reestenosis (F. Cipollone, y col., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 2001, 21, 327). Los ratones deficientes en CCR2 o en MCP-1 mostraron reducciones en el área íntima y en el porcentaje de íntima/media (en relación con camadas silvestres) después de daño arterial (Mercede Roque, y col., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 2002, 22, 554; A. Schober, y col., *Circ. Res.* 2004, 95, 1125; W. J. Kim, y col., *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 310, 936). En ratones, la transfección de un inhibidor negativo dominante de MCP-1 en el músculo esquelético (K. Egashira, y col., *Circ. Res.* 2002, 90, 1167) también redujo la hiperplasia intimal después de un daño arterial. El bloqueo de CCR2 usando un anticuerpo neutralizante redujo la hiperplasia neointimal después de la colocación de endoprótesis vasculares en primates (C. Horvath, y col., *Circ. Res.* 2002, 90, 488).

Dos informes describen la sobreexpresión de ratas MCP-1 con trauma cerebral inducido (J. S. King, y col., *J. Neuroimmunol.* 1994, 56, 127, y JoanW. Berman, y col., *J. Immunol.* 1996, 156, 3017). Además, los estudios han mostrado que tanto los ratones CCR2 -/- (O. B. Dimitrijevic, y col., *Stroke* 2007, 38, 1345) como los MCP-1 -/- (P. M. Hughes, y col., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 308) están protegidos parcialmente del daño por isquemia/reperfusión.

Se sabe que los monocitos/macrófagos desempeñan una función importante en el desarrollo del dolor neuropático (Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, Pain 2000, 86, 25). Coherente con este concepto, una función potencial para CCR2 en el tratamiento de tanto el dolor inflamatorio como el neuropático se ha descrito recientemente. Los ratones CCR2 -/- mostraron respuestas alteradas al dolor inflamatorio en relación con sus equivalentes TS, incluyendo el comportamiento de dolor reducido después de la inyección intraplantar de formalina y la alodinia mecánica ligeramente reducida después de la inyección intraplantar de CFA (C. Abbadie, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2003, 100, 7947). Además, los ratones CCR2 -/- no presentaron alodinia mecánica significativa después del daño en el nervio ciático. De la misma manera, una pequeña molécula antagonista de CCR2 redujo la alodinia mecánica al ~80% de los niveles previos al daño después de la administración oral (C. Abbadie, J. A. Lindia, y H. Wang, documento WO PCT 110376, 2004).

Un estudio describió la función crítica de MCP-1 en la cardiomiopatía isquémica (N. G. Frangogiannis, y col., *Circulation* 2007, 115, 584). Otro estudio describió la atenuación del fallo cardiaco experimental después de la inhibición de MCP-1 (S Hayashidani y col., *Circulation* 2003, 108, 2134).

Otros estudios han proporcionado pruebas de que MCP-1 se sobreexpresa en varios estados de enfermedad que no se mencionan anteriormente. Estos informes proporcionan pruebas correlativas de que los antagonistas de MCP-1 podrían ser terapias útiles para tales enfermedades. Otro estudio ha demostrado la sobreexpresión de MCP-1 en aloinjertos cardiacos en roedores, lo que sugiere una función para MCP-1 en la patogénesis de la arteriosclerosis del trasplante (Mary E. Russell, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 6086). Se ha destacado la sobreexpresión de MCP-1 en las células endoteliales pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Harry N. Antoniades, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5371). De manera similar, la sobreexpresión de MCP-1 se ha sido destacado en la piel de pacientes con psoriasis (M. Deleuran, y col., *J. Dermatol. Sci.* 1996, 13, 228 y R. Gillitzer, y col., *J. Invest. Dermatol.* 1993, 101, 127); los hallazgos correlativos con predominancia de células CCR2+ también se han notificado (C. Vestergaard, y col., *Acta Derm. Venerol.* 2004, 84, 353). Finalmente, un informe reciente ha mostrado que MCP-1 se sobreexpresa en los cerebros y fluido cerebroespinal de pacientes con demencia asociada al VIH-1 (Alfredo Garzino-Demo, documento N° WO 99/46991).

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

También debe destacarse que se ha implicado a CCR-2 como un correceptor para algunas cepas de VIH (B. J. Doranz, y col., *Cell* 1996, 85, 1149). También se ha determinado que el uso de CCR-2 como un correceptor de VIH puede relacionarse con el progreso de la enfermedad (Ruth I. Connor, y col., *J. Exp. Med* 1997, 185, 621). Este hallazgo es coherente con el hallazgo reciente de que la presencia de un mutante de CCR-2, CCR2-641, se

relaciona positivamente con el comienzo tardío de VIH en la población humana (Michael W. Smith, y col., Science 1997, 277, 959). Aunque no se ha implicado a MCP-1 en estos procedimientos, puede ser que los antagonistas de MCP-1 que actúan mediante la unión a CCR-2 puedan tener efectos terapéuticos beneficiosos en el retraso del progreso de la enfermedad a SIDA en pacientes infectados por VIH.

- 5 Debe destacarse que CCR2 también es el receptor para las quimiocinas humanas MCP-2, MCP-3 y MCP-4 (Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445). Puesto que los nuevos compuestos de fórmula (I) descritos en este documento antagonizan con MCP-1 uniéndose al receptor CCR-2, puede ser que estos compuestos de fórmula (I) también sean antagonistas eficaces de las acciones de MCP-2, MCP-3 y MCP-4 mediados por CCR-2. Por consiguiente, cuando se hace referencia en este documento a "antagonismo de MCP-1", debe asumirse que es  
10 equivalente a "antagonistas de la estimulación por quimiocinas de CCR-2".

Por consiguiente, los compuestos que modulan la actividad de las quimiocinas podrían demostrar una amplia gama de utilidades en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares. La Publicación de Patente n° WO2005021500 A1 (incorporada en este documento por referencia y asignada al presente solicitante) divulga compuestos que modulan la actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y  
15 MCP-4 mediante CCR2. La referencia también divulga distintos procedimientos para preparar estos compuestos incluyendo síntesis multietapa que incluye la introducción y la posterior retirada de grupos protectores.

Se desea encontrar nuevos compuestos con características farmacológicas mejoradas comparados con los moduladores de quimiocinas conocidos. Por ejemplo, se desea encontrar nuevos compuestos con la actividad inhibidora de CCR-2 y selectividad para CCR-2 mejoradas frente a otros receptores acoplados a proteína G (es decir el receptor 5HT2A). También se desea encontrar compuestos con características ventajosas y mejoradas en  
20 una o más de las siguientes categorías:

- a) propiedades farmacéuticas (es decir solubilidad, permeabilidad, posibilidad de formulaciones de liberación sostenida);
- (b) requerimientos de dosificación (por ejemplo, dosis bajas y/o dosificación una vez por día);
- 25 (c) factores que disminuyan las características pico a valle de la concentración sanguínea (es decir la eliminación y/o volumen de distribución);
- (d) factores que aumentan la concentración de fármaco activo en el receptor (es decir unión de proteínas, volumen de distribución);
- (e) Factores que disminuyen el inconveniente de las interacciones clínicas fármaco-fármaco (inhibición de la  
30 enzima del citocromo P450 o inducción, tales como inhibición de CYP 2D6, véase G. K. Dresser, J. D. Spence. D. G. Bailey, Clin. Pharmacokinet. 2000, 38, 41 - 57, que se incorpora en este documento por referencia);
- (f) factores que disminuyen el potencial para los efectos secundarios adversos (por ejemplo la selectividad farmacológica más allá de los receptores acoplados a proteínas G, la reactividad potencial química o metabólica, la penetración limitada del SNC, la selectividad del canal iónico). Es especialmente deseable encontrar compuestos  
35 que tienen una combinación deseable de las características farmacológicas anteriormente mencionadas.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un antagonista nuevo o un agonista parcial/antagonista parcial de la actividad del receptor de MCP-1: N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-  
40 ilamino)pirrolidino-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma, que tiene una combinación no esperada de características farmacológicas deseables. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas o las mismas para su uso como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares son también un objetivo de esta invención.

La presente divulgación también proporciona el uso de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-  
45 trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidino-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o enfermedades cardiovasculares.

### **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-  
50 (6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidino-1-il)ciclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4.

Figura 2. Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-

- (6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2.
- Figura 3. Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, 1,75 moles H<sub>2</sub>O, Forma H1,75-5.
- Figura 4. Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-1-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato mono-etanol, Forma E-1.
- Figura 5. Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato del ácido mono-acético, Forma HAC-1.
- Figura 6. Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato mono-R-propilenglicol, Forma RPG-3.
- Figura 7. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4.
- Figura 8. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4.
- Figura 9. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2.
- Figura 10. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2.
- Figura 11. Isotherma de Sorción de humedad de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2 a 25°C.
- Figura 12. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, 1,75 moles H<sub>2</sub>O, Forma H1,75-5.
- Figura 13. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, 1,75 moles H<sub>2</sub>O, Forma H1,75-5.
- Figura 14. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato del ácido mono-acético, Forma HAC-1.
- Figura 15. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato del ácido mono-acético, Forma HAC-1.
- Figura 16. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato mono-etanol, Forma E-1.
- Figura 17. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato mono-etanol, Forma E-1.
- Figura 18. DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, solvato mono-R-propilenglicol, Forma RPG-3.
- Figura 19. TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, mono-R-propilenglicol, Forma RPG-3.
- Figura 20. Modelo de exposición intradermal en mono cynomolgus: Ejemplo 1 recuento celular mononuclear inhibido a la piel.
- Figura 21. Peritonitis por TG de 48 horas en ratones hCCR2 KI: Ejemplo 1 de la inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos en la cavidad peritoneal.
- Figura 22. EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) en ratones hCCR2 KI: Puntuación clínica del tratamiento del Ejemplo 1.
- Figura 23. Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 3 – compuesto 7.
- Figura 24. Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 4 – compuesto 8.

Figura 25. Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 4 – compuesto 9.

Figura 26. Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 4 – compuesto 10.

Figura 27. Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 5 – compuesto 11.

### Descripción detallada

5 La presente invención proporciona un nuevo antagonista o un agonista parcial/antagonista parcial de la actividad del receptor de MCP-1: N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma, que tiene una combinación inesperada de características farmacológicas deseables. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y  
10 las mismas para su uso como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o enfermedades cardiovasculares también son un objetivo de esta invención.

La N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, demuestra de manera inesperada una combinación deseable de características farmacológicas incluyendo un grado sorprendentemente alto de biodisponibilidad oral en combinación con  
15 indicaciones de que es altamente eficaz y tiene excelentes criterios de seguridad.

Los moduladores conocidos de receptores CCR2, tales como aquellos descritos en la publicación de patente WO2005021500 publicada el 10 de marzo de 2005 (Patente de Estados Unidos N° 7.163.937, emitida el 16 de enero de 2007, asignada al presente Solicitante) que demuestran un grado adecuado de permeabilidad de membrana (un factor crítico para la biodisponibilidad oral), no son suficientemente eficaces, como se mide mediante  
20 su capacidad de unión a CCR2 (una medida de eficacia) y/o su carencia de criterios adecuados de seguridad como se indica mediante la selectividad de canales iónicos como se mide mediante los estudios de canales iónicos hERG y Na+.

Por el contrario, como se ilustra mediante los datos presentados en el presente documento en la sección denominada "Características Farmacológicas Comparativas", posteriormente, la molécula relativamente polar, N-  
25 ((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida demuestra un grado sorprendentemente alto de permeabilidad de membrana y a pesar de todo todavía mantiene la potente capacidad de unión a CCR2 junto con la excelente selectividad de los canales iónicos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un nuevo modulador de quimiocinas que tiene características farmacológicas mejoradas y que se espera que sea útil en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y cardiovasculares.  
30

### Realizaciones

En una realización, la divulgación se refiere a N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma.  
35

Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre.

Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, en la que la forma cristalina es la Forma N-2 caracterizada por (o que tiene) parámetros de celdilla unitaria sustancialmente iguales a los siguientes:  
40

Dimensiones de celdilla:

a = 18,7240 (4)

b = 8,0171 (2)

c = 19,6568 (5)

45  $\alpha$  = 90

$\beta$  = 114,935 (2)

$\gamma$  = 90

$$V (\text{\AA}^3) = 2675,7 (1)$$

Grupo espaciador P2<sub>1</sub>,2<sub>1</sub>,2<sub>1</sub>

Moléculas / celdilla unitaria 2

en la que dicho cristal está a una temperatura de aproximadamente +22°C (TA).

- 5 Otra realización es la Forma N-2 caracterizada por (o que tiene) un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende tres o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados entre 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 y 19,2 a una temperatura de aproximadamente 22°C.

- 10 Otra realización es la Forma N-2 caracterizada por (o que tiene) un patrón de difracción de rayos X en polvo que además comprende cuatro o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados de 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 y 19,2 a una temperatura de aproximadamente 22°C.

Otra realización es la Forma N-2 caracterizada por (o que tiene) unas coordenadas atómicas fraccionarias sustancialmente como se enumera en la Tabla 3.

Otra realización es la Forma N-2 caracterizada por (o que tiene) un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 2.

- 15 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, que comprende la Forma H 1,75-5 (1,75 moles de agua) caracterizada por los parámetros de celdilla unitaria que se encuentran en la Tabla 1; 3 ó 4 o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionarias sustancialmente como se enumeran en la Tabla 4 y/o un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 3.

- 20 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, que comprende la Forma H 0, 5-4 (hemi-hidrato), caracterizada por los parámetros de celdilla unitaria que se encuentran en la Tabla 1; 3 ó 4 o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionarias sustancialmente como se enumeran en la Tabla 2, y/o un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 1.

- 25 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, que comprende la Forma E1 (solvato de mono-etanol), caracterizada por los parámetros de celdilla unitaria que se encuentran en la Tabla 1; 3 ó 4 o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionarias sustancialmente como se enumeran en la Tabla 5 y/o un patrón de difracción de rayos X en polvo de acuerdo con la Figura 4.

- 30 Otra realización son patrones de la forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, que comprende la Forma HAC-1 (solvato del ácido mono-acético), caracterizada por los parámetros de celdilla unitaria que se encuentran en la Tabla 1; 3 ó 4 o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionarias sustancialmente como se enumeran en la Tabla 6 y/o un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 5.

- 35 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, que comprende la Forma IPA-1 (solvato de mono-isopropanol), caracterizada por los parámetros de celdilla unitaria que se encuentran en la Tabla 1; 3 ó 4 o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados de la Tabla 9; y/o coordenadas atómicas fraccionarias sustancialmente como se enumeran en la Tabla 7.

- 40 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre que comprende la Forma RPG-3 (solvato mono-R-propilenglicol), caracterizada por los parámetros de celdilla unitaria que se encuentran en la Tabla 1; 3 ó 4 o más de los valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$  = 1,5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionarias como se enumeran en la Tabla 8 y/o un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 6.

- 45 Otra realización es una composición farmacéutica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de los Ejemplos.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos, para usar en un procedimiento para la modulación de la actividad de quimiocinas o receptor de quimiocinas en un paciente.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos, para usar en un procedimiento para la modulación de la actividad del receptor de CCR-2 en un paciente.

- 5 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos, para usar en un procedimiento para la modulación de la actividad de la actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4, y MCP-5 que está mediada por el receptor de CCR-2 en un paciente.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos, para usar en un procedimiento para la modulación de la actividad de MCP-1 en un paciente.

- 10 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos, para usar en un procedimiento para la inhibición de la actividad de CCR2 y CCR5 en un paciente.

- 15 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en el tratamiento de trastornos en un paciente, estando seleccionados dichos trastornos de la diabetes, obesidad, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esclerodermia, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, fallo cardíaco congestivo, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada al VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis del trasplante, trauma cerebral inducido físicamente o químicamente, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus sistémico eritematoso, nefritis por suero neurotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de inserción de diálisis, hiperplasia intimal de derivación arteriovenosa, trasplante de órganos, nefropatía crónica de aloinjertos y cáncer.
- 20

- 25 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en el tratamiento de trastornos en un paciente, en el que dichos trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis del trasplante, trauma cerebral inducido físicamente o químicamente, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus sistémico eritematoso, nefritis por suero nefrotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis y artritis reumatoide, reestenosis, trasplante de órganos y cáncer.

- 30 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para tratar trastornos en un paciente, en el que dichos trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis y trasplante de órganos.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para tratar trastornos en un paciente, en el que dichos trastornos se seleccionan de esclerosis múltiple, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y diabetes.

- 35 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para tratar trastornos en un paciente, en el que dichos trastornos se seleccionan de reestenosis, trasplante de órganos y cáncer.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de diabetes en un paciente.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad de Crohn en un paciente.

- 40 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de la esclerosis múltiple en un paciente.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de aterosclerosis en un paciente.

- 45 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de la reestenosis en un paciente.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento del trasplante de órganos en un paciente.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de cáncer en un paciente.

Preferiblemente, el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer prostático y melanoma.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o enfermedades cardiovasculares en un paciente.

- 5 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares, que están al menos parcialmente mediadas por CCR-2, en un paciente.

Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para la modulación de la actividad de CCR2 en un paciente.

- 10 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en un procedimiento para modulación de la actividad de MIP-1 $\beta$  y RANTES, que está mediada por el receptor de CCR5 en un paciente.

Otra realización es el uso de un compuesto de los Ejemplos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes, obesidad, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esclerodermia, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, fallo cardíaco congestivo, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada al VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis del trasplante, trauma cerebral inducido físicamente o químicamente, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus sistémico eritematoso, nefritis por suero nefrotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de inserción de diálisis, hiperplasia intimal de derivación arteriovenosa, trasplante de órganos, nefropatía crónica de aloinjerto y cáncer.

- 20 Otra realización es un compuesto de los Ejemplos para usar en terapia.

Esta invención puede estar contenida en otras formas específicas sin alejarse del espíritu o los atributos esenciales de la misma. Esta invención también abarca todas las combinaciones de aspectos alternativos y realizaciones de la invención indicados en la presente memoria descriptiva.

- 25 Se entiende que cualquiera y todas las realizaciones pueden tomarse junto con cualquier otra realización para describir realizaciones adicionales de la presente invención. Además, se pretende que cualquier elemento de una realización (incluyendo los aspectos preferidos) se combine con cualquier y con todos los otros elementos a partir de cualquiera de la realizaciones para describir realizaciones adicionales.

### 30 **Definiciones**

Las siguientes son definiciones de términos usados en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas. La definición inicial proporcionada para un grupo o término en la presente memoria descriptiva, se aplica a ese grupo o término a través de la memoria descriptiva y reivindicaciones, individualmente o como parte de otro grupo, a no ser que se especifique lo contrario.

- 35 La expresión “farmacéuticamente aceptable” se emplea en en la presente memoria descriptiva para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que están, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, correspondientes a un porcentaje de beneficio/riesgo razonable.

- 40 Como se usa en el presente documento, “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto parental se modifica mediante la preparación de sales ácidas o básicas del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas o sales orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto parental formado, por ejemplo, a partir de ácidos no tóxicos inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, tales sales convencionales no tóxicas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídricos, bromhídricos, sulfúricos, sulfámicos, fosfóricos, nítricos y similares; y las sales preparadas de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, estearico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, y similares.

- 50 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto

parental que contiene un resto básico o ácido por medio de procedimientos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada o el ácido en agua o un disolvente inorgánico o en una mezcla de los dos; generalmente, un medio no acuoso como éter, etil acetato, etanol, isopropanol o acetonitrilo se prefieren. Las listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, ed. 17ª, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, pág. 1418, cuya descripción se incorpora en este documento mediante referencia.

Ya que los profármacos son conocidos por potenciar numerosas cualidades deseables de productos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.) los compuestos de la presente invención se pueden suministrar en forma de profármaco. De esta forma, la presente invención está pensada para cubrir los compuestos actualmente reivindicados, procedimientos para suministrar los mismos, y composiciones que contienen los mismos. Está pensado que los "profármacos" incluyan cualquier vehículo unido de forma covalente que libere un fármaco parental activo de la presente invención *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de la presente invención se preparan por medio de la modificación de grupos funcionales presentes en el compuesto, de tal forma que las modificaciones se escinden, o bien por manipulación rutinaria o bien *in vivo*, al compuesto parental. Los profármacos incluyen compuestos de la presente invención en los que un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo está unido a cualquier grupo que, cuando el profármaco de la presente invención se administra a un sujeto mamífero, escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre, o sulfhidrilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados acetato, formato y benzoato de alcohol y grupos amino funcionales en los compuestos de la presente invención.

"Compuesto estable" y "estructura estable" pretenden indicar un compuesto que es suficientemente resistente para sobrevivir al aislamiento a un grado útil de pureza de una mezcla de reacción y a la formulación en un agente terapéutico eficaz. La presente invención pretende contener compuestos estables.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" pretende incluir una cantidad de un compuesto de la presente invención sola o una cantidad de la combinación de compuestos reivindicada o una cantidad de un compuesto de la presente invención en combinación con otros ingredientes activos eficaces para inhibir MCP-1 o eficaces para tratar o prevenir trastornos.

Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" cubre un tratamiento de un estado de enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano e incluye: (a) la prevención del estado de enfermedad de producirse en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero está predispuesto al estado de enfermedad pero todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) la inhibición del estado de enfermedad, es decir, la detención de su desarrollo y/o (c) el alivio del estado de la enfermedad, es decir, produciendo la regresión del estado de enfermedad.

Los nombres que se usan en la presente memoria descriptiva para denominar una forma específica, por ejemplo, "N-2", no deben considerarse limitantes con respecto a otra sustancia cualquiera que posea características físicas y químicas similares o idénticas, sino más bien debe entenderse que estas denominaciones son meros identificadores que deben interpretarse de acuerdo con la caracterización de la información también presentada en este documento.

La presente invención proporciona, al menos en parte, formas cristalinas de la base libre de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, como un material nuevo, en particular, en una forma farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones preferidas, las formas cristalinas de la base libre están en forma sustancialmente pura. Las realizaciones preferentes de las formas cristalinas de la base libre se describen en el Ejemplo 2 como las Formas E-1, HAC-1, IPA-1, N-2, RPG-3, H0,5-4, y H1,75-5.

Como se usa en el presente documento, "polimorfo" se refiere a formas cristalinas que tienen la misma composición química pero distintas configuraciones espaciales de las moléculas, átomos y/o iones que forman el cristal.

Como se usa en el presente documento, "solvato" se refiere a una forma cristalina de una molécula, átomo y/o iones que además contienen moléculas de un disolvente o disolventes incorporadas en la estructura cristalina. Las moléculas de disolvente pueden estar presentes en el solvato en una configuración regular y/o en una configuración no ordenada. El solvato puede comprender una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de las moléculas de disolvente. Por ejemplo, un solvato con una cantidad no estequiométrica de moléculas de disolvente puede ser el resultado de la pérdida parcial de disolvente del solvato.

Como se usa en el presente documento, "amorfo" se refiere a una forma sólida de una molécula, átomo y/o iones que no es cristalina. Un sólido amorfo no presenta un patrón de difracción de rayos X definitivo.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente pura", cuando se usa en referencia a una forma

5 cristalina, significa un compuesto que tiene una pureza mayor del 90% en peso, incluyendo mayor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y 99% en peso, y también incluye igual a aproximadamente el 100% en peso del compuesto, basado en el peso del compuesto. El material restante comprende otra/s forma/s del compuesto y/o las impurezas de la reacción y/o las impurezas del procesamiento que surgen de su preparación. Por ejemplo, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, puede considerarse sustancialmente pura en que tiene una pureza mayor del 90% en peso, como se mide por medios que se conocen en este momento y son generalmente aceptados en la técnica, en la que menos del 10% restante de material en peso comprende otra/s forma/s de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, y/o impurezas de la reacción y/o impurezas del procesamiento.

10 Las muestras de las formas cristalinas pueden proporcionarse con homogeneidad de fases sustancialmente pura, que indica la presencia de una cantidad dominante de una sola forma cristalina y opcionalmente cantidades menores de una o más de otras formas cristalinas. La presencia de más de una forma cristalina en una muestra puede determinarse mediante técnicas tales como la difracción de rayos X en polvo (PXRD) o la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de estado sólido (SSNMR). Por ejemplo, la presencia de picos extra en la comparación con un patrón de PXRD medido experimentalmente con un patrón de PXRD estimulado puede indicar más de una forma cristalina en la muestra. El PXRD estimulado puede calcularse a partir de un solo dato de rayos X por cristal. Véase Smith, D. K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns", Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (Abril 1963).

15 Preferiblemente, la forma cristalina tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura como se indica mediante menos del 10%, preferiblemente menos del 5% y más preferiblemente menos del 2% del área de pico total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los picos extras que están ausentes en el patrón PXRD estimulado. Más preferiblemente es una forma cristalina que tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura con menos del 1% del área de pico total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los picos extras que están ausentes en el patrón PXRD estimulado.

20 Los procedimientos para la preparación de las formas cristalinas se conocen en la técnica. Las formas cristalinas se pueden preparar por una variedad de procedimientos, incluyendo por ejemplo, la cristalización o recristalización de un disolvente adecuado, la sublimación, el desarrollo a partir de un material fundido, la transformación al estado sólido a partir de otra fase, la cristalización de un fluido supercrítico y la pulverización por chorro. Las técnicas para la cristalización o recristalización de formas cristalinas a partir de una mezcla de disolventes incluyen, por ejemplo, la evaporación del disolvente, la disminución de la temperatura de la mezcla de disolventes, la colocación de la mezcla de disolventes supersaturada de la molécula y/o sal en cristales seminales, el secado por congelación de la mezcla de disolventes y la adición de antidisolventes (contradisolventes) a la mezcla de disolventes.

25 Las formas se pueden caracterizar y distinguir usando una sola difracción de rayos X por cristales, que está basada en mediciones de celdillas unitarias de un solo cristal de una forma a una temperatura analítica fijada. Una descripción detallada de las celdillas unitarias se proporciona en Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., Nueva York (1968), Capítulo 3, que se incorpora en este documento mediante referencia. Como alternativa, la única configuración de átomos en la relación espacial dentro de la red cristalina se puede caracterizar de acuerdo con las coordenadas atómicas fraccionales observadas. Véase la referencia Stout & Jensen para la determinación experimental de coordenadas fraccionales para análisis estructural. Otros medios de caracterizar la estructura cristalina son mediante el análisis de la difracción de rayos X en polvo en el que el perfil de difracción experimental u observado se compara con un perfil estimulado que representa el material en polvo puro, ambos a la misma temperatura analítica y las medidas para la forma sujeto caracterizadas como series de valores de  $2\theta$  e intensidades.

30 La expresión "pérdida de peso insignificante", como se emplea en este documento, como se caracteriza mediante TGA se indica la presencia de una forma de cristal pura (no solvatada).

La expresión "% de consumo de agua insignificante", como se emplea en este documento, como se caracteriza mediante la isoterma de sorción de humedad indica que la forma ensayada no es higroscópica.

35 En una realización de la invención, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida se proporciona en una forma sustancialmente pura. Esta forma cristalina puede emplearse en composiciones farmacéuticas que pueden incluir opcionalmente uno o más de otros componentes seleccionados, por ejemplo, del grupo que está constituido por excipientes, vehículos y uno de otros ingredientes farmacéuticamente activos o entidades químicas activas de diferentes estructuras moleculares.

40 Preferiblemente, la forma cristalina tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura como se indica mediante menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, y más preferiblemente menos del 2% del área de pico

total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los picos extras que están ausentes en el patrón PXRD estimulado. Más preferiblemente es una forma cristalina que tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura con menos del 1% del área de pico total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los picos extras que están ausentes en el patrón PXRD estimulado.

- 5 En otra realización, se proporciona una composición que está constituida esencialmente de las formas cristalinas de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida. La composición de esta realización puede comprender al menos el 90% en peso de la forma, que se basa en su peso en la composición.

10 La presencia de impurezas de la reacción y/o impurezas del procesamiento puede determinarse mediante técnicas analíticas que se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopia de masas o espectroscopia infrarroja.

15 Las formas cristalinas se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos, incluyendo por ejemplo, la cristalización o recristalización a partir de un disolvente adecuado, la sublimación, el desarrollo a partir de un material fundido, la transformación al estado sólido a partir de otra fase, la cristalización a partir de un fluido supercrítico y la pulverización por chorro. Las técnicas para la cristalización o recristalización de formas cristalinas a partir de una mezcla de disolventes incluyen, por ejemplo, la evaporación del disolvente, la disminución de la temperatura de la mezcla de disolventes, la colocación de una mezcla de disolvente supersaturada de la molécula y/o sal en cristales seminales, el secado por congelación de la mezcla de disolventes y la adición de antidisolventes (contradisolventes) a la mezcla de disolventes. Las técnicas de cristalización de alto rendimiento pueden emplearse para preparar formas cristalinas incluyendo polimorfos.

20 Los cristales de fármacos, incluyendo polimorfos, procedimientos de preparación y caracterización de los cristales de los fármacos se analizan en Solid-State Chemistry of Drugs, S. R. Byrn. R. R. Pfeiffer y J. G. Stowell, 2ª Edición, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

25 Para las técnicas de cristalización que emplean disolventes, la elección de disolvente o disolventes depende típicamente de uno o más factores, tales como la solubilidad de los compuestos, la técnica de cristalización y la presión de vapor del disolvente. Se pueden emplear las combinaciones de disolvente; por ejemplo, el compuesto puede solubilizarse en un primer disolvente para proporcionar una solución, seguido de la adición de un antidisolvente para disminuir la solubilidad del compuesto en la solución y para proporcionar la formación de cristales. Un "antidisolvente" es un disolvente en el que el compuesto tiene baja solubilidad. Los disolventes adecuados para preparar cristales incluyen disolventes polares y no polares.

30 En un procedimiento para preparar cristales, N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-((trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, se suspende y/o se agita en un disolvente adecuado para proporcionar una suspensión, que se puede calentar para promover la disolución. El término "suspensión", como se usa en este documento, significa una solución saturada de la base libre, que también puede contener una cantidad adicional del compuesto para proporcionar una mezcla heterogénea del compuesto y un disolvente a una temperatura dada. Los disolventes adecuados en este sentido incluyen, por ejemplo, disolventes polares apróticos y disolventes polares próticos y mezclas de dos o más de estos, como se describe en este documento.

40 Los cristales seminales se pueden añadir a cualquier mezcla de cristalización para promover la cristalización. Como será evidente para el especialista en la técnica, la siembra se usa como un medio de controlar el crecimiento de una forma cristalina particular o como un medio de controlar la distribución del tamaño de partícula del producto cristalino. Por consiguiente, el cálculo de la cantidad de semillas necesario depende del tamaño de semilla disponible y el tamaño deseado de una partícula media de producto como se describe, por ejemplo, en "Programmed cooling of batch crystallizes", J.W. Mullin y J. Nyvlt, Chemical Engineering Science 1971, 26: 369 – 45 377. En general, las semillas de pequeño tamaño se necesitan para controlar de manera eficaz el crecimiento de los cristales en el lote. Las semillas de pequeño tamaño se pueden generar mediante el tamizado, la molienda o la micronización de cristales más grandes o mediante microcristalización de soluciones. Se debe tener cuidado de que la molienda o el micronizado de cristales no dé como resultado ningún cambio en la cristalinidad de la forma cristalina deseada (es decir, cambio a amorfo o a otro polimorfo).

50 Una mezcla enfriada puede filtrarse al vacío, y los sólidos aislados pueden lavarse con un disolvente adecuado, tal como disolvente de recristalización frío, y secarse en una purga de nitrógeno para proporcionar la forma cristalina deseada. Los sólidos aislados pueden analizarse con una técnica espectroscópica o analítica adecuada, tal como SSNMR, DSC, PXRD o similar, para asegurar la formación de la forma cristalina preferida del producto. La forma cristalina resultante se produce típicamente en una cantidad de más de aproximadamente el 70% en peso de rendimiento aislado, pero preferiblemente más del 90% en peso basándose en el peso de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, empleada

55

originalmente en el procedimiento de cristalización. El producto puede co-molerse o pasarse a través de un tamiz de malla para desaglomerar el producto, si es necesario.

Pueden prepararse formas cristalinas directamente a partir del medio de reacción de la etapa de proceso final para preparar N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida. Esto puede conseguirse, por ejemplo, empleando en la etapa de proceso final un disolvente o mezcla de disolventes a partir de la cual puede cristalizarse la base libre. Como alternativa, las formas cristalinas pueden obtenerse por técnicas de destilación o de adición de disolvente. Los disolventes adecuados para este propósito incluyen cualquiera de los disolventes descritos en este documento, incluyendo disolventes próticos polares, tales como alcoholes, y disolventes apróticos polares, tales como cetonas.

A modo de directriz general, la mezcla de reacción puede filtrarse para retirar cualquier impureza indeseada, sales inorgánicas, y similares, seguido de lavado con un disolvente de reacción o cristalización. La solución resultante puede concentrarse para retirar el exceso de disolvente o constituyentes gaseosos. Si se emplea destilación, la última cantidad de destilado recogido puede variar, dependiendo de factores de proceso incluyendo, por ejemplo, tamaño del recipiente, capacidad de agitación, y similares. A modo de directriz general, la solución de reacción puede destilarse a aproximadamente 1/10 del volumen original antes de que se realice el reemplazo del disolvente. Pueden tomarse muestras de la reacción y ensayarse para determinar el grado de reacción y el % en peso de producto de acuerdo con técnicas de procesamiento convencionales. Si se desea, puede añadirse o retirarse un disolvente de reacción para optimizar la concentración de la reacción. Preferiblemente, la concentración final se ajusta a aproximadamente el 50% en peso, punto en el que típicamente se forma una suspensión.

Puede ser preferible añadir disolventes directamente al recipiente de reacción sin destilar la mezcla de reacción. Los disolventes preferidos para este propósito son los que participan en último lugar en la estructura reticular cristalina, como se ha analizado anteriormente con respecto al intercambio de disolvente. Aunque la concentración final puede variar dependiendo de la pureza deseada, recuperación y similar, la concentración final de la base libre en solución es preferiblemente de aproximadamente el 4% a aproximadamente el 7%. La mezcla de reacción puede agitarse seguido de adición del disolvente y calentamiento simultáneo. A modo de ilustración, la mezcla de reacción puede agitarse durante aproximadamente 1 hora mientras se calienta a aproximadamente 70°C. La reacción se filtra preferiblemente mientras permanece caliente y se lava con el disolvente de reacción, el disolvente añadido o una combinación de los mismos. Pueden añadirse cristales seminales a cualquier solución de cristalización para iniciar la cristalización.

Las diversas formas descritas en este documento pueden distinguirse entre sí mediante el uso de varias técnicas analíticas conocidas por un especialista en la técnica. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación a, difracción de rayos X en polvo (PXRD), y/o análisis termogravimétrico (TGA). De forma específica, las formas pueden caracterizarse y distinguirse usando difracción de rayos X de monocristal, que se basa en mediciones de celdillas unitarias de un monocristal de una forma dada a una temperatura analítica fija. Una descripción detallada de celdillas unitarias se proporciona en Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., Nueva York (1968), Capítulo 3, que se incorpora en este documento como referencia. Como alternativa, la disposición única de átomos en relación espacial dentro de la estructura reticular cristalina puede caracterizarse de acuerdo con las coordenadas atómicas fraccionarias observadas. Otro medio para caracterizar la estructura cristalina es por análisis de difracción de rayos X de polvo en el que el perfil de difracción se compara con un perfil simulado que representa el material en polvo puro, ambos se desarrollan a la misma temperatura analítica, y mediciones para la forma objeto se caracterizan como una serie de valores  $2\theta$  (normalmente cuatro o más).

Puede usarse otro medio para caracterizar la forma, tal como espectroscopía por resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), termografía y reconocimiento grueso de la morfología cristalina o amorfa. Estos parámetros también pueden usarse en combinación para caracterizar la forma objeto.

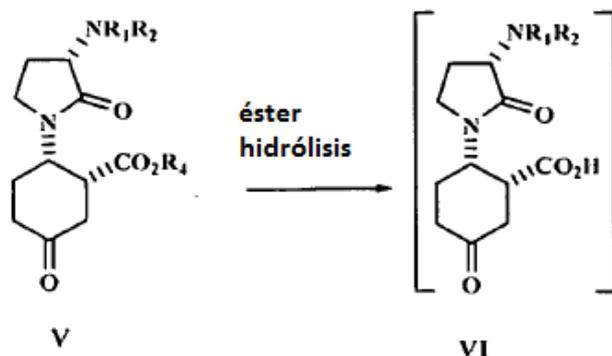
Un especialista en la técnica apreciará que un patrón de difracción de rayos X puede obtenerse con un error de medición que depende de las condiciones de medición empleadas. En particular, generalmente se sabe que las intensidades en un patrón de difracción de rayos X pueden fluctuar dependiendo de las condiciones de medición empleadas y de la forma y morfología del cristal. Debe entenderse también que las intensidades relativas también pueden variar dependiendo de las condiciones experimentales y, por consiguiente, no debe tenerse en cuenta el orden exacto de la intensidad. De forma adicional, un error de medición del ángulo de difracción para un patrón de difracción de rayos X convencional es típicamente de aproximadamente 0,2° o menos, preferiblemente de aproximadamente 0,1° (como se analiza más adelante en este documento), y dicho grado de error de medición debe tenerse en cuenta como concerniente a los ángulos de difracción mencionados anteriormente. Por consiguiente, debe entenderse que las formas de cristal de la presente invención no se limitan a las formas de cristal que proporcionan patrones de difracción de rayos X completamente idénticos a los patrones de difracción de rayos X representados en las Figuras adjuntas descritas en este documento. Cualquier forma de cristal que proporcione patrones de difracción de rayos X sustancialmente idénticos a los descritos en las figuras adjuntas

está dentro del alcance de la presente invención. La capacidad de determinar identidades sustanciales de patrones de difracción de rayos X está dentro del ámbito de un especialista en la técnica.

## Síntesis

### Esquema 1

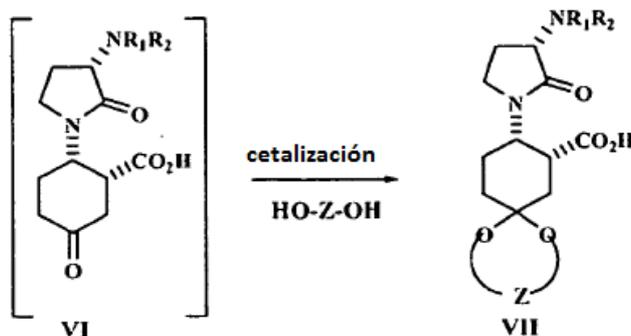
#### 5 Hidrólisis de cetoéster V a cetoácido VI



El cetoéster **V** se hidroliza a su cetoácido **VI** correspondiente suspendiendo **V** en un disolvente orgánico parcialmente miscible con agua, tal como éteres cíclicos o acíclicos que incluyen THF, 2-metil THF, 1,2-dimetoxietano, 1,4-dioxano, siendo preferido THF, y añadiendo una base acuosa tal como soluciones acuosas de hidróxidos de metales alcalinos MOH, en los que M es Li, Na o K, siendo NaOH 1N la base preferida, de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $+5^{\circ}\text{C}$ . La mezcla bifásica se agita después a  $\leq 5^{\circ}\text{C}$  durante al menos una hora. La baja temperatura para la adición y reacción de la base es importante para minimizar la epimerización en el carbono adyacente al grupo éster. Después se añade un disolvente no miscible en agua, preferiblemente metil terc-butil éter y se separan las fases. Después el producto se transfiere de la solución acuosa de vuelta al disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano, ajustando el pH con ácido, preferiblemente HCl 3N, y **VI** se usa en solución para la siguiente etapa.

### Esquema 2

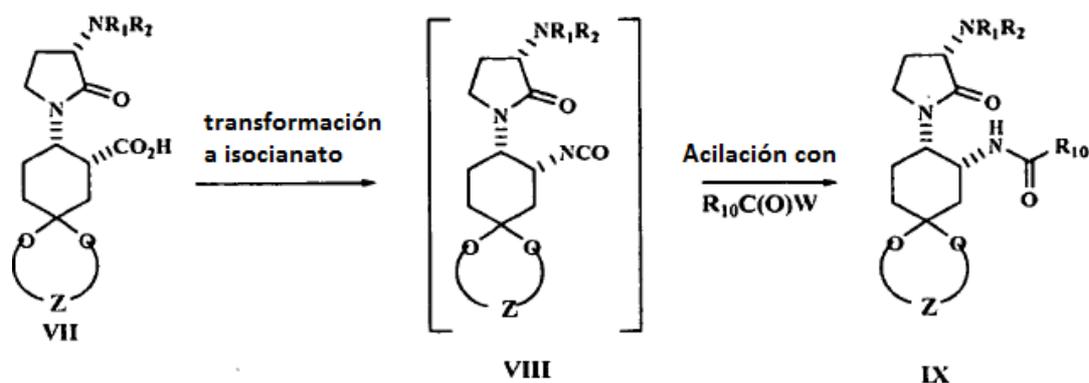
#### 15 Cetalización de cetoácido VI a cetal ácido VII



La solución de **VI**, preferiblemente en diclorometano, se intercambia a través de destilación en un disolvente de ebullición más elevada, no higroscópico, tal como tolueno, trifluorotolueno, xilenos, ésteres de ebullición más elevada tales como acetato de n-butilo o isobutilo, preferiblemente tolueno. Después se añade un glicol de la fórmula HO-Z-OH., (en la que Z es como se define *supra*), preferiblemente etilenglicol (1,2 eq), seguido de una cantidad catalítica (0,5 – 2 M %) de un ácido, preferiblemente ácido p-toluenosulfónico, y la mezcla se destila a presión atmosférica hasta que se completa la formación del compuesto **VII**. El producto **VII** cristaliza tras la adición de acetato de etilo después de enfriar a aproximadamente  $70^{\circ}\text{C}$ . Después de enfriamiento adicional a temperatura ambiente, **VII** se aísla por filtración y secado subsiguiente en aproximadamente el 70% de rendimiento (para  $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ ,  $\text{R}_1=\text{H}$ ,  $\text{R}_2=\text{CBz}$ ).

### Esquema 3

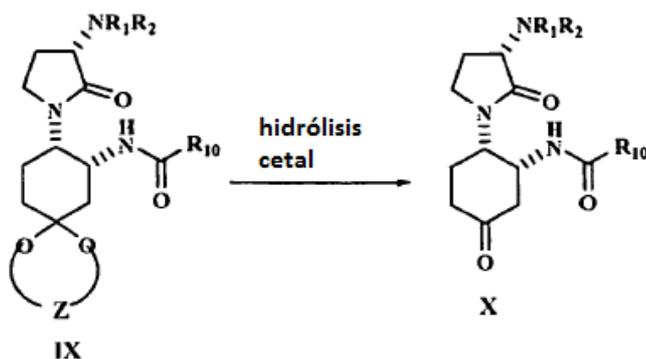
Transformación de cetal ácido VII a cetal isocianato no aislado VIII y después a cetal amida IX a través de activación / azidación ácida, transposición Curtius y acilación



El cetoácido **VII** se activa primero por medio de su transformación a su anhídrido mezclado usando aminas terciarias, preferiblemente trietilamina, y haloformatos, preferiblemente clorofornato de isobutilo en disolventes secos, tales como tolueno, trifluorotolueno, 1,2-dicloroetano, 1-clorobutano, xilenos, preferiblemente tolueno seco, por medio de la adición de un haloformato a una solución pre-enfriada de **VII** y trialquilamina. La temperatura preferida para la formación anhídrido mezclada es de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ . Después de aproximadamente 30 minutos, se añade una solución acuosa de azida de metales alcalinos, preferiblemente azida de sodio al  $\sim 30\%$  en peso y un catalizador de transferencia de fase, tal como sales de tetralquilamonio, preferiblemente bromuro de tetrabutilamonio (5 mol %) y la mezcla bifásica se agita enérgicamente durante aproximadamente 1h de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ . Después la fase orgánica se separa y la solución azida de acilo se seca, prefiriéndose cribas moleculares de 4 Å como agente de secado. La transposición y atrapado concomitante del isocianato **VIII** *in situ* con un ácido carboxílico para formar una cetal amida **IX** se lleva a cabo añadiendo primero un ácido carboxílico, preferiblemente ácido acético y su anhídrido correspondiente, hasta obtener una solución seca de la azida de acilo, y después calentando la mezcla de  $80^{\circ}$  a  $90^{\circ}\text{C}$  durante de 1 a 4 horas. El uso de un anhídrido junto con ácido carboxílico es crítico para minimizar la formación de impurezas. Después de retirar parcialmente el disolvente y el ácido carboxílico por destilación, el producto cristaliza tras el enfriamiento a temperatura ambiente. **IX** se aísla por filtración y secado en rendimiento al 65% – 78% (para  $Z = -(\text{CH}_2)_2-$ ,  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CBz}$ ,  $R_{10} = \text{Me}$ ).

#### Esquema 4

##### Hidrólisis de cetal amida **IX** a cetoamida **X**



La hidrólisis cetal del compuesto **IX** a la cetoamida **X** se lleva a cabo calentando una solución de **IX** en disolvente orgánico, miscible en agua, preferiblemente acetona y una solución acuosa de ácido fuerte, preferiblemente HCl 1N, durante 2 – 4 horas. La temperatura preferida para la hidrólisis es de  $45^{\circ}\text{C}$  –  $55^{\circ}\text{C}$ . Después de retirar la acetona, el producto se extrae a diclorometano, que se intercambia a acetato de etilo por destilación. El producto **X** cristaliza a partir de acetato de etilo tras enfriamiento a temperatura ambiente, y se aísla por filtración y secado en rendimiento al 85% – 90% (para  $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ ,  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CBz}$ ,  $R_{10} = \text{Me}$ ).

#### Esquema 5

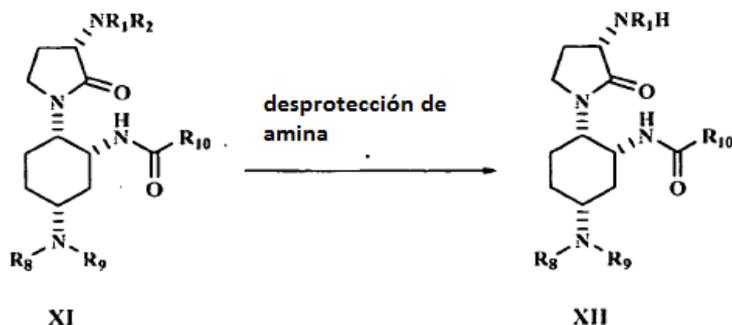
##### Aminación reductora de cetoamida **X** al aminoácido **XI**



A una solución seca de **X**, preferiblemente en diclorometano, se añade una amina primaria o secundaria, preferiblemente *tert*-butilamina (5 eq), seguido de un ácido Lewis, preferiblemente  $\text{TiCl}_2(\text{OPr-}i)_2$  (1,2 eq), de  $-20^\circ\text{C}$  a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla de imina resultante se calienta a  $10^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C}$  y se añade borano (1,1 - 1,2 eq) en forma de un complejo con sulfuro de dimetilo o THF, preferiblemente sulfuro de dimetilo. La mezcla de la reacción se agita durante 4 - 6 horas y después se añade acetato de etilo saturado con agua. Las sales de titanio se retiran por filtración y el producto **XI** se extrae del filtrado orgánico a agua en forma de su sal con un ácido acuoso, preferiblemente HCl 1N. Después se añade diclorometano y base acuosa, preferiblemente hidróxido de amonio concentrado, a la mezcla bifásica concentrada hasta que se ajusta el pH a 8,0 - 8,5. La fase de diclorometano rica en producto se separa después y se lava dos veces con solución de cloruro de amonio acuosa para retirar el isómero *trans* no deseado de **XI**, y finalmente con agua. El diclorometano se intercambia en acetato de etilo por destilación y **XI** cristaliza a partir de acetato de etilo tras el enfriamiento y adición de heptano. **XI** se aísla por filtración y secado en rendimiento al 65% - 70% (para  $R_1=\text{H}$ ,  $R_2=\text{CBz}$ ,  $R_8=\text{H}$ ,  $R_9=\text{tert-Bu}$ ,  $R_{10}=\text{Me}$ ).

#### Esquema 6

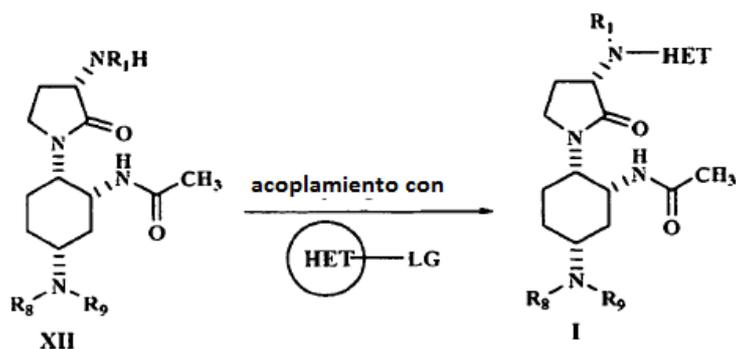
#### 15 Desprotección de amina de pirrolidonilo **XI**



La retirada del grupo de protección amina  $R_2$ , en el que  $R_2$  es  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$  o  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , se lleva a cabo por medio de la hidrogenación de una solución de **XI** en un alcohol, preferiblemente metanol, en presencia de catalizador Pd, preferiblemente Pd/C al 5% en peso durante varias horas. Después se retira el catalizador por filtración, y el metanol se intercambia en acetato de etilo por destilación. El producto **XII**, que cristaliza a partir de acetato de etilo tras el enfriamiento y la adición de heptano, se aísla por filtración y secado en rendimiento al 90% - 95% (para  $R_1=\text{H}$ ,  $R_2=\text{CBz}$ ,  $R_8=\text{H}$ ,  $R_9=\text{tert-Bu}$ ,  $R_{10}=\text{Me}$ ).

#### Esquema 7

#### Acoplamiento de amina **XII** con heterociclo que soporta un grupo saliente HET-LG



La síntesis del compuesto I se lleva a cabo por medio del acoplamiento de la pirrolidonilamina **XII** y un heterociclo que soporta un grupo saliente en presencia de una amina terciaria, preferiblemente trietilamina, en un disolvente compatible, tal como diclorometano, isopropanol o acetonitrilo, prefiriéndose diclorometano. Por lo tanto, todos los componentes se combinan y la solución se hace reaccionar durante 24 – 48 horas a temperatura ambiente. También se puede emplear una solución de componente heterocíclico bruto previamente preparada. Después de completar la reacción, el diclorometano se lava con ácido diluido, preferiblemente ácido acético acuoso al 5% en peso, la fase acuosa se separa y el diclorometano se intercambia después en acetato de etilo por destilación. El producto **I**, que cristaliza a partir de acetato de etilo tras el enfriamiento y la adición de heptano, se aísla por filtración y secado en rendimiento al 75% – 80% (para  $R_1=H$ ,  $R_8=H$ ,  $R_9=tert\text{-}Bu$ ,  $R_{10}=Me$ , H ET=6–(trifluorometil)quinazolin–4–ilo).

Para el procedimiento de esta invención, los materiales de partida están disponibles en el mercado o se pueden preparar fácilmente por parte de un experto habitual en la técnica. Los disolventes, temperaturas, presiones, materiales de partida que tienen los grupos deseados, y otras condiciones de reacción, se pueden seleccionar fácilmente como apropiados por un experto habitual en la técnica. El procedimiento se puede ampliar con el fin de preparar cantidades mayores del compuesto de la fórmula I, tales como en una instalación de producción comercial.

### Ejemplos

Los siguientes Ejemplos ilustran realizaciones de los compuestos y materiales de partida de la invención, y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

En su caso, las reacciones se realizaron en una atmósfera de nitrógeno seco (o argón). Para las reacciones anhidras, se utilizaron disolventes Dri-Solv de EM. Para otras reacciones, se utilizaron disolventes de calidad reactiva o de calidad HPLC. A menos que se indique otra cosa, todos los reactivos que se obtuvieron en el mercado se usaron tal como se recibieron.

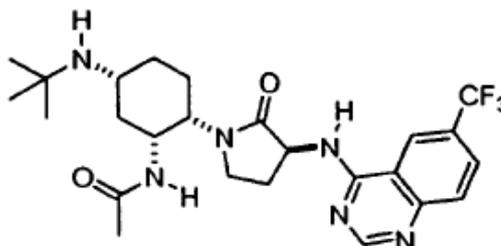
Las mediciones de CL/EM se obtuvieron usando un sistema de espectrómetro de masas cuadrupolo único híbrido Shimadzu HPLC/Waters ZQ. Los datos para el pico de interés se indican a partir de ionización por electronebulización en modo positivo. Los espectros RMN (resonancia magnética nuclear) se obtuvieron típicamente en instrumentos Bruker o JEOL de 400 MHz y 500 MHz en los disolventes indicados. Todos los desplazamientos químicos se indican en ppm a partir de tetrametilsilano con la resonancia del disolvente como patrón interno. Los datos espectrales RMN 1H se indican típicamente como sigue: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, s a = singlete ancho, d = doblete, dd = doblete de dobletes, t = triplete, c = cuadruplete, sept. = septuplete, m = multiplete, ap. = aparente), constantes de acoplamiento (Hz) e integración.

Un especialista en la técnica reconocerá las abreviaturas convencionales utilizadas en este documento, a través de la memoria descriptiva. Para facilidad de referencia, las abreviaturas incluyen, pero no se limitan necesariamente a: saturado = saturado, HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento, PA = porcentaje de área, KF = Karl-Fischer, TA = temperatura ambiente, mmol = milimoles, EMAR = espectroscopía de masas de alta resolución. TBTU = tetrafluoroborato de O-benzotriazol–2–il–N,N,N',N'–tetrametiluronio, MTBE = TBME = terc-butil metil éter, EDAC = clorhidrato de N–(3–dimetilaminopropil)–N'–etilcarbodiimida, EDC = N–(3–dimetilaminopropil)–N'–etilcarbodiimida, TEA = trietilamina, DPPA = difenil fosforil azida, IPA = alcohol isopropílico, TFA = ácido trifluoroacético, DCM = diclorometano, THF = tetrahidrofurano, DMF = N,N–dimetilformamida, BOP = hexafluorofosfato de (benzotriazol–1–iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio, EtOAc = acetato de etilo, DMSO = dimetilsulfóxido. °C = grados Centígrados, eq. = equivalente o equivalentes, g = gramo o gramos, mg = miligramo o miligramos, ml = mililitro o mililitros, h = hora u horas, M = molar, N = normal, min = minuto o minutos, MHz = megahercio, tlc = cromatografía de capa fina y v/v = relación volumen a volumen, y aproximadamente = aproximadamente.

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

### Ejemplo 1

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida



5

**Ejemplo 1, Etapa 1:** Se disolvió 2-benciloxicarbonilamino-7-oxo-6-aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo (89,6 g, 0,24 mol, véase: P. H. Carter, y col. solicitud PCT WO 2005/021500) en acetato de etilo (1,5 l) y la solución resultante se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 x 0,45 l) y NaCl saturado (1 x 0,45 l). La solución se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y después se filtró directamente en un matraz de fondo redondo de 3 l de 3 bocas. La solución se purgó con una inyección de nitrógeno directa antes de cargarse con Pd/C al 10% (13,65 g) en una atmósfera de nitrógeno. El matraz se evacuó y se recargó con hidrógeno; esto se repitió dos veces más. Se burbujeó hidrógeno a través de la solución durante 30 min y después la reacción se agitó en una atmósfera de H<sub>2</sub> durante 18 h. El matraz se evacuó, se recargó con nitrógeno y se cargó con catalizador recién preparado (6 g de Pd/C al 10%). Se burbujeó hidrógeno a través de la solución durante 30 min y después la reacción se agitó en una atmósfera de H<sub>2</sub> durante 18 h. El matraz se evacuó y se recargó con nitrógeno. La mezcla se filtró a través de Celite; después, la capa de filtro se lavó con acetato de etilo. El filtrado (volumen de ~1,6 l de EtOAc) se diluyó con acetonitrilo (0,3 l) y se cargó secuencialmente con L-N-Cbz-metionina (68 g, 0,24 mol), TBTU (77 g, 0,24 mol) y N,N-diisopropiletilamina (42 ml, 0,24 mol). La reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 4 h, tiempo durante el cual cambió de una suspensión a una solución transparente. La reacción se inactivó con la adición de NH<sub>4</sub>Cl saturado (0,75 l) y agua (0,15 l); la mezcla se diluyó adicionalmente con EtOAc (0,75 l). Las fases se mezclaron y se separaron y la fase orgánica se lavó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado (2 x 0,9 l) y NaCl saturado. (1 x 0,75 l). La solución se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró al vacío, dando 2-((S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(metiltio)butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo en forma de un aceite, que se recogió en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM para el pico principal: [M-Boc+H]<sup>+</sup> = 406,3; [M+Na]<sup>+</sup> = 528,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ 7,36 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 2,5 – 2,7 (m, 3H), 2,25 (m, 1H), 2,11 (s, 3H), 2,05 (m, 4H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 2H), 1,54 (s, 9H). También están presentes EtOAc [1,26 (t), 2,03 (s), 4,12 (c)] y N,N,N,N-tetrametilurea [2,83 (s)].

**Ejemplo 1, Etapa 2:** Una muestra de 2-((S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(metiltio)butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo (0,24 mol supuesto; véase el procedimiento previo) se disolvió en yodometano (1,250 g) y se agitó durante 48 h a la temperatura ambiente. La reacción se concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano y se concentró al vacío. Esto se repitió dos veces más. El lodo resultante se disolvió en diclorometano (0,4 l) y se vertió en una solución en agitación rápida de MTBE (4,0 l). Los sólidos amarillos resultantes se recogieron mediante filtración por succión y se secaron a alto vacío, proporcionando la sal sulfonio (179 g). Este material se recogió en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM para el pico principal: [M-Me<sub>2</sub>S+ H]<sup>+</sup> = 458,4; [M]<sup>+</sup> = 520,4. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 4,33 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,3 – 3,45 (m, 2H), 2,97 (s, 3H), 2,94 (s, 3H), 2,78 (m, 1H), 2,0 – 2,3 (m, 4H), 1,7 (m, 2H), 1,52 (s, 9H). También están presentes MTBE [1,18 (s), 3,2 (s)] e indicios de N,N,N,N-tetrametilurea [2,81 (s)].

**Ejemplo 1, Etapa 3:** Toda la sal sulfonio de la etapa anterior (0,24 mol supuesto) se disolvió en DMSO (2,0 l). La solución resultante se agitó en una atmósfera de nitrógeno a la temperatura ambiente y se cargó en porciones con carbonato de cesio (216 g). La suspensión se agitó a la temperatura ambiente durante 3 h y después se filtró para retirar los sólidos. La solución se dividió en porciones de ~0,22 l y se trató como sigue: la mezcla de reacción (~0,22 l) se diluyó con acetato de etilo (1,5 l) y se lavó sucesivamente con agua (3 x 0,5 l) y salmuera (1 x 0,3 l). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró al vacío. El 2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabiciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo deseado (90,8 g, 83%) se obtuvo en forma de una espuma microcristalina, libre de impurezas de tetrametilurea. CL/EM para el pico principal: [M-Boc+H]<sup>+</sup> = 358,4; [M+Na]<sup>+</sup> = 480,4. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,2 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,3 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,28–2,42 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,7–2,0 (m, 5H), 1,55 (s, 9H). Si se desea, este material se puede aislar en forma de un sólido mediante disolución en MTBE (1 volumen), adición a

heptano (3,3 volúmenes) y recogida del precipitado resultante.

**Ejemplo 1, Etapa 4:** Una solución en agitación de 2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabicyclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-terc-butilo (108 g, 0,236 mol) en THF (1 l) se cargó con hidróxido de litio monohidrato (21,74 g, 0,519 mol). Se añadió lentamente agua (0,3 l), de tal manera que la temperatura no excediera de 20°C. La reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche y los compuestos volátiles se retiraron al vacío. El pH se ajustó a ~4 mediante la adición de HCl 1 N (450 ml) y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Los precipitados blancos resultantes se recogieron por filtración y se lavaron con agua (2 x 1 l). El sólido se disolvió en diclorometano (1,5 l) y agua (1 l). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (0,7 l) y la solución resultante se calentó a reflujo durante 1 h. Después de enfriar a la TA, los sólidos se separaron y se recogieron mediante filtración. Estos sólidos se purificaron por recristalización en isopropanol, proporcionando el ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tercbutoxicarbonilamino) ciclohexanocarboxílico deseado en forma de un sólido de color blanco (104,5 g, rendimiento del 93%). CL/EM para el pico principal: [M-tBu+H]<sup>+</sup> = 420,2; [M-Boc+H]<sup>+</sup> = 376,2; [M+H]<sup>+</sup> = 476,2. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 3,45 – 3,6 (m, 2H), 2,99 (m, 1H), 2,41 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,6–1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

**Ejemplo 1, Etapa 5:** Un matraz de fondo redondo de 3 l se cargó con ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (75,5 g, 0,158 mol), EDC•HCl (33,5 g, 0,175 mol), 1-hidroxibenzotriazol (23,6 g, 0,175 mol) y diclorometano (1 l). La reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 h, tiempo durante cual cambió de una suspensión blanca a una solución transparente. Se burbujeó amoniaco (gas) a través de la solución hasta que el pH fue fuertemente básico (papel) y la reacción se agitó durante 10 min; esta adición de amoniaco se repitió y la reacción se agitó durante 10 minutos más. Se añadió agua. Antes de concentrarse al vacío, la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y salmuera. El residuo se suspendió con acetonitrilo (0,5 l) y después se concentró, dando (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxamida en forma de un sólido de color blanco (75,9 g, ~100%), que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM para el pico principal: [M-Boc+H]<sup>+</sup> = 375,3; [M+H]<sup>+</sup> = 475,4. [M-tBu+H]<sup>+</sup> = 419,3, RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,25 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,9 – 2,05 (m, 2H), 1,65 – 1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

**Ejemplo 1, Etapa 6:** La reacción se realizó en tres porciones iguales y se combinaron para el tratamiento acuoso. Un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 5 l se cargó con (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(terc-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxamida (25,3 g, 53 mmol), acetonitrilo (1,9 l) y 2,6 l de agua/hielo. La mezcla se agitó y se enfrió a 0°C. Se añadió diacetato de yodobenceno (25,77 g, 80 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h; se añadieron otros 0,5 eq. de diacetato de yodobenceno. La reacción se agitó durante 9 h (temperatura de reacción < 10°C). La mezcla se cargó con 8 eq. de N,N-diisopropiletilamina y 2 equiv. de anhídrido acético. Durante los treinta minutos siguientes, se añadieron 4 eq. de N,N-diisopropiletilamina y 2 eq. de anhídrido acético cada diez minutos hasta que la reacción se completó (HPLC). El acetonitrilo se retiró al vacío; algo de líquido se separó del residuo y esto se recogió por filtración. El residuo restante se extrajo con diclorometano (3 l, después 1 l). La fase orgánica se lavó secuencialmente con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera. Los sólidos recogidos se añadieron a la fase orgánica, junto con carbono activado (15 g). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 40°C antes de filtrarse y concentrarse al vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (1 l) y la solución resultante se agitó a 75°C durante 1 h antes de dejarse enfriar a la temperatura ambiente. Se separó un sólido y se recogió por filtración. Este sólido se purificó adicionalmente por recristalización: primero se disolvió en 0,5 l de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, después se concentró al vacío y después se recristalizó a partir de 1 l de EtOAc; esto se repitió tres veces. Los sólidos obtenidos a partir de aguas madre de antes se recristalaron tres veces usando el mismo procedimiento. Los sólidos combinados se recristalaron dos veces más en acetonitrilo (0,7 l), proporcionando 66 g (84%) de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (con una pureza de > 99,5% mediante HPLC). CL/EM para el pico principal: [M+H]<sup>+</sup> = 489,4; [M-tBu+H]<sup>+</sup> = 433,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ 7,3 – 7,4 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,6 (m, 2H), 2,44 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,87 – 2,05 (m, 4H), 1,87 (s, 3H), 1,55 – 1,7 (m, 2H), 1,46 (s, 9H). La fidelidad estereoquímica de la transposición de Hofmann se confirmó a través del análisis de la estructura de cristal de rayos X de este compuesto, como se muestra en la Figura 1.

**Ejemplo 1, Etapa 7:** A una solución de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de terc-butilo (100 g, 0,205 mol) en diclorometano (400 ml) se añadió TFA (400 ml) a -20°C. La solución de la reacción se agitó durante 2 h a la temperatura ambiente. El disolvente y la mayor parte del TFA se retiraron bajo presión reducida, y el residuo se diluyó con diclorometano (2 l) y solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuosa (2 l). El pH se ajustó a 10 con HCl 1N. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 1 l). La fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentró proporcionando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo en forma de un aceite (81 g, rendimiento al 100%). Esta amina se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

**Ejemplo 1, Etapa 8:** Una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (13,3 g, 34 mmol) y 3,5-di-*terc*-butilciclohexa-3,5-dien-1,2-diona (7,54 g, 34 mmol) en metanol (160 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución se concentró y se diluyó con acetona (132 ml) y agua (33 ml), seguido de la adición de Dowex-50WX8-200 (33 g). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Dowex-50WX8-200 se retiró por filtración y se lavó con diclorometano (300 ml). El filtrado se concentró al vacío para retirar la mayor parte de la acetona. El residuo se diluyó con diclorometano (200 ml) y se lavó con solución NaHCO<sub>3</sub> acuosa (200 ml) y salmuera (200 ml). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con diclorometano (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. El producto (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo se obtuvo en forma de un sólido (12 g, rendimiento al 90%) por cristalización en EtOAc (100 ml) y Hexano (200 ml). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7,99 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H), 7,44 (d, *J*=8,80 Hz, 1 H), 7,28 – 7,39 (m, 5 H), 5,03 (s, 2 H), 4,50 (s, 1 H), 4,31 (d, *J*= 12,10 Hz, 1 H), 4,18 (c, *J*=8,98 Hz, 1 H), 3,27 (m, 2 H), 2,82 (dd, *J*=15,12, 5,22 Hz, 1 H), 2,52 – 2,65 (m, 1 H), 2,40 (dd, *J*= 12,92, 4,67 Hz, 1 H), 2,15 – 2,31 (m, 2 H), 2,09 (d, *J*= 15,40 Hz, 1 H), 1,90 (m, 1 H), 1,81 (s, 3 H), 1,68 (m, 1 H), *m/z* 388,46 [M+H].

**Ejemplo 1, Etapa 9:** A una solución de TiCl<sub>4</sub> (1M en diclorometano, 36 ml, 36 mmol) en diclorometano (30 ml) a 0 °C se añadió Ti(OiPr)<sub>4</sub> (10,8 ml, 36 mmol). Después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. A una solución de (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (23,25 g, 60 mmol) en diclorometano (600 ml) se añadió *terc*-butilamina (30 ml, 300 mmol) a temperatura ambiente, seguido de la adición de la solución de TiCl<sub>4</sub>/Ti(OiPr)<sub>4</sub> a -50 °C. La reacción se controló en HPLC por medio de la inactivación de una muestra de HPLC con NaBH<sub>4</sub> en metanol). La solución se enfrió a 10 °C y se añadió BH<sub>3</sub>•SMe<sub>2</sub> (1M en diclorometano, 66 ml, 66 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h después se inactivó con solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 ml). Se filtró el precipitado. Las dos fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (600 ml). Las fases de diclorometano combinadas se extrajeron con HCl 1N dos veces (150 ml y 15 ml). (El producto y el isómero *trans* no deseado estaban ambos en la fase acuosa ácida.) Las fases acuosas ácidas combinadas se neutralizaron con solución acuosa de NH<sub>4</sub>OH 12M (12 ml) a pH=8 y se extrajeron con diclorometano dos veces (600 ml, 450 ml). (El producto estaba en fase inorgánica, mientras que el isómero *trans* estaba todavía en la fase acuosa.) Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl 3 veces (3 x 200 ml) hasta que no se dejó ningún isómero *trans* en la fase orgánica. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. El residuo se purificó por cristalización en EtOAc/Hexano (200 ml / 800 ml) proporcionando el deseado (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(*terc*-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo deseado (20,80 g, rendimiento al 78%) en forma de un sólido de color blanco con pureza al 99,5%. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 8,76 (s, 1H), 7,27 – 7,46 (m, 6 H), 5,03 (m, 2 H), 4,14 (m, 1 H), 4,07 (q, *J*=8,80 Hz, 1H), 3,83(m, 1H), 3,36 (m, 2H), 2,91 (s, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,04 (m, 1H), 1,78 (s, 3H), 1,41 – 1,74 (m, 7H), 1,04 (s, 9H), *m/z* 445,54 [M+H].

**Ejemplo 1, Etapa 10:** A una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(*terc*-butilamino)-ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (43,3 g, 98 mmol) en metanol (400 ml) se le añadió Pd/C húmedo al 10% (4,34 g). La mezcla se evacuó y se volvió a filtrar con hidrógeno con un globo de hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla se filtró y se lavó con metanol (500 ml) y se concentró en vacío hasta que se secó. El producto bruto obtenido se destiló con IPA (2 x 100 ml) a presión reducida proporcionando el producto N-((1R,2S,SR)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butilamino)ciclohexil)acetamida en forma de un aceite (30 g, rendimiento al 98%). Esta amina se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

**Ejemplo 1, Etapa 11:** A una solución de N-((1R,2S,SR)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butilamino)ciclohexil)acetamida (30 g, 97 mmol) en IPA (400 ml) se le añadió TEA (27 ml, 195 mmol) y 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (25 g, 107 mmol); véase: P. H. Carter y col., solicitud PCT WO 2005/021500). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una noche a 70 °C durante 1 hora. La solución resultante se concentró a presión reducida hasta que se secó. El residuo se disolvió en diclorometano (1 l) y se extrajo con solución de ácido acético I (preparada combinando 700 ml de agua y 22,6 ml de ácido acético glaciado) dos veces (500 ml, 200 ml). La fase acuosa ácida (pH 4 – 5) se extrajo con diclorometano (2 x 300 ml). La fase de diclorometano se extrajo con solución de ácido acético II (300 ml; preparada combinando 300 ml de agua con 4 ml de ácido acético glaciado). Las fases de ácido acético combinadas se basificaron con NaOH 1M a pH > 12 y se extrajeron con diclorometano (3 x 700 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron y se concentraron proporcionando el producto bruto en forma de un sólido (45,6 g, rendimiento al 93%). El producto bruto se purificó por recristalización a partir de EtOAc (400 ml)/Hexano (900 ml) proporcionando 42,86 g (88%) de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida con el 99,7% pureza. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9,71 (1 H, s, s.), 9,02 (1 H, s), 8,71 (1 H, d, *J*=7,97 Hz), 8,59 (1 H, s), 8,04 (1 H, dd, *J*=8,66, 1,79 Hz), 7,88 (1 H, d, *J*=8,52 Hz), 4,91 – 5,13 (1 H, m), 4,30 – 4,57 (1 H, m), 3,86 (1 H, dt, *J*=11,89, 3,71, 3,64 Hz), 3,43 – 3,57 (1 H, m), 3,35 – 3,45 (1 H, m), 3,04 (1 H, t, *J*=3,85 Hz), 2,23 – 2,40 (1 H, m), 2,05 – 2,22 (1 H, m), 1,90 – 1,98 (1 H, m), 1,86 – 1,93 (3 H, m), 1,50 – 1,78 (5 H, m), 0,98 – 1,15 (9 H, m), RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 171,23, 169,35, 159,54, 156,87, 151,17, 128,97, 128,20, 125,76 (1 C, c, *J*=30,52 Hz), 121,55 (1 C, s, s.), 124,04 (1

C, c,  $J=272,11$  Hz), 114,31, 53,26, 52,39, 50,81, 47,56, 45,70, 42,77, 34,52, 32,17, 29,14 (3 C, s), 26,49, 23,29, 20,30, RMN  $^{19}\text{F}$  (471 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm  $-60,34$  (s),  $m/z$  507,0 [M+H], Anal, Calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_2\text{F}_3$ : C, 59,27; H, 6,56; N, 16,59; F, 11,25 Encontrado: C, 59,44; H, 6,64; N, 16,74; F, 10,99,

### Preparación alternativa del Ejemplo 1

5 **Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 1:** Un matraz de fondo redondo de 3 bocas secado en horno se equipó con una barra de agitación seca, un condensador de reflujo seco y dos tabiques. Después de enfriar bajo  $\text{N}_2$ , el matraz se cargó secuencialmente con ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benziloxycarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butoxycarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (60 g, 126 mmol; Véase el Ejemplo 1, Etapa 4), acetonitrilo (800 ml), N-metilmorfolina (27,7 ml, 252 mmol), y azida de difenilfosforilo (29,9 ml, 139 mmol). La reacción se agitó a TA durante 1 h y 40 min, momento en el que se añadió 2-trimetilsililetanol (90 ml, 631 mmol). La reacción se dejó calentar, y alcanzó reflujo 30 minutos más tarde. Se dejó a reflujo durante 1 h, momento en el que se dejó enfriar a 50 °C gradualmente y después se enfrió a 15 °C con enfriamiento externo. La reacción se inactivó con la adición de ácido acético (1,734 ml, 30,3 mmol). La reacción se concentró en vacío y después se disolvió en EtOAc (1,2 l). Se lavó secuencialmente con agua (1 x 0,3 l),  $\text{NaHCO}_3$  saturado (2 x 0,3 l), HCl 1N (1 x 0,3 l), y salmuera (2 x 0,3 l). La fase orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtró y se concentró en vacío. Apareció un sólido muy temprano en el proceso de concentración. Después de que se retiraran los compuestos volátiles, se añadió 800 ml de EtOAc/Hexanos al 10%, y la mezcla se agitó durante toda la noche. El sólido se recogió y se secó para proporcionar (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benziloxycarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-((2-trimetilsilil)etoxicarbonilamino)ciclohexilcarbamato de *terc*-butilo (60,5 g, 102 mmol, rendimiento al 81%). HPLC mostró que el material era puro al 72%, con dos impurezas del 12%. Este material se tomó en la siguiente etapa sin purificación. El filtrado se concentró más tarde para proporcionar otros 4,38 g de producto. Rendimiento total = 64,9 g (87%).

15 **Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 2:** Un matraz de fondo redondo de 500 ml seco se equipó con una barra de agitación y se cargó secuencialmente con (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benziloxycarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-((2-trimetilsilil)etoxicarbonilamino)ciclohexilcarbamato de *terc*-butilo (60,5 g),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (180 ml), y una solución de monohidrato del ácido para-toluenosulfónico (19,48 g, 102 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (120 ml) y metanol (30 ml). La mezcla se colocó en un evaporador de rotación y se eliminó el grueso de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (temperatura de baño aproximadamente 20 °C). Cuando la mezcla empezó a espumar, se liberó el vacío, y la temperatura del baño aumentó a 46 °C (la temperatura varió entre 44 °C and 51 °C; se controló con la adición de hielo externo). La mezcla se rotó a esta temperatura durante exactamente una hora (la evolución de gas era visible por todas partes) y después diluyó con EtOAc (1 l). La fase orgánica se lavó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,5 N (2 x 250 ml). Los lavados acuosos se combinaron y se apartaron. La fase orgánica se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado (1 x 250 ml) y NaCl saturado (1 x 250 ml); Estos lavados acuosos se descartaron. Los lavados iniciales de  $\text{NH}_4\text{OH}$  combinados se volvieron a extraer con EtOAc (1 x 250 ml), y este extracto orgánico se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado (1 x 60 ml) y NaCl saturado (1 x 60 ml). Todos los extractos orgánicos se combinaron, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron, y se concentraron. El residuo se purificó por elución a través de un lecho de  $\text{SiO}_2$  (13 cm de ancho x 7,5 cm de alto). El primer eluyente era EtOAc puro (aproximadamente 4 l). El segundo eluyente era 1:9 ( $\text{NH}_4\text{OH}$  al 10% en MeOH) /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (aproximadamente 5 l). Las fracciones que contenían el producto deseado se reunieron en conjunto y se evaporaron para proporcionar el 2-(trimetilsilil)etil(1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benziloxycarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato deseado (31,6 g, 64,4 mmol, rendimiento al 63 %).

30 **Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 3:** Una solución en agitación de (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benziloxycarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (400 mg, 0,82 mmol) en acetonitrilo (3 ml) se cargó secuencialmente con se cargó secuencialmente con diisopropiletilamina (315,8 mg, 3 eq.) y bromoacetonitrilo (109,5 mg, 1,1 eq.). La mezcla se agitó a 40 °C durante 30 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando 1,5% de metanol en diclorometano en forma de eluyente. El (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxycarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(cianometilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo deseado se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (400 mg, 93%). CL/EM encontrado  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 530$ .

40 **Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 4:** Una solución en agitación de 2-(trimetilsilil)etil(1R,2S,SR)-2-((S)-3-benziloxycarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(cianometilamino)ciclohexilcarbamato (400 mg, 0,76 mmol) en diclorometano (5 ml), se enfrió a 0 °C y se cargó con m-CPBA (372,6 mg, 2,2 eq) en porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se añadió solución  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  saturada (3 ml) y solución  $\text{NaHCO}_3$  saturada (3 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h. La mezcla se diluyó con diclorometano (80 ml), se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturada (20 ml) y salmuera (20 ml). La solución se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró *in vacuo*. El residuo obtenido se disolvió en metanol (5 ml) y la solución se cargó con  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (262,7 mg, 5 eq). La mezcla se agitó a 60 °C durante 2,5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con diclorometano (80 ml) y se filtró a través de un lecho de celita. El filtrado se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado (2 x 20 ml). Los lavados acuosos se extrajeron con diclorometano (30 ml). Las fases de diclorometano se combinaron y se lavaron con salmuera (30 ml). La solución se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró *in vacuo*.

proporcionando 2-(trimetilsilil)etil(1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(hidroxiaminolciclohexilcarbamato (350 mg, 91%). CL/EM encontrado  $[M + H]^+ = 507$ .

**Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 5:** Una solución de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(hidroxiaminolciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (350 mg, 0,69 mmol) en acetona (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se concentró *in vacuo*. El residuo se disolvió en THF anhidro (7 ml) y se enfrió a 0°C. Una solución de MeMgBr (1,1 ml, 3M en éter dietílico, 5 eq) se añadió gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La reacción se inactivó con agua (5 ml) a 0°C. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (100 ml) y se filtró a través de un lecho de celita. El filtrado se lavó con salmuera (30 ml). La solución se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró *in vacuo*. El residuo se disolvió en 2 ml de acetonitrilo y se añadió 1 ml de CS<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando el 1,5% de metanol en diclorometano en forma del eluyente, proporcionando el (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo deseado (160 mg, 42%). CL/EM encontrado  $[M + H]^+ = 547$ .

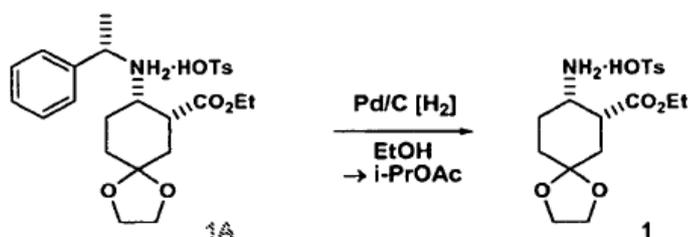
**Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 6:** Una solución en agitación de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benziloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (100 mg, 0,183 mmol) en diclorometano (3 ml) se cargó con ácido trifluoroacético (2 ml). La reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y se concentró *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (50 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (20 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 30 ml). Las fases de diclorometano se combinaron y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado, se filtraron, y se concentraron *in vacuo* proporcionando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(*terc*butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (66 mg, 90%). CL/EM encontrado  $[M + H]^+ = 403$ .

**Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 7:** Una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(*terc*-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (22 mg, 0,055 mmol) en diclorometano (2 ml) se cargó secuencialmente con trietilamina (11,1 mg, 2 eq) y anhídrido acético (6,1 mg, 1,1 eq). La reacción se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano (50 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (20 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró, y se concentró *in vacuo* proporcionando (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(*terc*-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (22 mg, 90%). CL/EM encontrado  $[M + H]^+ = 445$ .

**Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 8:** A una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(*terc*-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (22 mg, 0,05 mmol) en metanol (2 ml) se añadió Pd(OH)<sub>2</sub> (20 mg de catalizador húmedo al 50%). El matraz se evacuó y se volvió a rellenar con hidrógeno a partir de un globo de hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se retiró el catalizador por filtración. El filtrado se concentró *in vacuo* proporcionando N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butilamino)ciclohexil)acetamida (13 mg, 85%). CL/EM encontrado  $[M + H]^+ = 311$ .

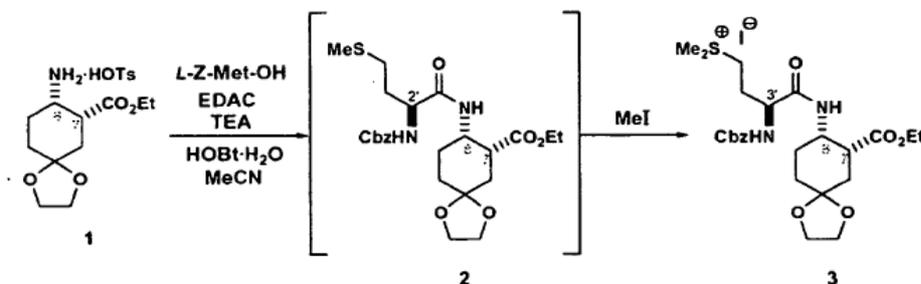
**Ejemplo 1, Preparación Alternativa, Etapa 9:** A una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(*terc*-butilamino)ciclohexil)acetamida (70 mg, 0,225 mmol) en isopropanol (3 ml) se añadió 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (63 mg, 1,2 eq.) y trietilamina (56,9 mg, 2,5 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El disolvente se retiró bajo presión reducida. El residuo se purificó con HPLC preparativo proporcionando el compuesto del título en forma de su sal bis-TFA (110 mg, 67%). CL/EM encontrado  $[M + H]^+ = 507$ .

#### Segunda preparación alternativa del ejemplo 1

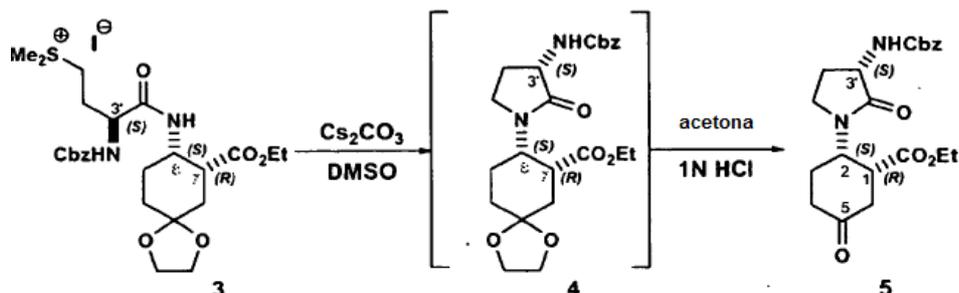


**Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 1a:** Se cargaron en un hidrogenador sal 4-toluenosulfonato de (7R,8S)-8-((S)-1-fenil-etilamino)-1,4-dioxo-espiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 1A (1417 g, 2,8 mol, consúltese: documento WO2004098516, preparado de forma análoga a la patente de Estados Unidos 6.835.841), etanol (200 prueba, 11,4 l) y catalizador Pd/C al 10% (al 50% humedad, 284 g). La mezcla se hizo inerte con nitrógeno, después se presurizó con gas hidrógeno (45 psig) y se agitó energicamente a aprox. 40°C hasta que el

material de partida se consumió (HPLC). La suspensión se enfrió, se purgó con gas nitrógeno y el catalizador se retiró por filtración mientras se hacía inerte. El catalizador gastado se lavó con etanol (4,3 l). El filtrado y los lavados se combinaron y se concentraron al vacío hasta un volumen de 2 – 3 l, manteniendo mientras el lote entre 40°C – 60°C. Se cargó acetato de isopropilo (5 l) y la mezcla se concentró hasta un volumen de ~2 l hasta que la mayoría del etanol se eliminó (< 0,5%) y el contenido en humedad residual fue < 1.000 ppm. El volumen del lote se ajustó a ~7,5 l mediante la adición de acetato de isopropilo. La mezcla se calentó a 80°C hasta que se hizo transparente y después se enfrió a 65°C – 70°C. Se añadieron cristales seminales de 1 (5 g) y el lote se enfrió a 50°C durante 2 horas, después se enfrió a 20°C durante 4 horas más y se mantuvo durante ~10 horas. La suspensión resultante se filtró y la torta se lavó con acetato de isopropilo (2 l). El producto se secó al vacío a ~35°C hasta que los compuestos volátiles se redujeron por debajo del ~1% (LOD). Se obtuvo sal 4-toluenosulfonato de (7R,8S)-8-amino-1,4-dioxa-espiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 1 en forma de un sólido cristalino de color blanco (936 g, rendimiento del 83%, pureza mediante HPLC: 99,8%). RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8,14 – 7,89 (s a, 3H), 7,75 (d, J 9,0 Hz, 2H), 7,15 (d, J 8,0 Hz, 2H), 4,22 – 4,04 (m, 2H), 4,01 – 3,77 (m, 4H), 3,55 – 3,43 (m, 1H), 3,20 – 3,13 (m, 1H), 2,40 – 2,27 (m, 4H), 2,21 – 1,94 (m, 2H), 1,81 – 1,51 (m, 3H), 1,23 (t, J 7,0 Hz, 3H); HPLC: Waters Xterra EM C18 4,6 mm x 150 mm d.i., tamaño de partículas de 3,5 µm, NH<sub>4</sub>OH al 0,05% (ACN al 5%, H<sub>2</sub>O al 95%, disolvente A), a NH<sub>4</sub>OH al 0,05% (ACN al 95%, H<sub>2</sub>O al 5%, disolvente B), del 5% de B al 20% de B en 10 minutos, cambiado al 95% de B a los 25 minutos y después cambiado al 5% de B al 1 minuto; 11,1 minutos (aminoéster 1).

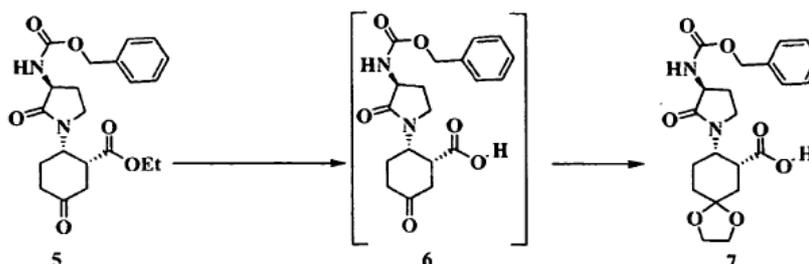


**Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 1b:** Se combinó sal de 4-toluenosulfonato (7R,8S)-8-amino-1,4-dioxaespiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 1 (450,1 g); el producto de desprotección reductora de un compuesto conocido, véase R. J. Cherney, documento WO2004/098516 y G. V. Delucca & S. S. Ko, documento WO2004/110993) con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)carbodiimida (236,3 g), 1-hidroxi benzotriazol hidrato (171,9 g), N-carbobenciloxi-L-metionina (333,4 g) y acetonitrilo (3,1 l). A la mezcla agitada se le añadió trietilamina (249,5 g) por debajo de 30°C. Después de que la reacción se completara (HPLC), la mezcla se diluyó con acetato de etilo (8,2 l) y se lavó con solución de bicarbonato potásico acuoso al 5% (2 x 4,5 l) seguido de agua (4,5 l). La fase orgánica se separó y se concentró a presión reducida, obteniendo una solución de (7R,8S)-8-((S)-2-benciloxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butirilamino)-1,4-dioxaespiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 2 (1,4 l). Se añadió yoduro de metilo (2,39 kg), el recipiente se protegió de la luz y la mezcla se mantuvo en agitación lenta durante aprox. 24 h. Al precipitado amarillo espeso se le añadió terc-butil metil éter (2,7 l) y la mezcla se mantuvo durante aprox. 1 h. El producto se aisló por filtración y la torta se lavó con terc-butil metil éter (2 x 1,4 l) y después se secó al vacío, produciendo yoduro de [(S)-3-benciloxi-carbonilamino-3-((7R,8S)-7-etoxicarbonil-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-ilcarbamoil)-propil]-dimetilsulfonio 3 (671,4 g, rendimiento de ~94%) en forma de un sólido de color blanquecino (pureza del 99,9% por HPLC).

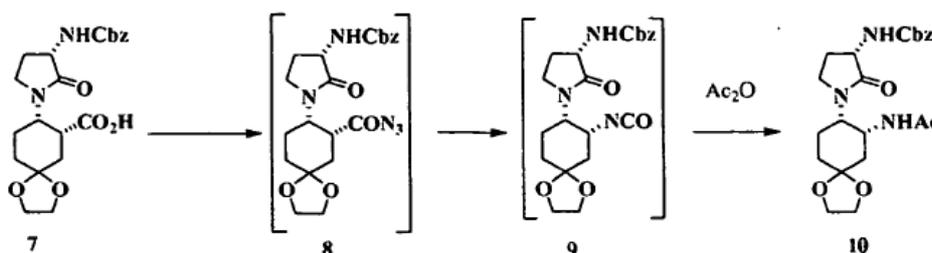


**Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 2:** Se combinaron en un reactor equipado con una torre de lavado la sal sulfonio 3 (619,4 g), carbonato de cesio (416,8 g) y dimetilsulfóxido anhidro (6,2 l) para neutralizar los sulfuros volátiles. Se mantuvo en agitación enérgica hasta que se obtuvo la conversión completa (HPLC). Se añadió acetato de etilo (12,4 l), seguido de salmuera al 20% (3 l). La fase orgánica se separó, se lavó dos veces con

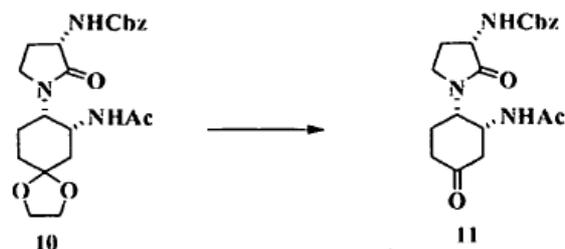
salmuera (2 x 3 l) y se evaporó, obteniendo una solución de (7R,8S)-8-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-1,4-dioxaspiro [4.5]decano-7-carboxilato de etilo 4 en acetato de etilo (~0,8 l). Se añadió acetona (2,55 l) seguido de solución acuosa 0,5 M de ácido clorhídrico (2,3 l). Con buen mezclado, la solución se calentó de 50°C a 60°C hasta que se completó la conversión de 4 a (1R,2S)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-oxo-ciclohexanocarboxilato de etilo 5 (HPLC). La mezcla se concentró a presión reducida mientras permanecía por debajo de 40°C, se enfrió a ~30°C y se añadió agua (4,1 l). La suspensión resultante se enfrió de 5 a 10°C y se agitó durante ~1 hora. El producto se filtró y la torta se lavó con agua (2 x 2,5 l). Después de la destilación, la torta se secó a un peso constante por debajo de 40°C en un horno de vacío. Se obtuvo ciclohexanona 5 (272 g, rendimiento del 70%) (pureza del 98,7% por HPLC).



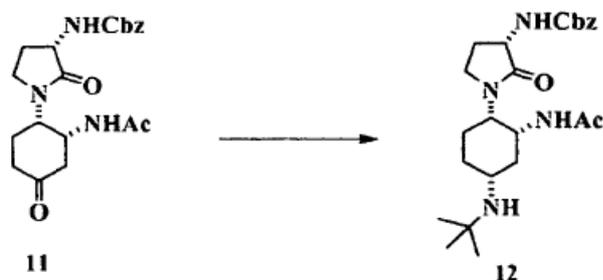
**Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 3:** Se suspendió ciclohexanona 5 (100 g) en THF (500 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió NaOH 1N (271 g) a 0°C – 5°C y la mezcla bifásica se agitó a  $\leq 5^\circ\text{C}$  durante al menos una hora. Se añadió MTBE (500 ml) y se separaron las fases. La fase acuosa del fondo se lavó otra vez con MTBE (500 ml) y se separaron las fases. Se cargó diclorometano (500 ml) a la fase acuosa rica en producto, y la mezcla se enfrió a 0°C. Se cargó HCl 3N (156 g) manteniendo  $\leq 5^\circ\text{C}$ . Después de agitar durante al menos 10 min, la mezcla se calentó a 20°C – 25°C, y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (100 ml). Las fases orgánicas se combinaron y el disolvente se intercambiaba en tolueno a través de destilación. El volumen de la solución de tolueno se ajustó a aproximadamente 1 l, y se añadió monohidrato del ácido p-toluenosulfónico (0,24 g). Se añadió etilenglicol (16,22 g), y la mezcla se destiló a presión atmosférica hasta que se completó la formación del compuesto 7 y el volumen del recipiente era aproximadamente 500 ml – 700 ml. La solución se enfrió a aproximadamente 70°C, y se añadió acetato de etilo (500 ml) manteniendo aproximadamente 70°C. La mezcla se enfrió y se filtró proporcionando 73 g (rendimiento al 70%) del compuesto 7, ácido (7R,8S)-8-((3S)-3-(((benziloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaspiro[4.5]decano-7-carboxílico.



**Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 4:** A una suspensión del compuesto 7 (147 g) en tolueno seco (370 ml) se cargó trietilamina (32,7 g) a 15°C – 25°C. Después de que la suspensión se convirtiera en solución después de agitación durante 10 – 15 minutos a 25°C, el matraz se enfrió a -10°C y se cargó clorofornato de isobutilo (44,1g) a -10° – 0°C. La mezcla se agitó a -10° – 0°C durante aproximadamente 30 min. Se añadió una solución de azida de sodio (42 g) y bromuro de tetrabutilamonio (5,2 g) en agua (130 ml) a -10° – 0°C. La suspensión bifásica se agitó enérgicamente durante al menos una hora y se añadió tolueno (1750 ml) seguido de agua (300 ml). Las dos fases se agitaron durante al menos 10 min y la fase orgánica superior se separó y se secó con cribas moleculares de 4Å. Se añadió anhídrido acético (76 ml) y ácido acético (28 ml) y la solución se calentó a 80°C – 90°C durante 1 – 4 horas, hasta que se detectó <2 AP de intermedio 9 por HPLC. El disolvente se destiló parcialmente a aproximadamente dos tercios del volumen inicial bajo presión atmosférica, la solución se enfrió a temperatura ambiente y la suspensión resultante se agitó durante 16 horas. Se añadió lentamente heptano (350 ml) y la suspensión se agitó durante 1 hora. Los sólidos se filtraron, se lavaron con tolueno / heptano 4:1 (300 ml), y se secaron proporcionando 109 g (rendimiento al 78%) del compuesto 10, ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.



5 **Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 5:** A una solución del compuesto **10** (109 g) en acetona (760 ml) se cargó HCl 1N (760 ml). La mezcla se calentó a 50°C durante 2,5 horas. La acetona se destiló a presión reducida y el producto se extrajo con diclorometano dos veces 1 x 1 l y 1 x 0,5 l. Las fases de diclorometano se combinaron y el diclorometano se intercambió en acetato de etilo por destilación hasta que el punto de ebullición en el recipiente alcanzó 78°C y el volumen final era aproximadamente 10 ml/g de la entrada del compuesto **10**. La suspensión de acetato de etilo se enfrió a temperatura ambiente, se agitó durante 16 horas y los sólidos se filtraron y se lavaron con acetato de etilo (400 ml). El sólido se secó proporcionando 84 g (rendimiento al 87%) del compuesto **11**, ((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.



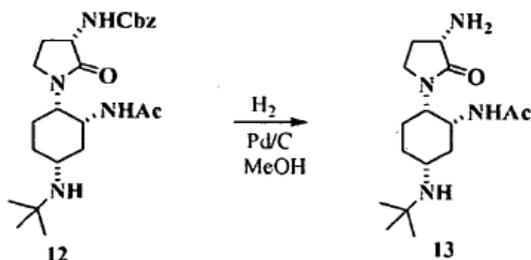
10 **Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 6:** El reactivo  $\text{TiCl}_2(\text{OPr})_2$  se pre-formó por medio de la adición de  $\text{Ti}(\text{OPr})_4$  (11,5 ml) a una solución de  $\text{TiCl}_4$  1M en diclorometano (39 ml) a 5°C – 10°C y agitación subsiguiente a temperatura ambiente durante 15 min. El compuesto **11** (25 g) se disolvió en diclorometano (500 ml) y se añadió t-butilamina (34 ml) a temperatura ambiente. Después de 10 min la solución se enfrió a de –25°C a –20°C y la solución de reactivo de titanio preformada se añadió a una temperatura por debajo de –20°C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. Se tomó una muestra para confirmar la formación completa de imina por mini-inactivación con borohidruro de sodio en metanol (la ausencia de alcoholes indicó el consumo completo de la cetona de partida **11**). Después se añadió sulfuro de dimetilo borano (7,0 ml) at 0°C – 5°C y la mezcla de la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante al menos 5 horas. El diclorometano se evaporó parcialmente (aproximadamente la mitad) bajo presión reducida y se añadió acetato de etilo húmedo (300 ml, preformado agitando acetato de etilo con agua) en 30 – 60 min. La suspensión resultante se agitó durante al menos 4 h, los sólidos se filtraron y se lavaron varias veces con diclorometano hasta que no más del 5% M del producto se retenía en la torta. El filtrado y los lavados se combinaron, se añadió HCl 1N (200 ml) y la mezcla bifásica se agitó durante al menos 30 min (la evolución de gas cesó después de ~20 min). La fase acuosa rica en producto (fase superior) se separó y se añadió diclorometano (500 ml). Se añadió hidróxido de amonio concentrado a la mezcla bifásica concentrada hasta que el pH se ajustó a 8 – 8,5 (~15 ml). La fase orgánica se separó y se lavó 2 x 100 ml con cloruro de amonio al 14% en peso, para eliminar el isómero trans no deseado del compuesto **12**, y finalmente con agua (25 ml). El diclorometano se intercambió en acetato de etilo por destilación bajo presión normal hasta que el punto de ebullición del recipiente alcanzó los 78°C y el volumen final era aproximadamente 5 ml/g de la entrada del compuesto **11** (~140 ml). La solución se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió heptano (250 ml) lentamente a 40°C – 50°C y el compuesto **12** empezó a cristalizar. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y los sólidos se filtraron, se lavaron con heptano (100 ml) y se secaron proporcionando 20,1 g (rendimiento al 70%) del compuesto **12**, ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(*tert*-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, en forma de cristales esponjosos de color blanco.

15

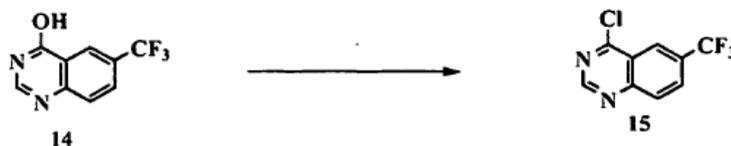
20

25

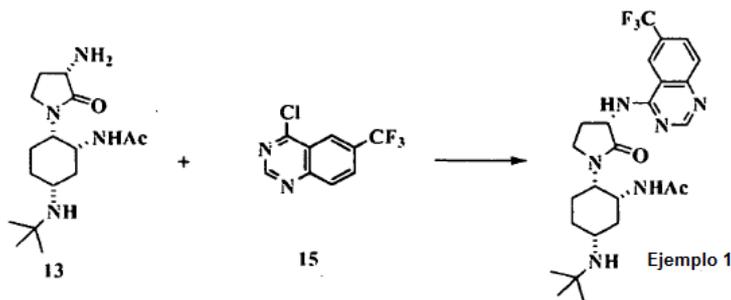
30



5 **Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 7:** El compuesto **12** (20 g) se disolvió en metanol (400 ml) y se añadió catalizador Pd/C al 5% (1,8 g, 9% en peso). La mezcla se hidrogenó a 25°C y 25 psig durante 3 horas. El catalizador se retiró por filtración, y el metanol se intercambiaba en acetato de etilo por destilación continua. El producto cristalizó a partir de acetato de etilo (160 ml) después de enfriamiento. Se añadió heptano (160 ml) a 25°C, la suspensión se agitó durante 1 hora y el producto se filtró, se lavó con heptano y se secó proporcionando 12,8 g (rendimiento al 94%) del compuesto **13**, *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-2-((3*S*)-3-amino-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(*tert*-butilamino)ciclohexil)acetamida.



10 **Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 8:** Se suspendió 6-(trifluorometil)-4-quinazolinol, **14** (5 g; véase P. H. Carter, y col. Solicitud de PCT WO 2005/021500) en diclorometano (100 ml). Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (4,2 ml, 1,05 eq) y DMF (0,4 ml, 0,2 eq). Después se añadió cloruro de oxalilo (3,0 ml, 1,5 eq) a la suspensión agitada a 20°C – 25°C bajo enfriamiento (adición exotérmica). La suspensión de color naranja se agitó a 30°C – 35°C durante 2 horas. Se observó evolución de gas constante durante ~1,5 horas, momento en el  
15 que la suspensión se volvió una solución naranja. Después de enfriar a 20 °C, la solución de la reacción se añadió gota a gota a K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> acuoso al 20% (50 ml) bajo agitación enérgica y evolución de gas. La fase orgánica inferior se separó y se lavó una vez más con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> acuoso al 20% (50 ml). La solución orgánica se usó como es para la siguiente etapa en 16h.



20 **Ejemplo 1, Segunda preparación alternativa, Etapa 8:** A una solución de **15** en diclorometano (22 ml, 5,5 mmol), se añadió el sólido **13** (1,55 g, 5 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió trietilamina (1,4 ml, 11 mmol) y la mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua (10 ml), las dos fases se agitaron durante 10 min y se separó la fase orgánica. Se intercambiaba diclorometano en acetato de etilo por destilación continua hasta que el punto de ebullición del recipiente alcanzó los  
25 78°C y el volumen final era aproximadamente 10 ml/g de la entrada del compuesto **13** (~15 ml). La suspensión se enfrió a temperatura ambiente, se añadió heptano (15 ml) lentamente y la suspensión se agitó durante 16 h. Los sólidos se filtraron, se lavaron con heptano/acetato de etilo 1:1 (5 ml) y se secaron proporcionando 1,83 g (rendimiento al 72 %) de cristales de color beige (forma N-2 por XRD) de *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(*tert*-butilamino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, Ejemplo 1.

30 **Ejemplo 2**

**Formas cristalinas de *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(*tert*-butilamino)-2-((*S*)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida**

Diversas formas de cristal de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, se prepararon y se caracterizaron como se describe a continuación.

### Procedimientos de Caracterización de las Formas

#### 5 Datos de un monocristal

Los datos se recogieron en un difractor Bruker-Nonius (BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison. Documento WI 53711 Estados Unidos) de serie CAD4. Los parámetros de celdilla unitaria se obtuvieron a través de análisis por mínimos cuadrados de los ajustes del difractor experimental de 25 reflexiones de ángulo elevado. Las intensidades se midieron usando radiación Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) a una temperatura constante con la técnica de barrido variable de  $\theta-2\theta$  y se corrigieron sólo para los factores de polarización de Lorentz. Los recuentos de fondo se recogieron en los extremos del barrido para la mitad del tiempo del barrido. Como alternativa, se recogieron los datos de un monocristal en un sistema Bruker-Nonius Kappa CCD 2000 usando radiación Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). La indexación y el procesamiento de los datos de intensidad medidos se realizaron con el paquete de software HKL2000 (Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) en *Macromolecular Crystallography*, eds. Carter, W.C. Jr & Sweet, R.M. (Academic. Nueva York), Vol. 276, pág. 307 – 326) en el conjunto de programas Collect. (Collect Data collection and processing user interface: Collect: Data collection software, R. Hooft, Nonius B.V., 1998,). Como alternativa, los datos de un monocristal se recogieron en un sistema Bruker-AXS APEX2 CCD usando radiación Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). La indexación y el procesamiento de los datos de intensidad medidos se realizaron con el paquete de software/conjunto de programas APEX2 (APEX2 Data collection and processing user interface: APEX2 User Manual, v1.27; BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 5371 Estados Unidos).

Cuando se indicó, los cristales se enfriaron en la corriente fría de un sistema Oxford cryo (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: J. Cosier and A.M. Glazer, *J. Appl. Cryst.*, 1986, 19, 105) durante la recogida de datos.

Las estructuras se resolvieron mediante procedimientos directos y se refinaron en base a las reflexiones observadas usando el paquete de software SDP (SDP, Structure Determination Package, Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716, Factores de dispersión, incluyendo  $f'$  y  $f''$ ), en el programa SDP se tomaron "International Tables for Crystallography", Kynoch Press, Birmingham, Inglaterra, 1974; Vol. IV, Tablas 2,2A and 2,3,1) con pequeñas modificaciones locales o los paquetes cristalográficos MAXUS (solución maXus y refinamiento de paquete de software: S. Mackay, C.J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. maXus: un programa informático para la solución y refinamiento de estructuras de cristales a partir de datos de difracción o SHELXTL4. Los parámetros atómicos de derivación (factores de coordinación y temperatura) se refinaron a través de una matriz de mínimos cuadrados completa. La función minimizada en los refinamientos fue  $\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2 / R$  se definió como  $\sum (|F_o| - |F_c|) / \sum |F_o|$  mientras  $R_w = [\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2 / \sum_w |F_o|^2]^{1/2}$  en la que  $w$  es una función de ponderación apropiada basada en los errores de intensidades observados. Mapas diferentes se examinaron en todas las etapas de refinamiento. Se introdujeron hidrógenos en posiciones ideales con factores de temperatura isotrópicos, pero no se variaron los parámetros de hidrógeno.

#### Datos de Difracción de Rayos X en Polvo (PXRD)

Los datos PXRD se obtuvieron usando un Bruker C2 GADDS. La radiación era Cu K $\alpha$  (40 KV, 50 mA). La distancia entre la muestra y el detector era de 15 cm. Las muestras en polvo se colocaron en capilares de vidrio sellados de 1 mm o menos de diámetro; el capilar se hizo rotar durante la recogida de datos. Los datos se recogieron durante  $3 \leq 2\theta \leq 35^\circ$  con un tiempo de exposición de muestra de al menos 2000 segundos. Los arcos de difracción bidimensionales resultantes se integraron para crear un patrón PXRD unidimensional con un tamaño de etapa de 0,02 grados  $2\theta$  en el intervalo de 3 a 35 grados  $2\theta$ .

#### Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los experimentos de DSC se realizaron en un Instruments™ TA modelo Q1000 ó 2920. La muestra (aproximadamente 2 – 6 mg) se pesó en un recipiente de aluminio y se registró con una precisión de una centésima de miligramo y se transfirió al DSC. El instrumento se purgó con gas nitrógeno a 50 ml/min. Los datos se recogieron entre la temperatura ambiente y 300°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La representación se hizo con los picos endotérmicos orientados hacia abajo.

#### Análisis Termogravimétrico (ATG)

Los experimentos ATG se realizaron en un Instruments™ TA modelo Q500 ó 2950. La muestra (aproximadamente 10 – 30 mg) se colocó en un recipiente de platino previamente tarado. El peso de la muestra se midió con precisión y se registró hasta milésimas de miligramo con el instrumento. El horno se purgó con gas nitrógeno a 100 ml/min. Los datos se recogieron entre temperatura ambiente y 300°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

### Preparación y Análisis de las Formas

Los datos de celdilla unitaria y otras propiedades de estos ejemplos se presentan en la Tabla 1. Los parámetros de celdilla unitaria se obtuvieron a partir de análisis cristalográfico por rayos X de un monocristal. Una explicación detallada de celdillas unitarias se puede encontrar en el capítulo 3 de Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: a Practical Guide, (MacMillian, 1968).

Las coordenadas atómicas fraccionarias para los Ejemplos 2a, b, c, d, e, f y g, y las condiciones en las que se miden se presentan en las Tablas 2 – 9.

Además, las posiciones características de los picos de difracción de rayos X en polvo (grados  $2\theta \pm 0,1$ ) a TA para los Ejemplos 2a, b, d, e y f se presentan en la Tabla 9, todos los cuales están basados en patrones de alta calidad recogidos con un difractorómetro (CuK $\alpha$ ) con un capilar para centrífuga con calibrado  $2\theta$  con NIST de otro patrón adecuado.

Finalmente, las Figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6 presentan patrones de PXRD para los Ejemplos 2a, b, c, d, e y f. Las Figuras 8, 10, 13, 15, 17 y 19 describen el ATG de los Ejemplos 2a, b, c, d, e y f, respectivamente. Las Figuras 7, 9, 12, 14, 16 y 18 describen la DSC de los Ejemplos 2a, b, c, d, e y f, respectivamente. La Figura 11 describe la Isoterma de Absorción de Humedad del Ejemplo 2b.

### Preparación de las Formas, caracterización por DSC y ATG

**Ejemplo 2a, Forma H0,5–4:** 150 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se disolvió en acetato de n-butilo templado saturado con agua. Se añadió heptano hasta que se observó una nube persistente. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente. La Forma H0,5–4 se caracterizó por 0,5 moles de agua por moles de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma H0,5–4 se caracterizó por un termograma de DSC que tenía un inicio de endotermy amplio típicamente en el intervalo entre aproximadamente TA y aproximadamente 67°C de acuerdo con la curva de ATG; a temperaturas más elevadas, pueden resultar otras circunstancias. La Forma H0,5–4 se caracterizó por una curva térmica de ATG que tiene una pérdida de peso típicamente desde el 0,6% hasta aproximadamente el 1,4% hasta aproximadamente 100°C. La pérdida de peso teórica para la Forma H0,5–4 es del 1,7%, sin embargo, es normal que los hidratos inestables se deshidraten parcialmente después del secado.

**Ejemplo 2b, Forma N–2:** 1 g de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se disolvió en 10 ml de EtOAc libre de agua a 77°C. La solución se enfrió a 70°C. Se añadieron 10 mg de semillas de N–2. A la suspensión se añadió 18 ml de n-heptano durante 1 con una bomba de jeringa. La suspensión se enfrió de 70°C a 20°C durante 1 hora, y se agitó a 20°C durante toda la noche. El sólido se aisló por filtración, se lavó con 3 ml de n-heptano, se secó a 50°C en un horno de vacío durante toda la noche. La Forma N–2 es N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil) acetamida, base libre, una forma pura (sin moléculas adicionales de agua o disolvente). La Forma N–2 se caracterizó por termograma de DSC que tenía un inicio de endotermy típicamente entre aproximadamente 230°C y aproximadamente 232°C en forma de una sola fusión sin transformaciones adicionales. La forma N–2 se caracterizó por una curva del ATG que tenía pérdida de peso insignificante hasta aproximadamente 200 °C y de acuerdo con la estructura del monocristal.

**Ejemplo 2c, Forma H1,75–5:** Una suspensión de 50 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se agitó enérgicamente en 1 ml de agua durante más de 16 horas. La Forma H1,75–5 se caracteriza por 1,75 moles de agua por un mol de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma H1,75–5 se caracterizó por un termograma de DSC que tenía un inicio de endotermy típicamente entre aproximadamente TA Y aproximadamente 70°C de acuerdo con la curva del ATG; a temperaturas más elevadas, pueden resultar otras circunstancias. La Forma H1,75–5 se caracterizó por una curva del ATG que tenía pérdida de peso aproximadamente del 4,3% hasta aproximadamente el 5,3%, a temperaturas hasta aproximadamente 100°C. La pérdida de peso teórica es aproximadamente del 5,9%, sin embargo, es normal que los hidratos inestables se deshidraten parcialmente después del secado.

**Ejemplo 2d, HAC–1:** 100 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, se disolvió en 0,1 ml de HOAc a 80°C. A esto, se añadió 0,2 ml de t-BuOAc y la solución se enfrió a 20°C. La solución se evaporó hasta que se secó. El sólido resultante se agitó en heptano a 50°C durante 15 horas, seguido de enfriamiento a 20°C. HAC–1 se filtró y se secó a 25°C bajo vacío durante toda la noche. La Forma HAC–1 se caracteriza por 1 mol de ácido acético por un mol de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma HAC–1 se caracterizó por un termograma de DSC que tenía un inicio

de endotermia típicamente entre aproximadamente 100°C de acuerdo con la curva del ATG; a temperaturas más elevadas, pueden resultar otras circunstancias. La Forma HAC-1 también se caracterizó por una curva del ATG que tiene aproximadamente el 15,3% de pérdida de peso hasta aproximadamente 200°C. La pérdida de peso teórica es aproximadamente el 10,5%, sin embargo es normal que cantidades menores de disolventes con elevado punto de ebullición sigan asociadas con el sólido. En casos como este, PXRD es diagnóstico de la Forma pero no es sensible a pequeñas cantidades de disolvente adventicio.

**Ejemplo 2e, Forma E-1:** 50 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se disolvió en <1ml de etanol en ebullición. La solución se enfrió a TA y se dejó evaporar lentamente. La Forma E-1 se caracteriza por 1 mol de etanol por un mol de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil) acetamida, base libre. La Forma E-1 se caracterizó por un termograma de DSC que tenía un inicio de endotermia típicamente a aproximadamente 100°C de acuerdo con la curva del ATG; a temperaturas más elevadas, pueden resultar otras circunstancias. La Forma E-1 se caracterizó por una curva térmica del ATG que tiene una pérdida de peso de aproximadamente del 7,1% a aproximadamente el 7,6% hasta aproximadamente 150°C. La pérdida de peso teórica es aproximadamente del 8,3%, sin embargo, es normal que los hidratos inestables se disuelvan parcialmente después del secado.

**Ejemplo 2f, RPG-3:** De 30 a 40 mg of N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, se disolvió en 2 ml de propilenglicol racémico. Se añadió agua hasta que se observó una nube. El disolvente se dejó evaporar lentamente hasta que se secó. La Forma RPG-3 se caracteriza por 1 molécula de R-propilenglicol por una molécula de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma RPG-3 se caracterizó por un termograma de DSC que tenía un inicio de endotermia típicamente a aproximadamente 70 °C de acuerdo con la curva del ATG, a temperaturas más elevadas, pueden resultar otras circunstancias. La Forma RPG-3 se caracterizó por una curva de ATG que tiene una pérdida de peso de aproximadamente el 16,4% hasta aproximadamente 110°C. La pérdida de peso teórica es aproximadamente del 13.1%, sin embargo es normal que cantidades menores de disolventes con elevado punto de ebullición sigan asociadas con el sólido. En casos como este, PXRD es diagnóstico de la Forma pero no es sensible a pequeñas cantidades de disolvente adventicio.

**Ejemplo 2g, Forma IPA-1:** 40 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se suspendió en <1ml de alcohol isopropílico. La suspensión se calentó suavemente para disolver el sólido restante. La solución se enfrió a TA y se dejó evaporar lentamente hasta que se observaron cristales. La Forma IPA-1 se caracteriza por 1 mol de alcohol isopropílico por un mol de N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre.

TABLA 1

## Parámetros de celdillas unitarias

Compuesto	Forma	T	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha^\circ$	$\beta^\circ$	$\gamma^\circ$	V(Å <sup>3</sup> )
Ejemplo 2a	H0,5-4	-50	17,7845(7)	7,6215(3)	20,9510(9)	90	109,062(3)	90	2684,1(2)
Ejemplo 2b	N-2	TA	18,7240(4)	8,0171(2)	19,6568(5)	90	114,935(2)	90	2675,7(1)
Ejemplo 2c	H1,75-5	-70	12,7648(2)	34,3194(7)	12,9659(2)	90	99,053(1)	90	5609,4(2)
Ejemplo 2d	HAC-1	TA	7,9766(7)	11,058(2)	33,348(4)	90	90	90	2941,4(6)
Ejemplo 2e	E-1	-50	7,9866(3)	11,2594(6)	32,680(2)	90	90	90	2938,7(2)
Ejemplo 2f	RPG-3	-50	10,3004(3)	10,5475(4)	15,4784(6)	90,045(3)	102,476(2)	109,083(2)	1547,0(1)
Ejemplo 2g	IPA-1	TA	8,4487(2)	11,6615(3)	31,3800(9)	90	90	90	3091,7(1)

TABLA 1 (Continúa)

## Parámetros de celdillas unitarias

Compuesto	Z'	Vm	ge	dcalc.
Ejemplo 2a	2	671	P2 <sub>1</sub>	1,235
Ejemplo 2b	2	669	P2 <sub>1</sub>	1,258
Ejemplo 2c	4	701	P2 <sub>1</sub>	1,274
Ejemplo 2d	1	735	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1,279
Ejemplo 2e	1	735	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1,249
Ejemplo 2f	2	774	PI	1,257
Ejemplo 2g	1	773	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1,217

Las variables usadas en la Tabla 1 se definen a continuación:

- 5 T = temperatura en grados Centígrados para los datos cristalográficos (TA es temperatura ambiente, que es aproximadamente +22°C)

V = volumen de celdilla unitaria

Z' = número de moléculas de fármaco por unidad simétrica

Vm = V (celdilla unitaria) / (Z moléculas de fármaco por celdilla)

- 10 ge = Grupo espacial

dcalc = densidad de cristal calculada

TABLA 2

Coordenadas atómicas para el Ejemplo 2a, Forma H0,5-4							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	0,1718	0,5612	0,2388	F138	0,9730	0,9700	0,6210
F2	0,1576	0,4167	0,1518	F139	1,0220	0,7300	0,6430
F3	0,1277	0,6827	0,1463	F140	0,9470	0,7710	0,5532
N7	0,3729	0,0177	-0,0187	O137	0,5289	1,1320	0,2702
N9	0,3967	0,3613	0,0716	H10	0,3464	0,3422	0,0601
N11	0,5034	0,5324	0,1275	H16	0,1889	-0,1347	-0,0192
N12	0,1513	-0,3723	-0,0803	H85	0,2780	0,4332	0,1193
N15	0,2070	-0,0340	-0,0258	H88	0,4895	0,3182	0,0357
N18	0,4944	0,7660	0,2016	H90	0,2688	-0,4938	-0,1162
O23	0,3677	0,2704	-0,0786	H91	0,2791	-0,3427	-0,1635
O25	0,2371	0,2420	0,0154	H93	0,2277	0,1128	-0,0967
C82	0,2630	0,6176	0,1822	H95	0,3290	-0,0521	-0,1140
C83	0,4281	0,4888	0,1165	H99	0,3760	-0,3135	-0,0574

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
C84	0,3027	0,5269	0,1466	H100	0,3100	-0,3067	-0,0228
C86	0,3810	0,5754	0,1513	H102	0,5234	0,0450	0,0773
C87	0,4447	0,251	0,0409	H103	0,4804	0,1033	0,1290
C89	0,2647	-0,3681	-0,1237	H105	0,1184	-0,0766	-0,1500
C92	0,2304	-0,0122	-0,0852	H106	0,1831	-0,0821	-0,1859
C94	0,3163	-0,0776	-0,0729	H110	0,3980	0,9063	0,2542
C96	0,4172	0,7161	0,1933	H112	0,4292	-0,1628	0,0516
C97	0,1821	0,5681	0,1800	H113	0,3692	-0,0449	0,0742
C98	0,3221	-0,2755	-0,0632	H115	0,2715	0,8230	0,2452
C101	0,4735	0,0847	0,0816	H117	0,0540	-0,3914	-0,0071
C104	0,1724	-0,1130	-0,1448	H118	0,1047	-0,5613	-0,0042
C107	0,3915	0,1858	-0,0261	H119	0,0122	-0,5664	-0,0392
C108	0,2116	0,0919	0,0195	H121	0,0157	-0,2070	-0,1065
C109	0,3748	0,8103	0,2276	H122	-0,0438	-0,3568	-0,1418
C111	0,4081	-0,0451	0,0507	H123	0,0156	-0,2818	-0,1762
C114	0,2994	0,7605	0,2220	H126	0,1446	-0,3645	-0,1779
C116	0,0592	-0,4960	-0,0309	H128	0,5835	0,7006	0,1755
C120	0,0087	-0,3106	-0,1338	H 130	0,2266	0,0448	0,1189
C124	0,0696	-0,4465	-0,0977	H131	0,1603	-0,0732	0,0701
C125	0,1783	-0,3101	-0,1359	H132	0,1430	0,1249	0,0800
C127	0,5309	0,6696	0,1690	H 134	0,0091	-0,6633	-0,1497
C129	0,1827	0,0426	0,0774	H 135	0,1005	-0,6984	-0,1175
C133	0,0611	-0,6143	-0,1412	H136	0,0686	-0,5851	-0,1833
F4	0,9541	0,9380	0,5714	H141	0,1830	-0,4440	-0,0580
F5	0,9826	0,6800	0,5759	H 14	0,6945	1,0312	0,5339
F6	1,0259	0,8300	0,6655	H21	0,7741	1,5073	0,4379
N8	0,6040	1,3694	0,4758	H28	0,7049	1,4602	0,3064
N13	0,6631	1,0203	0,5573	H29	0,6130	1,4114	0,2902
N17	0,7581	1,7462	0,3780	H32	0,5464	1,0615	0,5430
N19	0,6266	0,8793	0,6383	H34	0,6724	1,6789	0,4661
N20	0,7501	1,4082	0,4350	H35	0,5807	1,7062	0,4509
N22	0,7080	0,6517	0,7080	H38	0,8152	0,9372	0,5749
024	0,7581	1,1336	0,4774	H41	0,5545	1,4575	0,3823
026	0,5442	1,1244	0,4164	H44	0,5540	1,3350	0,5873
C27	0,6643	1,5023	0,3242	H45	0,6406	1,2709	0,6290

(CONT)							
C30	0,6817	0,9034	0,6081	H48	0,6272	1,8887	0,3818
C31	0,5921	1,1293	0,5402	H49	0,5627	1,7587	0,3377
C33	0,6205	1,6624	0,4324	H52	0,6566	1,2721	0,3752
C36	0,5758	1,2019	0,4701	H55	0,6234	1,5433	0,5534
C37	0,8201	0,8496	0,6069	H56	0,6965	1,4170	0,5619
C39	0,7568	0,8126	0,6288	H58	0,8887	1,9136	0,4290
C40	0,6067	1,4694	0,4172	H59	0,9292	1,8759	0,3743
C42	0,8902	0,7591	0,6317	H60	0,9085	1,7203	0,4146
C43	0,6042	1,2934	0,5840	H62	0,6632	1,7578	0,2922
C46	0,7651	0,6822	0,6794	H64	0,8824	1,3038	0,5620
C47	0,6162	1,7663	0,3697	H65	0,8870	1,4370	0,5064
C50	0,8099	1,8166	0,3410	H66	0,9097	1,2396	0,5019
C51	0,6689	1,3952	0,3877	H69	0,7263	1,9822	0,2803
C53	0,7895	1,2775	0,4740	H70	0,8132	2,0339	0,2846
C54	0,6389	1,4243	0,5469	H71	0,7823	2,0761	0,3450
C57	0,8917	1,8331	0,3947	H73	0,8374	1,5813	0,3078
C61	0,6751	1,6998	0,3362	H74	0,8486	1,7393	0,2638
C63	0,8750	1,3182	0,5148	H75	0,7629	1,6701	0,2558
C67	0,9615	0,8066	0,6143	H77	0,8443	0,5011	0,7349
C68	0,7802	1,9934	0,3099	H79	0,9456	0,5638	0,6960
C72	0,8152	1,6904	0,2872	H81	0,6060	0,7320	0,7067
C76	0,8381	0,5893	0,7029	H142	0,7500	1,8390	0,4090
C78	0,8982	0,6264	0,6799	H143	0,5333	1,1298	0,3123
C80	0,6445	0,7516	0,6862	H144	0,5194	1,0278	0,2538

TABLA 3

Coordenadas atómicas para el Ejemplo 2b, Forma N-2							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N1	0,7824	1,3195	0,3238	C71	0,9289	1,4591	0,5167
N2	0,1685	0,3056	-0,0178	H72	0,9378	1,4237	0,5668
H3	0,1633	0,1989	-0,0196	H73	0,9764	1,4359	0,5102
N4	0,6223	0,8215	0,1887	C74	0,8719	1,7574	0,6080
N5	0,2627	0,4840	-0,0849	C75	0,6719	1,2862	0,4846
N6	0,6868	0,9765	0,2943	H76	0,6246	1,2933	0,4390

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
H7	0,7030	0,9877	0,3420	H77	0,6814	1,3914	0,5103
N8	0,4185	0,9718	0,0742	H78	0,6660	1,2009	0,5162
N9	0,0989	0,0258	-0,1003	C79	0,9173	1,6199	0,6639
N10	0,7913	1,3680	0,4754	H80	0,8851	1,5217	0,6541
H11	0,7826	1,4618	0,4918	H81	0,9305	1,6578	0,7142
N12	0,5331	0,6005	0,1R13	H82	0,9647	1,5943	0,6584
N13	0,3353	0,7474	0,0475	C83	0,9176	1,9198	0,6225
H14	0,3028	0,6896	0,0583	H84	0,9680	1,8999	0,6220
N15	0,8501	1,6946	0,5311	H85	0,9252	1,9631	0,6707
N16	0,4567	1,1267	0,1887	H86	0,8887	1,9992	0,5842
O17	0,7470	1,1042	0,4435	C87	0,7960	1,7901	0,6131
O18	0,2114	0,7470	-0,1165	Her	0,7660	1,8705	0,5758
O19	0,2229	0,5239	0,0583	H89	0,8064	1,8325	0,6620
O20	0,8588	1,0890	0,3360	H90	0,7667	1,6881	0,6048
F21	0,5881	0,9034	0,4961	C91	0,2069	0,3753	0,0494
F22	0,4828	0,7754	0,4659	C92	0,1886	0,3981	-0,1294
F23	0,5874	0,6500	0,5199	H93	0,1617	0,4641	-0,1751
C24	0,1049	-0,1653	-0,0049	C94	0,1345	0,3960	-0,0889
H25	0,1473	-0,2167	-0,0125	H95	0,1249	0,5115	-0,0787
H26	0,0773	-0,2487	0,0097	C96	0,3636	0,8982	0,1612
H27	0,1257	-0,0826	0,0338	C97	0,0560	0,3169	-0,1396
C28	0,0052	-0,2107	-0,1371	H98	0,0300	0,3865	-0,1836
H29	-0,0334	-0,1565	-0,1806	H99	0,0226	0,3123	-0,1131
H30	-0,0204	-0,2889	-0,1178	C100	0,0655	0,1409	-0,1647
H31	0,0423	-0,2685	-0,1506	H101	0,0138	0,0994	-0,1999
C32	-0,0102	0,0236	-0,0618	C102	0,2651	0,6526	-0,0801
H33	0,0176	0,1111	-0,0276	C103	0,3727	0,8727	0,0930
H34	-0,0371	-0,0447	-0,0399	C 104	0,3129	0,8065	0,1831
H35	-0,0478	0,0713	-0,1077	H 105	0,2826	0,7213	0,1525
C36	0,6347	0,8573	0,2590	C 106	0,4090	1,0275	0,2081
C37	0,7956	1,1614	0,3094	C107	0,1998	0,2249	-0,1544
C38	0,5429	0,6399	0,2526	H108	0,2268	0,1548	-0,1108
C39	0,5969	0,8058	0,3661	H109	0,2321	0,2314	-0,1820

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
H40	0,6303	0,8901	0,3943	C110	0,0479	-0,0823	-0,0781
C41	0,5928	0,7673	0,2949	C111	0,3943	0,5437	-0,0102
C42	0,7174	1,0886	0,2543	H 112	0,4319	0,5306	0,0416
H43	0,7243	1,0288	0,2140	H 113	0,4226	0,5469	-0,0417
C44	0,8437	1,4188	0,3R06	C114	0,1202	0,1477	-0,2041
H45	0,8919	1,4020	0,3733	H115	0,0955	0,2128	-0,2496
C46	0,8266	1,6034	0,3730	H116	0,1283	0,0355	-0,2179
H47	0,7791	1,6255	0,3797	C117	0,3076	0,8411	0,2485
H48	0,8177	1,6396	0,3230	C118	0,2292	0,2619	0,1158
C49	0,5524	0,7201	0,3942	H119	0,2846	0,2720	0,1469
C50	0,6668	1,2414	0,2237	H120	0,2172	0,1487	0,0989
H51	0,6690	1,2785	0,1776	H121	0,2001	0,2924	0,1441
H52	0,6125	1,2182	0,2137	C122	0,3349	0,4024	-0,0337
C53	0,8609	1,3569	0,4595	H123	0,3502	0,3144	-0,0588
H54	0,8773	1,2398	0,4636	H124	0,3290	0,3556	0,0092
C55	0,4991	0,5496	0,2836	C125	0,3458	0,7009	-0,0200
H56	0,4668	0,4624	0,2569	H126	0,3682	0,7937	-0,037
C57	0,7010	1,3718	0,2841	C127	0,4561	1,0941	0,1233
H58	0,6975	1,4822	0,2628	H128	0,4859	1,1659	0,1085
H59	0,6744	1,3722	0,3171	C129	0,4030	1,0567	0,2762
C60	0,9137	1,6472	0,5099	H130	0,4339	1,1390	0,3084
H61	0,9621	1,7039	0,5438	C131	0,2548	0,7395	0,2713
C62	0,7404	1,2441	0,4666	C132	0,3536	0,9679	0,2955
C63	0,5039	0,5898	0,3526	H133	0,3500	0,9907	0,3403
H64	0,4747	0,5300	0,3726	F134	0,1847	0,7359	0,2156
C65	0,5722	0,6959	0,1556	F135	0,2364	0,8060	0,3220
H66	0,5642	0,6734	0,1065	E136	0,2859	0,5920	0,2960
C67	0,8949	1,7014	0,4308	F137	0,1977	0,8329	0,2710
H68	0,9412	1,6866	0,4211	F138	0,2168	0,6170	0,2301
H69	0,8818	1,8193	0,4256	F139	0,2934	0,6790	0,3395
C70	0,5532	0,7632	0,4678	H140	0,8280	1,7679	0,5060
				H141	0,1330	-0,0400	-0,1062

TABLA 4

Coordenadas atómicas para el Ejemplo 2c, Forma Base H1,75-5							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C1	0,3942	0,1176	0,2183	C51	0,6094	0,0443	-0,0547
C2	0,2287	0,1174	0,0897	C52	0,6750	0,0382	0,0420
N3	0,1192	0,1293	0,0594	C53	0,9963	0,1572	0,4974
N4	0,1798	0,0501	0,1322	C54	0,7176	-0,0005	0,0684
N5	0,3753	0,0509	0,2822	C55	1,1985	0,0503	0,7049
N6	-0,0927	0,1070	-0,1055	C56	1,1539	0,1133	0,4965
N7	-0,3691	0,1154	-0,3165	C57	1,0229	0,1608	0,6162
N8	-0,2260	0,1440	-0,1970	C58	1,0367	0,1185	0,4572
O9	0,1323	0,1298	-0,1137	C59	0,7341	0,1669	0,3280
O10	0,0301	0,0456	0,0130	C60	1,1829	0,1168	0,6162
C11	0,0785	0,1332	-0,0419	C61	1,1435	0,1563	0,6496
C12	0,2431	0,0735	0,0697	C62	0,5636	0,1744	0,0306
C13	-0,2272	0,0747	-0,2281	C63	0,6973	0,1581	0,4320
C14	0,0812	0,0382	0,0995	C64	0,7972	0,1517	0,5115
C15	0,4135	0,0738	0,2008	C65	1,3015	0,0605	0,7775
C16	0,2774	0,1283	0,2010	C66	1,2257	0,0279	0,6122
C17	0,3592	0,0623	0,0929	C67	1,1287	0,0258	0,7652
C18	-0,3242	0,0799	-0,2978	C68	0,9017	0,0664	0,4282
C19	-0,1859	-0,0329	-0,2601	C69	0,8592	0,0308	0,4749
C20	-0,3192	0,1441	-0,2671	F70	0,7706	-0,0040	0,1659
C21	-0,1804	0,1091	-0,1748	F71	0,7890	-0,0119	0,0101
C22	-0,1842	0,0372	-0,2149	F72	0,6477	0,0283	-0,0583
C23	0,0394	0,1336	0,1281	N73	0,7366	0,2979	0,1640
C24	-0,3330	0,0112	-0,3340	N74	0,9286	0,2769	0,3415
C25	-0,2347	0,0067	-0,2683	N75	0,9490	0,3548	0,4399
C26	0,0308	0,0146	0,1792	N76	0,6679	0,2686	0,0076
C27	-0,3753	0,0465	-0,3473	N77	0,5468	0,3015	-0,1239
C28	-0,0381	0,1410	-0,0545	N78	1,1302	0,3587	0,6021
C29	0,4391	0,0161	0,3216	O79	0,7689	0,2552	0,3756
C30	0,4331	-0,0152	0,2365	O80	0,8000	0,3561	0,3182
C31	-0,0565	0,1490	0,0571	C81	0,6779	0,3005	0,0685
C32	0,5574	0,0267	0,3640	C82	0,8021	0,2636	0,1953
C33	0,3907	0,0006	0,4127	C83	0,6253	0,3363	0,0330

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
F34	-0,1107	-0,0374	-0,1835	C84	0,8293	0,2641	0,3145
F35	-0,1514	-0,0419	-0,3469	C85	0,9704	0,2829	0,4523
F36	-0,2560	-0,0605	-0,2519	C86	0,9612	0,3232	0,6101
N37	0,9782	0,0854	0,4895	C87	1,0815	0,3238	0,6395
N38	0,8832	0,1624	0,4564	C88	0,6395	0,3717	0,0871
N39	0,6198	0,1729	0,1273	C89	0,9221	0,3194	0,4932
N40	0,7167	0,1350	0,2533	C90	0,5107	0,3694	-0,1081
N41	0,5429	0,1472	-0,0401	C91	0,5605	0,3350	-0,0649
N42	1,1331	0,0855	0,6708	C92	0,6021	0,2715	-0,0843
043	0,9140	0,1821	0,2960	C93	0,5266	0,4037	-0,0538
044	0,8654	0,0771	0,3382	C94	0,9119	0,2659	0,1620
C45	0,8542	0,1720	0,3563	C95	0,5911	0,4051	0,0443
C46	0,5876	0,1117	-0,0112	C96	1,1535	0,3924	0,6738
C47	0,6629	0,1387	0,1561	C97	0,6068	0,4429	0,0984
C48	0,6954	0,0688	0,1114	C98	0,8832	0,3710	0,3595
C49	0,6512	0,1060	0,0865	C99	1,0912	0,2839	0,4757
C50	0,5679	0,0801	-0,0813	C 100	1,1264	0,2872	0,5933
C101	0,9810	0,2861	0,2520	O151	0,4292	0,1756	0,7593
C102	0,9190	0,4094	0,3235	O152	0,3473	0,1636	0,8339
C103	1,0516	0,4113	0,6921	H153	0,4310	0,1254	0,2979
C104	1,2130	0,3807	0,7821	H154	0,4349	0,1341	0,1645
C105	1,2167	0,4208	0,6206	H155	0,2779	0,1337	0,0447
F106	0,6836	0,4427	0,1806	H156	0,2164	0,0417	0,2100
F107	0,5186	0,4543	0,1375	H157	0,3714	0,0703	0,3474
F108	0,6281	0,4715	0,0364	H158	-0,0576	0,0785	-0,0868
N109	0,3031	0,2523	0,0895	H159	0,2173	0,0675	-0,0123
N110	0,3202	0,3294	0,1970	H160	0,4992	0,0681	0,2061
N111	0,5022	0,3356	0,3522	H161	0,2372	0,1127	0,2569
N112	0,0946	0,2741	-0,0674	H162	0,2676	0,1594	0,2134
N113	-0,0336	0,2377	-0,1697	H163	0,3639	0,0302	0,0854
N114	-0,2016	0,2650	-0,2433	H164	0,4006	0,0751	0,0350
O115	0,1682	0,3314	0,0829	H165	-0,3534	0,1727	-0,2828
O116	0,1499	0,2237	0,1243	H166	-0,1099	0,0321	-0,1626
C117	0,2052	0,2373	0,0644	H167	0,0215	0,1059	0,1611
C118	0,2992	0,2930	0,2475	H168	0,0659	0,1539	0,1907

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
C119	-0,0515	0,3401	-0,0764	H169	-0,3750	-0,0142	-0,3730
C120	0,3416	0,2960	0,3644	H170	-0,0484	0,0061	0,1467
C121	-0,1222	0,3701	-0,0923	H171	0,0783	-0,0115	0,2000
C122	0,4698	0,2615	0,2174	H172	0,0297	0,0317	0,2489
C123	-0,1737	0,2997	-0,1931	H173	-0,4526	0,0496	-0,3983
C124	-0,0044	0,2713	-0,1206	H174	-0,0573	0,1673	-0,1021
C125	-0,2438	0,331	-0,2090	H175	0,4770	-0,0409	0,2650
C126	-0,0754	0,3040	-0,1278	H176	0,3484	-0,0242	0,2146
C127	0,1701	0,2420	-0,0535	H177	0,4596	-0,0045	0,1679
C128	0,3488	0,2578	0,2007	H178	-0,1282	0,1348	0,0707
C129	0,5097	0,2640	0,3350	H179	-0,0650	0,1804	0,0686
C130	0,4624	0,2986	0,3883	H180	0,5963	-0,0009	0,3924
C131	-0,0968	0,4077	-0,0362	H181	0,5930	0,0381	0,3032
C132	0,3460	0,2683	0,0015	H182	0,5596	0,0461	0,4284
C133	-0,1317	0,2372	-0,2271	H183	0,4332	-0,0251	0,4433
C134	0,5253	0,3677	0,4289	H184	0,3902	0,0220	0,4712
C135	-0,2190	0,3662	-0,1602	H185	0,3084	-0,0081	0,3820
C136	0,2745	0,2511	-0,0941	H186	0,9987	0,0754	0,5691
C137	0,5618	0,4023	0,3689	H187	0,7487	0,1066	0,2786
C138	0,6152	0,3567	0,5186	H188	1,1096	0,0983	0,7400
C139	0,4264	0,3788	0,4754	H189	0,7448	0,0641	0,1858
C140	0,2540	0,3461	0,1186	H190	0,5192	0,0845	-0,1565
C141	0,2900	0,3831	0,0758	H191	0,5930	0,0200	-0,1086
F142	0,0020	0,4176	-0,0257	H192	1,0402	0,1792	0,4633
F143	-0,1497	0,4372	-0,0806	H193	1,1791	0,0849	0,4744
F144	-0,1239	0,4079	0,0550	H194	1,1975	0,1355	0,4619
O145	0,4346	0,1106	0,5123	H195	0,9975	0,1890	0,6409
O146	0,1371	0,2037	0,3256	H196	0,9825	0,1382	0,6530
O147	0,6629	0,2454	0,5702	H197	1,0259	0,1190	0,3726
O148	0,4523	0,2291	0,5970	H198	0,6972	0,1932	0,2915
O149	0,3986	0,3042	0,6776	H199	1,2687	0,1146	0,6366
O150	0,3459	0,1840	0,4326	H200	1,1831	0,1795	0,6123
H201	1,1631	0,1593	0,7328	H251	1,1684	0,4299	0,5453
H202	0,5306	0,2029	0,0082	H252	0,3950	0,3437	0,2241
H203	0,6519	0,1824	0,4545	H253	0,5749	0,3293	0,3230

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
H204	0,6483	0,1323	0,4245	H254	0,1193	0,3022	-0,0335
H205	0,8029	0,1216	0,5375	H255	0,2147	0,2880	0,2355
H206	0,7957	0,1702	0,5801	H256	0,0233	0,3437	-0,0249
H207	1,3466	0,0340	0,8006	H257	0,3083	0,3215	0,3958
H208	1,3500	0,0795	0,7383	H258	0,3160	0,2703	0,4028
H209	1,2843	0,0747	0,8476	H259	0,5050	0,2366	0,1841
H210	1,2710	0,0024	0,6388	H260	0,4927	0,2878	0,1790
H211	1,1517	0,0185	0,5635	H261	-0,3192	0,3277	-0,2606
H212	1,2687	0,0462	0,5671	H262	0,1323	0,2153	-0,0854
H213	1,1703	-0,0007	0,7926	H263	0,3327	0,2320	0,2439
H214	1,1105	0,0421	0,8313	H264	0,4885	0,2372	0,3700
H215	1,0556	0,0182	0,7149	H265	0,5951	0,2670	0,3470
H216	0,7976	0,0176	0,4203	H266	0,4874	0,2957	0,4712
H217	0,9226	0,0100	0,4973	H267	0,3419	0,2998	0,0019
H218	0,8269	0,0390	0,5453	H268	0,4278	0,2594	0,0040
H219	0,7349	0,3217	0,2190	H269	-0,1537	0,2100	-0,2663
H220	1,0259	0,3684	0,4660	H270	-0,2738	0,3905	-0,1734
H221	1,2052	0,3497	0,5802	H271	0,3087	0,2249	-0,1215
H222	0,7595	0,2370	0,1705	H272	0,2609	0,2719	-0,1576
H223	0,9510	0,2576	0,4964	H273	0,5805	0,4266	0,4203
H224	0,9305	0,2994	0,6498	H274	0,6328	0,3938	0,3368
H225	0,9306	0,3505	0,6365	H275	0,5006	0,4101	0,3051
H226	1,1023	0,3226	0,7234	H276	0,6311	0,3804	0,5741
H227	0,6892	0,3732	0,1634	H277	0,5931	0,3310	0,5600
H228	0,8361	0,3164	0,4802	H278	0,6878	0,3500	0,4880
H229	0,4622	0,3687	-0,1842	H279	0,4455	0,4020	0,5307
H230	0,5955	0,2449	-0,1310	H280	0,3644	0,3877	0,4139
H231	0,4887	0,4301	-0,0865	H281	0,4001	0,3535	0,5147
H232	0,9411	0,2373	0,1483	H282	0,2315	0,3935	0,0139
H233	0,9065	0,2830	0,0906	H283	0,3050	0,4046	0,1373
H234	1,1232	0,2576	0,4474	H284	0,3642	0,3778	0,0457
H235	1,1194	0,3088	0,4371	H297	0,5031	0,1166	0,5720
H236	1,2129	0,2887	0,6081	H298	0,4013	0,1383	0,4827
H237	1,1010	0,2618	0,6307	H291	0,1415	0,2116	0,2456
H238	0,9841	0,3173	0,2399	H292	0,0561	0,1944	0,3301

(CONT)							
H239	1,0614	0,2747	0,2630	H285	0,7189	0,2533	0,6386
H240	0,8608	0,4208	0,2603	H286	0,7007	0,2488	0,5014
H241	0,9250	0,4304	0,3884	H287	0,4531	0,2087	0,6605
H242	0,9943	0,4069	0,2987	H288	0,5334	0,2354	0,5869
H243	1,0681	0,4363	0,7411	H289	0,4187	0,2763	0,6478
H244	1,0091	0,4217	0,6147	H290	0,4459	0,3091	0,7532
H245	1,0017	0,3911	0,7227	H293	0,3695	0,2054	0,4921
H246	1,2276	0,4062	0,8315	H294	0,2663	0,1913	0,3921
H247	1,1658	0,3601	0,8194	H295	0,4701	0,1653	0,8329
H248	1,2882	0,3671	0,7752	H296	0,4645	0,1639	0,6962
H249	1,2341	0,4465	0,6673	H299	0,2731	0,1523	0,8513
H250	1,2881	0,4078	0,6030	H300	0,4117	0,1542	0,8909

TABLA 5

Coordenadas atómicas para el Ejemplo 2e, Forma Base E-1							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F18	0,2662	0,4002	0,0274	F23	0,0301	0,3722	0,0039
F19	0,0473	0,4191	0,0033	C18	0,1648	0,3165	0,0297
F20	0,1401	0,2386	0,0059	H31	0,2375	0,5477	0,2387
O2	0,3035	0,7582	0,1985	H41	0,5018	0,4R01	0,2585
O28	0,4277	0,5819	0,1087	H42	0,4761	0,3850	0,2161
N1	0,5559	0,6627	0,1978	H51	0,6480	0,5043	0,1733
N6	0,2412	0,4989	0,1766	H52	0,7376	0,5463	0,2204
N8	0,0422	0,3993	0,2139	H61	0,2881	0,5282	0,1472
N10	-0,1606	0,2714	0,1828	H91	-0,1519	0,3157	0,2435
N27	0,6744	0,6813	0,1115	H111	-0,2586	0,1707	0,1140
N29	0,9824	0,8036	0,1064	H121	-0,1207	0,1964	0,0469
C2	0,3877	0,6687	0,2028	H141	0,2343	0,4431	0,0976
C3	0,3235	0,5438	0,2136	H211	0,5921	0,8399	0,1984
C4	0,4822	0,4775	0,2252	N221	0,4827	0,7942	0,1303
C5	0,6231	0,5426	0,2028	H231	0,6846	0,8993	0,0877
C7	0,1130	0,4242	0,1780	H232	0,6444	0,9699	0,1348
C9	-0,0900	0,3261	0,2139	H241	0,9421	0,9813	0,1221
C11	-0,1488	0,2295	0,1107	H251	1,0517	0,8711	0,1826
C12	-0,0761	0,2450	0,0735	H252	0,8644	0,9484	0,1930

(CONT)							
C13	0,0600	0,3235	0,0687	H261	0,8551	0,7433	0,2231
C14	0,1243	0,3844	0,1017	H262	0,8872	0,6821	0,1741
C15	-0,0857	0,2914	0,1453	H271	0,8051	0,6804	0,1028
C16	0,0498	0,3680	0,1409	H291	1,0794	0,7695	0,1261
C17	0,1207	0,3503	0,0270	H294	0,7893	0,5312	0,0656
C21	0,6470	0,7650	0,1817	H292	0,6583	0,4189	0,0854
C22	0,6168	0,7817	0,1361	H293	0,5951	0,5011	0,0421
C23	0,7030	0,8953	0,1212	H311	0,9885	0,9169	0,0098
C24	0,8922	0,8952	0,1304	H312	0,8322	0,8277	0,0324
C25	0,9185	0,8727	0,1765	H313	0,8750	0,9701	0,0523
C26	0,8353	0,7590	0,1910	H321	1,2632	0,9515	0,0466
C28	0,5782	0,5936	0,0987	H322	1,1556	1,0063	0,0897
C29	0,6596	0,5024	0,0711	H323	1,2983	0,8878	0,0951
C30	1,0633	0,8393	0,0676	H331	1,1943	0,7459	0,0197
C31	0,9326	0,8931	0,0389	H332	1,2251	0,6857	0,0690
C32	1,2044	0,9276	0,0745	H333	1,0345	0,6616	0,0430
C33	1,1314	0,7245	0,0492	H971	-0,8355	0,1305	0,1615
O99	-0,4402	0,1232	0,1894	H972	-0,7164	0,0043	0,1747
C97	-0,7313	0,0985	0,1797	H973	-0,7551	0,1157	0,2115
C98	-0,5812	0,1608	0,1676	H981	-0,5951	0,2544	0,1716
F21	0,3052	0,3620	0,0283	H982	-0,5565	0,1430	0,1349
F22	0,1907	0,2403	0,0143	H991	-0,3383	0,1855	0,1847

TABLA 6

Coordenadas atómicas para el Ejemplo 2d, Forma Base HAC-1							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C1	0,0418	0,3612	0,1413	H32	-0,1504	0,2133	0,0512
N2	-0,1614	0,2566	0,1827	H21	0,2024	0,4361	0,1001
N3	0,5574	0,6476	0,1969	H19	-0,2633	0,1786	0,1141
O4	0,4002	0,5938	0,1104	H15	-0,1260	0,2877	0,2400
N5	0,0480	0,3793	0,2136	H6	0,2703	0,5248	0,1514
N6	0,2349	0,4911	0,1766	H14	0,2507	0,5355	0,2354
N7	0,6581	0,6819	0,1120	H25A	0,5017	0,4595	0,2502
O9	0,3141	0,7518	0,2032	H25B	0,4643	0,3765	0,2131
C10	0,6548	0,7519	0,1823	H22A	0,6302	0,4915	0,1724

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
C11	0,1091	0,4116	0,1779	H22B	0,7255	0,5203	0,2124
C12	0,6143	0,7805	0,1389	H10	0,6208	0,8184	0,1990
C13	-0,0977	0,2822	0,1453	H12	0,4961	0,7944	0,1361
C14	0,3251	0,5321	0,2128	H31A	0,7369	0,5221	0,0663
C15	-0,0849	0,3037	0,2135	H31B	0,5607	0,5108	0,0459
C16	0,5496	0,5972	0,0993	H31C	0,6086	0,4250	0,0815
C17	0,8422	0,7397	0,1888	H17A	0,8651	0,7215	0,2164
N18	0,9734	0,7976	0,1050	H17B	0,8826	0,6751	0,1722
C19	-0,1674	0,2302	0,1113	H23A	0,6885	0,9061	0,0978
C20	0,0380	0,3268	0,0698	H23B	0,6640	0,9626	0,1405
C21	0,1085	0,3827	0,1029	H28A	0,8869	0,9177	0,1920
C22	0,6188	0,5229	0,1991	H28B	1,0495	0,8473	0,1796
C23	0,7063	0,8942	0,1260	H27	0,9448	0,9635	0,1263
C24	0,3943	0,6572	0,2042	H18	1,0626	0,7570	0,1189
C25	0,4808	0,4583	0,2218	H39A	1,2479	0,9507	0,0498
C27	0,8951	0,8864	0,1321	H39B	1,2853	0,8792	0,0894
C28	0,9305	0,8535	0,1757	H39C	1,1647	0,9911	0,0903
F29	0,2449	0,4047	0,0277	H38A	0,9706	0,9352	0,0175
C30	1,0501	0,8412	0,0669	H38B	0,8802	0,9740	0,0573
C31	0,6205	0,5052	0,0708	H38C	0,8310	0,8527	0,0360
C32	-0,1018	0,2511	0,0743	H40A	1,1575	0,7492	0,0195
C33	0,1058	0,3467	0,0300	H40B	1,0092	0,6805	0,0403
F36	0,1168	0,2494	0,0085	H40C	1,1861	0,6845	0,0608
F37	0,0041	0,4132	0,0068	H7	0,7708	0,6743	0,1022
C38	0,9217	0,9066	0,0421	H35A	-0,8134	0,1022	0,1656
C39	1,2014	0,9229	0,0747	H35B	-0,7586	0,1045	0,2107
C40	1,1073	0,7290	0,0448	H35C	-0,7035	-0,0029	0,1830
O8	-0,4446	0,1296	0,1963	H8	-0,3548	0,1817	0,1876
C26	-0,5724	0,1491	0,1735				
O34	-0,5673	0,2213	0,1458				
C35	-0,7251	0,0824	0,1840				

TABLA 7

Coordenadas atómicas para el Ejemplo 2g, Forma Base IPA-1							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	0,1519	0,3786	0,0243	H4B	0,8724	0,7912	0,1232
F3	-0,0140	0,2540	-0,0043	H3	0,6171	0,6809	0,1026
F2	0,0260	0,4241	0,0085	H1	0,1162	0,5505	0,1460
N4	0,8062	0,8075	0,1016	H10	0,3362	0,7935	0,1099
N3	0,5159	0,6834	0,1054	H9	0,3991	0,8799	0,1736
N2	0,3481	0,7197	0,1890	H6A	0,4782	0,9618	0,1051
N1	0,0675	0,5440	0,1700	H6B	0,5369	0,8805	0,0686
N5	-0,1311	0,4643	0,2095	H22	0,0665	0,4473	0,0929
N6	-0,2941	0,3121	0,1828	H5	0,7491	0,9735	0,1042
O1	0,1140	0,8031	0,1697	H21	-0,3360	0,1865	0,1167
O2	0,2925	0,5779	0,1031	H12A	0,5507	0,4357	0,0989
C10	0,4463	0,7911	0,1197	H12B	0,6252	0,5211	0,0660
C9	0,4471	0,8051	0,1677	H12C	0,4678	0,4565	0,0549
C4	0,9030	0,8194	0,0629	H8A	0,6698	0,7392	0,17R6
C24	-0,0632	0,3232	0,0669	H8B	0,6137	0,8216	0,2153
C19	-0,0909	0,3946	0,1378	H16	0,0302	0,6334	0,2243
C6	0,5348	0,8912	0,0992	H13A	0,4882	0,6277	0,2283
C20	-0,2139	0,3158	0,1454	H13B	0,4421	0,5607	0,1863
C11	0,4342	0,5879	0,0964	H3B	0,9771	0,9859	0,0712
C22	-0,0159	0,3962	0,0980	H3C	1,0944	0,9144	0,0431
C5	0,7048	0,9021	0,1156	H3D	1,0915	0,8973	0,0926
C17	-0,0508	0,4684	0,1726	H23	-0,2112	0,1922	0,0537
C21	-0,2559	0,2399	0,1123	H18	-0,3052	0,3848	0,2368
C14	0,1869	0,7250	0,1863	H2A	0,7158	0,7853	0,0234
C12	0,5279	0,4917	0,0774	H2B	0,8604	0,8380	-0,0010
C8	0,6155	0,8107	0,1847	H2C	0,7518	0,9169	0,0270
C16	0,1187	0,6161	0,2052	H7A	0,6551	0,9825	0,1718
C13	0,4041	0,6134	0,2080	H7B	0,8129	0,9118	0,1736
C3	1,0281	0,9129	0,0679	H1A	1,0319	0,6803	0,0846
C23	-0,1824	0,2437	0,0749	H1B	1,0662	0,7077	0,0366
C18	-0,2485	0,3861	0,2114	H1C	0,9087	0,6458	0,0495
C2	0,7981	0,8420	0,0246	H15A	0,2542	0,5916	0,2593
C7	0,7045	0,9108	0,1635	H15B	0,2564	0,4841	0,2288

(CONT)							
C1	0,9852	0,7023	0,0579	H3A	-0,4990	0,1985	0,1863
C15	0,2577	0,5672	0,2298	H27	-0,6926	0,2734	0,1759
C25	0,0153	0,3263	0,0246	H26A	-0,7745	0,0861	0,1320
F4	0,1640	0,2980	0,0315	H26B	-0,6492	0,1771	0,1173
F5	-0,0739	0,3770	-0,0036	H26C	-0,8259	0,2136	0,1243
F6	0,0440	0,2214	0,0112	H28A	-0,8028	0,1216	0,2237
O3	-0,5666	0,1486	0,1890	H28B	-0,9203	0,1527	0,1868
C27	-0,7093	0,1903	0,1763	H28C	-0,8515	0,2497	0,2160
C26	-0,7420	0,1648	0,1343				
C28	-0,8290	0,1780	0,2024				
C29	-0,8460	0,1070	0,1744				
C30	-0,6990	0,2550	0,1410				

TABLA 8

Coordenadas atómicas para el Ejemplo 2F, Forma Base RPG-3							
Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	1,4700	0,5720	0,6614	N2	0,6350	0,3813	0,3765
F7	1,4119	0,5575	0,7000	N6	0,2687	0,8628	0,3992
F2	1,4315	0,5398	0,7741	N4	0,3398	0,7349	0,3149
F8	1,5600	0,5336	0,8131	N1	0,8898	0,3354	0,4598
F3	1,6320	0,5630	0,7860	N5	0,0527	0,9107	0,3489
F9	1,6111	0,5864	0,6960	C12	0,4202	0,2078	0,3911
N9	0,7997	-0,0295	0,8348	O1	0,6129	0,7507	0,2839
N8	0,7989	0,1232	0,9974	C10	0,7273	0,4981	0,3447
N11	1,1628	-0,0946	0,6829	C6	0,8597	0,4735	0,3332
N10	1,0937	0,0679	0,7424	C9	0,7661	0,6239	0,4071
N7	0,5331	0,0253	1,0441	C20	0,1173	0,7695	0,2548
N12	1,3802	-0,0414	0,6342	C19	0,0264	0,8385	0,2716
O3	0,8190	0,0931	0,7142	C5	0,9561	0,4627	0,4193
O4	1,0177	0,2159	0,9737	C17	0,2435	0,7914	0,3234
C34	0,7187	0,1296	0,9094	C8	0,8573	0,6109	0,4957
C45	1,3119	0,1383	0,6926	O2	0,4273	0,3887	0,2980
C37	0,6769	0,0002	0,8509	C24	-0,0460	0,6680	0,1174
C30	0,4799	0,0412	0,9508	C16	0,4606	0,7449	0,3864
C42	1,1869	0,0349	0,7058	C22	0,0802	0,6875	0,1776

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
C31	0,5850	0,1596	0,9161	C14	0,5786	0,7190	0,3544
C49	1,4737	0,3643	0,7029	C7	0,9892	0,5850	0,4828
C33	0,5750	-0,1179	0,8869	C23	-0,1359	0,7367	0,1342
C47	1,3487	0,2751	0,7153	C18	0,1707	0,9200	0,4061
C40	0,8584	0,0198	0,7679	C25	-0,0848	0,5788	0,0372
C32	0,4447	-0,0846	0,8933	C13	0,5736	0,6259	0,4906
C41	0,9773	-0,0327	0,7663	C21	-0,1010	0,8179	0,2096
C39	1,0115	-0,0750	0,8618	C4	0,9438	0,1985	0,3554
C35	0,9405	0,1730	1,0250	C3	0,9469	0,2256	0,4509
C38	0,8681	-0,1166	0,8863	C15	0,4317	0,6466	0,4565
C28	0,4760	0,0765	1,1130	C2	1,0956	0,2572	0,5066
C43	1,2625	-0,1234	0,6483	C11	0,4953	0,3347	0,3508
C44	1,4064	0,0935	0,6556	C1	0,8466	0,1026	0,4843
C46	1,5338	0,1870	0,6430	F4	-0,1040	0,4554	0,0598
C48	1,5649	0,3202	0,6666	F5	0,0211	0,6100	-0,0030
C36	1,0000	0,1703	1,1211	F6	-0,1869	0,5900	-0,0238
C29	0,5552	0,0482	1,2020	F10	-0,2221	0,5070	0,0190
C27	0,3192	0,0052	1,1006	E11	-0,0370	0,4791	0,0400
C26	0,5156	0,2276	1,1108	F12	-0,0360	0,6334	-0,0302
C50	1,5103	0,5068	0,7292	07	0,3015	0,5242	0,1820
N3	0,6420	0,6560	0,4169	O8	0,5067	0,7155	0,1016
C55	0,4573	0,5719	0,0792	H12C	0,3410	0,1518	0,3473
C56	0,3131	0,5089	0,0936	H10A	0,6770	0,5138	0,2867
C54	0,4592	0,5517	-0,0152	H6A	0,8326	0,3912	0,2958
O5	1,1135	0,3136	0,8309	H6B	0,9113	0,5467	0,3027
O6	0,9224	0,3638	0,6775	H9	0,8236	0,6994	0,3801
C52	0,9658	0,4383	0,7607	H95	1,0446	0,4603	0,4067
C53	1,0998	0,4403	0,8150	H8B	0,8035	0,5371	0,5249
C51	0,9706	0,5801	0,7445	H8C	0,8845	0,6928	0,5336
H8	0,7521	0,0843	1,0354	H16	0,4967	0,8363	0,4153
H10	1,1043	0,1515	0,7516	H22	0,1413	0,6448	0,1660
H34	0,7767	0,2034	0,8813	H7A	1,0479	0,6636	0,4601
H37	0,6246	0,0147	0,7931	H77B	1,0425	0,5720	0,5399
H30	0,3926	0,0620	0,9462	H23	-0,2199	0,7261	0,0931
H31A	0,5395	0,1776	0,8580	H18	0,1897	0,9731	0,4584

ES 2 365 264 T3

(CONT)							
H31B	0,6110	0,2396	0,9557	H13A	0,6288	0,6865	0,5425
H33A	0,5480	-0,1985	0,8476	H13B	0,5604	0,5340	0,5057
H33B	0,6213	-0,1349	0,9450	H21	-0,1626	0,8605	0,2204
H47	1,2884	0,3066	0,7391	H4A	0,8479	0,1679	0,3217
H32A	0,3953	-0,0742	0,8343	H4B	0,9856	0,1305	0,3502
H32B	0,3818	-0,1587	0,9172	H4C	0,9960	0,2797	0,3330
H41	0,9434	-0,1120	0,7240	H15A	0,3587	0,5626	0,4312
H39A	1,0471	-0,1496	0,8633	H15B	0,4034	0,6838	0,5038
H39B	1,0801	-0,0006	0,9013	H2A	1,1552	0,3410	0,4913
H38A	0,8152	-0,2110	0,8689	H2B	1,1310	0,1867	0,4955
H38B	0,8786	-0,0998	0,9495	H2C	1,0948	0,2640	0,5683
H43	1,2434	-0,2140	0,6327	H1A	0,8496	0,1213	0,5456
H46	1,5955	0,1582	0,6190	H1B	0,8758	0,0261	0,4785
H48	1,6483	0,3822	0,6582	H1C	0,7522	0,0839	0,4497
H36A	1,0650	0,1213	1,1285	H99	0,9009	0,3500	0,5070
H36B	0,9249	0,1270	1,1498	H7	0,3628	0,5029	0,2157
H36C	1,0484	0,2607	1,1471	H8A	0,5335	0,7307	0,1555
H29A	0,5101	-0,0427	1,2144	H55	0,5214	0,5322	0,1164
H29B	0,5546	0,1090	1,2479	H56A	0,2502	0,5475	0,0555
H29C	0,6509	0,0606	1,1995	H56B	0,2814	0,4136	0,0755
H27A	0,2727	0,0063	1,0399	H54A	0,4034	0,5980	-0,0510
H,27B	0,2829	0,0501	1,1386	H54B	0,4208	0,4574	-0,0335
H27C	0,3022	-0,0863	1,1155	H54C	0,5546	0,5867	-0,0221
H26A	0,6150	0,2666	1,1142	H5	1,0835	0,2863	0,8748
H26B	0,4925	0,2636	1,1602	H6	0,9213	0,2865	0,6847
H26C	0,4641	0,2486	1,0564	H52	0,8933	0,3997	0,7941
H100	0,5160	-0,0550	1,0510	H53A	1,1740	0,4907	0,7866
H2	0,6741	0,3386	0,4153	H53B	1,1148	0,4884	0,8717
H4	0,3295	0,6914	0,2656	H51A	1,0458	0,6226	0,7158
H12A	0,3879	0,2319	0,4404	H51B	0,9866	0,6294	0,8002
H12B	0,4843	0,1597	0,4113	H51C	0,8826	0,5788	0,7073

TABLA 9

Posiciones características de los picos de difracción de rayos X en polvo (grados $2\theta \pm 0,1$ ) a TA para los Ejemplos 2a, b, d, c, d, e, f y g, basadas en un patrón de alta calidad, recogidas con un difractorómetro (CuK $\alpha$ ) con un capilar para centrífuga con calibrado $2\theta$ con un NIST de otro patrón adecuado.						
Exp 2a	Exp 2b	Exp 2c	Exp 2d	Exp 2e	Exp 2f	Exp 2g
5,2	5,5	5,1	5,3	5,4	6,3	6,9
7,9	9,1	6,9	9,6	9,4	9,0	8,7
7,1	12,1	7,4	13,7	11,2	11,7	9,8
17,6	14,0	10,2	14,7	13,7	15,0	10,3
19,6	19,2	18,0	19,5	19,1	17,6	11,8

### Características farmacológicas comparativas

5 Los ensayos y los datos que comparan las características farmacológicas del Ejemplo 1 y los compuestos que se encuentran en el documento WO2005021500 (que corresponde a la Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 7.163.937 asignado al presente Solicitante) se presentan a continuación.

### Unión celular mononuclear de sangre periférica humana (“Unión a CCR2”)

10 Véase por ejemplo: Yoshimura y col., J. Immunol. 1990, 145, 292. El ensayo de unión a CCR2 humano se estableció con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCh) usando <sup>125</sup>I-MCP-1 humana como el ligando indicador. Las PBMCh se aislaron a partir del leukopak humano (Biological Specialty Inc.) usando un protocolo convencional con Ficoll-Hypaque (Mediatech Cellgro). Las PBMCh aisladas se lavaron y diluyeron hasta  $1 \times 10^7$ /ml en tampón de unión (RPMI-1640, ASB al 0,1%, Hepes 20 mM, pH 7,4). <sup>125</sup>I-MCP-1 (NEN/Perk Elmer) se diluyó hasta 0,45 nM en tampón de unión. El compuesto se diluyó en tampón de unión a 3 veces las concentraciones usadas en el ensayo de unión. El ensayo de unión se realizó usando una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore). La unión total de <sup>125</sup>I-MCP-1 se evaluó de la siguiente manera: a cada reacción de un volumen total de 150  $\mu$ l se le añadieron  $5 \times 10^5$  células, <sup>125</sup>I-MCP-1 0,15 nM y compuestos de modo que la concentración final varió desde 0 hasta 100 nM. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido de tres lavados con RPMI-1640, ASB al 0,1%, NaCl 0,4 M, Hepes 20 mM, pH 7,4 usando una filtración por colector de vacío (Millipore). Después de lavar, la placa se secó por aire durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se añadió 25  $\mu$ l de Microscint 20 en cada pocillo. Se cerró la placa y se contó en el Trilux durante 1 minuto. La unión no específica se determinó en presencia de MCP-1 frío 300 nM (PeproTech Inc.). El <sup>125</sup>I-MCP-1 específico se calculó como la diferencia entre la unión total y la no específica. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. La CI50 se define como la concentración de compuesto competidor que se necesita para reducir la unión específica en el 50%.

### 25 Flujo hERG

Se cultivaron las células HEK293 que expresaban establemente los canales hERG (37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>) en medio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado con el 10% de suero bovino fetal Sigma, aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM y 500  $\mu$ g/ml de G418, en la incubadora. El tampón de disociación celular se usó para extraer las células de los matraces, que después se sembraron en placas Corning blancas/negras de 384 pocillos recubiertas de poli-D-lisina a una densidad de  $2 \times 10^4$  células por pocillo (20  $\mu$ l) en el 10% de medio de suero y se incubaron durante 15 – 24 horas a 37°C en una incubadora con el 5% de CO<sub>2</sub> hasta que se obtuvo una monocapa de células confluentes.

35 Una solución madre de colorante BTC-AM 2 mM (Molecular Probes, Eugene, OR) se preparó en DMSO al 100% y después se añadió 1:1 de ácido plurónico al 10% (p/v) el día del ensayo. Después se diluyó el colorante en tampón externo hERG EP (NaCl 140 mM, KCl 4,0 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3 y glucosa 10 mM; todos los componentes del tampón se obtuvieron de Sigma Chemical). Esta mezcla de colorante BTC (30  $\mu$ l) se añadió a las células y produjo una concentración de carga final 2,5  $\mu$ M. Las células se incuban a 21°C durante 45 minutos.

40 Los compuestos de ensayo se diluyeron hasta DMSO 10 mM en 60  $\mu$ l. Estos compuestos después se diluyeron en serie a una proporción de 1:2 en DMSO en las columnas 1 – 10 y 11 –20 de una placa de 384 pocillos. Las placas de lectura de los ensayos se generaron mediante el estampado de 2,5  $\mu$ l de la placa diluida en serie de DMSO, que

se preparó en el Velocity 11 BioCel. Las placas acuosas se crearon añadiendo 48 µl de tampón EP y después se diluyeron 30–45 minutos antes de que se leyera el ensayo en el FLIPR. Después de la carga del colorante, los compuestos en dilución acuosa se añadieron a las células de las tres placas replicadas (10 µl) produciendo un intervalo de concentración de diez puntos de 80 µM a 0,156 nM. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 1%. Las placas acuosas de lectura del ensayo se prepararon y diluyeron en un manipulador de líquidos Cybio.

Las células cargadas con el colorante se leyeron en el FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que excita el colorante usando la longitud de onda de 488 nm de un laser de argón. Se filtró la emisión usando un filtro de paso banda de  $540 \pm 30$  nm. Los canales hERG se estimulan para abrirse mediante la adición de 20 µl/pocillo de tampón EP que contiene  $K_2SO_4$  66 mM y  $Tl_2SO_4$  1,3 mM (Sigma/Aldrich). Para cada placa, se recogieron los datos cada segundo durante un periodo de 12 segundos, a los que se añadió el tampón que contiene  $Tl^+$  estímulo. La recogida de datos transcurrió cada segundo durante 48 segundos y después continuó cada tres segundos durante dos minutos adicionales.

El intervalo dinámico del ensayo se determinó a partir de blancos y pocillos totales. Los pocillos totales (columnas 21 y 22) definen la máxima activación de hERG para la placa (sin compuesto de ensayo presente) y los pocillos blancos (columnas 23 y 24) definen el 100% de la inhibición de hERG. Los pocillos blancos contienen 400 nM de los inhibidores convencionales de hERG dofetilida (Ficker y col., 1998) o E-4031. Los puntos de datos sin procesar de cada pocillo de muestra se corrigieron primero para la variación de la célula/señal, en fondo de control negativo (blancos) y se normalizaron a los controles positivos (totales) usando el software en línea FLIPR. Las curvas de respuesta de la concentración de los compuestos de ensayo para el flujo de datos hERG  $Tl^+$  se ajustaron después usando el Excel Fit (ID Business Solutions Limited, Surrey, Reino Unido) con una ecuación logística de un solo sitio  $Y = A + ((B-A)/1 + ((C/X)^D))$  en la que A = máxima inhibición. Se analizaron los datos mediante el ajuste de las amplitudes máximas de cambio en la fluorescencia para el flujo  $Tl^+$  para una condición dada de un compuesto de ensayo. Las potencias (valores de  $CI_{50}$ ) de los compuestos se calcularon a partir de la media de pocillos triplicados.

#### Canal de sodio, ensayo de unión al sitio 2

Véase también: W. A. Catterall, y col., J. Biol. Chem. 1981, 256, 8922. El tampón de unión convencional contenía HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, Cloruro de Colina 130 mM, KCl 5,4 mM,  $MgCl_2$  0,8 mM, glucosa 5,5 mM, 40 µg/ml de LqT. Las reacciones de unión se iniciaron mediante la adición de sinaptosomas (preparado a partir de cerebro de rata Wistar) a la mezcla de reacción que contenía [ $^3H$ ]-Batracotoxina 5 nM en un tampón de unión convencional y el compuesto a ensayar a la concentración deseable. Después se mezclaron las muestras y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Se pararon las reacciones al añadir tampón de lavado helado que contenía HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4,  $CaCl_2$  1,8 mM,  $MgCl_2$  0,8 mM y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. Los sinaptosomas se recogieron de manera inmediata en filtros de fibra de vidrio y se lavaron tres veces con tampones de lavado. La radiactividad de [ $^3H$ ]-Batracotoxina que permaneció en los filtros se recontó usando espectrómetros de centelleo líquido.

#### 35 Ensayo de Permeabilidad de Membrana Artificial Paralelo (EPMAP)

El ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralelo (EPMAP) está constituido por una combinación lipídica basada en lecitina especialmente formulada denominada como el lípido del tracto gastrointestinal (TGI). El lípido de TGI se usa para formar una membrana en un conjunto de placas en sándwich similar a lo usado en los ensayos Caco-2. El lípido de TIG se parece mucho a la composición y funcionamiento de la membrana in vivo como se mide mediante los compuestos patrón que se conoce que se absorben pasivamente en seres humanos. El EPMAP se usa ampliamente como un modelo in vitro para la exploración de la permeabilidad de los compuestos del descubrimiento. El porcentaje de paso de los compuestos a través de la membrana EPMAP se usa para determinar el coeficiente de permeabilidad ( $C_p$ ), que puede estar relacionado con la permeabilidad pasiva in vivo del compuesto.

El coeficiente de permeabilidad ( $C_p$ ) de un compuesto particular se examina en un entorno dependiente de pH con pH apical y basolateral de 7,4. Todos los experimentos se realizan en determinaciones por triplicado.

Los compuestos (soluciones madre de 10 mM en DMSO al 100%) se diluyeron 1:100 en tampón del pocillo donador pH 7,4 (pION CAT N° 110151), proporcionando una solución de ensayo de 100 µM en DMSO al 1%. El compuesto diluido en el tampón del pocillo donador se transfirió a una placa Whatman Unifilter y se filtró antes de dispensar 200 µl en el pocillo donador de la placa de ensayo (pION CAT N° 110163). La membrana EPMAP se formó mediante la toma de 4 µl con una pipeta de la solución lipídica (pION CAT N°110169) en la placa de filtro (VWR CAT N° 13503). La membrana después se cubrió con 200 µl de tampón del pocillo aceptor a pH 7,4 (pION CAT N°110139). La placa de ensayo EPMAP (lado donador y lado aceptor) se combinó y se permitió incubarse a una temperatura ambiente durante 4 horas. La placa después se desmontó y las placas del espectrofotómetro (VWR CAT N° 655801) se rellenaron (150 µl/pocillo). Las placas donadoras, aceptoras, de referencia y blanco se leyeron en el lector de placas SpectraMax UV. Se recogieron los datos con el software pION, que analiza el espectro y

genera valores de Cp.

### Quimiotaxis de CCR2

El ensayo de quimiotaxis de CCR2 humano se realizó con la línea celular monocítica humana THP-1. Las células THP-1 se marcaron primero con el colorante fluorescente Calcein-AM en rojo fenol libre, ASB libre RPMI-1640 (pH 7,4) a 37°C durante 30 minutos con mezclado suave cada 15 minutos. Las células marcadas se lavaron después y se resuspendieron a  $1 \times 10^5$ /ml en tampón de quimiotaxis (rojo fenol libre RPMI-1640, ASB al 0,1%, pH 7,4). El compuesto de ensayo se diluyó en tampón de quimiotaxis de modo que la concentración final del ensayo variaba desde 0,01 nM a 1 µM. El ligando MCP-1 (PeproTech Inc.) se diluyó hasta 20 nM en tampón de quimiotaxis. Para realizar el ensayo se mezcló un volumen igual de diluciones de compuestos de ensayo con un volumen igual de células marcadas THP-1 (Mezcla 1) y un volumen igual de diluciones de compuestos de ensayo se mezcló con un volumen igual de ligando MCP-1 (Mezcla 2). Se incubaron ambas mezclas independientemente a 37°C durante 10 minutos seguido del mezclado suave. La quimiotaxis inducida por MCP-1 se midió después en una placa de quimiotaxis (Becton Dickinson) mediante la colocación de 50 µl de la Mezcla 1 en la cámara superior y 225 µl de Mezcla 2 en la cámara inferior. Se cubrió la placa con una capa y se incubó a 37°C durante 30 minutos. 30 minutos más tarde, se leyó la placa en un Cytofluor. Se ensayaron todas las condiciones por duplicado. Para la señal de la determinación del ruido se colocaron 50 µl de células marcadas THP-1 solas ( $5 \times 10^4$ /pocillo) en la cámara superior y 225 µl de ligando MCP-1 solo se puso en la cámara inferior (concentración final de 10 nM). La inhibición que se consiguió mediante concentraciones diferentes de los compuestos de ensayo se calculó como un porcentaje del control MCP-1 libre de compuesto. La CI50 se define como la concentración de compuesto de ensayo que se necesita para alcanzar el 50% de la inhibición de la quimiotaxis celular.

### Pinzamiento Zonal hERG

El pinzamiento zonal celular total se usó para medir directamente las corrientes de hERG en células HEK-293 que expresaban establemente la subunidad  $\alpha$  del canal de potasio de hERG clonado. Se ensayó el compuesto en un tampón acuoso con pH 7,4 a temperatura ambiente. Pulsos de ensayo repetitivos (0,05 Hz) se aplicaron a partir de un potencial de reposo de -80 mV hasta +20 mV durante 2 segundos y las corrientes de cola se indujeron después de los pulsos de ensayo mediante el incremento del voltaje hasta -65 mV. Los efectos del compuesto se calcularon midiendo la inhibición de la corriente de cola pico.

### Pinzamiento Zonal del Canal de Sodio

El pinzamiento local celular total se usó para medir directamente las corrientes de sodio entrantes en células HEK-293 que expresaban el canal de sodio cardiaco humano, SCN5A. Se ensayó el compuesto en un tampón acuoso libre de proteínas. Para determinar la inhibición en el estado estacionario, las corrientes de sodio se indujeron cada cinco segundos usando el siguiente protocolo de voltaje: las células se mantuvieron a un potencial de -90 mV y se aumentaron hasta -20 mV durante 60 ms. Se calcularon los efectos midiendo la inhibición de la corriente de pico durante el pulso de ensayo hasta -20 mV. La dependencia de la tasa de inhibición se evaluó mediante estimulación a frecuencias de 1 Hz y 4 Hz.

### Farmacocinética de dosis única en Ratas

Ratas macho Sprague-Dawley (250 -300 g) se usaron para los estudios farmacocinéticos. Se mantuvieron las ratas en ayuno durante una noche antes de la dosificación por vía oral y se alimentaron cuatro horas después de la dosis. Las muestras de sangre (~0,3 ml) se recogieron de la vena yugular en tubos que contenían K<sub>2</sub>EDTA y después se centrifugaron a 4°C (1500 - 2000 xg) para obtener plasma. En un estudio de biodisponibilidad oral, 2 grupos de animales (N = 2 - 3 por grupo) recibieron el compuesto de ensayo como infusión intravenosa (IV) (durante 10 min.) a través de la vena yugular o mediante una sonda oral. Las muestras de sangre en serie se obtuvieron a 0,17 (sólo para IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h después de la dosis. Las muestras de plasma, que se obtuvieron mediante centrifugación a 4°C (1500 - 2000 xg), se almacenaron a -20°C hasta el análisis por LC/MS/MS.

### Farmacocinética de Dosis única en Monos

La farmacocinética de varios compuestos de ensayos se evaluó en monos Cynomolgus en un diseño cruzado. Se mantuvieron en ayuno los monos durante una noche antes de la dosificación por vía oral y se alimentaron 4 h después de la dosis. Un grupo de 1 - 3 animales (3 a 5 kg) recibieron el compuesto por infusión IV (durante 10 min.) mediante una vena femoral y por sonda oral, con un descanso de 1 semana entre tratamientos. Las muestras de sangre en serie (~0,3 ml) se recogieron de una arteria femoral a 0,17 (sólo IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h después de la dosis y se centrifugaron a 4°C (1500 - 2000 xg) para obtener plasma. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el análisis mediante LC/MS/MS.

### Análisis de datos para los ensayos farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron mediante el análisis no compartimental de la concentración de plasma frente a los datos de tiempo (software KINETICA™, Versión 4,2, InnaPhase Corporation, Filadelfia, PA). La concentración de pico (C<sub>max</sub>) y el tiempo para C<sub>max</sub> se registraron directamente a partir de observaciones experimentales. El área bajo la curva desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo (AUC(0-T)) se calculó usando una combinación de las sumas trapezoidales lineales y logarítmicas. El aclaramiento plasmático total (CL<sub>Tp</sub>), el volumen de distribución del estado estacionario (V<sub>ss</sub>), la semivida de eliminación aparente (T<sub>1/2</sub>) y el tiempo medio de residencia (TMR) se estimaron después de la administración IV. Las estimaciones del T<sub>1/2</sub> se hicieron usando un mínimo de 3 puntos de tiempo con concentraciones cuantificables. La biodisponibilidad oral absoluta (F) se estimó como el porcentaje de valores de AUC de dosis normalizadas después de las dosis orales e IV.

A continuación se pueden encontrar datos para cada compuesto como se mide en los ensayos descritos anteriormente.

**Tabla 10. Datos comparativos In vitro**

Compuesto	Cl <sub>50</sub> unión a CCR2 (nM)	Cl <sub>50</sub> FLUJO hERG (nM)	Unión a canal Na <sup>+</sup> (%) inhibición)	Permeabilidad EPMAF (nm/seg)
Ejemplo 12as, documento WO2005021500	0,27 (1)	2.800	No disponible	No disponible
Ejemplo 12aj, documento WO2005021500	0,43 ± 0,06 (2)	770	No disponible	No disponible
Ejemplo 12k, documento WO2005021500	0,88 ± 0,60 (23)	51.000	97%, 10.000 nM	529 ± 157 (9)
Ejemplo 12bd, documento WO2005021500	1,15 ± 0,07 (2)	> 80.000	54%, 10.000 nM	392
Ejemplo 8a, documento WO2005021500	1,83 ± 0,80 (12)	> 80.000	3%, 10.000 nM 33%, 30.000 nM	94 ± 58 (10)
Ejemplo 8e, documento WO2005021500	2,20 ± 0,03 (2)	> 80.000	6%, 10.000 nM	2 ± 2 (2)
Ejemplo 9c, documento WO2005021500	0,96 ± 0,26 (19)	> 80.000	48%, 10.000 nM 75%, 30.000 nM	145 ± 71 (8)
Ejemplo1 Presente invención	2,74 ± 1,34(15)	> 80.000	13% 10.000 nM 32%, 30.000 nM	560 ± 86 (5)

15

**Tabla 11a. Datos comparativos adicionales In vitro**

Compuesto	Cl <sub>50</sub> quimiotaxis CCR2 (nM)	Pinzamiento zonal hERG (%) inhibición)	Pinzamiento zonal del canal de Na <sup>+</sup> (%) inhibición)
Ejemplo 2k, documento WO2005021500	0,24 ± 0,16 (12)	83%, 10.000 nM	52%, 10.000 nM 90%, 30.000 nM

(CONT)			
Ejemplo 8a, documento WO2005021500	2,63 ± 1,24 (4)	4%, 10.000 nM	22%, 10.000 nM 49%, 30.000 nM
Ejemplo 9c, documento WO2005021500	0,21	4%, 10.000 nM	19%, 10.000nM 39%, 30.000nM
Ejemplo1 Presente invención	0,75 ± 0,42 (16)	12%, 10.000 nM 19%, 30.000 nM	29%, 30.000 nM

**Tabla 11b. Datos Farmacocinéticos Comparativos In vivo en la Rata**

Compuesto	Dosis (mg/kg)	IV/VO	Cl (ml/min/kg)	F%	AUC (nM*h)	Oral
Ejemplo 2k, documento WO2005021500	2,5 / 25		40	68	9294	
Ejemplo 8a, documento WO2005021500	6 / 72		42	1,4	690	
Ejemplo 9c, documento WO2005021500	4 / 43		54	14	1855	
Ejemplo1 Presente invención	2 / 10		25	79	10169	

**Tabla 11c. Datos Farmacocinéticos Comparativos In vivo en el Mono**

Compuesto	Dosis (mg/kg)	IV/VO	Cl (ml/min/kg)	F%	AUC (nM*h)	Oral
Ejemplo 2k, documento WO2005021500	1 / 1,4		25	46	862	
Ejemplo 8a, documento WO2005021500	1 / 11		14	9,4	1896	
Ejemplo 9c, documento WO2005021500	1 / 10		12	26	6763	
Ejemplo1 Presente invención	1 / 1		12	95	2352	

5

**Utilidad**

Se muestra que los compuestos representativos de los ejemplos son moduladores de la actividad del receptor de quimiocinas usando ensayos que conocen aquellos especialistas en la técnica. En esta sección, se describen estos ensayos y se dan sus referencias bibliográficas. En este documento se describen más ensayos en la sección denominada "Características Farmacológicas Comparativas", anteriormente. Presentando la actividad en estos ensayos del antagonismo de MCP-1, se espera que los compuestos de los ejemplos sean útiles en el tratamiento de las enfermedades humanas asociadas con las quimiocinas y sus receptores afines. La definición de la actividad en estos ensayos es un compuesto que demuestra un valor CI50 de 30 µM o una concentración menor cuando se mide en un ensayo particular.

10

Antagonismo de la Unión de MCP-1 a PBMC humana (Yoshimura y col., J. Immunol. 1990, 145, 292)

Al menos unos compuestos descritos en los ejemplos tienen actividad en el antagonismo de la unión de MCP-1 a las PBMC humanas (células mononucleares de sangre periférica) descritas en este documento.

5 Las placas de filtro Millipore (Nº MABVN 1250) se tratan con 100 µl de tampón de unión (albúmina de suero bovino al 0,5%, tampón HEPES 20 mM y cloruro de magnesio 5 mM en medio RPMI 1640) durante treinta minutos a temperatura ambiente. Para medir la unión 50 µl de tampón de unión, con o sin una concentración conocida del compuesto, se combina con 50 µl de MCP-1 humana marcada con <sup>125</sup>I (para dar una concentración final de 150 pM de radioligando) y 50 µl de tampón de unión que contiene 5 x 10<sup>5</sup> células. Las células que se usan para estos ensayos de unión pueden incluir células mononucleares de sangre periférica humanas aisladas mediante una centrifugación en gradiente Ficoll-Hypaque, monocitos humanos, (Weiner y col., J. Immunol. Methods. 1980, 36, 89) o la línea celular THP-1 que expresa el receptor endógeno. La mezcla de compuesto, células y radioligando se incuban a temperatura ambiente durante treinta minutos. Las placas se colocan en un colector al vacío, se aplica el vacío y las placas se lavan tres veces con tampón de unión que contiene NaCl 0,5 M. Se elimina el faldón de la placa, la placa se deja secar al aire, se perforan los pocillos y se recuentan. El porcentaje de inhibición de la unión se calcula usando los recuentos totales obtenidos en ausencia de cualquier compuesto competidor y la unión de fondo se determina mediante la adición de MCP-1 100 nM en la placa del compuesto de ensayo.

Antagonismo del Flujo de entrada de Calcio Inducido por MCP-1 (Sullivan, y col., Methods Mol. Biol., 114, 125 – 133 (1999))

20 Al menos unos compuestos descritos en los ejemplos tienen actividad en el antagonismo del ensayo del flujo de entrada de calcio inducido por MCP-1 descrito en este documento.

La movilización de calcio se mide usando el colorante fluorescente indicador de Ca<sup>2+</sup>, Fluo-3. Se incuban las células a 8 x 10<sup>5</sup> células/ml en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,1%, tampón HEPES 20 mM, glucosa 5 mM, suero bovino fetal al 1%, Fluo-3 AM 4 µM y probenecida a 2,5 mM durante 60 minutos a 37°C. Las células usadas para estos ensayos de calcio pueden incluir monocitos humanos aislados como describe Weiner y col., J. Immunol. Methods, 36, 89 – 97 (1980) o líneas celulares que expresan el receptor endógeno CCR2 tales como THP-1 y MonoMac-6. Después se lavan las células tres veces en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,1%, HEPES 20 mM, glucosa 5 mM y probenecida 2,5 mM. Se vuelven a suspender las células en solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,5%, HEPES 20 mM y probenecida 2,5 mM a una concentración final de 2 – 4 x 10<sup>6</sup> células/ml. Se siembran las células en microplacas de pared negra de 96 pocillos (100 µl/pocillo) y se centrifugan las placas a 200 x g durante 5 minutos. Se añaden distintas concentraciones de compuestos a los pocillos (50 µl/pocillo) y después de 5 minutos, se añaden 50 µl/pocillo de MCP-1 para dar una concentración final de 10 nM. La movilización de calcio se detecta usando un lector de placas de imágenes fluorescentes. La monofase celular se excita con un láser de argón (488 nM) y la fluorescencia asociada a las células se mide durante 3 minutos, (cada segundo durante los primeros 90 segundos y cada 10 segundos durante los siguientes 90 segundos). Se generan los datos como unidades de fluorescencia arbitrarias y el cambio en la fluorescencia para cada pocillo se determina como el diferencial máximo mínimo. La inhibición dependiente del compuesto se calcula en relación a la respuesta de MCP-1 solo.

Antagonismo de la Quimiotaxis de las PBMC Humanas Inducida por MCP-1 (Bacon y col., Brit. J. Pharmacol. 1988, 95, 966)

Al menos unos compuestos descritos en los ejemplos tienen actividad en el antagonismo del ensayo de quimiotaxis PBMC humana inducida por MCP-1—descrito en este documento.

45 La cámara de quimiotaxis Neuroprobe MBA96 de 96 pocillos, la placa Polyfiltronics MPC de 96 pocillos y los filtros de 8 micrones de policarbonato libres de polivinilpirrolidona Neuroprobe PFD5 se calientan en una incubadora a 37°C. Las Células Mononucleares de Sangre Periférica Humanas (PBMC) (Boyum y col., Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl. 1968, 97, 31), recientemente aisladas mediante el procedimiento convencional de separación por densidad ficoll, se suspenden en DMEM a 1 x 10<sup>7</sup> c/ml y se calientan a 37°C. Una solución de MCP-1 humana 60 nM también se calienta a 37°C. Las diluciones de los compuestos de ensayo se hacen 2x la concentración necesaria en DMEM. La suspensión de PBMC y la solución de MCP-1 60 nm se mezclan 1:1 en tubos de polipropileno con DMEM precalentado con o sin una dilución de los compuestos de ensayo. Estas mezclas se calientan en un calentador de tubos a 37°C. Para empezar el ensayo, se añade la mezcla compuestos/MCP-1 en los pocillos de la placa de 96 pocillos que se ha colocado en la parte inferior de la cámara de quimiotaxis Neuroprobe. El volumen aproximado es 400 µl a cada pocillo y debe haber un menisco positivo después de la distribución. El filtro de 8 micrones se coloca suavemente en la parte superior de la placa de 96 pocillos, se une una junta de goma a la parte posterior de la cámara de arriba y se monta la cámara. Un volumen de 200 µl de la mezcla compuestos/suspensión celular se añade a los pocillos adecuados en la cámara de arriba. La cámara de arriba se cubre con un sellador de placas y la

unidad montada se pone en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. Después de la incubación, el sellador de placas se elimina y toda la suspensión celular restante se aspira fuera. Se desmonta la cámara y se elimina el filtro suavemente. Mientras que se mantiene el filtro a un ángulo de 90 grados, las células que no han migrado se eliminan usando un chorro de solución salina tamponada con fosfato y la parte de arriba del filtro se seca con la punta de un rodillo exprimidor de goma. Se repite este lavado dos veces más. Se seca el filtro por aire y después se sumerge completamente en tinte Wright Geimsa durante 45 segundos. Después se lava el filtro mediante su empapado en agua destilada durante 7 minutos y después un lavado adicional de 15 segundos en agua destilada fresca. El filtro se seca de nuevo por aire. Las células que han migrado al filtro se cuantifican mediante microscopía visual.

Los receptores de quimiocinas de mamíferos proporcionan una diana que interfiere o promueve la función celular inmune en un mamífero, tal como un ser humano. Los compuestos que inhiben o promueven la función del receptor de quimiocinas son particularmente útiles para modular la función celular inmune para fines terapéuticos. Por consiguiente, la presente invención se dirige a compuestos que son útiles en la prevención y/o tratamiento de una gran variedad de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosos e inmunoreguladores, incluyendo asma y enfermedades alérgicas, infección por microbios patógenicos (que, por definición, incluyen virus), así como patologías autoinmunes tales como la artritis reumatoide y arterosclerosis.

Por ejemplo, un compuesto presente que inhibe una o más funciones de un receptor de quimiocinas de mamíferos (por ejemplo, un receptor de quimiocinas humanas) se puede administrar para inhibir (es decir, reducir o prevenir) enfermedades inflamatorias o infecciosas. Como resultado, uno o más procedimientos inflamatorios, tales como la emigración de leucocitos, la adhesión, la quimiotaxis, la exocitosis (por ejemplo, de enzimas, histamina) o la liberación de mediadores inflamatorios, se inhibe.

De manera similar, un compuesto presente que inhibe una o más funciones del receptor de quimiocinas de mamíferos (por ejemplo, un receptor de quimiocina humano) como se administra para estimular (inducir o potenciar) una respuesta inmune o inflamatoria, tal como la emigración de leucocitos, la adhesión, la quimiotaxis, la exocitosis (por ejemplo de enzimas, histamina) o la liberación de mediadores inflamatorios, lo que da como resultado una estimulación beneficiosa de los procedimientos inflamatorios. Por ejemplo, se pueden reclutar eosinófilos para combatir las infecciones parasíticas. Además, el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes mencionadas anteriormente puede contemplarse también para un compuesto presente que promueve una o más funciones del receptor de quimiocinas de mamíferos si se contempla el suministro de compuesto suficiente para producir la pérdida de la expresión del receptor en células a través de la inducción de la internalización del receptor de quimiocinas o del suministro de compuestos de un modo que da como resultado la mala dirección de la migración celular.

Además de los primates, tales como seres humanos, se puede tratar a una variedad de otros mamíferos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, se pueden tratar mamíferos, incluyendo pero sin limitarse a, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores o murinas. Sin embargo, el procediendo también se puede practicar en otras especies, tales como las especies aviares. El sujeto tratado en los procedimientos anteriores es un mamífero, macho o hembra, en el que se desea la modulación de la actividad del receptor de quimiocina. "Modulación" como se usa en este documento pretende abarcar antagonismo, agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

#### 40 **Ensayos de Unión de CCR5 y Funcionales**

Derivación celular y cultivo celular: Un grupo de células HT 1080 que expresaban establemente el receptor de quimiocinas endógeno CC 5 (CCR5) se desarrollaron usando los procedimientos descritos por Harrington, Sherf, y Rundlett (véase la patente de Estados Unidos US 6.361.972 y US 6.410.266). Los clones que tenían más expresión se aislaron usando citometría de flujo repetitiva, seguida de la subclonación. Estas células se cultivaron después en placas de 6 pocillos a  $3 \times 10^5$  células/pocillos y se transfectaron con vector de ADN que contenía la proteína quimérica G marcada con AH Gqi5 (Molecular Devices; 5 microgramos de vector de ADN linealizado en 15 microlitros de Ex-Gen de Fermentes se usó para la transfección). Dos días después de la transfección, las células se combinaron y se sembraron en placas P 100. Siete días después de sembrarlas, las colonias se recogieron, se expandieron y se analizaron respecto al contenido de Gqi5 mediante transferencia de Western. Un clon (denominado 3559.1.6) que tenía alta expresión de Gqi5 (de la transfección) y de CCR5 (endógeno) se seleccionó y se usó para los experimentos descritos a continuación. Las células HT1080 (clon 3559.1.6) se cultivaron con alfa-MEM suplementado con suero bovino fetal dializado al 10%, penicilina/estreptomina/glutamina al 2% y 500 microgramos/ml de higromicina B (concentración final) a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% en una atmósfera humidificada.

Preparación de la Membrana: Un precipitado celular que contenía  $1 \times 10^8$  células HT 1080 (clon 3559.1.5) se volvió a suspender en 5 ml de Tampón de Preparación de Membrana helado (HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) y se homogeneizó a alta velocidad en el homogeneizador Polytron durante 20 seg en hielo. El homogeneizado se diluyó con otros 25 ml de Tampón de Preparación de Membrana y se centrifugó durante 12 min. (48.000 x g a 4°C).

El precipitado celular se volvió a suspender en 5 ml de Tampón de Preparación de Membrana antes de su rehomogeneización como se divulga anteriormente. El homogeneizado se diluyó con 5 ml de Tampón de Preparación de Membrana y se ensayó respecto a la concentración de proteína CCR5.

5 Ensayo de unión: El homogeneizado preparado recientemente a partir de la Preparación de Membrana descrito anteriormente se diluyó en tampón de Unión (HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, ASB al 0,1%; una tableta completa de inhibidor de proteasa se añadió antes del ensayo) para conseguir una concentración final de proteínas de 10 microgramos/pocillo (placas sólidas blancas de 96 pocillos de Coming, Inc.). Esta preparación de membrana se mezcló con perlas WGA-SPA (Amersham; preempapado en tampón de unión) para dar una concentración de 200 microgramos/pocillo. La mezcla perlas SPA/membrana (100 microlitros/pocillo) se añadió después a una placa que se había presalpicado con 2 microlitros de DMSO que contenía distintas concentraciones de productos de ensayo (DMSO puro para el control negativo; distintas concentraciones de ejemplos de presente invención para los productos de ensayo; MIP-1 beta 500 nM como un control positivo). El ensayo de unión se inició a través de la adición de 50 microlitros de [<sup>125</sup>I]-MIP-1 beta (Perkin Elmer; el material se diluyó en tampón de unión de modo que la adición de 50 microlitros/pocillo da una concentración final de 0,1 nM de [<sup>125</sup>I]-MIP-1 beta). Se cerró la placa y se permitió estar a temperatura ambiente durante 4 – 6 h antes de recontarse en un Packard TopCount. El porcentaje de unión para el producto de ensayo se calculó, usando controles negativos y positivos para definir el intervalo para cada experimento.

20 Ensayo Funcional basado en el Lector de Placas de Imagen Fluorométrica (FLIPR): Las células HT1080 (clon 3559.1.6) se sembraron en placas de 384 pocillos a 10.000 células/pocillo (30 microlitros) (Biocoat PDL de fondo negro/blanco, Beckton Dickinson) y se cargaron con 30 microlitros/pocillo de colorante fluorescente Fluro-4 AM (preparado por disolución de 1 mg de Fluro-4 AM en 440 microlitros de DMSO y diluyendo con 100 microlitros de solución plurónica antes de diluir más con 10 ml de tampón de Hanks). Se incubaron las células a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 30 minutos antes de lavarse tres veces y suspenderse en Tampón de Ensayo (HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Probenecida 2,5 mM, ASB al 0,5%, 1x Hanks). El producto de ensayo se diluyó en serie en DMSO y después se diluyó 1:10 con Tampón de Ensayo antes de añadirse a las células (10 microlitros/pocillo). Usando FLIPR, se leyeron las placas (10 – 70 segundos) para la inducción del flujo (es decir, la actividad agonista). Se cargaron además las células con Solución de Agonista (30 microlitros/pocillo; se prepararon mediante la dilución de 30 microlitros de MIP-1 beta 100 microMolar en 100 ml de Tampón de Ensayo; este protocolo suministra al ensayo una concentración final de 5 nM de MIP-1 beta) y las placas se leyeron usando FLIPR durante un minuto. La actividad antagonista del producto de ensayo se determinó en relación con el control negativo de DMSO/Tampón al 0,4%.

Al menos un compuesto de la descripción es un inhibidor tanto de CCR2 como de CCR5 y se puede usar para tratar enfermedades relacionadas con cualquier quimiocina. Los compuestos de la presente invención se consideran antagonistas duales.

35 Las enfermedades o afecciones del ser humano u otras especies que pueden tratarse con inhibidores de la función del receptor de quimiocinas, incluyen, pero no se limitan a: enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis hipersensible, celulitis eosinofílica (por ejemplo, el síndrome de Well), neumonía eosinofílica (por ejemplo, el síndrome de Loeffler, neumonía eosinofílica crónica), faringitis eosinofílica (por ejemplo, síndrome de Shulman), hipersensibilidad de tipo retardado, enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o EPI asociada con artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergia a medicamentos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), síndrome de eosinofilia mialgia debido a la ingesta de triptófano contaminado, alergia a picaduras de insectos; enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, artritis psoriática, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, miastemia gravis, diabetes juvenil; glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet; rechazo de injertos (por ejemplo, en trasplantes), incluyendo rechazo de aloinjertos o enfermedad del injerto contra huésped; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa; espondiloartropatías; esclerodermia; psoriasis (incluyendo psoriasis mediada por linfocitos T) y dermatosis inflamatorias tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y por hipersensibilidad); miositis eosinofílica, fascitis eosinofílica; cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos. Otras enfermedades o afecciones en las que respuestas inflamatorias indeseables deben inhibirse se pueden tratar, incluyendo, pero no limitadas a, vasculitis, placas vulnerables, hiperplasia neointimal venosa, daño por reperfusión, hiperplasia neointimal de inserción de diálisis, hiperplasia intimal de derivación arteriovenosa, aterosclerosis, ciertos desórdenes hematológicos, toxicidad inducida por citoquinas (por ejemplo, choque séptico, choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis. Las enfermedades o afecciones infecciosas de los seres humanos u otras especies que se pueden tratar con inhibidores de la función del receptor de quimiocina, incluyen, pero no se limitan a, VIH.

Las enfermedades o afecciones del ser humano u otras especies que se pueden tratar con promotores de la función del receptor de quimiocina, incluyen, pero no se limitan a: inmunosupresión, como la de individuos con síndromes de inmunodeficiencia tales como el SIDA u otras infecciones virales, individuos sometidos a terapia de radiación, quimioterapia, terapia para enfermedades autoinmunes o terapia farmacológica (por ejemplo, terapia de corticosteroides), que produce inmunosupresión, inmunosupresión debida a la deficiencia congénita en la función del receptor u otras causas y enfermedades infecciosas, tales como enfermedades parasíticas, incluyendo, pero no limitadas a infecciones por helmintos, tales como nematodos (gusano redondo); (Trichuriasis, Enterobiasis, Ascariasis, Anquilostoma, Estrongiloidiasis, Triquinosis, filariasis); trematodos (duela) (Esquistosomiasis, Clonorquiasis), cestodos (tenia) (Equi-nococcosis, Taeniasis saginata, Cisticercosis); gusanos viscerales, larva migratoria visceral (por ejemplo, Toxocara), gastroenteritis eosinofílica (por ejemplo, Anisaki sp., Phocanema sp.), larva migratoria cutánea (Ancylostoma braziliense, Ancylostoma caninum). Los compuestos de la presente invención son por consiguiente útiles en la prevención y tratamiento de una gran variedad de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunorreguladoras.

Además, el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes mencionadas anteriormente también se puede contemplar para promotores de la función de receptores de quimiocinas si se contempla el suministro de compuesto suficiente para provocar la pérdida de la expresión del receptor en células a través de la inducción de la internalización del receptor de quimiocina o suministro del compuesto de un modo que da como resultado la mala dirección de migración celular.

En otro aspecto, la invención presente puede usarse para evaluar los agonistas o antagonistas específicos putativos de un receptor acoplado a proteínas G. La presente invención se dirige al uso de estos compuestos en la preparación y ejecución de ensayos de exploración para compuestos que modulan la actividad de los receptores de quimiocinas. Además, los compuestos de presente invención son útiles en el establecimiento o determinación del sitio de unión de otros compuestos a los receptores de quimiocinas por ejemplo, mediante inhibición competitiva o como una referencia en un ensayo para comparar su actividad conocida frente a un compuesto con una actividad desconocida. Cuando se desarrollan nuevos ensayos o protocolos, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden usar para ensayar su eficacia. Específicamente, estos compuestos se pueden proporcionar en un kit comercial, por ejemplo, para el uso en la investigación farmacéutica que implica las enfermedades mencionadas anteriormente. Los compuestos de la invención presente también son útiles para la evaluación de moduladores específicos putativos de los receptores de quimiocina. Además, se podrían utilizar compuestos de la presente invención para examinar la especificidad de receptores acoplados a proteínas G que no se cree que sean receptores de quimiocinas, sirviendo como ejemplos de compuestos que no se unen o como variantes estructurales de compuestos activos en estos receptores que pueden ayudar para definir los sitios específicos de interacción.

Los compuestos que se describen en este documento son útiles para tratar o prevenir trastornos seleccionados de artritis reumatoide, osteoartritis, choque séptico, aterosclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, choque hemodinámico, síndrome de sepsis, daño después de una reperfusión isquémica, malaria, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias del intestino, infección micobacteriana, meningitis, psoriasis, fallo cardiaco congestivo, enfermedades fibróticas, caquexia, rechazo de injertos, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias de la piel, esclerosis múltiple, daño por radiación, daño alveolar hiperóxico, VIH, demencia por VIH, diabetes mellitus no dependiente de insulina, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, fibrosis pulmonar idiopática, pemfigoide vesicular, infecciones parasíticas helmínticas, colitis alérgica, eczema, conjuntivitis, trasplante, eosinofilia familiar, celulitis eosinofílica, neumonías eosinofílicas, fascitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, eosinofilia inducida por fármacos, fibrosis quística, síndrome de Churg–Strauss, linfoma, enfermedad de Hodgkin, carcinoma del colon, síndrome de Felty, sarcoidosis, uveítis, Alzheimer, Glomerulonefritis y lupus sistémico eritematoso, carcinoma de células escamosas del esófago, dolor neuropático y obesidad.

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

En otro aspecto, los compuestos se usan para tratar o prevenir trastornos inflamatorios seleccionados de artritis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis. La enfermedad de Crohn, las enfermedades inflamatorias del intestino y la esclerosis múltiple.

En otro aspecto, los ejemplos descritos en este documento pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de cánceres, incluyendo, pero no limitado a, los siguientes:

carcinoma incluyendo el de vejiga (incluyendo el cáncer de vejiga acelerado y metastático), de mama, de colon (incluyendo el cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y el adenocarcinoma pulmonar), ovario, próstata, testículos, tracto génito urinario, sistema linfático, del recto, de la laringe, páncreas, (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar,

cérvix, tiroides y piel (incluyendo el carcinoma de células escamosas);

tumores hematopoyéticos de linaje linfoide incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin, tricoleucemia, linfoma histiocítico y linfoma de Burketts;

- 5 los tumores hematopoyéticos de linaje mielóide incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, el síndrome mielodoblástico, leucemia mielóide y leucemia promioblástica;

los tumores del sistema nervioso central y periférico incluyen astrocitoma, neurolastoma, glioma y schwannomas;

tumores de origen mesenquimal incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y

- 10 otros tumores incluyen melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

En otra realización, los compuestos se pueden usar en procedimientos para el tratamiento contra el cáncer, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata y melanoma. Adicionalmente, los compuestos descritos en este documento pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer de ovarios y el mieloma múltiple.

- 15 La presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de una variedad de enfermedades proliferativas no cancerosas.

La terapia combinada para prevenir y tratar enfermedades y trastornos inflamatorios, infecciosos e inmunoreguladores, incluyendo el asma y las enfermedades alérgicas, al igual que la patología autoinmunes tales como artritis reumatoide y arterosclerosis y aquellas patologías indicadas anteriormente se ilustra por la combinación de compuestos de presente invención y otros compuestos que se conocen para dichas utilidades. Por ejemplo, en el tratamiento o prevención de la inflamación, los compuestos presentes se pueden usar junto con un agente antiinflamatorio o analgésico tal como un agonista opiáceo, un inhibidor de lipoxigenasa, un inhibidor de ciclooxigenasa-2, un inhibidor de interleucina, tal como un inhibidor de interleucina-1, un inhibidor del factor de necrosis tumoral, un antagonista de NMDA, un inhibidor u óxido nítrico o un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un inhibidor de fosfodiesterasa o un agente antiinflamatorio supresor de citoquina, por ejemplo con un compuesto tal como acetaminofeno, aspirina, codeína, fentanilo, ibuprofeno, indometacina, ketorolac, morfina, naproxeno, fenacetina, piroxicam, un analgésico esteroideo, sufentanil, sunlindac, interferón alfa y similares. De manera similar, los compuestos presentes se pueden administrar con un agente aliviador del dolor; un potenciador tal como la cafeína, un antagonista de H<sub>2</sub>, simeticona, aluminio o hidróxido de magnesio; un descongestivo tal como fenilefrina, fenilpropranolamina, pseudofedrina, oximatazolina, epinefrina, nafazolina, xilometazolina, propilhexedrina o levodesoxiefedrina; un antitusivo tal como la codeína, hidrocodona, caramifen, carbetapentano o dexametorfano; un diurético; y una antihistamina sedante o no sedante. De la misma manera, los compuestos descritos en este documento pueden usarse en combinación con otros fármacos que se usan en el tratamiento/prevención/supresión o mejora de las enfermedades o afecciones para las que los compuestos de la presente invención son útiles. Estos otros fármacos se pueden administrar, por una vía y en una cantidad comúnmente usada por tanto, contemporáneamente o secuencialmente con un compuesto de la presente invención. Cuando un compuesto se usa contemporáneamente con uno o más de otros fármacos, una composición farmacéutica que contiene tales fármacos se puede usar además del compuesto de la presente invención. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas que también contienen uno o más ingredientes activos, además de un compuesto de la presente descripción.

Los ejemplos de otros ingredientes activos que pueden combinarse con un compuesto de la presente invención, administrado separadamente o en las mismas composiciones farmacéuticas, incluyen, pero no se limitan a: (a) antagonistas de integrinas tales como aquellos para selectinas, ICAM y VLA-4; (b) esteroides tales como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona e hidrocortisona; (c) inmunosupresores tales como ciclosporina, tracolimus, rapamicina y otros inmunosupresores de tipo FK-506; (d) antihistaminas (antagonistas de la histamina H<sub>1</sub>) tales como bromofeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, triprolidina, clemastina, difenhidramina, difenilpiralina, tripeleennamina, hidroxizina, methdilazina, prometazina, trimeprazina, azatadina, ciproheptadina, antazolina, feniramina pirilamina, astemizol, terfenadina, loratadina, cetirizina, fexofenadina, descarboetoxiloratadina y similares; (e) antiasmáticos no esteroideos tales como agonistas de b<sub>2</sub> (terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetarina, albuterol, bitolterol y pirbuterol), teofilina, cromolin sódico, atropina, bromuro de ipratropio, antagonistas de leucotrienos (zafirlukast, montelukast, pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-102.203), inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos (zileuton, BAY-1005); (f) agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) tales como los derivados del ácido propiónico (alminoprofeno, benxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido

5 triprofénico y tioxaprofeno), derivados del ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclóxico, fentiazaco, furofenaco, ibufenaco, isoxepaco, oxpinaco, sulindaco, tiopinaco, tolmetina, zidometacina y zomepiraco), derivados del ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico), derivados del ácido bifenilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetil salicílico, sulfasalazina) y las pirazonas (apazona, bezpiperilón, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona); (g) inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2); (h) inhibidores de la fosfodiesterasa de tipo IV (PDE-IV); (i) otros antagonistas de los receptores de quimiocinas; (j) agentes reductores de colesterol tales como los inhibidores de la reductasa HMG-COA (lovastatina, simvastatina y pravastatina, fluvastatina, atorvastatina y otras estatinas), secuestrantes (colestiramina y colestipol), ácido nicotínico, derivados del ácido fenofibrato (gemfibrozilo, clofibrato, fenofibrato y benzafibrato), y probucol; (k) agentes antidiabéticos tales como insulina, sulfonilureas, biguanidas (metformina), inhibidores de la glucosidasa  $\alpha$  (acarbosa) y glitazonas (troglitazona y pioglitazona); (l) preparaciones de interferones (interferón alfa-2a, interferón-2B, interferón alfa-N3, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón gama-1b); (m) compuestos antivirales tales como efavirenz, nevirapina, indinavir, ganciclovir, lamivudina, famciclovir y zalcitabina; (o) otros compuestos tales como el ácido 5-aminosalicílico y profármacos del mismo, antimetabolitos tales como azatioprina y 6-mercaptopurina y agentes quimioterapéuticos citotóxicos contra el cáncer. La relación de peso del compuesto de la presente invención respecto al segundo ingrediente activo puede ser variado y dependerá de las dosis eficaces de cada ingrediente.

20 Generalmente, se usará una dosis eficaz de cada uno. Por lo tanto, por ejemplo, cuando un compuesto se combina con un AINES la relación de peso del compuesto de la presente invención respecto al AINES variará generalmente de aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 1:1000, o como alternativa de aproximadamente 240:1 a aproximadamente 1:200. Las combinaciones de un compuesto de la presente invención y otros ingredientes activos también estarán generalmente dentro del intervalo mencionado anteriormente, pero en cada caso, se debería usar una dosis eficaz de cada ingrediente.

25 En el tratamiento contra el cáncer, una combinación de agentes quimioterapéuticos y/u otros tratamientos (por ejemplo terapia por radiación) es a menudo ventajoso. El segundo (o tercer) agente puede tener el mismo o diferente mecanismo de acción que el primer agente terapéutico. Puede ser especialmente útil emplear combinaciones de fármacos citotóxicos en las que los dos o más fármacos que se administran actúan de diferente modo o en diferente fase de ciclo celular y/o en la que los dos o más fármacos tienen toxicidades o efectos secundarios solapantes y/o en la que el fármaco que se combina tiene una eficacia demostrada en el tratamiento del estado particular de la enfermedad manifestado por el paciente.

30 Por consiguiente, los compuestos descritos en este documento (u otras fórmulas descritas en este documento) se pueden administrar en combinación con otros agentes y tratamientos anticáncer y citotóxicos útiles en el tratamiento contra el cáncer u otras enfermedades proliferativas. La invención en este documento comprende además el uso de compuestos del presente documento (u otras fórmulas descritas en este documento), en la preparación de medicamentos para el tratamiento contra el cáncer y/o comprende el empaquetado de los compuestos del presente documento junto con instrucciones de que los compuestos se utilizan en combinación con otros agentes y tratamientos anticáncer o citotóxicos para el tratamiento contra el cáncer. La presente invención comprende además combinaciones de los compuestos de y uno o más agentes adicionales en forma de kit, por ejemplo, en el que se empaquetan juntos o se ponen en cajas separadas para venderse juntos como un kit o en el que se empaquetan para formularse juntos.

Los segundos (o más) agentes anticáncer se pueden seleccionar de uno cualquiera o más de los siguientes:

45 agentes alquilantes, (incluyendo mostazas de nitrógeno, alquilsulfonatos, nitrosoureas, derivados de etileniminas y triazenos); antiangiogénicos (incluyendo inhibidores de metaloproteinasas de matriz); antimetabolitos (incluyendo inhibidores de la desaminasa de adenosina, antagonistas del ácido fólico, análogos de purina y análogos de pirimidina); antibióticos o anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos CTLA-4, antraciclinas); inhibidores de aromataza;

modificadores de la respuesta del ciclo celular; enzimas; inhibidores de la proteína farnesil transferasa;

50 agentes hormonales y antihormonales y esteroides (incluyendo análogos sintéticos, glucocorticoides, estrógenos/ antiestrógenos [por ejemplo, MSRE], andrógenos/antiandrógenos, progestinas, agonistas de los receptores de progesterona y agonistas y antagonistas de la liberación de la hormona luteinizante [LHRH]); los moduladores del sistema de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF)/receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR) (incluyendo los inhibidores IGFR1 I); los inhibidores de la señalización por integrinas; inhibidores de quinasa (incluyendo multiquinasa y/o inhibidores de la quinasa Src o Src/abl, inhibidores de la quinasa dependiente de ciclinas [CDK], anticuerpos panHer, Her-1 y Her-2, inhibidores de VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF, inhibidores de EGFR, inhibidores de la proteína activada por mitógeno [MAP], inhibidores de MEK, inhibidores de quinasa Aurora, inhibidores de PDGF y otros inhibidores de tirosina quinasas o inhibidores de serina/treonina

quinasas;

agentes disruptores de microtúbulos, tales como ecteinascidinas o sus análogos o derivados: agentes estabilizantes de microtúbulos tales como taxanos y los epotilonos que se producen de forma natural y sus análogos sintéticos y semisintéticos;

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

inhibidores de topoisomerasas; inhibidores de la proteína prenil transferasa; complejos coordinadores de platino; inhibidores de la transducción de la señal; y otros agentes usados como agentes anticáncer y citotóxicos tales como modificadores de la respuesta biológica, factores de crecimiento y moduladores inmunes.

10 Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden formular o coadministrar con otros agentes terapéuticos que se seleccionan por su utilidad particular al dirigir los efectos secundarios asociados con las afecciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden formularse con agentes para prevenir las náuseas, la hipersensibilidad y la irritación gástrica, tales como antieméticos y antihistamínicos H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>.

15 Los otros agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, se pueden usar, por ejemplo, en aquellas cantidades indicadas en el Physicians' Desk Reference (PDR) o como se determina de otra manera por un experto habitual en la materia.

20 Los compuestos se administran a un mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz. Mediante "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad de un compuesto de la presente descripción que, cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a un mamífero, es eficaz para prevenir o mejorar el estado de la enfermedad o la progresión de la enfermedad.

### Dosificación y formulación

25 Los compuestos de esta divulgación se pueden administrar en formas farmacéuticas orales tales como comprimidos, cápsulas (cada una de ellas incluyen formulaciones de liberación prolongada o controlada), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, siropes y emulsiones. También se pueden administrar en forma intravenosa (en embolada o infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas usando formas farmacéuticas que conocen bien aquellos expertos habituales en la técnica farmacéutica. Se pueden administrar solos, pero generalmente se administrarán con un vehículo farmacéutico seleccionado en base a la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica convencional.

30 La pauta de dosificación para los compuestos de la presente invención variará, por supuesto, dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; la especie, edad, sexo, salud, condición médica y peso del receptor; la naturaleza y extensión de los síntomas; el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia de tratamiento; la vía de administración, la función hepática y renal del paciente y el efecto deseado. Un médico o veterinario puede determinar y prescribir la cantidad eficaz del fármaco que se necesita para prevenir, contrarrestar o detener el progreso del trastorno.

35 A modo de orientación general, la dosis oral diaria de cada ingrediente activo, cuando se usa para los efectos indicados, variará entre aproximadamente 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal, o entre aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal por día o como alternativa, entre aproximadamente 1,0 a 20 mg/kg/día. Por vía intravenosa, las dosis variarán desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg/minuto durante una infusión de velocidad constante. Los compuestos de esta invención pueden administrarse en una sola dosis diaria o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. En una realización, la dosis oral diaria del ingrediente activo está entre 3 y 600 mg cuando se administra una vez al día o dividido en dosis administradas dos veces al día. Como alternativa, el ingrediente activo se puede administrar en dosis de 10 – 20 mg administrados dos veces al día o de 40 a 100 mg administrados una vez al día. Como alternativa, el ingrediente activo se puede administrar una dosis de 12,5 mg dos veces al día o 75 mg una vez al día. Como alternativa, el ingrediente activo se puede administrar en dosis de 3, 10, 30, 100, 300 y 600 mg administrados una o dos veces a día.

50 Los compuestos de esta invención se pueden administrar en una forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados o mediante vías transdérmicas, usando parches transdérmicos. Cuando se administra de la forma de un sistema de suministro transdérmico, la administración de la dosis será, por supuesto, continua en lugar de intermitente a través de la pauta de dosificación.

Los compuestos se administran típicamente en una mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticamente adecuados (denominados colectivamente en este documento como vehículos farmacéuticos) seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración que se pretende, es decir, comprimidos

orales, cápsulas, elixires, siropes y similares, y coherentes con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un vehículo oral inerte farmacéuticamente aceptable tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metil celulosa, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares; para la administración oral en forma líquida, los compuestos de fármaco oral se pueden combinar con cualquier vehículo oral inerte farmacéuticamente aceptable, no tóxico, tal como etanol, glicerol, agua, y similares. Además, cuando se desee o sean necesarios, se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales o sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes que se usan en estas formas farmacéuticas incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metil celulosa, goma de agar, bentonita, goma xantano y similares.

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

Los compuestos de la presente invención también pueden estar acoplados con polímeros solubles en forma de vehículos de fármacos dirigibles. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol o polietilenoóxido-polilisina sustituido con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles en conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros del ácido poliláctico y poliglicólico, poliepsilón caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliactales, polidihidropiranos, policianoacilatos y copolímeros de bloque entrelazados o antipáticos de hidrogeles.

Las formas farmacéuticas (composiciones farmacéuticas) adecuadas para la administración pueden contener desde aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 100 miligramos de ingrediente activo por unidad de dosificación. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo estará presente habitualmente en una cantidad de aproximadamente el 0,5% – 95% en peso basado en el peso total de las composiciones.

Las cápsulas de gelatina pueden contener el ingrediente activo y vehículos en polvo, tales como derivados de lactosa, almidón, celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Se pueden utilizar diluyentes similares para fabricar comprimidos comprimidos. Tanto comprimidos como cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación prolongada para proporcionar una liberación controlada de medicación durante un periodo de horas. Los comprimidos comprimidos pueden estar recubiertos por azúcar o recubiertos por una película ,para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o recubiertos entéricamente para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente.

En general, el agua, un aceite adecuado, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y soluciones azucaradas relacionadas y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos adecuados para soluciones parenterales. Las soluciones para la administración parenteral pueden contener una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizantes adecuados, y si es necesario, sustancias tampón. Los agentes antioxidantes tales como el bisulfito de sodio o ácido ascórbico, solos o combinados, son agentes estabilizantes adecuados. También se usan ácido cítrico y sus sales y EDTA de sodio. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil- o propilparabeno y clorobutanol.

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

Las formas de dosificación farmacéuticas útiles representativas para la administración de los compuestos de esta invención se pueden ilustrar de la siguiente manera:

#### 50 **Cápsulas**

Un gran número de unidades de cápsulas se pueden preparar rellenando cápsulas convencionales de gelatina duras de dos piezas cada una con 100 miligramos de ingrediente activo en polvo, 150 miligramos de lactosa, 50 miligramos de celulosa y 6 miligramos de estearato de magnesio.

**Cápsulas de Gelatina Blanda**

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

**Comprimidos**

10 Los comprimidos se pueden preparar mediante procedimientos convencionales de modo que la unidad de dosificación es 100 miligramos de ingrediente activo, 0,2 miligramos de dióxido de silicio coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 miligramos de celulosa microcristalina, 11 miligramos de almidón y 98,8 miligramos de lactosa. El revestimiento apropiado se puede aplicar para aumentar el buen sabor o retrasar la absorción.

**Inyectable**

Una composición parenteral adecuada para la administración por inyección se puede preparar agitando el 1,5% en peso del ingrediente activo en el 10% en volumen de propilenglicol y agua. La solución debería hacerse isotónica con cloruro sódico y esterilizarse.

**15 Suspensión**

Una suspensión acuosa se puede preparar para la administración oral de modo que cada 5 ml contienen 100 mg de ingrediente activo dividido finamente, 200 mg de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg de benzoato de sodio, 1,0 g de solución de sorbitol, U.S.P. y 0,025 ml de vainilina.

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

25 Cuando dos o más de los segundos agentes terapéuticos anteriores se administran con el compuesto de los ejemplos, generalmente la cantidad de cada componente en una dosis diaria típica y forma farmacéutica típica se puede reducir en relación a la dosis normal del agente cuando se administra solo, en vista del efecto aditivo o sinérgico de los agentes terapéuticos cuando se administra en combinación.

30 Particularmente cuando se proporciona en forma de una sola unidad de dosificación, el potencial para una interacción química entre los principios activos combinados existe. Por este motivo, cuando el compuesto de los ejemplos y un segundo agente terapéutico se combinan en una sola unidad de dosificación se formulan de modo que aunque los ingredientes activos se combinan en una sola unidad de dosificación, el contacto físico entre los ingredientes activos se minimiza (es decir, se reduce). Por ejemplo un ingrediente activo puede estar revestido entéricamente. Revistiendo entéricamente uno de los ingredientes activos, es posible no sólo minimizar el contacto

35 entre los ingredientes activos combinados, sino también, es posible controlar la liberación de uno de estos componentes en el tracto gastrointestinal de modo que uno de estos componentes no se libera en el estómago sino más bien se libera en los intestinos. Uno de los ingredientes activos también puede estar revestido con un material que afecte a la liberación prolongada a través del tracto gastrointestinal y también sirve para minimizar el contacto físico entre los ingredientes activos combinados.

40 Además, el componente de liberación prolongada puede estar revestido adicionalmente entéricamente de modo que la liberación de este componente se produce sólo en el intestino. Otro planteamiento implicaría la formulación de un producto de combinación en el que uno de los componentes está revestido con un polímero de liberación prolongada o entérica y el otro componente también está revestido con un polímero tal como hidroxipropil metilcelulosa de bajo grado de (HPMC) u otros materiales adecuados como se sabe en la técnica, para separar

45 más los componentes activos. El revestimiento polimérico sirve para formar una barrera adicional para la interacción con el otro componente.

50 Estas y otras maneras de minimizar el contacto entre los componentes de los productos de combinación de la presente invención, si se administran en una sola forma farmacéutica o se administran en formas separadas pero al mismo tiempo de la misma manera, se pondrán de manifiesto a aquellos especialistas en la técnica, una vez dispongan de la presente descripción.

Adicionalmente, ciertos compuestos descritos en este documento pueden ser útiles como metabolitos de otros compuestos. Por lo tanto, en una realización, los compuestos pueden ser útiles como un compuesto

sustancialmente puro, que puede también incorporarse después en una composición farmacéutica o puede ser útil como metabolito que se genera después de la administración del profármaco de ese compuesto. En una realización, un compuesto puede ser útil como un metabolito siendo útil para el tratamiento de trastornos como se describe en este documento.

- 5 “Sustancialmente puro” como se usa en este documento pretende incluir un compuesto que tiene una pureza mayor de aproximadamente el 90 por ciento incluyendo aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 por ciento.

10 Como un ejemplo, un compuesto descrito en este documento puede ser sustancialmente puro en tanto que tiene una pureza mayor de aproximadamente el 90 por ciento (en peso), en el que el menos de aproximadamente 10 por ciento restante de material comprende otros metabolitos del compuesto, un profármaco del compuesto y/o reacción y/o impurezas del procesamiento que surgen de su preparación.

Obviamente, numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención son posibles en vista de los contenidos anteriores. Debe entenderse, por lo tanto, que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención se puede practicar de otra manera que se describe específicamente en este documento.

### 15 **Ensayos in vivo y eficacia**

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-(S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil) acetamida (también denominado como “Ejemplo 1”) se evaluó en los siguientes ensayos in vivo como se describe a continuación.

### 20 **Sección 1. Ejemplo 1 en el reclutamiento de células mononucleares bloqueadas a la piel siguiendo la exposición intradérmica (ID) de MCP-1 en monos cynomolgus**

La inyección intradérmica de MCP-1 da como resultado la infiltración de células mononucleares al sitio de inyección. Este modelo se desarrolló inicialmente para evaluar el efecto inhibitorio de los antagonistas de CCR2 en la infiltración de células mononucleares al tejido de la piel inyectado con MCP-1 humana. El infiltrado celular se puede medir de forma semi-cuantitativa por medio de registro histológico.

### 25 **Procedimientos**

Se dosificó a cada mono con el Ejemplo 1 o su vehículo de control (HCl 0,05 N) una vez al día durante tres días. El Ejemplo 1 se administró por vía oral a dosis de 0, 5, 10 ó 20 mg/kg a grupos de 4 monos cynomolgus (2 por sexo por grupo). Inmediatamente después de la dosificación en el Día 3, todos los animales recibieron dos inyecciones intradérmicas de 10 µg (50 µl/inyección) de MCP-1 humana (R&D Systems) y 2 inyecciones intradérmicas de su control DPBS (50 µl/inyección) en sitios separados del tórax dorsal. Las biopsias dérmicas de todos los sitios se obtuvieron aproximadamente 18 horas después de la exposición a MCP-1 (o DPBS). Se procesaron las biopsias para la evaluación histológica semi-cuantitativa. Las secciones representativas de muestras de piel se examinaron mediante microscopía óptica, las lesiones microscópicas y la infiltración celular se apuntaron y sus incidencias se tabularon.

35 Además del análisis por biopsias, se recogió sangre y se evaluó para los recuentos totales sanguíneos y diferenciales celulares. También se evaluaron las muestras de plasma para las concentraciones de compuesto (y metabolitos) y las muestras de suero para los niveles sistémicos de MCP-1.

### **Resultados**

40 El reclutamiento de células mononucleares a la piel de animales de control tratados con vehículos en respuesta a MCP-1 fue significativo (puntuación histológica media de 2,0 con un intervalo de 1 – 3, Tabla 10). El Ejemplo 1, a 5, 10, y 20 mg/kg, inhibió esta infiltración dérmica de células mononucleares en el 75%, 95% y 95%, respectivamente (Tabla 10 y Figura 20). El compuesto también inhibió la infiltración de otros tipos celulares tales como eosinófilos y neutrófilos (Tabla 12). Las concentraciones de plasma del Ejemplo 1 a las 18 horas y su relación con los niveles de inhibición y los valores de CI90 de quimiotaxis Cyno se resumen en la Tabla 12. Basándose en el valor CI50 de 7,1 ± 2,7 nM para el Ejemplo 1 en el ensayo de quimiotaxis Cyno, las dosis de 5, 10 y 20 mg/kg dieron como resultado una concentración de plasma libre de 0,8, 2,1, y 4,3 veces la CI90 de quimiotaxis 18 horas después de la dosificación (Tabla 12).

50

TABLA 12

<b>Resumen de los efectos del Ejemplo 1 en la infiltración de células mononucleares y otros tipos celulares en respuesta a la exposición de MCP-1 en monos cynomolgus<sup>a,b</sup></b>						
<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Concentración plasmática libre (nM)</b>	<b>Nº de veces CI90 Quimiotaxis</b>	<b>Puntuación de células mononucleares (intervalo) (% Inhibición)</b>	<b>Puntuación PMN<sup>c</sup> (intervalo)</b>	<b>Puntuación Eos<sup>d</sup> (intervalo)</b>	<b>Puntuación total células (intervalo)</b>
0	0	0	2,0 (1 – 3) (0%)	0,3 (0 – 1)	1,5 (0,5 – 3)	4,0 (2 – 6 <sup>e</sup> )
5	99	0,8	0,5 (0 – 1) (75%)	0,1 (0 – 0,5)	1,4 (1 – 2)	2,0 (1 – 3)
10	248	2,1	0,1 (0 – 0,5) (95%)	0,1 (0 – 0,5)	0,8 (0,5 – 1)	1,0 (0,5 – 2)
20	512	4,3	0,1 (0 – 0,5) (95%)	0 (0 – 0)	0,8 (0,5 – 1)	0,9 (0,5 – 1)

<sup>a</sup> Um sistema arbitrario de escala de 0 a 4 se utilizó con cada número que representa una designación particular de infiltrado inflamatorio como sigue: 0, número no apreciable de células inflamatorias; 0.5, indicios; 1, mínimo; 2, suave; 3, moderado; 4, infiltración marcada.

<sup>b</sup> Los valores medios son un promedio de 8 biopsias en el sitio de MCP-1, representando 2 biopsias separadas de 4 monos por grupo. Los intervalos representan la gama de puntuaciones histológicas promedio para 2 biopsias por animal.

<sup>c</sup> PMN significa célula polimorfonuclear (neutrófilo).

<sup>d</sup> Eos es una abreviación de eosinófilos.

<sup>e</sup> La puntuación total es una suma matemática de valores medios para cada tipo de célula para demostrar la respuesta a la dosis.

5 La evaluación de los cambios en los mediadores inflamatorios del suero mostró un aumento (aproximadamente 3 – 4 veces) en el nivel de MCP-1 en los grupos tratados del Ejemplo 1 en relación con el vehículo de control. Además, el análisis del cuadro hemático completo (CHC) mostró un aumento (~ 2 veces) en neutrófilos en los grupos tratados del Ejemplo 1 en relación al vehículo de control, a las 18 horas del día 4 siguiendo tres días de dosificación.

10 Para refinar la respuesta a la dosis (concentración) del Ejemplo 1 en un sistema cuantificable más fácilmente, se usan ratones hCCR2 KI para evaluar el efecto del Ejemplo 1 en la infiltración de monocitos/ macrófagos en el modelo de peritonitis por tioglicolato (TG) con procedimientos basados en citometría de flujo.

### **Sección 2. Ejemplo 1 en la infiltración de monocitos/macrófagos inhibidos en el modelo de peritonitis por TG de 48 horas en ratones hCCR2 K1**

15 El modelo de peritonitis inducida por TG se ha usado como un modelo de reclutamiento de monocitos/macrófagos al sitio de inflamación. Tanto los estudios internos como los publicados han demostrado que el reclutamiento de monocitos/macrófagos en este modelo es dependiente de CCR2. Véase See Boring L. y col., Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout-mice. J Clin Invest.,

100(10):2552 – 61. (1997); y Kuziel, W.A. y col., Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc Natl Acad Sci USA. 94(22):12053 – 8 (1997).

**Procedimientos**

5 Para el estudio de peritonitis por TG de 48 horas, se dosificó el Ejemplo 1 dos veces al día con la primera dosis una hora antes de la inyección de TG. Los recuentos celulares peritoneales totales se obtuvieron en células aisladas mediante un contador celular. También se recogió sangre en heparina del seno retro-orbital al final de cada estudio en EDTA para determinar la concentración de fármaco.

10 Para el análisis citométrico de flujo, las células exudadas peritoneales ( $1 \times 10^6$ ) se lavaron una vez con tampón FACS (PBS/ASB al 0,5%) y se volvieron a suspender en tampón FACS. Se incubaron las células con un anticuerpo bloqueante de Fc (BD Pharmingen) en hielo durante 15 min. seguido de la adición de los siguientes anticuerpos (BD Pharmingen): anti-F4/80 conjugado con PE, anti-Ly6C conjugado con FITC y anti-hCCR2 conjugado con Alexa 647. Después de 45 min. en hielo, se fijaron las células mediante BD Cytotfix durante 15 min. en hielo, se lavaron dos veces con tampón FACS y se volvieron a suspender en 200  $\mu$ l de tampón FACS. Los acontecimientos celulares (40.000) se obtuvieron para cada muestra y se analizaron los datos usando el software FloJo (TreeStar). La puerta FSC/SSC se configuró para incluir todos los monocitos (SSC bajo, FSC más alto) mientras que se excluían los granulocitos del análisis. Esta población acotada se analizó después para la expresión de Ly6C (FITC) y F4/80 (PE). Los números de monocitos/macrófagos peritoneales se determinaron multiplicando los recuentos celulares peritoneales totales obtenidos mediante el contador celular y el porcentaje de monocitos/macrófagos identificados mediante células F4/80+ de la citometría de flujo. La significancia estadística de las diferencias entre las medias se analizó usando el ensayo t apareado de dos colas con significancia fijada a valores p por debajo de 0,05.

**Resultados**

25 El Ejemplo 1 se evaluó en el modelo de peritonitis por TG de ratón hCCR2 KI para determinar su CE50 en la inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos. Se administró a los ratones tioglicolato y se dosificaron por vía oral con el Ejemplo 1 a 1, 25 ó 100 mg/kg dos veces al día. Durante cuarenta y ocho horas después del tratamiento con TG, se obtuvo el lavado peritoneal para el análisis de infiltración celular.

30 Para distinguir entre los monocitos/macrófagos reclutados frente a los macrófagos y granulocitos residentes, la tinción de marcadores de superficie tanto F4/80 como Ly6C se usó para definir los monocitos/macrófagos reclutados. Se observó una inhibición dependiente de dosis en la infiltración de monocitos/macrófagos. Las dosis de 1, 25 y 100 mg/kg dieron una inhibición del 24%, 74% y 78%, respectivamente. En tres estudios separados con dosis múltiples, el valor CE50 medio para la inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos mediante este análisis se estimó que era 3,9 nM.

35 Para evaluar el nivel in vivo de la ocupación de receptores por el Ejemplo 1 en el modelo de peritonitis por tioglicolato de 48 horas usando el ratón hCCR2 KI, se midieron los niveles plasmáticos tanto del Ejemplo I como del ratón MCP-1. La advertencia para esta estimación es que sólo se tuvieron en cuenta CCR2 y su ligando principal MCP-1. La ocupación del receptor de un ligando en presencia de un inhibidor competitivo se define por la ecuación de Gaddum:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{I}{1 + (K_d / [L]) (1 + [I] / K_i)}$$

40 Puesto que el Ejemplo 1 es un inhibidor competitivo de la unión de MCP-1 a CCR2, las cantidades de tanto el complejo receptor MCP-1/CCR2 de ratón como el complejo receptor Ejemplo 1/CCR2 se pueden determinar usando los niveles séricos de tanto el MCP-1 de ratón como de la proteína no unida del Ejemplo I en plasma. La  $K_d$  para la unión del MCP-1 de ratón a hCCR2 es 0,91 +/- 0,08 nM (n = 8) que se determinó en experimentos de competición de unión de ligando en frío usando  $^{125}$ I-MCP-1 humana. La  $K_i$  media para la unión del Ejemplo 1 a hCCR2 es 1,3 nM. La fracción de complejo receptor de MCP-1/CCR2 de ratón se determinó usando la forma de la ecuación descrita anteriormente. Para determinar la fracción de complejos Ejemplo 1/CCR2 la ecuación se redefine como:

$$\frac{[RI]}{[R]} = \frac{I}{1 + (K_i / [I]) (1 + [L] / K_d)}$$

Finalmente, la cantidad de CCR2 libre se determinó a partir de:

$$[\text{CCR2}]_{\text{total}} = [\text{CCR2}]_{\text{libre}} + [\text{ratón MCP-1/CCR2}] + [\text{Ejemplo 1/CCR2}]$$

Como se muestra en la Tabla 13, el porcentaje de inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos en el peritoneo a las 48 h refleja el porcentaje de complejo receptor del Ejemplo 1/CCR2.

5

TABLA 13

Determinación de la ocupación del receptor in vivo del Ejemplo 1 en sangre de ratones hCCR2 KI en el modelo de peritonitis por TG de 48 horas						
Dosis (mg/kg)	Concentración de MCP-1 de ratón en plasma (nM)	Concentración de Ejemplo 1 libre en plasma (nM) (número de veces de CI90 de unión CCR2)	% de CCR2 unido a MCP-1 de ratón	% de CCR2 unido a Ejemplo 1	% de CCR2 libre	% de inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos
100	0,015	53 (1,8)	0,04	97,6	2,4	78
25	0,017	14 (0,5)	0,16	91,2	8,6	74
1	0,005	1,4 (0,05)	0,26	51,4	48,3	24
0 (vehículo)	0	0	0	0	100	0

### Sección 3. Estudios de eficacia crónica

#### Encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). Procedimientos

Para evaluar el efecto del Ejemplo 1 en modelos crónicos de enfermedad, se usó el modelo de EAE de esclerosis múltiple en ratones hCCR2 KI. Para estudiar el efecto del Ejemplo 1 en modelos de EAE se usaron 10 ratones por grupo. En el día 0, los ratones hCCR2 KI se inmunizaron por vía subcutánea con un total de 200 µl de 300 µg de glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) 35 – 55 (Genemed Synthesis) mezclado 1:1 con 300 µg de Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) (Becton – Dickinson) en adyuvante de Freund incompleto (AFI) (Sigma–Aldrich). En el día 0 (dos horas después de la inmunización) y día 2, se inyectó intraperitonealmente 100 µl de 400 ng de toxina pertussis a ratones. La puntuación clínica empezó el día 10, continuó tres veces por semana a lo largo del estudio y se basó en una escala de 0 – 5: 0, ningún síntoma de enfermedad; 0,5, debilidad parcial de la cola; 1, cola flácida o balanceo del paso con tonicidad de cola; 1,5, balanceo de pato con debilidad parcial de cola; 2, balanceo de paso con cola flácida (ataxia); 2,5 (ataxia con parálisis parcial de miembro); 3, parálisis total de un miembro; 3,5, parálisis total de un miembro con parálisis parcial de un segundo miembro; 4, parálisis de dos miembros; 4,5, moribundo; 5, muerte. La dosificación oral del Ejemplo 1 a 25 mg/kg y 55 mg/kg (dos veces al día) se inició en el día 1.

#### Resultados

El Ejemplo 1 en ambas dosis redujo el área bajo la curva (AUC) de la puntuación clínica en el 49% (p < 0,05) (Figura 22). El valor CI50 es 3,7 nM para el Ejemplo 1 en la unión de <sup>125</sup>I MCP-1 de ratón a las células que expresan hCCR2, PBMCh (imitando la configuración de hCCR2 KI). Basándose en este valor de CI50, las dosis de 25 mg/kg y 55 mg/kg dieron como resultado una concentración de valle de plasma libre de 1 y 3 veces la unión de CI90. La evaluación histológica de la médula espinal el Día 22 no demostró una diferencia significativa en el infiltrado celular inflamatorio total entre ratones tratados con el Ejemplo 1 frente al vehículo. Un infiltrado de neutrófilos notable se observó en ratones tratados con el compuesto.

30

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto que es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 2.- Un compuesto de la reivindicación 1 que es una fórmula cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 3.- La forma cristalina de las reivindicaciones 1 – 2 **caracterizada por** parámetros de celdilla unitaria sustancialmente iguales a los siguientes:
- Dimensiones de celdilla:
- 10 a = 18,7240 (4)
- b = 8,0171 (2)
- c = 19,6568 (5)
- $\alpha = 90$
- $\beta = 114,935 (2)$
- 15  $\gamma = 90$
- $V (\text{Å}^3) = 2675,7 (1)$
- Grupo espaciador P2<sub>1</sub>,2<sub>1</sub>,2<sub>1</sub>
- Moléculas / celdilla unitaria 2
- en la que dicho cristal está a una temperatura de aproximadamente +22°C (TA).
- 20 4.- La forma cristalina de las reivindicaciones 1 – 3 **caracterizada por** un patrón de difracción de rayos X en polvo comprendiendo cuatro o más valores de  $2\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda = 1,5418\text{Å}$ ) seleccionado de 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 y 19,2, a una temperatura de aproximadamente 22°C.
- 5.- La forma cristalina de las reivindicaciones 1 – 4 además **caracterizada por** un patrón de difracción de rayos X en polvo comprendiendo cuatro o más valores  $2\theta$  (CuK $\alpha$   $\lambda = 1,5418\text{Å}$ ) seleccionado de 5,5, 9,1, 12,1, 14,0 y 19,2, a una temperatura de aproximadamente 22°C.
- 25 6.- La forma cristalina de las reivindicaciones 1 – 5 **caracterizada por** coordenadas atómicas fraccionales sustancialmente como se indica en la Tabla 3.
- 7.- La forma cristalina de las reivindicaciones 1 – 6 que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 2.
- 30 8.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de las reivindicaciones 1–7 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 9.- Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 – 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en el que la enfermedad se selecciona de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esclerodermia, osteoartritis,
- 35 aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, fallo cardiaco congestivo, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada a VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis de trasplante, trauma cerebral inducido física o químicamente, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus sistémico eritomatoso, nefritis por suero nemotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia neointimal venosa,
- 40 hiperplasia neointimal de inserción de diálisis, hiperplasia intimal de derivación arteriovenosa, trasplante de órganos, neuropatía de aloinjerto crónico y cáncer.
- 10.- Un compuesto de la reivindicación 9 en la que la enfermedad se selecciona de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, lupus sistémico eritomatoso, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis y trasplante de órganos.
- 45 11.- Un compuesto de las reivindicaciones 9 a 10 en el que la enfermedad se selecciona de esclerosis múltiple,

aterosclerosis, enfermedad de Crohn y diabetes.

12.– Una composición farmacéutica de la reivindicación 8, que además comprende uno o más de uno de otros ingredientes activos.

FIGURA 1

Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4.

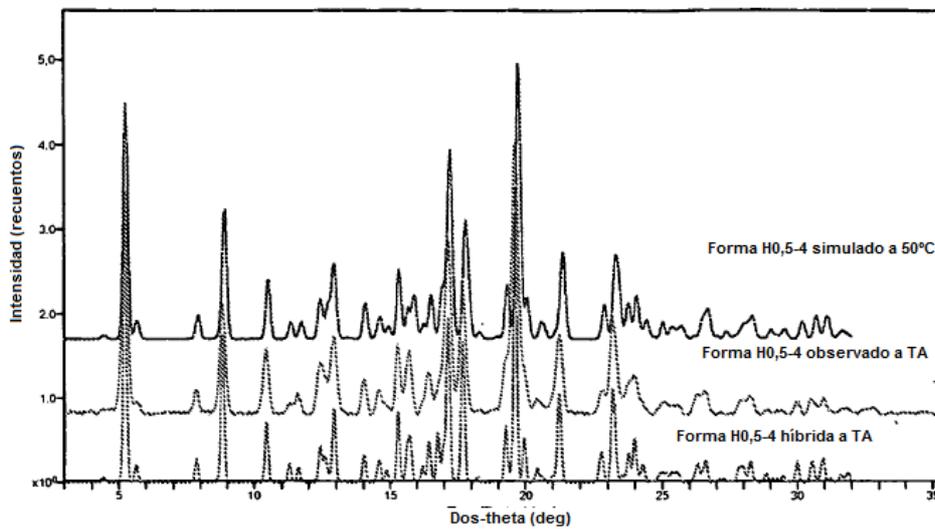


FIGURA 2

Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pinolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2

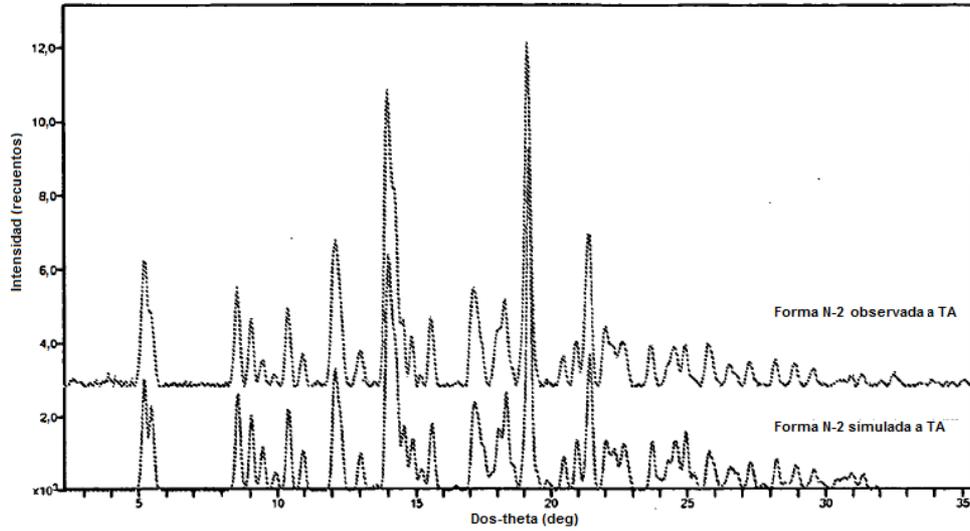


FIGURA 3

Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, 1,75 moles H<sub>2</sub>O, Forma H1,75-5.

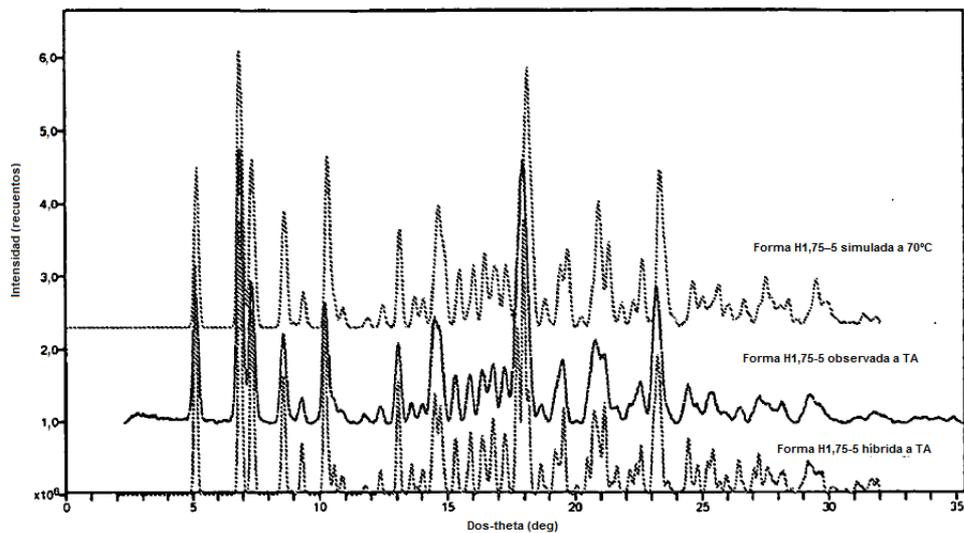


FIGURA 4

Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-1-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato mono-etanol, Forma E-1.

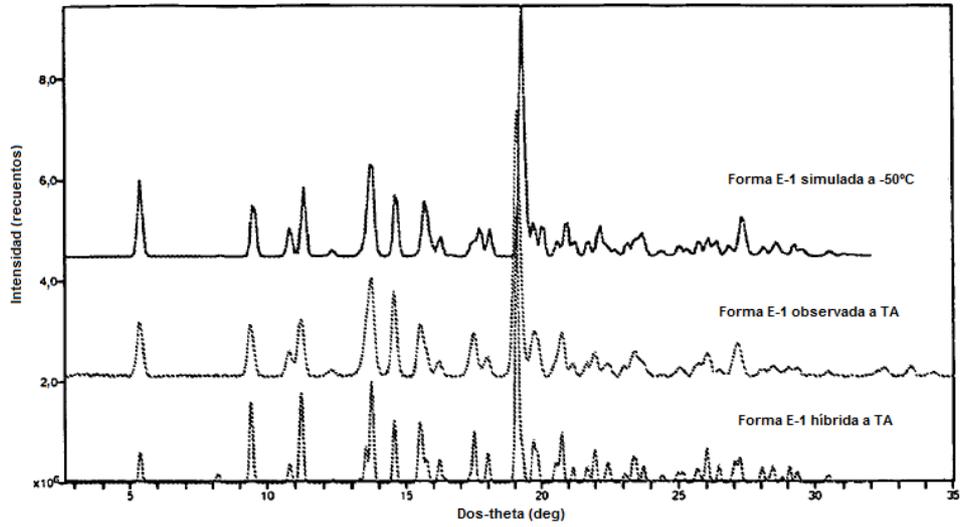


FIGURA 5

Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato del ácido mono-acético, Forma HAC-1.

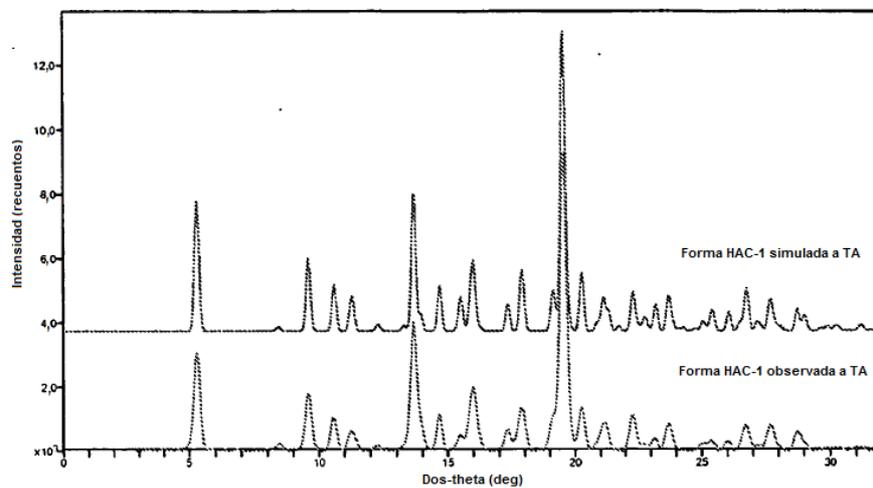


FIGURA 6

Patrones de polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato mono-R-propilenglicol, Forma RPG-3.

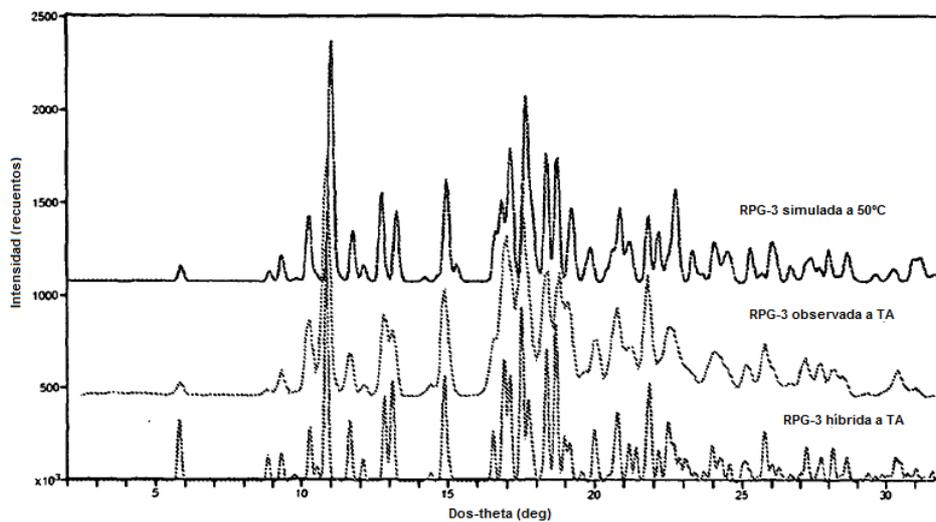


FIGURA 7

DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4.

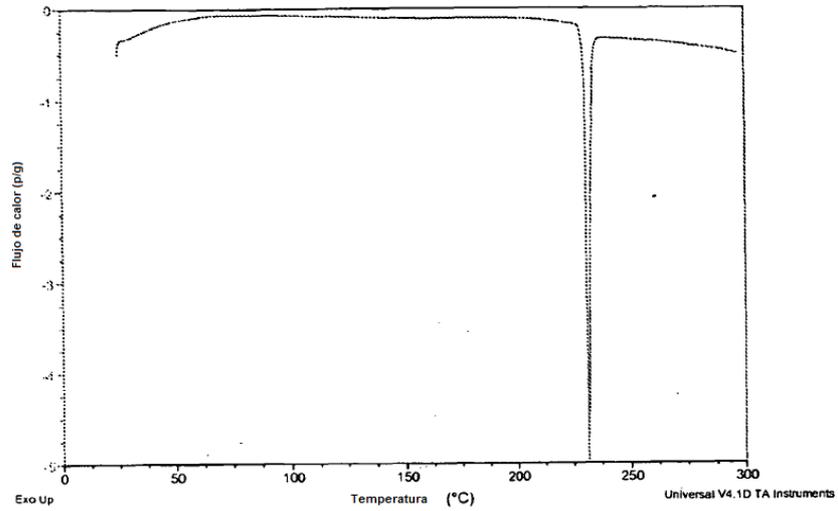


FIGURA 8

TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0,5-4

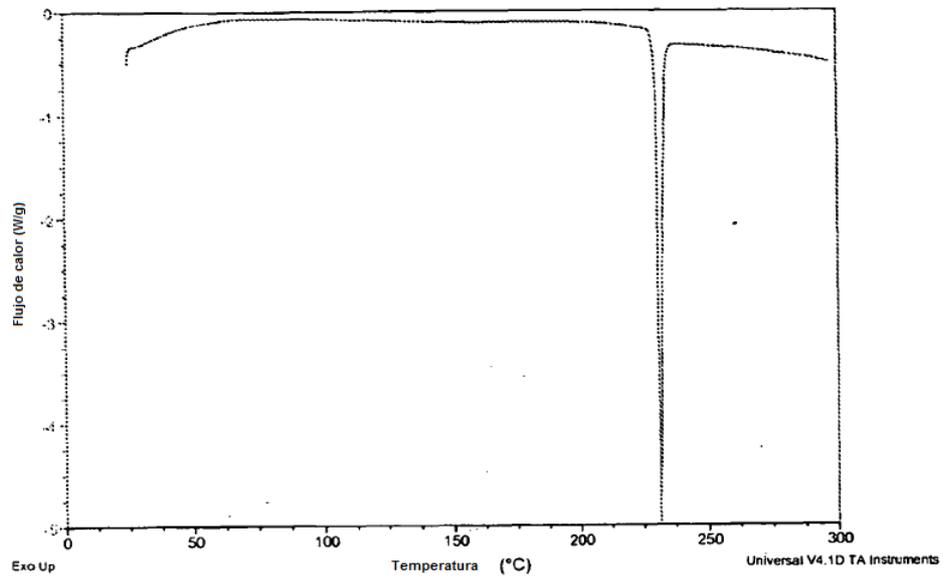


FIGURA 9

DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2.

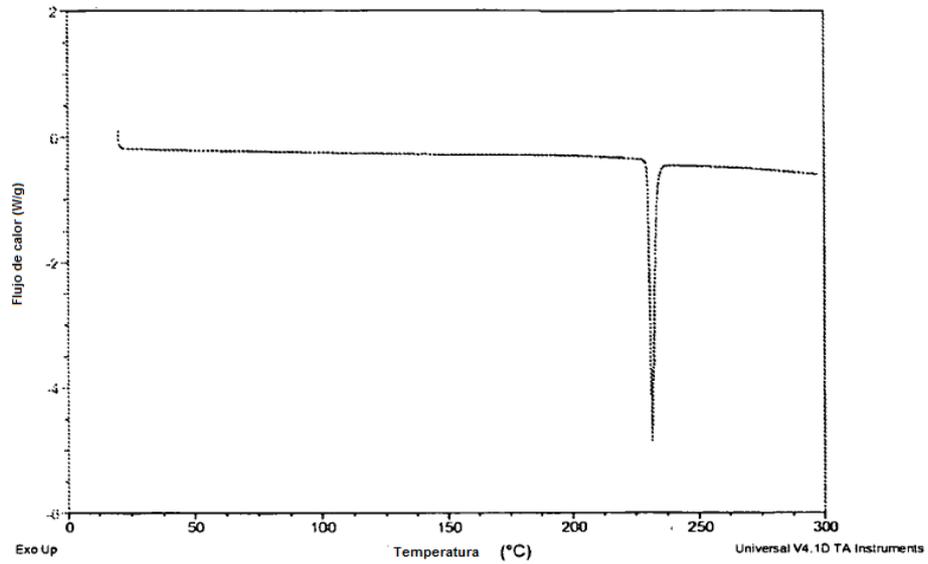


FIGURA 10

TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)cyclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2

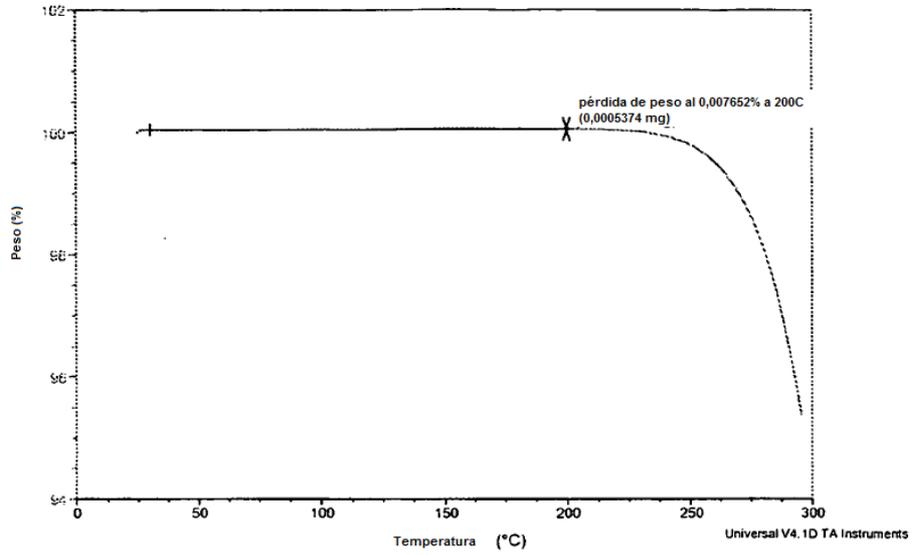


FIGURA 11

Isoterma de Sorción de humedad de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2 a 25°C

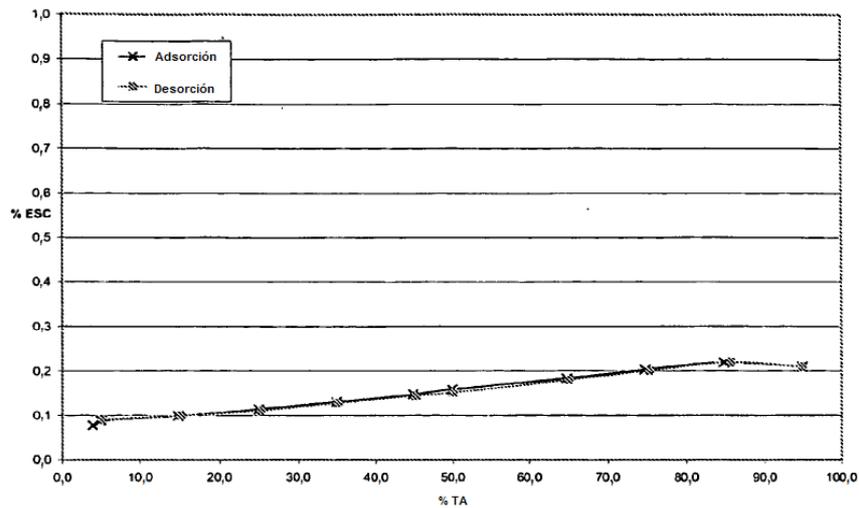


FIGURA 12

DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, 1,75 moles H<sub>2</sub>O, Forma H1,75-5

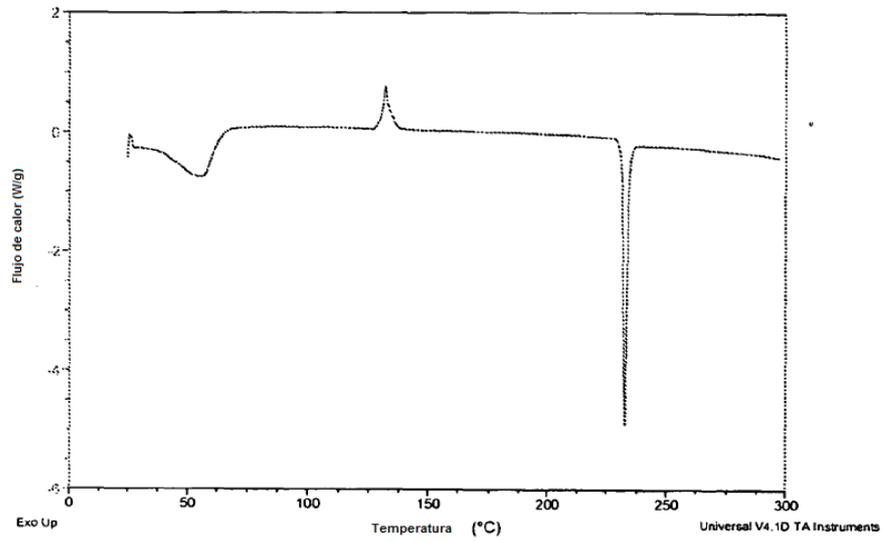


FIGURA 13

TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, 1,75 moles H<sub>2</sub>O, Forma H1,75-5

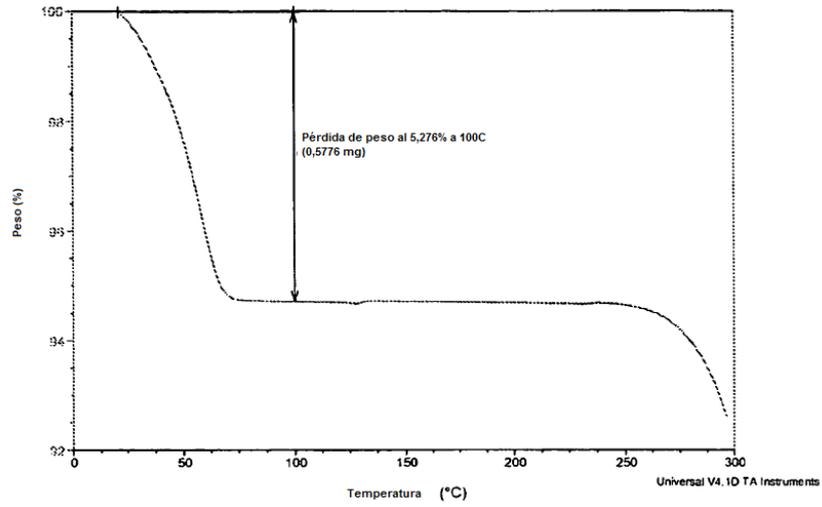


FIGURA 14

DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato del ácido mono-acético, Forma HAC-1

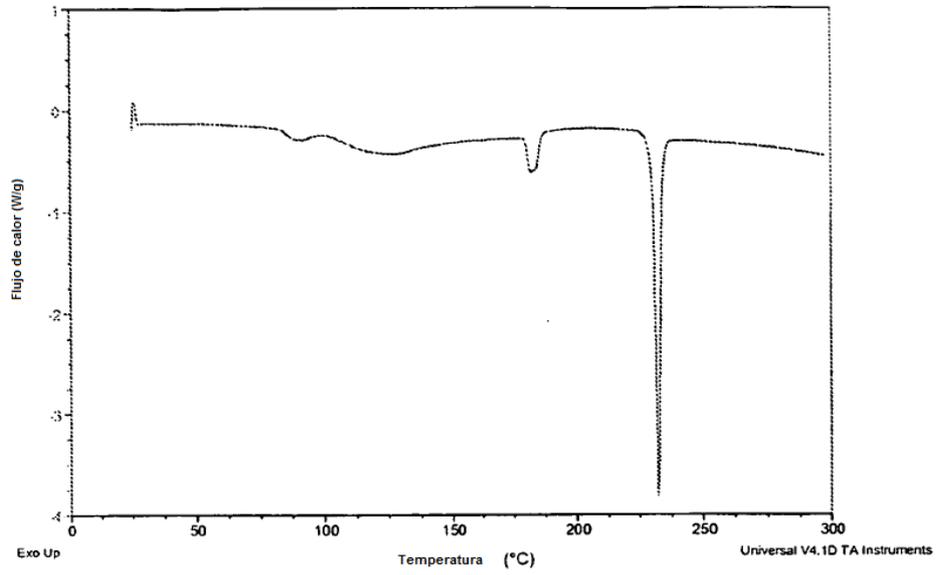


FIGURA 15

TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato del ácido mono-acético, Forma HAC-1

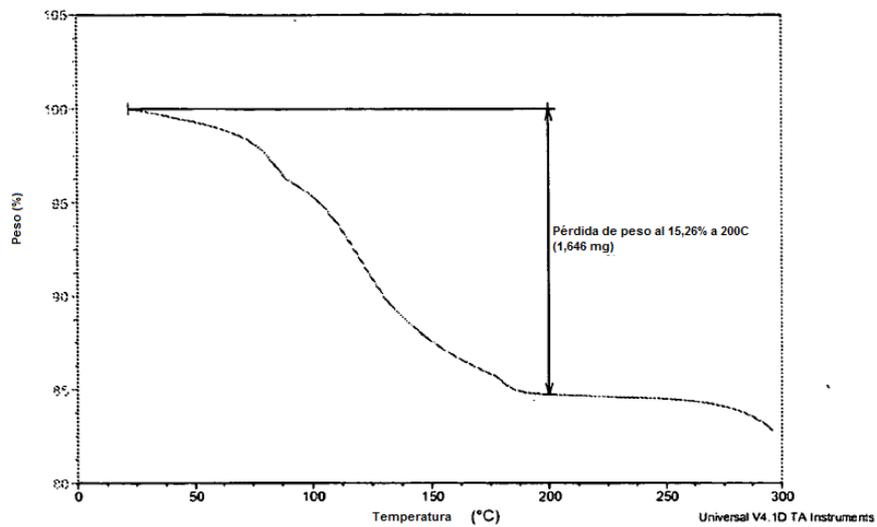


FIGURA 16

DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato mono-etanol, Forma E-1

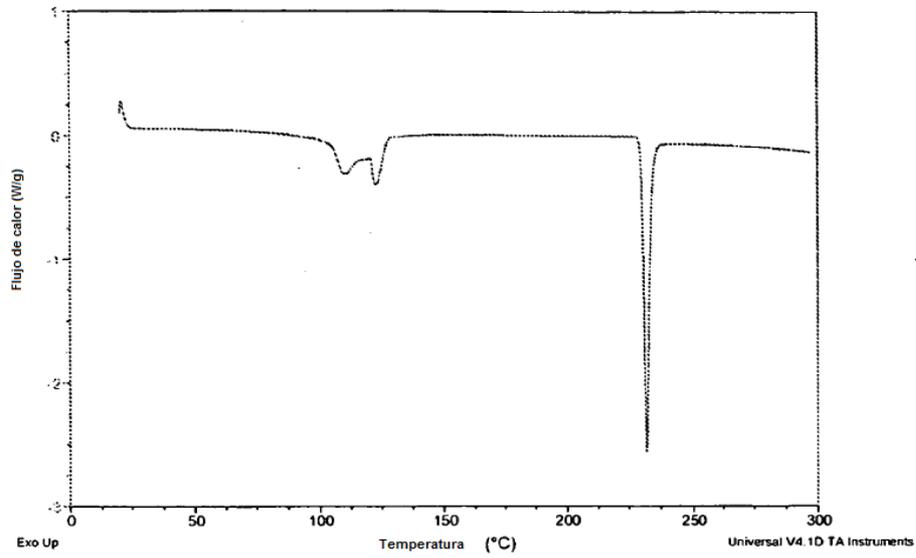


FIGURA 17

TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato mono-etanol, Forma E-1

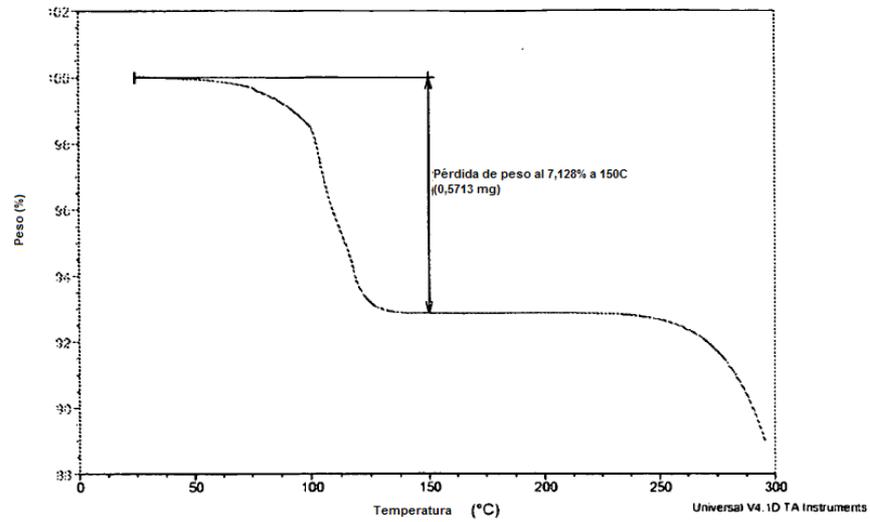


FIGURA 18

DSC de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato mono-R-propilenglicol, Forma RPG-3

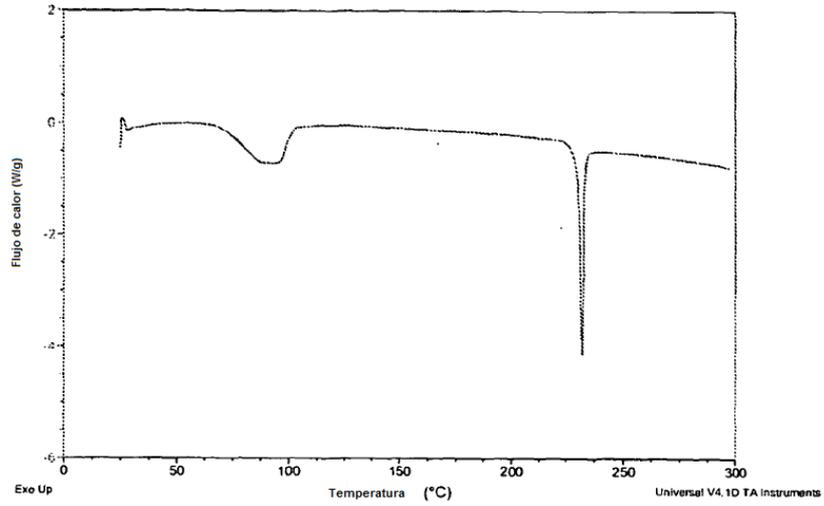


FIGURA 19

TGA de N-((1R,2S,SR)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, mono-R-propilenglicol, Forma RPG-3

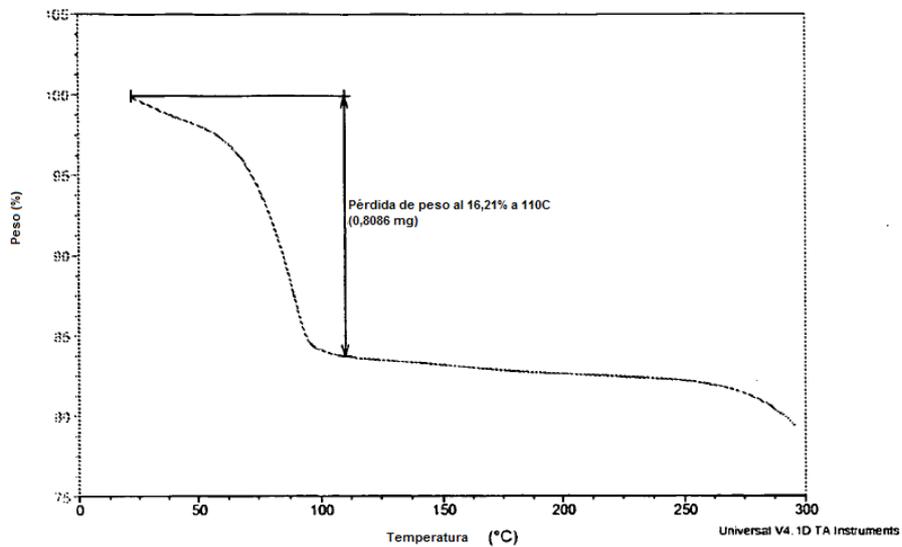


FIGURA 20

Modelo de exposición intradermal en mono cynomolgus: Ejemplo I recuento celular mononuclear inhibido a la piel

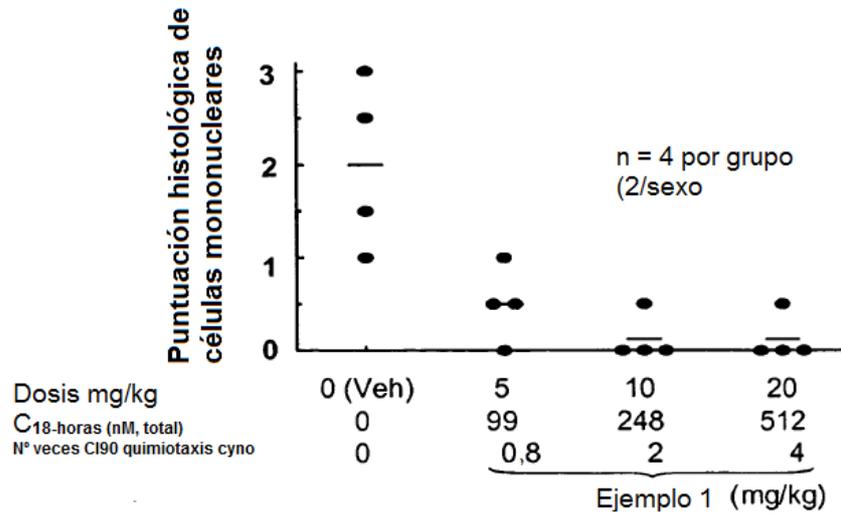


FIGURA 21

Peritonitis por TG de 48 horas en ratones hCCR2 KI: Ejemplo 1 de la inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos en la cavidad peritoneal

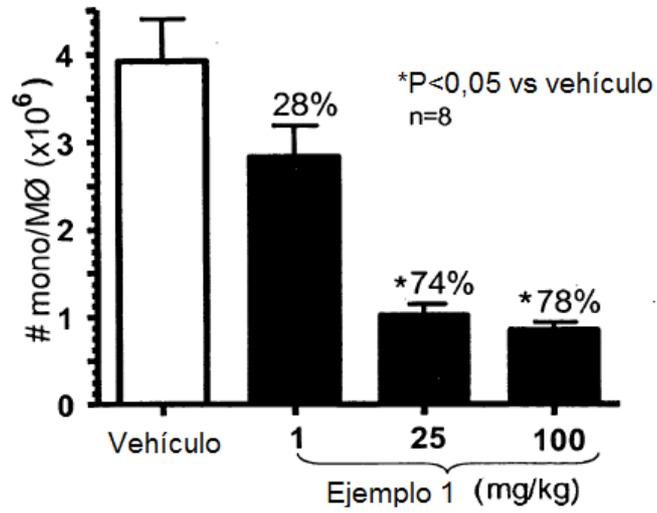


FIGURA 22

EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) en ratones hCCR2 KI: Puntuación clínica del tratamiento del Ejemplo 1

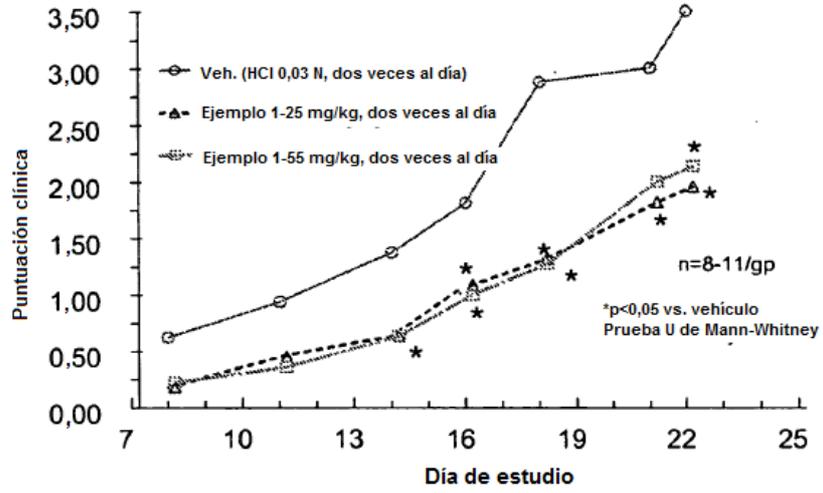


FIGURA 23

Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 3 – compuesto 7

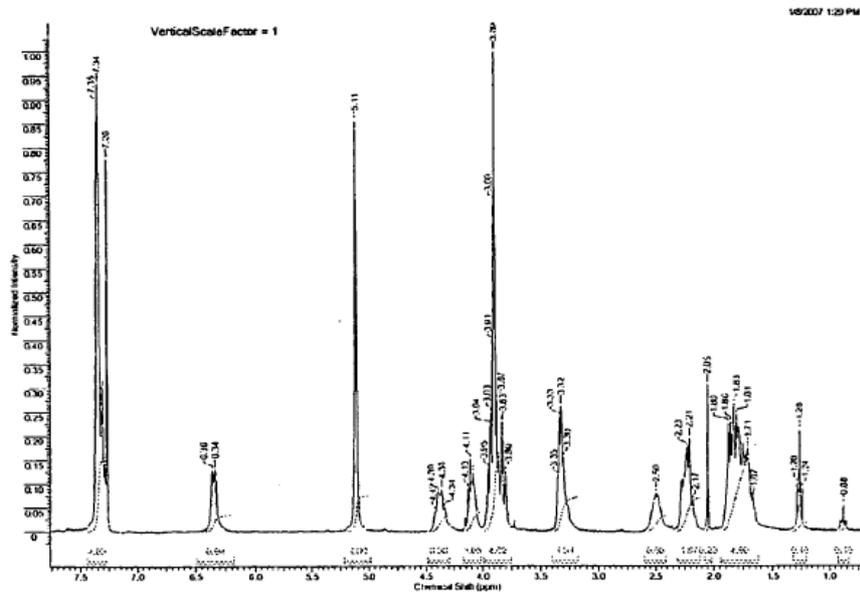


FIGURA 24

Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 4 – compuesto 8

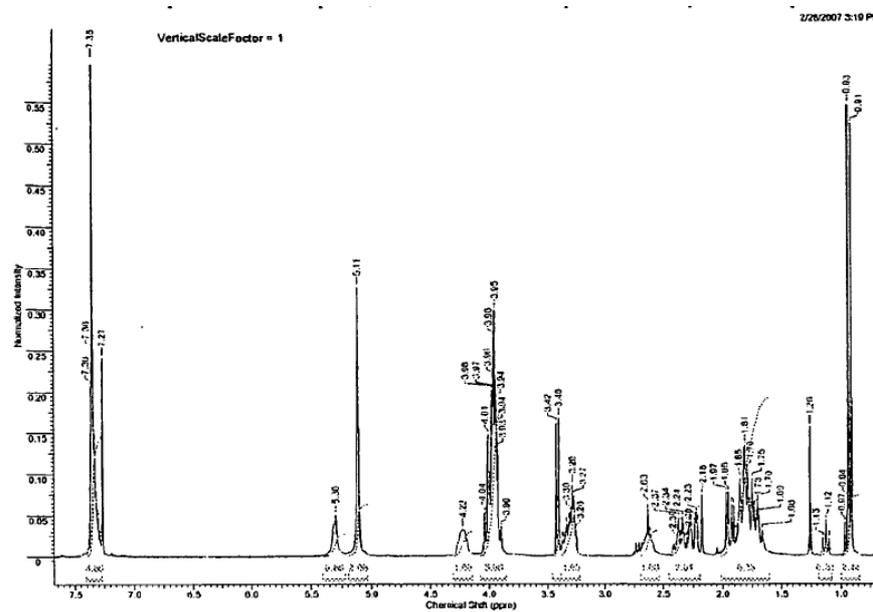


FIGURA 25

Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2ª Alternativa, Etapa 4 – compuesto 9

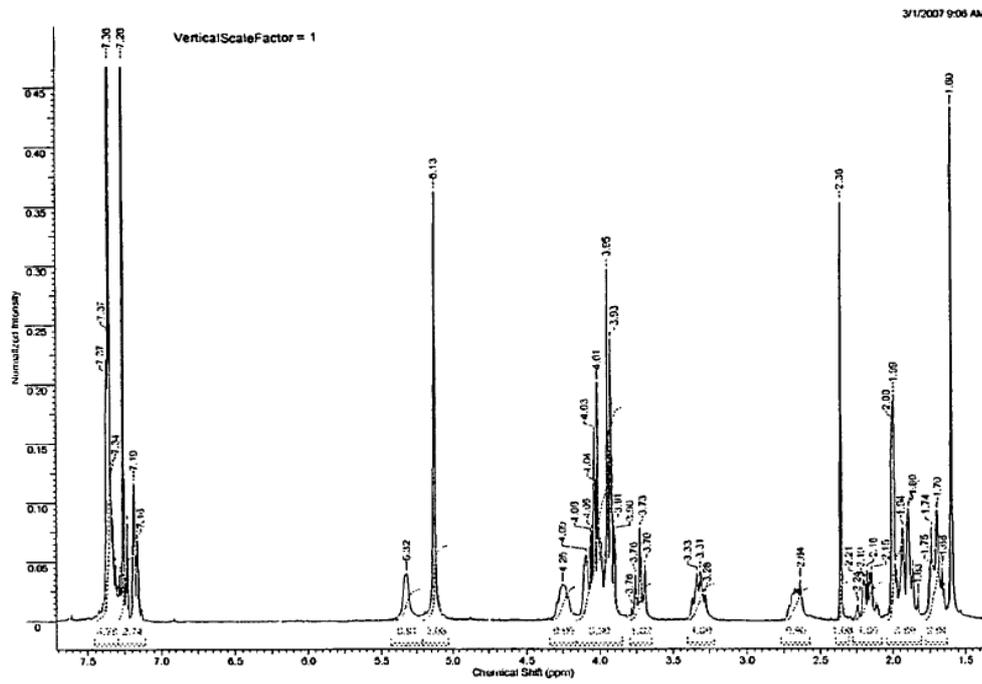


FIGURA 26

Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2<sup>a</sup> Alternativa, Etapa 4 – compuesto 10

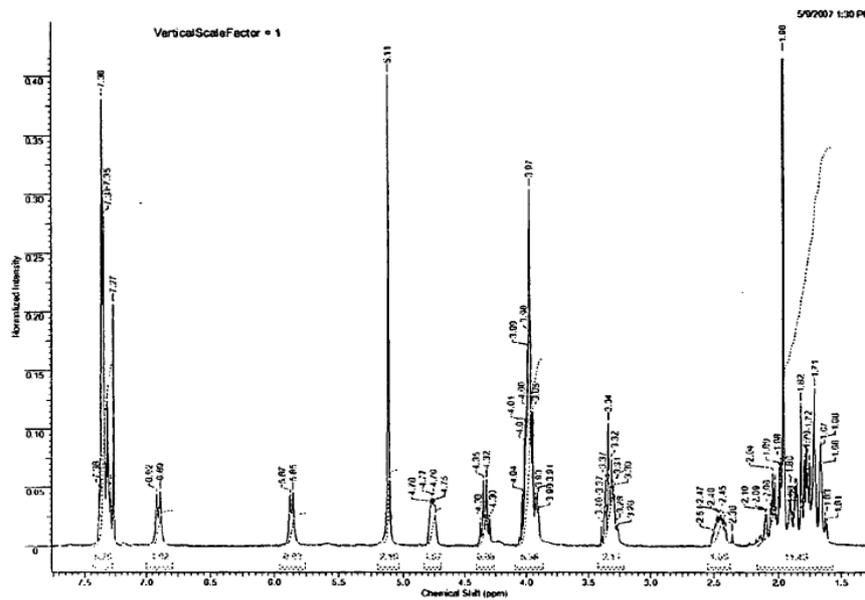


FIGURA 27

Espectro de RMN de protón del Ejemplo 1, Preparación 2<sup>a</sup> Alternativa, Etapa 5 – compuesto 11

