

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 969**

51 Int. Cl.:
C07C 257/14 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03793292 .8**
96 Fecha de presentación: **22.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1534668**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **Forma sólida cristalina del ácido (2S-5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico**

30 Prioridad:
23.08.2002 US 405526 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2012

73 Titular/es:
**PHARMACIA CORPORATION
100 ROUTE 206 NORTH
PEAPACK, NJ 07977, US**

72 Inventor/es:
HALLINAN, Ann E.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 969 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

Forma sólida cristalina del ácido (2S-5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico

Campo de la invención

5 La presente invención comprende un nuevo compuesto útil en el tratamiento de enfermedades y, más particularmente, una nueva sal de clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico, y composiciones farmacéuticas del mismo, para el tratamiento de afecciones que implican una expresión inapropiada de óxido nítrico a partir de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa. El ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico se describe y reivindica en la Patente de Estados Unidos de cesión común con número de serie 09/953.049 transferida legalmente, presentada el 15 de septiembre de 2001, que reivindica prioridad respecto a la Patente de Estados Unidos provisional con número de serie 60/232.683, presentada el 15 de septiembre de 2000, ambas incorporadas en el presente documento por referencia. El ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico también se describe en la publicación internacional número WO 02/22562, publicada el 21 de marzo de 2002, que es una publicación de la solicitud de patente internacional de cesión común PCT/US0128673 transferida legalmente, presentada el 15 de septiembre de 2001 y que se incorpora en el presente documento por referencia.

Antecedentes de la invención

El óxido nítrico (NO) es un gas de radicales libres bioactivo producido por una cualquiera de las diversas isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La actividad fisiológica de lo que posteriormente se identificó como NO se descubrió inicialmente a principios de los años 80 cuando se descubrió que la relajación vascular provocada por acetilcolina era dependiente de la presencia del endotelio vascular. El factor derivado del endotelio, denominado entonces factor de relajación derivado de endotelio (EDRF), que media dicha relajación vascular, se sabe ahora que es NO que es generado en el endotelio vascular por una isoforma de NOS. La actividad de NO como vasodilatador se conoce desde hace más de 100 años. Además, el NO es la especie activa derivada de nitrovasodilatarios conocidos incluyendo amilnitrito y gliceriltrinitrato. El óxido nítrico también es un estimulador endógeno de guanilato ciclasa soluble (GMPc) y, de esta manera, estimula la producción de GMPc. Cuando NOS es inhibida por N-nomometilarginina (L-NMMA), la formación de GMPc se evita completamente. Además de la relajación dependiente del endotelio, se sabe que el NO está implicado en un número de acciones biológicas, incluyendo citotoxicidad de las células fagocíticas y comunicación célula a célula en el sistema nervioso central.

La identificación del EDRF como NO coincidió con el descubrimiento de una ruta bioquímica mediante la cual el NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por la enzima NO sintasa. Hay al menos tres tipos de NO sintasa como sigue:

- (i) una enzima constitutiva dependiente de Ca^{++} /calmodulina, localizada en el cerebro, que libera NO como respuesta a la estimulación de un receptor o estimulación física;
- (ii) una enzima independiente de Ca^{++} , una proteína de 130 kD, que es inducida después de la activación del músculo liso vascular, macrófagos, células endoteliales y un número de otras células por endotoxinas y citocinas; y
- (iii) una enzima constitutiva, dependiente de Ca^{++} /calmodulina, localizada en el endotelio, que libera NO como respuesta a la estimulación de un receptor o estimulación física.

Una vez expresada, la óxido nítrico sintasa inducible (en lo sucesivo en el presente documento "iNOS") genera NO continuamente durante largos periodos. Los estudios clínicos han mostrado que la producción de NO y la expresión de iNOS aumentan en una diversidad de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide y osteoartritis (véase, por ejemplo, McInnes L B. y col., J. Exp. Med 184: 1519 (1996)), enfermedad inflamatoria del intestino (véase, por ejemplo, Lundberg J. O. N. y col., Lancet 344: 1673, (1994)), y asma (véase, por ejemplo, Hamid, Q. y col., Lancet 342: 1510 (1993)), e iNOS está implicado como un factor patológico principal en estas enfermedades inflamatorias crónicas.

De esta manera, la inhibición de una producción de NO excesiva por iNOS es probable que sea antiinflamatoria. Sin embargo, puesto que la producción de NO a partir de eNOS y nNOS está implicada en la fisiología normal, sería deseable que cualquier inhibidor de NOS que se use para tratar la inflamación fuera selectivo para iNOS, de manera que la modulación fisiológica normal de la presión sanguínea por el NO generado por eNOS, y la transmisión neuronal no adrenérgica, no colinérgica por el NO generado por nNOS permanecieran sin verse afectados.

Con todos los compuestos y composiciones farmacéuticas, la estabilidad química y física de un compuesto farmacéutico es importante en el desarrollo comercial de esa sustancia farmacéutica. Dicha estabilidad incluye la estabilidad en condiciones ambiente, especialmente en condiciones de humedad y almacenamiento. La estabilidad elevada en diferentes condiciones de almacenamiento es necesaria para predecir las diferentes condiciones de almacenamiento posibles durante la vida útil de un producto comercial. Un fármaco estable evita el uso de condiciones de almacenamiento especiales así como la reposición de inventario frecuente. Un compuesto farmacéutico debe ser estable también durante el proceso de fabricación que, a menudo, requiere molienda del fármaco para conseguir material farmacéutico con un tamaño de partícula y área superficial uniformes. Los

materiales inestables a menudo experimentan cambios polimórficos. Por lo tanto, cualquier modificación de una sustancia farmacéutica que mejore su perfil de estabilidad proporciona un beneficio significativo sobre las sustancias menos estables.

5 Se han descrito diversos inhibidores de iNOS, tales como, por ejemplo, el ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico, que se describe en la publicación internacional con número WO 02/22562 transferida legalmente, publicada el 21 de marzo de 2002, que es una publicación de la solicitud de patente internacional PCT/US0128673, presentada el 15 de septiembre de 2001. Este compuesto, sin embargo, es un sólido amorfo. Sería deseable, por lo tanto, proporcionar una forma sólida cristalina de un inhibidor de iNOS, tal como el ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico.

10 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva sal cristalina de clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico. El presente compuesto en forma de sal posee actividad inhibitora de óxido nítrico sintasa útil, y se espera que sea útil en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección en la que la síntesis, o síntesis en exceso, de las formas de óxido nítrico es una parte contributiva.

15 Estequiométricamente, una celdilla unitaria de la nueva sal son dos moléculas de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico y tres moléculas de ácido clorhídrico.

La nueva sal está caracterizada por algunas o todas las siguientes mediciones físicas: análisis elemental (tal como por análisis por combustión), punto de fusión y calor de fusión (calorimetría de exploración diferencial y análisis termogravimétrico), índices de refracción (microscopía de luz polarizada), patrón de difracción de rayos x de polvo, absorción de humedad (por ejemplo, equilibrio de humedad DVS) y firma vibratoria (espectro Raman).

La presente sal novedosa puede usarse en composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades que implican degeneración del cartílago, que tiene lugar en ciertas afecciones tales como artritis. Por consiguiente, las afecciones en las que es provechoso inhibir la producción de NO a partir de L-arginina incluyen afecciones artríticas tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis gotosa, artritis juvenil, artritis séptica, espondiloartritis, artritis reumática aguda, artritis enteropática, artritis neuropática y artritis biogénica. Además, la depresión inducida por NO de respiración de condrocitos podría modular la pérdida matricial y la mineralización del cartílago secundario en artritis, en particular osteoartritis.

Otras afecciones para las que la presente sal puede ser útil incluyen enfermedad inflamatoria o crónica del intestino, isquemia cardiovascular, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, aterosclerosis, migraña, glaucoma, aneurisma aórtico, esofagitis por reflujo, diarrea, síndrome del intestino irritable, fibrosis quística, enfisema, asma, bronquiectasia, hiperalgesia, isquemia cerebral, ictus trombótico, isquemia global (posterior a la parada cardíaca), esclerosis múltiple y otros trastornos del sistema nervioso central mediados por NO, por ejemplo enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Otros trastornos neurodegenerativos en los que la inhibición de NO puede ser útil incluyen degeneración nerviosa y/o necrosis nerviosa en trastornos tales como hipoxia, hipoglucemia, epilepsia y heridas externas (tales como lesiones en médula espinal y cabeza), convulsiones y toxicidad por oxígeno hiperbárico, demencia, por ejemplo demencia pre-senil y demencia relacionada con SIDA, corea de Sydenham, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Korsakoffs, imbecilidad relacionada con un trastorno de los vasos cerebrales, trastornos del sueño, esquizofrenia, depresión, depresión u otros síntomas asociados con el síndrome premenstrual (SPM), ansiedad y choque séptico.

La presente sal puede usarse también cuando la inhibición del óxido nítrico puede desempeñar también un papel en el tratamiento, tal como dolor incluyendo somatogénico (bien nociceptivo o neuropático), tanto agudo como crónico. Los presentes compuestos podrían usarse en cualquier situación en la que se administraría tradicionalmente un AINE común u otro analgésico opiáceo.

Además, otros trastornos que puedan tratarse inhibiendo la producción NO con la presente sal incluyen tolerancia a opiáceos en pacientes que necesitan analgésicos opiáceos prolongados y tolerancia a benzodiazepina en pacientes que toman benzodiazepinas, y otro comportamiento adictivo, por ejemplo, nicotina y trastornos de la alimentación. Los presentes compuestos pueden ser útiles también como agentes antibacterianos.

Afecciones adicionales en las que la presente sal puede usarse para inhibir la producción de NO a partir de L-arginina incluyen hipotensión sistémica asociada con choque séptico y/o tóxico inducido por una amplia diversidad de agentes; terapia con citocinas tales como TNF, IL-1 e IL-2; y como un adyuvante para inmunosupresión a corto plazo en terapia de trasplantes.

La presente sal puede ser útil también en el tratamiento de una afección ocular (tal como hipertensión ocular, retinitis uveítis), lupus sistémico eritematoso (SLE), glomerulonefritis, restenosis, secuelas inflamatorias de infecciones víricas, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS), lesiones en los pulmones inducidas por oxidantes, terapia con IL-2 como en un paciente con cáncer, caquexia, inmunosupresión, tal como terapia de trasplantes, trastornos de motilidad gastrointestinal, quemadura solares, eczemas, psoriasis, gingivitis, pancreatitis, daño al tracto gastrointestinal resultante de infecciones, fibrosis quística, tratamiento para un sistema inmune disfuncional tal

como un adyuvante para inmunosupresión a corto plazo en terapia de trasplante de órganos, inducción del parto, poliposis adenomatosa, control del crecimiento de tumores, quimioterapia, quimioprevención y bronquitis.

5 La presente sal puede ser útil también en composiciones farmacéuticas para el tratamiento del dolor, asma y otros trastornos de las vías respiratorias, cáncer, artritis, trastornos oculares, incluyendo retinopatías y glaucoma, trastornos relacionados con la inflamación incluyendo síndrome del intestino irritable y otros trastornos en los que una producción excesiva de óxido nítrico desempeña un papel, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un cristal de clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Además de ser útil para tratamiento humano, esta forma también es útil en composiciones farmacéuticas para tratamiento veterinario de animales de compañía, animales exóticos y animales de granja, incluyendo mamíferos, aves y similares. Los animales más preferidos incluyen caballos, perros y gatos.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es un diagrama de una celdilla unitaria de la sal cristalina ácido 2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl de la presente invención;
 La Figura 2 es un gráfico del estudio de calorimetría de exploración diferencial del ácido 2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl de la presente invención;
 La Figura 3 es un patrón de rayos X de polvo del ácido 2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl;
 20 La Figura 4 es un patrón de rayos X de polvo calculado a partir de la estructura cristalina individual superpuesta con el patrón de rayos X de polvo del ácido 2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl;
 La Figura 5 es una representación termogravimétrica del ácido 2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl de la presente invención; y
 La Figura 6 es el espectro Raman de la sal 1,5 HCl del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

Los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando", como se usan en el presente documento, incluyen tratamiento profiláctico paliativo o tratamiento reparador.

30 La expresión "cantidad eficaz" significa una dosis que conduce al tratamiento. Una cantidad eficaz puede administrarse en una sola dosis o en dosis divididas durante un periodo de tiempo.

El término "esferulítico" significa que toma la forma aproximada de una esferulita.

El término "esferulita" significa una forma ubicua de agregado cristalino, que se da en un amplio intervalo de materiales diferentes, caracterizado por un crecimiento radial que conduce a simetría esférica.

Abreviaturas

35 ACN o, como alternativa, CH₃CN es acetonitrilo

AcOH es ácido acético

CH₂Cl es cloruro de metilo

DIBAL es hidruro de diisobutilaluminio

DMF es dimetilformamida

40 Et₃N es trietilamina

EtOAc es acetato de etilo

KHMDS es hexametildisilizada potásica

KOH es hidróxido potásico

MeI es yoduro de metilo

45 EM es espectro de masas

MsCl es cloruro de mesilo

NaHCO₃ es hidrogenocarbonato sódico (bicarbonato sódico)

Na₂SO₄ es sulfato sódico

THF es tetrahidrofurano

5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico cristalino pueden estar en asociación con uno o más vehículos y/o diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos (denominados colectivamente en el presente documento materiales de "soporte") y, si se desea, otros ingredientes activos. La forma cristalina del clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico de la presente invención puede administrarse por cualquier vía adecuada, preferentemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha vía, y en una dosis eficaz para el tratamiento pretendido. El clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico activo y sus composiciones, por ejemplo, pueden administrarse por vía oral, intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o tópica.

15 Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, un comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica está fabricada preferentemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del ingrediente activo. Los ejemplos de dichas unidades de dosificación son comprimidos o cápsulas. El ingrediente activo puede administrarse también por inyección como una composición en la que, por ejemplo, puede usarse solución salina, dextrosa o agua como un vehículo adecuado.

20 La cantidad de compuesto terapéuticamente activo que se administra y el régimen de dosificación para tratar una patología con el compuesto y/o las composiciones de la presente invención depende de una diversidad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo y estado médico del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía y frecuencia de administración y el compuesto particular empleado y, de esta manera, puede variar ampliamente. Las composiciones farmacéuticas pueden contener ingredientes activos en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 2000 mg, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 500 mg y, lo más preferentemente, entre aproximadamente 1 y 100 mg. Una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal y, lo más preferentemente, entre aproximadamente 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal puede ser apropiada. La dosis diaria puede administrarse de una a cuatro dosis por día.

30 El clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico cristalino puede administrarse también mediante un dispositivo transdérmico. Preferentemente la administración tópica se conseguirá usando un parche de tipo depósito o tipo membrana porosa o de una variedad de matriz sólida. En cualquier caso, el agente activo se suministra continuamente desde el depósito o en forma de microcápsulas a través de una membrana hacia el adhesivo permeable al agente activo, que está en contacto con la piel o la mucosa del destinatario. Si el agente activo se absorbe a través de la piel, un flujo controlado y predeterminado del agente activo se administra al destinatario. En el caso de microcápsulas, el agente de encapsulación puede funcionar también como la membrana.

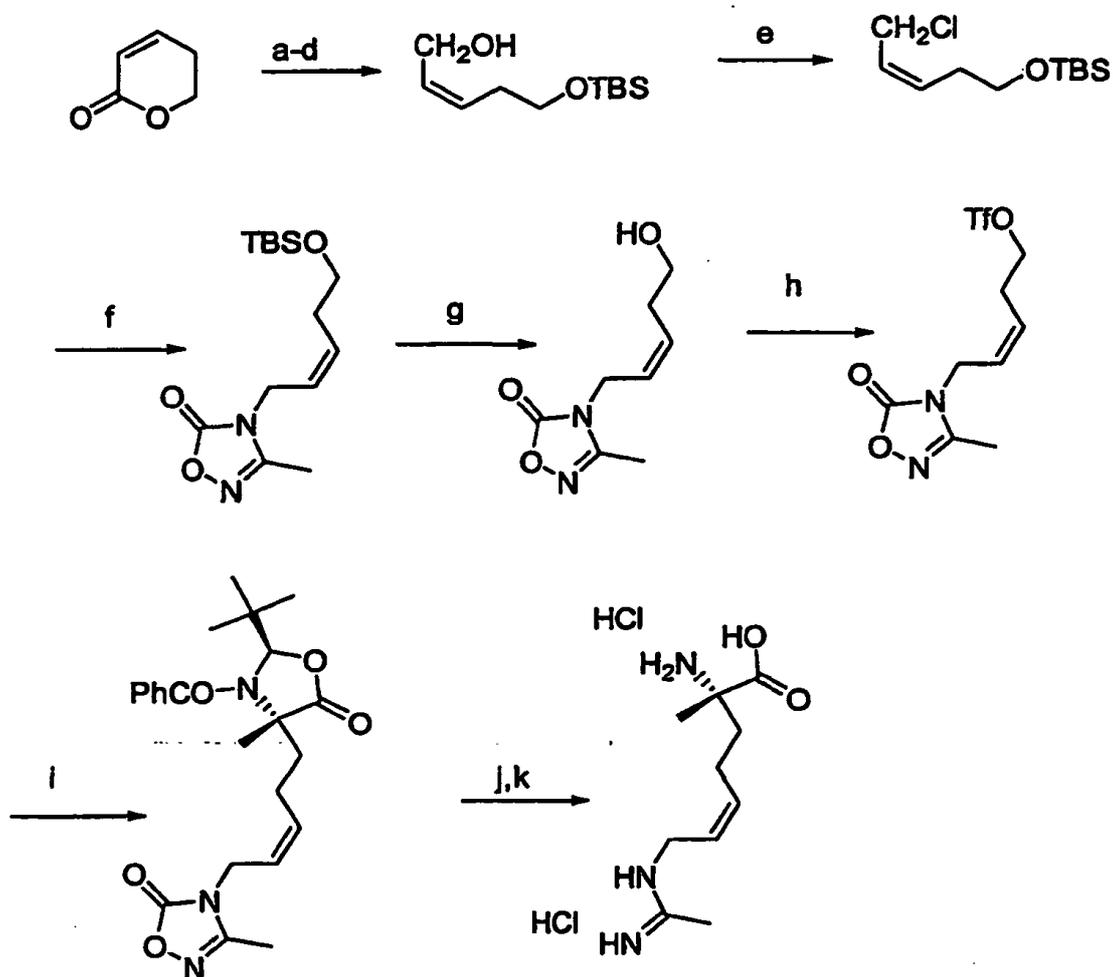
35 La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención puede estar constituida a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante, puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o ambos grasa y aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizador. También se prefiere incluir ambos aceite y grasa. Juntos, el emulsionante o emulsionantes con o sin estabilizador o estabilizadores constituyen lo que se denomina cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa constituyen lo que se denomina base de pomada emulsionante que forma la fase oleosa dispersada de las formulaciones en crema. Los emulsionantes y estabilizadores de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la presente invención incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico, entre otros.

45 La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación está basada en conseguir las propiedades cosméticas deseadas, puesto que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites probablemente usados en las formulaciones farmacéuticas en emulsión es muy baja. De esta manera, la crema preferentemente no debería ser grasa, que no manche y que sea un producto que pueda lavarse con una consistencia adecuada para evitar fugas desde tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres de alquilo mono- o di- básicos de cadena lineal o ramificada, tales como di-isodiapto, estearato de isocetilo, propilenglicol diéster de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitado de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada. Éstos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

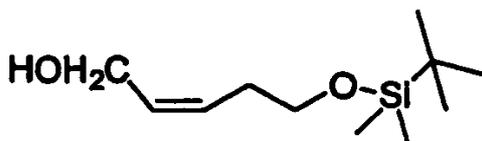
55 Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo incluyen también gotas para los ojos en las que los ingredientes activos están disueltos o suspendidos en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para los ingredientes activos. Los ingredientes activos antiinflamatorios están presentes preferentemente en dichas formulaciones en una concentración del 0,5 al 20%, ventajosamente del 0,5 al 10% y particularmente aproximadamente al 1,5% p/p.

- Para fines terapéuticos, el clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico cristalino normalmente se combina con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Si se administra *per os*, el compuesto puede mezclarse con lactosa, sacarosa, almidón de polvo, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ésteres de alquilo de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma de arábica, alginato sódico, polivinilpirrolidona, y/o alcohol polivinílico, y después se forma en comprimidos o encapsula para administración conveniente. Dichas cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada que puede proporcionarse en una dispersión del compuesto activo en hidroxipropilmetil celulosa. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones para inyección estéril isotónica acuosas o no acuosas o suspensiones. Estas soluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles que tienen uno o más de los vehículos o diluyentes mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral. La Forma B cristalina puede disolverse en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro sódico y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración se conocen bien y ampliamente en la técnica farmacéutica.
- La forma amorfa de clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico cristalino puede prepararse de acuerdo con el esquema general mostrado a continuación:

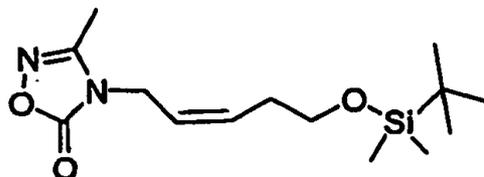
Esquema de Síntesis Genérico



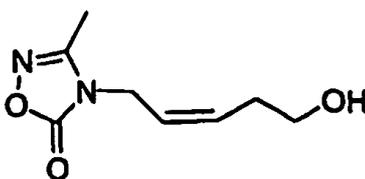
- a) KOH b) MeI c) TBSCl d) DIBAL e) MsCl f) sal potásica de 3-metil-1,2,4-oxadiazolin-5-ona g) AcOH h) Tf₂O i) KHMDs / (2S,4S)-3-benzoil-2-t-butil-4-metil-1,3-oxazolidin-5-ona j) catalizador de Lindlar k) HCl 6 N

Ejemplo 1 - Preparación de diclorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-2-metil-7-[(1-iminoetil)amino]-5-heptenoico**5 Diclorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-2-metil-7-[(1-iminoetil)amino]-5-heptenoico**

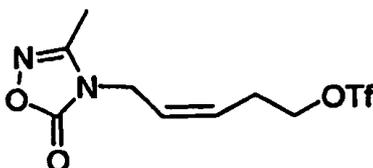
EJ-1A) (Z)-5-t-butildimetilsiloxi-2-penten-1-ol (**EJ-1A**) se preparó a partir de 5,5-dihidro-2-pirona (Aldrich) por el procedimiento de Harold, Mohr y Tamm Helvetica Chimica Acta 66, 2, 1983 744-754.



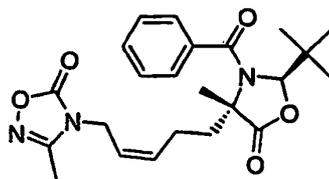
EJ-1B) A una solución del **EJ-1A** (720 mg, 3,3 mmol) en CH_2Cl_2 (25 ml) se le añadió Et_3N (525 mg, 5,3 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (561 mg, 4,90 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min a 0°C y después a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió CH_2Cl_2 adicional, la solución se extrajo con NaHCO_3 , salmuera y se secó produciendo 790 mg de un aceite amarillo. El aceite se disolvió en DMF (20 ml) y se añadieron (513 mg, 3,7 mmol). La solución resultante se agitó a 50°C durante 16 h. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se dividió entre EtOAc y salmuera. La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró produciendo un aceite que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con éter:hexano (1:1) dando 780 mg g (79%) del producto de amidina cíclica Z-alílica protegida deseada como un aceite transparente, que contiene únicamente el isómero Z deseado por RMN de ^1H .



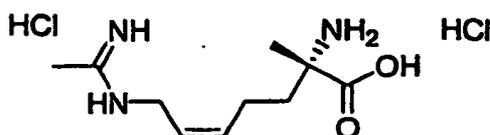
EJ-1C) Una solución del **EJ-1B** (100 mg, 0,34 mmol) en una mezcla de ácido acético (1 ml), THF (3 ml) y agua (1 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución resultante se concentró al vacío hasta un aceite que se disolvió en EtOAc. La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 saturado, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó dando 80 g (cuant.) del producto de alcohol deseado como un aceite incoloro transparente.



EJ-1D) A una solución en CH_2Cl_2 (3 ml) del **EJ-1C** (80 mg, 0,43 mmol) se le añadió Et_3N (44 mg) y anhídrido triflico (146 mg, 0,52 mmol) a 0°C , la mezcla se agitó durante 1,5 h. La solución se concentró al vacío y a la suspensión amarilla resultante se le añadió una solución del **EJ-2D** (0,15 g, 0,74 mmol) en CH_2Cl_2 (1,5 ml). El material bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc:hexano (1:1) dando 62 mg (44%) del producto de triflato deseado en forma de un aceite transparente.



5 **EJ-1E**) A una solución en THF (10 ml) de (2S,4S)-3-benzoyl-2-t-butyl-4-metil-1,3-oxazolidin-5-ona (Ref.) (532 mg, 2,04 mmol) a -78°C se le añadió KHMDS (4,48 ml, 2,2 mmol, 0,5 M en THF). La solución de color naranja resultante se agitó durante 15 min seguido de la adición del **EJ-1D** (580 mg, 1,8 mmol). La solución resultante se dejó calentar a temperatura ambiente seguido de la adición de KHSO₄ (10%, 1,5 ml), salmuera y EtOAc. La fase orgánica se separó, se secó y se concentró al vacío dando 960 mg de un aceite amarillo. El material bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc:hexano (1:1) dando 138 mg (18%) del producto alquilado deseado en forma de un aceite transparente.



10 **EJ-1**) A una solución en metanol (10 ml) del **EJ-1E** (138 mg, 0,32 mmol) se le añadió catalizador de Lindlar (260 mg). La suspensión agitada se calentó a reflujo durante 2 horas, después se enfrió a temperatura ambiente. El catalizador se retiró por filtración a través de celite, y el filtrado se separó dando el producto de amidina desprotegido deseado en forma de un aceite amarillo pálido. Una solución del aceite amarillo en HCl (6 N, 10 ml) se calentó a reflujo durante 1,75 horas. El disolvente se retiró al vacío, y la espuma resultante se purificó por HPLC en fase inversa eluyendo con un gradiente de 30 minutos de CH₃CN al 0-40% H₂O (0,25% ácido acético). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y concentraron hasta una espuma. El producto se disolvió en HCl 1 N y el disolvente se retiró al vacío (2x) dando 34 mg (20%) de producto diclorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-2-metil-7-[(1-iminoetil)amino]-5-heptenoico deseado. EM calculado para C₁₀H₁₉N₃O₂: m/z = 214 [M+H]⁺, encontrado: 214. (100 %)
 15 RMN de ¹H (D₂O) δ 1,40 (s, 3H), 1,5-2,0 (m, 4H) 1,90 (s, 3H), 3,55 (m, 2H) 5,15-5,25 (m, vinilo, 1H), 5,30-5,45 (m, vinilo, 1H).
 20

Tabla I: Análisis	
Nombre del material: ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico (sal HCl, hidrato)	
Aspecto	vidrio/goma de incoloro a decolorado
Identidad por CL-EM	se ajusta al ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico con una masa de 214 (electronebulización+)
Ensayo por CL-EM (por UV)	>99% - contiene co-eluyente superreducido clorhidrato del ácido (2S)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilheptanoico
Impurezas por CL-EM (por UV)	2,5% de clorhidrato del ácido (2S)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilheptanoico superreducido
Otras impurezas individuales	<p style="text-align: center;">+2HCl</p> <p>(por proporción de integrales del canal de EM)</p> <p>ninguno detectable</p>
Identidad por CL quiral (por UV)	se ajusta a un patrón > 99,9% de pureza quiral (isómero S) 94,62% de pureza química de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico

(continuación)

Tabla I: Análisis	
Ensayo por CL quiral (por UV)	1,73% superreducido del clorhidrato del ácido (2S)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilheptanoico
Otras impurezas individuales por CL quiral	ninguna detectada
Identidad por RMN de ¹ H (D ₂ O)	se ajusta a la estructura del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico
Pureza por RMN de ¹ H (D ₂ O)	98% de pureza química del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico
Impurezas por RMN de ¹ H (D ₂ O)	1% de especies superreducidas de clorhidrato del ácido (2S)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilheptanoico
	1% de especies de enlace migrado
TFA residual (% p/p)	no detectado (el límite de cuantificación es 50 ppm)
Análisis de metales	Pb < 1 mg/kg Pd < 2 mg/kg Ni 1,8 mg/kg Fe 18,7 mg/kg
Análisis elemental	calculado C: 35,28 H: 7,55 N: 12,34 Cl: 26,03 encontrado C: 34,97 H: 7,41 N: 12,33 Cl: 24,07 → 2,5 HCl 2 H ₂ O (Nota: El material parece ser higroscópico - el análisis elemental refleja el contenido de agua en el momento del análisis).

Ejemplo 2 - preparación de la forma cristalina de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico**5 Cristalización**

El ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico amorfo, con exceso de clorhidrato, es muy soluble en agua, metanol y etanol, y soluble en isopropanol y diversos disolventes que contienen agua tales como agua al 10% en THF, acetato de etilo saturado en agua, agua al 10% en acetonitrilo y alcoholes superiores con

agua. El amorfato es insoluble a significativamente menos de un mg/ml en los disolventes secos ensayados: acetona, MEK, metil isobutil cetona, THF, acetato de etilo, cloroformo, cloruro de metileno, hexanos, ciclohexano, éter di-isopropílico, acetonitrilo y tolueno.

5 Aproximadamente 460 mg de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico se disolvieron en 10 ml de agua de calidad para HPLC. La resina de intercambio de iones Amberlite IRA400 que se había convertido de la forma cloruro a la forma hidróxido se usó para valorar la solución de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico a pH 10,7. Un electrodo selectivo de cloruro indicaba que el cloruro se redujo a 200 ppm. Esta solución se filtró a través de una membrana LS Millipore de 5 μ m y la solución se liofilizó. El análisis elemental del sólido secado congelado, Tabla II, indicaba que el cloruro se redujo a 0,25 equivalentes, que era consistente con las
10 200 ppm de ión selectivo que leyó el electrodo.

Tabla II

Resultados del análisis elemental: medido por análisis por combustión frente a teórico; porcentaje en peso			
Elemento	Teórico 0 HCl	Teórico 0,25 HCl	Medido (por duplicado)
Carbono	56,3	51,96	52,47 / 52,06
Hidrógeno	8,98	8,72	8,89 / 8,96
Nitrógeno	19,7	18,18	18,16 / 17,96
Cloro	0	3,83	3,98

15 La sal clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico se disolvió en agua, diversos alcoholes inferiores, THF-agua, acetonitrilo-agua y acetato de etilo saturado en agua para obtener soluciones concentradas. Los antidisolventes indicados anteriormente se usaron para forzar la sal de la solución. Cuando sale el líquido - fase líquida, se obtuvieron emulsiones y precipitados vítreos en todos los casos. Las celdas de difusión de vapor se constituyeron también con unos pocos sistemas, produciendo exclusivamente salidas en fase emulsión.

20 Una muestra de la sal clorhidrato se evaporó rotatoriamente, se disolvió, liofilizó y se dejó reposar durante cuatro a seis semanas en una campana extractora de humos. Esta muestra empezó a cambiar espontáneamente. La microscopía de luz polarizada se usó para mostrar que la cristalización estaba ocurriendo. Casi la mitad del volumen de la muestra se decoloró y nunca cristalizó, pero casi la mitad se hizo cristalina. Parte del material se usó como semillas en un número de experimentos de cristalización, con diversos disolventes, para obtener más material cristalino a partir del clorhidrato del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico. Ocurrió muy poca, si acaso alguna, cristalización y después solo muy lentamente. Los cristales de cada lote se examinaron por
25 microscopía de luz polarizada para evidencias de polimorfismo. El hábito cristalino y las propiedades ópticas permanecieron consistentes para una forma. Los cristales de cada lote eran biaxiales, presentando una cara de alta birrefringencia y una cara de baja birrefringencia, $n_1 - n_2 < 0,006$, con ejes ópticos que surgían de la cara de baja birrefringencia.

30 No se observó evidencia de solvatación por microscopía electrónica de exploración con espectroscopía dispersiva de energía SEM/EDS o microscopía de luz polarizada de platina caliente. El fundido eutéctico de los cristales, con la fase oleosa decolorada que no podría haberse retirado completamente sin disolver también los cristales, era de aproximadamente 210 °C.

35 Se aislaron varios cristales grandes de una primera muestra para determinación estructural. La estequiometría de la celdilla unitaria se determinó que era: dos moléculas independientes de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico y tres de HCl. No se observó solvatación. El grupo espacial era P1 (triclínico) y la celdilla unitaria $a = 8,1623$, $b = 9,0524$, $c = 10,5937$, $\alpha = 71,522$, $\beta = 73,472$, $\gamma = 86,086$. Se confirmó que la configuración absoluta del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico era "S".

40 Aproximadamente 1,5 g de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico, (2,5 HCl x 2,0 H₂O) se disolvieron en 5,0 ml de H₂O y la resina amberlite OH se añadió para valorar a pH 7, según se mide con un electrodo de pH y un medidor. La solución se filtró a través de un filtro Millipore LS de 5 μ m y se liofilizó produciendo 903 mg de la sal monoclorhidrato. El material liofilizado se disolvió prácticamente en 6,0 ml de isopropanol que contenía H₂O al 0,38%, seguido de la adición de HCl (150 μ l, 12 M) para formar el sesquiclorhidrato. Esta mezcla se sometió a formación de vórtice y a ultrasonidos y se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente para asegurar la saturación y el equilibrio. Los cristales de siembra se añadieron después (aproximadamente 0,1 mg) y la agitación continuó. Se observó que la cristalización comenzaba en unos minutos y resultó ser sustancial a las 3
45 horas. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Los cristales se recogieron por filtración, se lavaron con un pequeño volumen de isopropanol y se secaron al vacío a 40°C durante una noche para producir 860 mg, 89% del teórico de sólido blanco.

Se apreciará que "sembrar" una solución de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico podría iniciar o aumentar la nucleación en las condiciones descritas. Los cristales están disponibles en Pharmacia Corporation, 4901 Searle Parkway, Skokie, Illinois, USA 60077.

5 Se realizaron dos experimentos similares. Unos pocos cientos de miligramos del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico se disolvieron a aproximadamente la misma concentración en isopropanol como el material liofilizado en el experimento previo. La concentración de clorhidrato no se ajustó. Este sistema se sembró y se agitó a temperatura ambiente. No se observó cristalización. En el siguiente experimento, el pH de la solución se ajustó con hidróxido sódico concentrado a aproximadamente pH 3 y se sembró. Se obtuvo algo de producto cristalino, pero el rendimiento era solo de aproximadamente el 30 al 40%. La adición de éter aumento el
10 rendimiento a casi el 90%.

Ejemplo 3 - Caracterización de la sal cristalina de ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico

15 El ácido 2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl sólido era cristalino por microscopía de luz polarizada y el tamaño de la cristalita era del orden de un micrómetro. Las partículas aglomeradas era esferulíticas. El análisis elemental del ácido 2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl por metodología física proporcionó una correspondencia muy fuerte con la teoría para una sal 1,5 HCl sin solvatación, véase la Tabla III. El análisis del agua por Karl Fischer Coulométrico encontró un 0,6% de agua, 0,09 equivalentes, a partir de una media de dos mediciones.

Tabla III

Resultados del análisis elemental del ácido 2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl		
Medido por análisis de combustión frente a teórico; porcentaje en peso		
Elemento	Medido (duplicado)	Teórico 1,5 HCl
Carbono	44,56/44,57	44,82
Hidrógeno	7,87/7,93	7,71
Nitrógeno	15,58/15,60	15,68
Cloro	19,61/19,68	19,85

20 La microscopía de luz polarizada del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl descubrió índices de refracción $n_d \alpha$ 1,508, β aproximadamente 1,59, γ 1,608, un signo óptico negativo y 2V cerca de 37 grados. La fuerte dispersión de los ejes ópticos era evidente en las cifras de interferencia.

25 La calorimetría de exploración diferencial (DSC) descubrió un fundido único a 224°C y un calor de fusión de 147 julios gramo⁻¹. (Véase la Figura 2).

La Figura 3 muestra el patrón de rayos x de polvo del ácido 2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl.

30 Haciendo referencia a la Figura 4, el patrón de rayos x de polvo calculado a partir de la estructura monocristalina superpuesta con el patrón de rayos de polvo del ácido 2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl coincidía muy bien, permitiendo la diferencia de temperatura. Los datos de monocristal se recogieron a 120 °K y los datos de rayos x de polvo a temperatura ambiente.

No se observó pérdida de masa por análisis termogravimétrico (TGA) respecto al inicio del fundido (véase la Figura 5). Se observó una pérdida del 0,47% durante la fusión por TGA.

35 El ácido 2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl cristalino no es higroscópico, y está por debajo del 70% de humedad relativa. La adsorción de humedad del ácido 2-amino-7-(etanimidolamino)-2-metilhept-5-enoico 1,5 HCl a 25°C por equilibrio de humedad DVS, mostró una ganancia de humedad del 0,91% al 70% de humedad relativa (HR). A una HR del 80%, la ganancia era del 18,5% y a una HR del 90%, la ganancia era del 76,8%. El instrumento se volvió a someter a un ciclo a una humedad relativa baja y la muestra se retiró y después se examinó por microscopía de luz polarizada. La muestra era totalmente cristalina después de retirarla del equilibrio de
40 humedad, pero el tamaño de cristalita había aumentado. Las propiedades ópticas fácilmente observadas por PLM sugirieron que no había ocurrido cambio en la forma cristalina, pero al menos algunas de las muestras habían dejado de estar licuadas y se habían recristalizado al secarse. La Tabla IV muestra los datos detallados a partir del equilibrio de humedad DVS. Esta forma de sal, 1,5 HCl, no tiene solvatación

Tabla IV

	HR diana (%)	Adsorción	Desorción	Histéresis
Ciclo 1	0,0	0,00	13,02	
	10,0	0,10		
	20,0	0,16	18,93	18,77
	30,0	0,21		
	40,0	0,26	22,72	22,46
	50,0	0,28		
	60,0	0,27	33,44	33,16
	70,0	0,91		
	80,0	18,48	67,59	49,10
	85,0	46,91		
	90,0	76,82	76,82	

Sólido cristalino blanco
PF 253

RMN-H, HR-EM, CHN >99,0

5 Sólido cristalino blanco
PF 229,33

RMN-H, HR-EM, CHN >99,0

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina del ácido (2S,5Z)-2-amino-7-(etanimidoilamino)-2-metilhept-5-enoico 1:5 clorhidrato **caracterizado por** al menos una medición física seleccionada entre: patrón de difracción de rayos x de polvo como se muestra en la Figura 3, espectro Raman como se muestra en la Figura 6, un punto de fusión de 224°C y un calor de fusión de 147 julios gramo⁻¹.
- 5

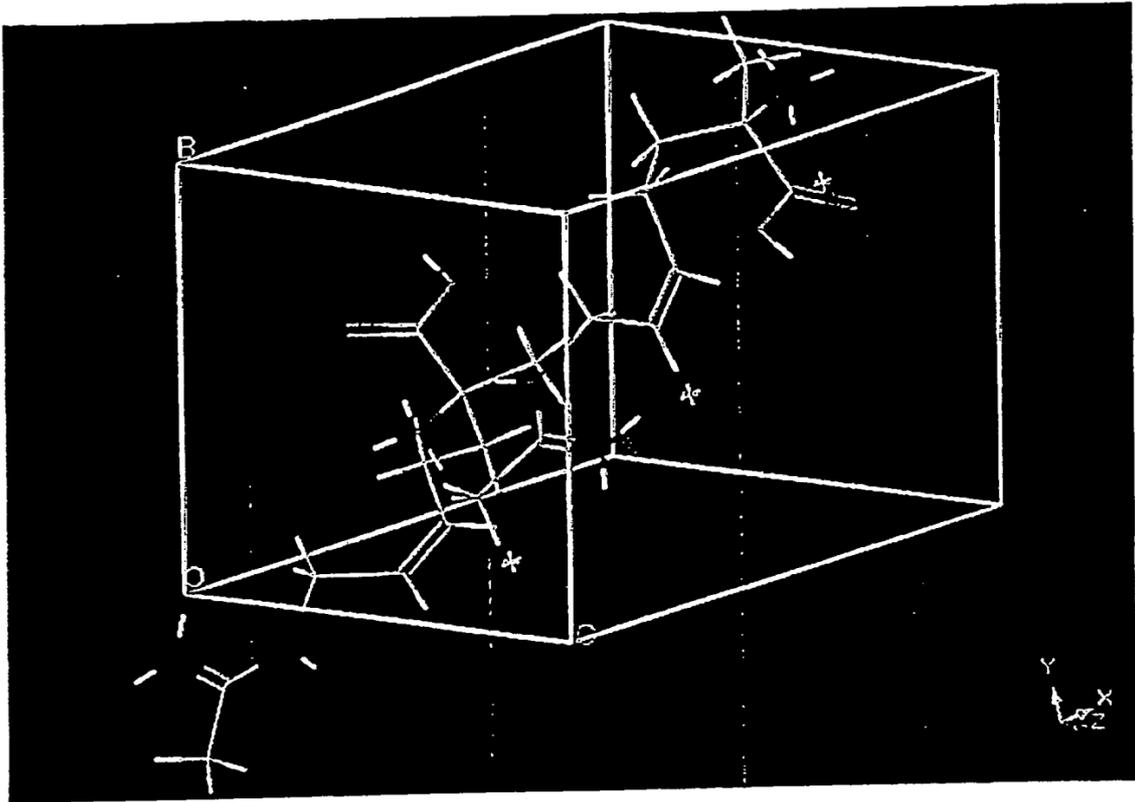


FIG. 1

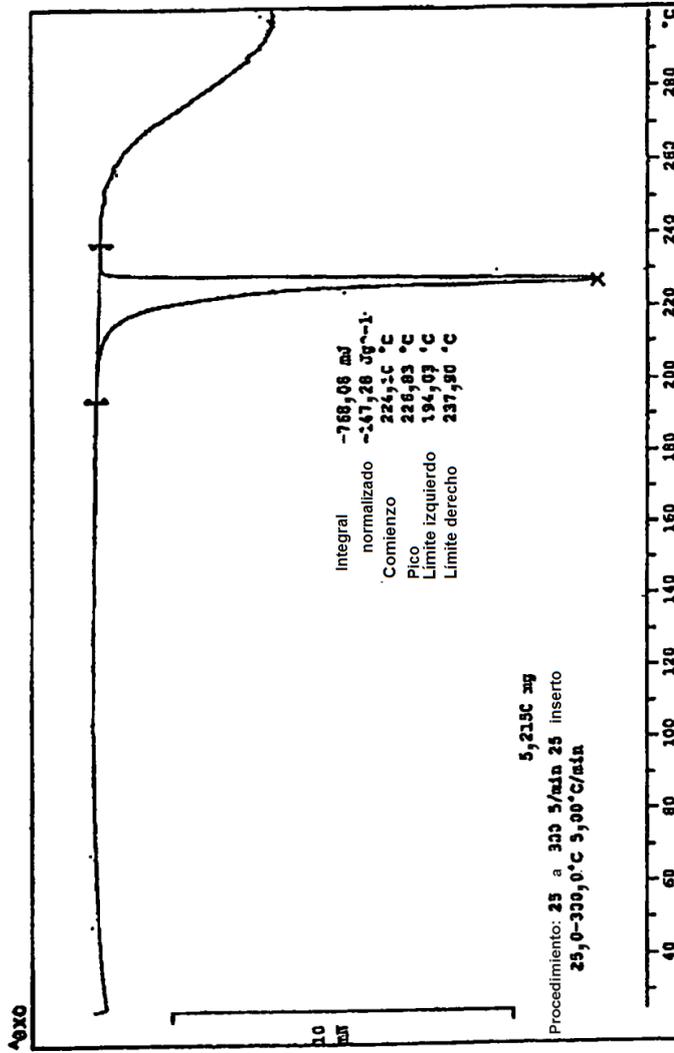


FIG. 2

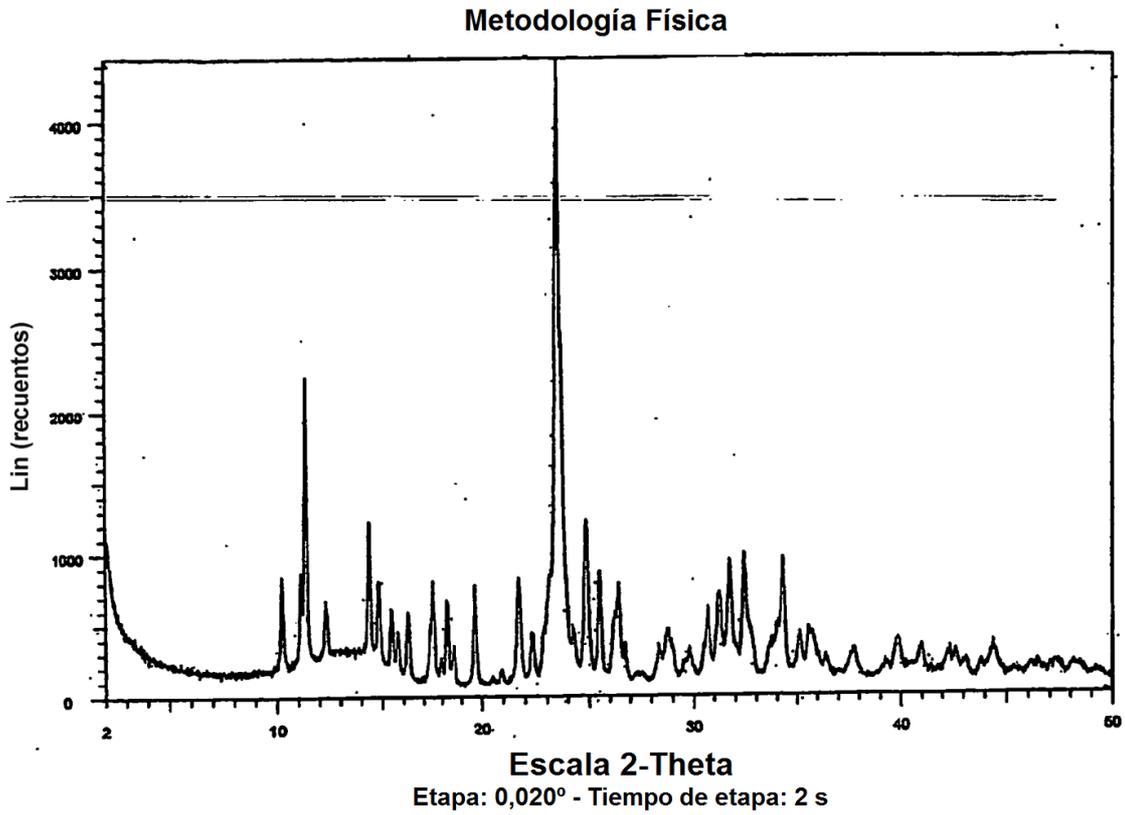


FIG. 3

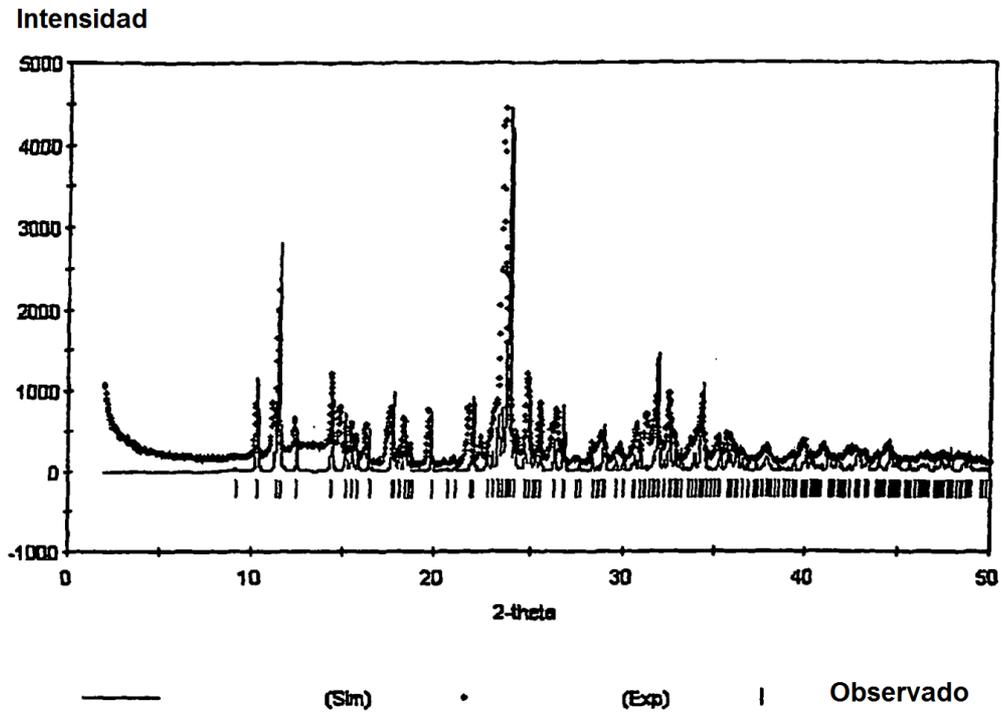


FIG. 4

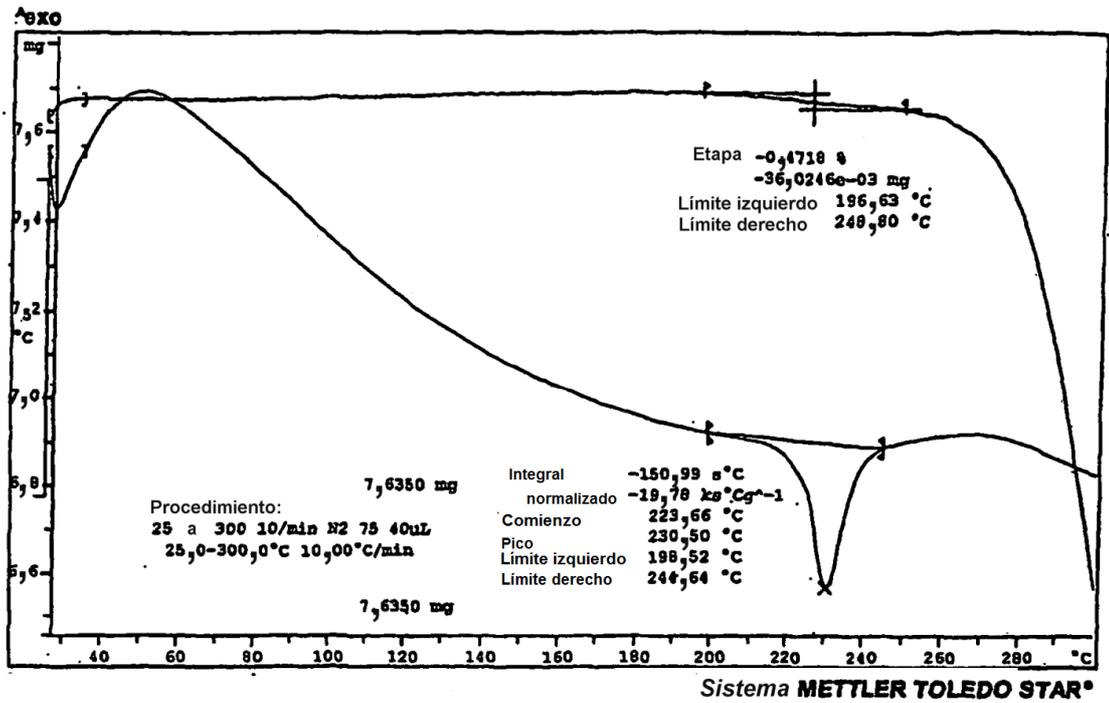


FIG. 5

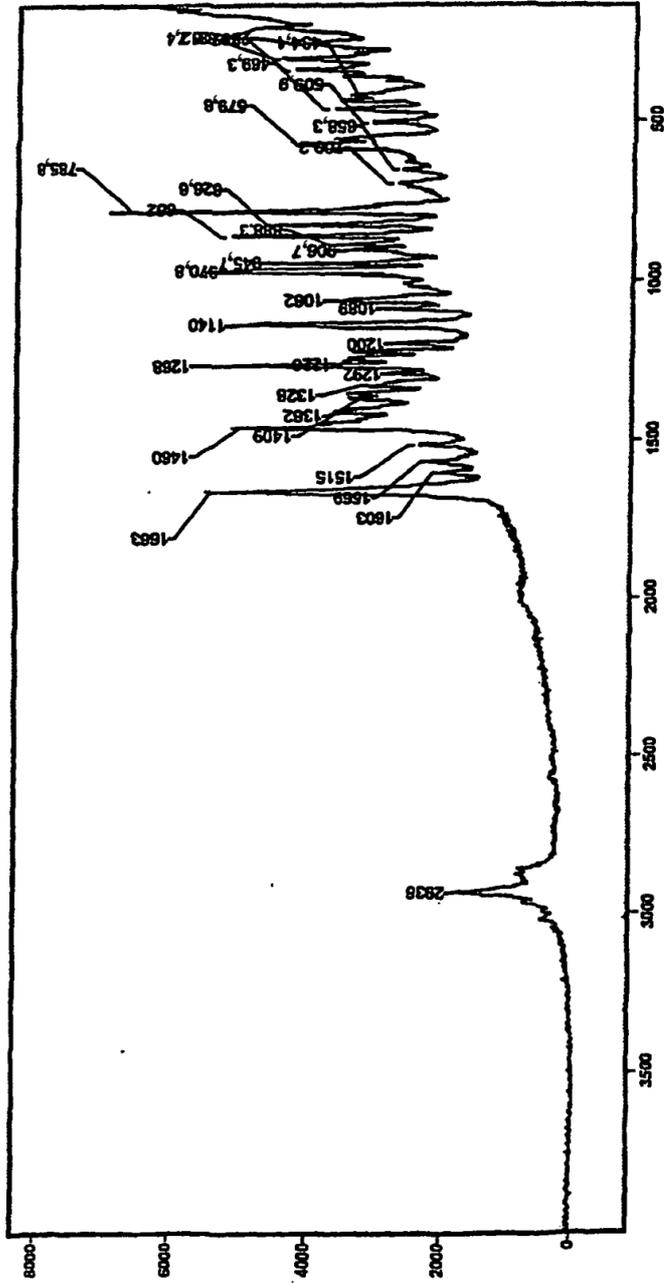


FIG. 6