

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 908**

51 Int. Cl.:

C07D 519/00 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2010** **E 10702164 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012** **EP 2391629**

54 Título: **Pirrollopirimidindiona dimérica y su uso en la terapia de enfermedades respiratorias**

30 Prioridad:

30.01.2009 GB 0901616

11.05.2009 GB 0908068

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

04.04.2013

73 Titular/es:

CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)

Via Palermo, 26/A

43100 Parma, IT

72 Inventor/es:

EDWARDS, CHRISTINE;

KULAGOWSKI, JANUS y

FINCH, HARRY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 908 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

Pirrolopirimidindiona dimérica y su uso en la terapia de enfermedades respiratorias

Campo de la invención

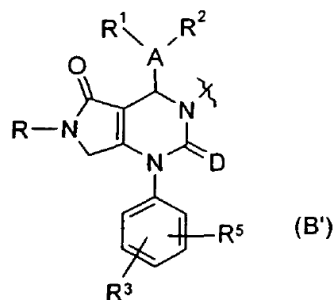
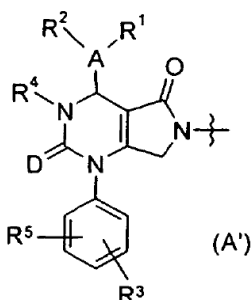
La presente invención se refiere a un compuesto de 3,4,5,7-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidin-2,5-diona sustituido específico que es un inhibidor de la elastasa de neutrófilos humana, y a su uso en la terapia de enfermedades respiratorias mediante administración inhalada.

Antecedentes de la invención

La elastasa de neutrófilos humana (HNE) es una serina proteinasa de 32 kDa que se encuentra en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Desempeña un papel en la degradación de una amplia gama de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, laminina, proteoglicanos, colágenos de tipo III y de tipo IV, así como elastina (Bieth, G., en Regulation of Matrix accumulation, Mecham, R.P. (eds.), Academic Press, NY, EEUU, 1986, 217-306). Desde hace tiempo se ha considerado que la HNE desempeña un papel importante en la homeostasis a través de la reparación y la eliminación de tejidos dañados por medio de la degradación de las proteínas estructurales del tejido. También es importante en la defensa contra una invasión bacteriana por medio de la degradación del cuerpo bacteriano. Además de sus efectos sobre los tejidos de la matriz, la HNE se ha implicado en la sobreexpresión de la expresión del gen IL-8 y también induce la liberación de IL-8 desde las células epiteliales del pulmón. En modelos animales de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica inducida por la exposición al humo del tabaco, los inhibidores de molécula pequeña y los inhibidores de proteínas de HNE inhiben la respuesta inflamatoria y el desarrollo de enfisema (Wright, J.L. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2002, 166, 954-960; Churg, A. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2003, 168, 199-207). Así, la HNE puede desempeñar un papel en la destrucción de la matriz y en la amplificación de respuestas inflamatorias en enfermedades respiratorias crónicas en las que el influxo de neutrófilos es una característica. En efecto, se cree que la HNE desempeña un papel en varias enfermedades pulmonares, incluyendo la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la fibrosis quística (CF), el síndrome de insuficiencia respiratoria agudo (ARDS), el enfisema pulmonar, la neumonía y la fibrosis pulmonar. También está implicada en varias enfermedades cardiovasculares en las que está implicada la remodelación de tejidos, por ejemplo, en la insuficiencia cardíaca y la generación de lesiones de tejidos isquémicas tras un infarto de miocardio agudo.

La COPD es un término colectivo que abarca a tres diferentes trastornos patológicos, todos los cuales contribuyen a la limitación del flujo del aire: la bronquitis crónica, el enfisema y la enfermedad de las vías respiratorias pequeñas. En general, los tres existen en diversos grados en pacientes con COPD, y los tres pueden ser debidos a la inflamación mediada por neutrófilos, apoyando esto último el mayor número de neutrófilos observado en los fluidos de lavado broncoalveolar (BAL) en pacientes con COPD (Thompson, A.B., Daughton, D., et al., Am. Rev. Respir. Dis., 1989, 140, 1527-1537). Desde hace tiempo se ha considerado que el principal determinante patogénico en la COPD era el equilibrio proteasa-antiproteasa (también denominada "hipótesis de elastasa:antielastasa"), en el que el desequilibrio de HNE y antiproteasas endógenas, tales como α_1 -antitripsina (α_1 -AT), el inhibidor de proteasas segregado por leucocitos (SLPI) y la pre-elafina, conduce a los diversos trastornos inflamatorios de la COPD. Los individuos que tienen una deficiencia genética en el inhibidor de proteasas α_1 -antitripsina desarrollan un enfisema que aumenta de gravedad a lo largo del tiempo (Laurell, C.B., Eriksson, S., Scand. J. Clin. Invest., 1963, 15, 132-140). Por tanto, un exceso de HNE es destructivo, conduciendo al colapso de la morfología pulmonar con pérdida de elasticidad y destrucción de las uniones alveolares de las vías respiratorias en el pulmón (enfisema), mientras que de modo simultáneo aumenta la permeabilidad microvascular y la hipersecreción de moco (bronquitis crónica).

La publicación de patente internacional WO 2007/129060 divulga, entre otras cuestiones, compuestos homodiméricos o heterodiméricos de fórmula M-L-M¹, en la que L es un radical conector divalente, y M y M¹ son cada uno independientemente un radical de fórmula (A') o (B'):



en las que:

A es arilo o heteroarilo;

D es oxígeno o azufre;

R¹, R², R³ y R⁵ son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, nitro, ciano, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, hidroxilo, alcoxi C₁-C₆, o alquenilo C₂-C₆, en los que alquilo C₁-C₆ y alcoxi C₁-C₆ pueden estar sustituidos también con uno a tres radicales iguales o diferentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo y alcoxi C₁-C₄;

R y **R⁴** representan cada uno independientemente un radical de fórmula $-[X]_m-[Alq^1]_p-[Q]_n-[Alq^2]_q-[X^1]_k-Z$, en la que

k, m, n, p y q son independientemente 0 o 1;

Alq¹ y **Alq²** representan cada uno independientemente un radical alquileo C₁-C₆ o alquenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido que puede contener opcionalmente un enlace éter (-O-), tioéter (-S-) o amino (-NR^A-), en el que R^A es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

Q representa (i) -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -S⁺(R^A)-, -N(R^A)-, -N⁺(R^A)(R^B)-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -S(O₂)NR^A-, -NR^AS(O₂)-, -NR^AC(=O)NR^B-, -NR^AC(=NR^A)NR^B-, -C(=NR^D)NR^E-, -NR^EC(=NR^D)-,

en los que R^A, R^B, R^D y R^E son independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o cicloalquilo C₃-C₆, o R^A y R^B, o R^D y R^E tomados conjuntamente con el nitrógeno al cual están unidos forman un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 átomos del anillo que puede contener otro heteroátomo seleccionado de N, O y S, o (ii) un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico divalente opcionalmente sustituido que tiene 3-6 miembros del anillo;

X representa -C(=O)-, -S(O₂)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, o -S(O₂)NR^A-, en los que R^A es hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o cicloalquilo C₃-C₆;

X¹ representa -O-, -S- o -NH-; y

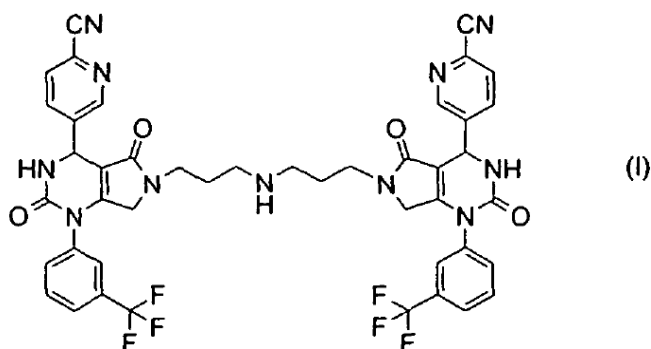
Z es hidrógeno o un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico opcionalmente sustituido que tiene 3-6 miembros del anillo.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto dentro del alcance de las reivindicaciones del documento WO 2007/129060 pero no descrito específicamente en él. Al igual que los compuestos del documento WO 2007/129060, el presente compuesto es particularmente útil para la aplicación pulmonar mediante inhalación, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del pulmón y del tracto respiratorio. Sin embargo, el presente compuesto tiene la ventaja de un tiempo de residencia en el pulmón más corto, expresado como su semivida (T_{1/2}), comparado con su análogo estructural más cercano descrito en el documento WO 2007/129060, que conduce a la característica deseable de una eliminación más temprana tras cesar el tratamiento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables:

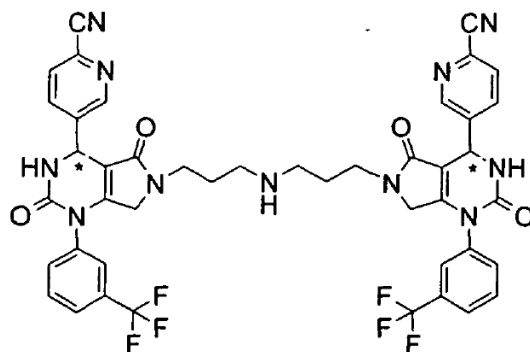


Para un informe acerca de las sales, véase Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002). Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención incluyen sales de adición de ácidos, tales como las sales hidrocloreto, hidrobromuro, fosfato, sulfato, acetato, diacetato, fumarato, maleato, tartrato, citrato, oxalato, metansulfonato o *p*-toluensulfonato.

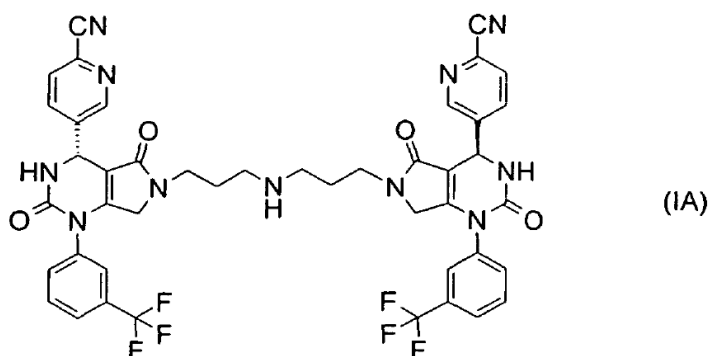
Se espera que el compuesto de la invención pueda aislarse como uno o más hidratos o solvatos, y en una única o en múltiples formas cristalinas polimórficas. Cualquier referencia en la presente, incluyendo las reivindicaciones en la presente, a "un compuesto al cual se refiere la invención" o "un compuesto de la invención" o "el presente compuesto", o "los compuestos de fórmula (I)" y similares, incluye la referencia a las sales, los hidratos y los solvatos de dichos compuestos, y sus formas cristalinas.

El término “solvato” se emplea en la presente para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una cantidad estequiométrica de una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, etanol. El término “hidrato” se emplea cuando dicho disolvente es agua.

El compuesto de la invención tiene dos centros quirales indicados por los asteriscos como sigue:



- 5 Preferiblemente, el compuesto de la invención tiene predominantemente la configuración R-R (mostrada en la fórmula (IA)) en esos centros, en lugar de la configuración R-S y/o S-S.



Así, las muestras preferidas del compuesto de la invención predominantemente contienen el diastereómero R-R. Por ejemplo, las muestras del compuesto de la invención pueden consistir en al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, y más preferiblemente 98% o más en peso del diastereómero R-R según se muestra en la fórmula (IA), y menos del 10%, 5% o 2% en peso, respectivamente, de otros diastereómeros.

El compuesto de la invención está previsto para una administración pulmonar para el tratamiento o la prevención de enfermedades del tracto respiratorio en las que está implicada la HNE, por ejemplo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la bronquitis crónica, la fibrosis pulmonar, la neumonía, el síndrome de insuficiencia respiratoria agudo (ARDS), el enfisema pulmonar, el enfisema inducido por tabaquismo o la fibrosis quística, el asma y la rinitis. Así, los compuestos de la invención pueden utilizarse en un procedimiento de terapia, para el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad o un trastorno del tracto respiratorio, según se definió anteriormente.

Así, otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica adaptada para la administración pulmonar mediante inhalación, que comprende el compuesto de la invención y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Tal como se explicó anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen aquellas en las que el compuesto de la invención está presente predominantemente como el diastereómero R-R (con relación a los diastereómeros S-S y R-S). Preferiblemente, las composiciones de la invención contienen el compuesto de fórmula (I) como al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98% o más en peso del diastereómero R-R, y menos del 10%, 5% o 2% en peso, respectivamente, de otros diastereómeros.

Se conocen composiciones adecuadas para la administración mediante inhalación pulmonar, y pueden incluir vehículos y/o diluyentes conocidos por su uso en estas composiciones. La composición puede contener 0,01-99% en peso del compuesto activo. Preferiblemente, una dosis unitaria comprende el compuesto activo en una cantidad de 1 µg a 10 mg.

El nivel de dosificación más adecuado puede ser determinado mediante cualquier procedimiento adecuado

conocido por los expertos en la técnica. Sin embargo, deben entenderse que la cantidad específica para cualquier paciente concreto dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico que se está empleando, la edad, el peso corporal, la dieta, la salud general y el sexo del paciente, el momento de la administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, el uso de cualquier otro fármaco, y la gravedad de la enfermedad que está bajo tratamiento. En general, el intervalo de dosis diaria estará en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal de un mamífero, preferiblemente de 0,01 mg a aproximadamente 50 mg por kg, y lo más preferiblemente de 0,1 a 10 mg por kg, en dosis individuales o divididas. Por otra parte, puede ser necesario utilizar dosificaciones fuera de estos límites en algunos casos.

Para el transporte mediante inhalación, el compuesto activo preferiblemente está en forma de micropartículas. Estas pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas, que incluyen secado por pulverización, liofilización, y micronización.

Como ejemplo, una composición de la invención puede prepararse como una suspensión para la administración desde un nebulizador, o como un aerosol en un propelente líquido, por ejemplo, para su uso en un inhalador dosimétrico presurizado (PMDI). Los propelentes adecuados para su uso en un PMDI son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen CFC-12, HFA-134a, HFA-227, HCFC-22 (CCl_2F_2) y HFA-152 (CH_3F_2 e isobutano).

En una realización preferida de la invención, una composición de la invención está en forma de polvo seco, para su administración utilizando un inhalador de polvo seco (DPI). Se conocen muchos tipos de DPI.

Las micropartículas para el transporte por inhalación pueden formularse con excipientes que ayuden al transporte y la liberación. Por ejemplo, en una formulación en polvo seco, pueden formularse micropartículas con partículas portadoras grandes que ayuden al flujo desde el DPI hacia el pulmón. Se conocen algunas partículas portadoras adecuadas, e incluyen partículas de lactosa; pueden tener una mediana de masa de diámetro aerodinámico mayor que 90 μm .

La generación de un aerosol puede realizarse utilizando, por ejemplo, atomizadores de chorro a presión o atomizadores ultrasónicos, preferiblemente empleando aerosoles dosimétricos accionados por un propelente o una administración sin propelente de compuestos activos micronizados, por ejemplo desde cápsulas de inhalación u otros sistemas de transporte de "polvo seco".

El compuesto activo puede dosificarse según se ha descrito dependiendo del sistema inhalador empleado. Además de los compuestos activos, las formas de administración pueden contener también excipientes tales como, por ejemplo, propelentes (por ejemplo, Frigen en el caso de aerosoles dosimétricos), sustancias tensioactivas, emulgentes, estabilizantes, conservantes, aromas, cargas (por ejemplo, lactosa en el caso de inhaladores de polvos) o, si resulta apropiado, otros compuestos activos.

Para la inhalación está disponible un gran número de sistemas con los que pueden generarse y administrarse aerosoles con un tamaño de partícula óptimo, empleando una técnica de inhalación que sea apropiada para el paciente. Además del uso de adaptadores (espaciadores, expansores) y recipientes con forma de pera (por ejemplo, Nebulator®, Volumatic®), y dispositivos automáticos que emiten una nube pulverizada (Autohaler®), para aerosoles dosimétricos, en particular en el caso de inhaladores de polvos, está disponible una serie de soluciones técnicas (por ejemplo, Diskhaler®, Rotadisk®, Turbohaler® o los inhaladores descritos, por ejemplo, en el documento EP-A-0505321).

En el caso de una formulación basada en un aerosol, una composición preferida es la siguiente:

Compuesto de la invención	24 mg/bote
Lecitina, NF liq. conc.	1,2 mg/bote
Triclorofluorometano, NF	4,025 g/bote
Diclorodifluorometano, NF	12,15 mg/bote

El compuesto de la invención puede utilizarse en combinación con otros fármacos que se emplean en el tratamiento/prevenición/supresión o mejora de enfermedades o trastornos para los cuales los presentes compuestos son útiles. Estos otros fármacos pueden administrarse mediante cualquier vía y en una cantidad que se emplean habitualmente para ello, de modo simultáneo o secuencial con un compuesto de la invención. Cuando

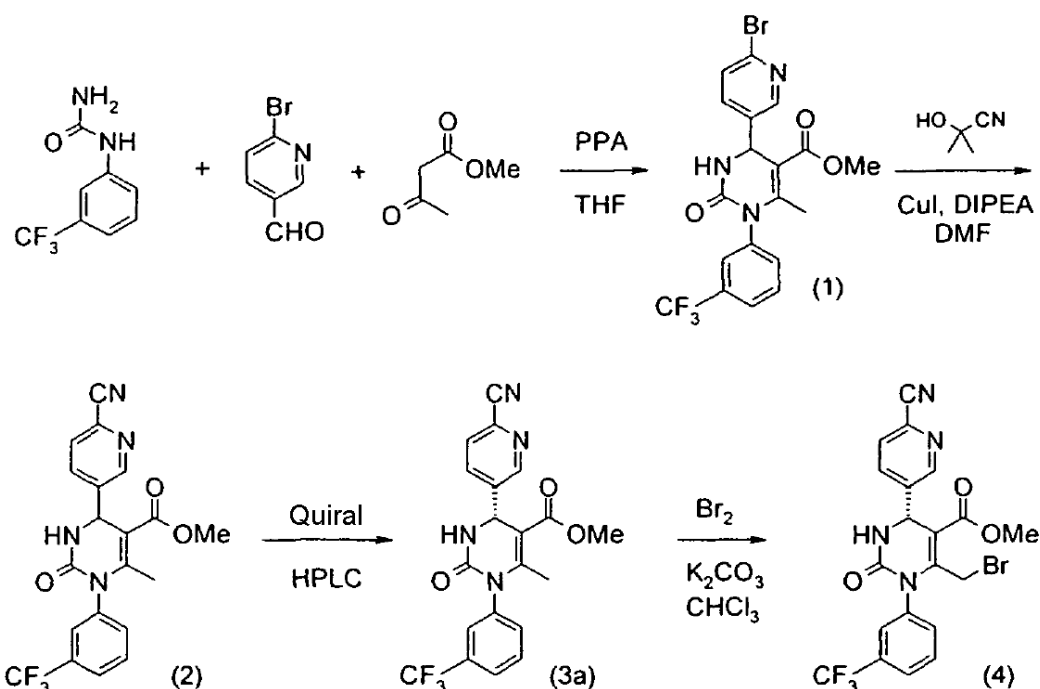
un compuesto de la invención se utiliza de modo simultáneo con uno o más fármacos distintos, se prefiere una composición farmacéutica que contenga estos otros fármacos además del compuesto de la invención. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen las que también contienen uno o más ingredientes activos distintos, además del compuesto de la invención.

Los agentes terapéuticos adecuados para una terapia de combinación con el compuesto de la invención incluyen: (1) un corticosteroide, por ejemplo, fluticasona o budesonida; (2) un agonista de β -adrenorreceptor, por ejemplo salmeterol o formeterol; (3) un modulador de leucotrienos, por ejemplo montelukast o pranlukast; (4) agentes anticolinérgicos, por ejemplo antagonistas del receptor muscarínico-3 (M3) selectivos, tales como bromuro de tiotropio; (5) un antagonista de receptor muscarínico-3 (M3)/agonista de β 2-adrenorreceptor dual, tal como GSK 961081; (6) inhibidores de fosfodiesterasa-IV (PDE-IV), por ejemplo, roflumilast o cilomilast; (7) un agente antitusivo, tal como codeína o dextromorfano; (8) un agente antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), por ejemplo ibuprofeno o cetoprofeno; (9) un mucolítico, por ejemplo N-acetilcisteína o fudosteína; (10) un expectorante/modulador mucocinético, por ejemplo, ambroxol, disoluciones hipertónicas (por ejemplo, disolución salina o manitol), o tensioactivo; (11) un mucolítico peptídico, por ejemplo dexasirribonucleasa I humana (domasa-alfa o rhADNasa) o helicidina; y (12) antibióticos, por ejemplo azitromicina, tobramicina y aztreonamo.

La invención se explica más a fondo en los siguientes ejemplos.

A. Síntesis del compuesto de la invención

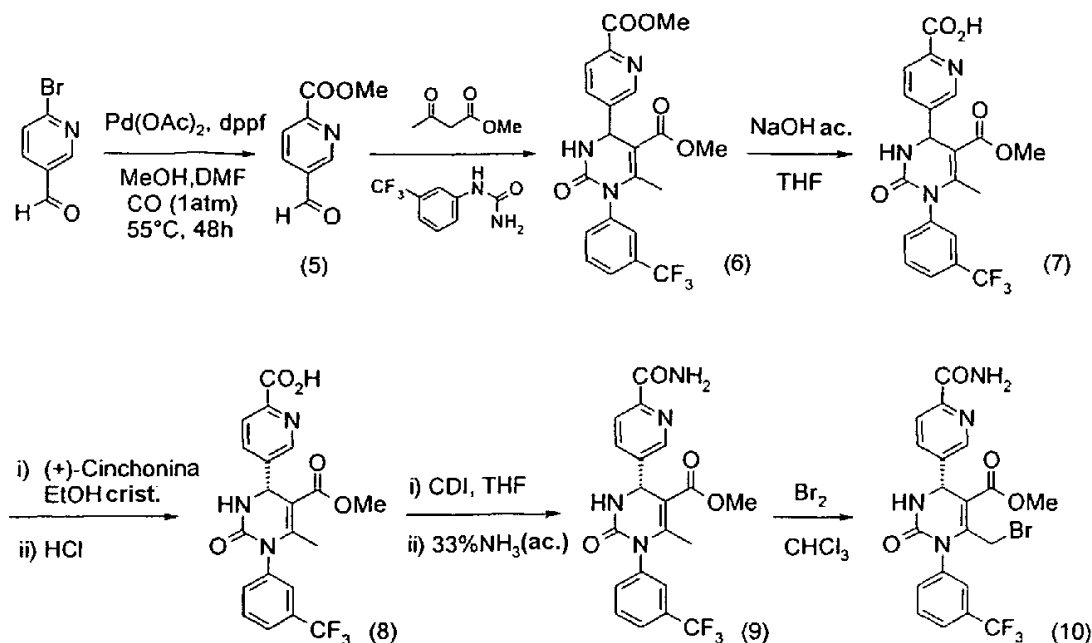
Las vías mostradas en los esquemas 1 a 3 describen vías alternativas para la síntesis del compuesto (1A). La reacción de Biginelli entre 2-bromopiridin-5-carboxaldehído, (3-trifluorometilfenil)urea y un acetoacetato de alquilo o arilo, por ejemplo, acetoacetato de metilo, para formar el compuesto (1), puede realizarse en presencia de un catalizador, tal como ácido polifosfórico. La sustitución de un átomo de bromo por un grupo ciano puede realizarse utilizando diversas condiciones de reacción de cianación convencionales, por ejemplo, cianohidrina acetona con catálisis de cobre. La separación quiral de los enantiómeros de (2) puede lograrse utilizando HPLC quiral. La bromación del (R)-enantiómero (3a) utilizando bromo, u otro reactivo de bromación convencional, puede entonces proporcionar (4) (esquema 1).



Esquema 1

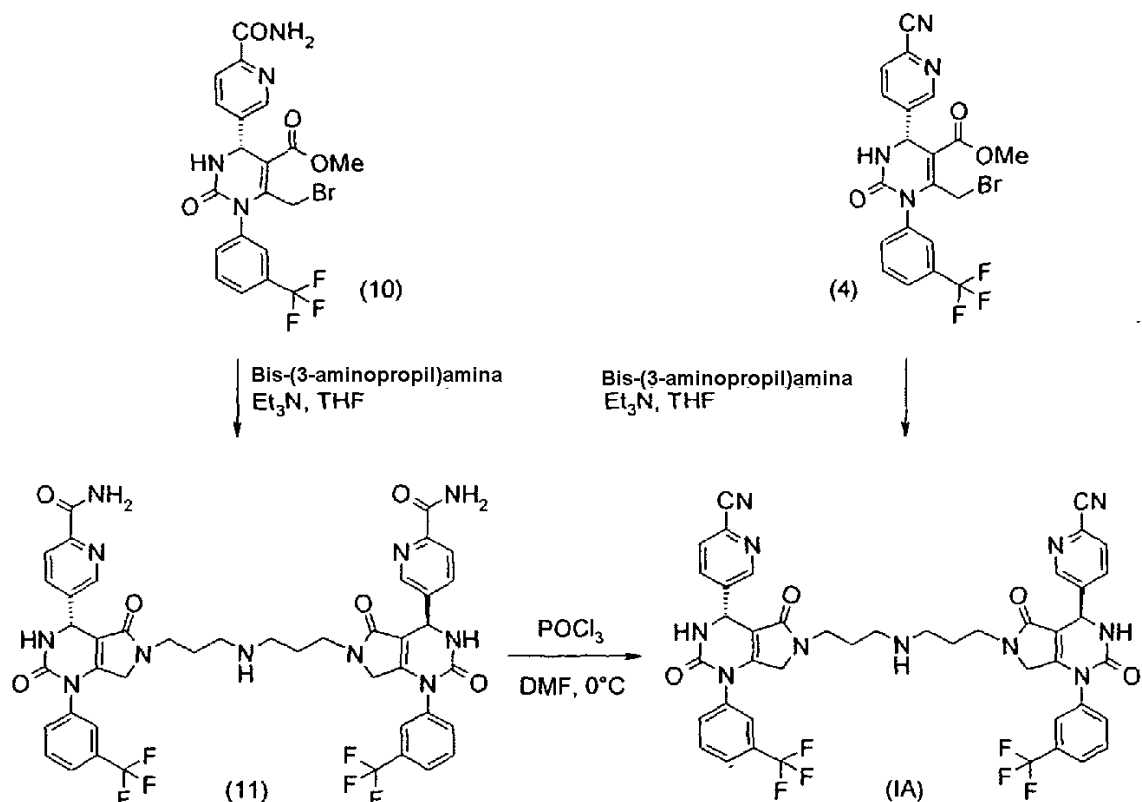
Como alternativa (esquema 2), puede utilizarse una reacción de Biginelli entre un éster del ácido 5-formilpiridin-2-carboxílico, un acetoacetato de alquilo o arilo, (3-trifluorometilfenil)urea en presencia de un catalizador, tal como ácido polifosfórico. De modo específico, el 5-formilpiridin-2-carboxilato de metilo (5), que puede prepararse mediante la carbonilación de 2-bromopiridin-5-carboxaldehído en presencia de metanol, puede hacerse reaccionar con acetoacetato de metilo y (3-trifluorometilfenil)urea para producir el compuesto (6). La conversión al ácido

carboxílico (7) puede lograrse utilizando condiciones de hidrólisis convencionales, por ejemplo, hidróxido de sodio acuoso. La formación de una mezcla diastereomérica de sales mediante el tratamiento de (7) con (+)-cinchonina, y la cristalización del (*R*)-enantiómero preferiblemente en etanol, permite el aislamiento de (8) después de un tratamiento con ácido. Para la formación de la amida (9), las reacciones pueden realizarse utilizando condiciones convencionales, por ejemplo, el tratamiento del ácido (8) con carbonildiimidazol, seguido de una reacción con amoníaco. La bromación de (8) para producir (10) puede lograrse, por ejemplo, utilizando bromo o *N*-bromosuccinimida. El intermedio (9) puede convertirse, como alternativa, en el intermedio (3), que es útil en la vía alternativa (esquema 1), mediante deshidratación.



Esquema 2

El esquema 3 muestra que ambos compuestos (4) y (10) puede convertirse en el compuesto (IA). La reacción de dimerización con bis-(3-aminopropil)amina puede aprovechar el uso de una base adecuada, por ejemplo, trietilamina, NaHCO_3 , DIPEA , etc., y puede utilizarse la bis-(3-aminopropil)amina en una forma protegida, es decir, la amina secundaria puede protegerse, por ejemplo, con terc-butiloxicarbonilo, benciloxicarbonilo, etc., retirándose el grupo protector en una etapa posterior. El compuesto (11), el producto de la reacción de (10) con bis-(3-aminopropil)amina, puede deshidratarse para producir (IA), mientras que (4) reacciona directamente con bis-(3-aminopropil)amina para producir (IA). El compuesto (IA) puede obtenerse como la base libre mediante una cromatografía y después convertirse en una sal mediante un tratamiento con un compuesto ácido adecuado. Como alternativa, puede obtenerse (IA) mediante una cristalización en una sal adecuada, por ejemplo, la sal 4-toluensulfonato, procedente de la reacción de dimerización bruta (4). Todas las reacciones pueden realizarse en diversos disolventes que deben ser compatibles con los reactivos utilizados, y pueden realizarse a diversas temperatura adecuadas, generalmente 0 - 80°C .



Esquema 3

Procedimientos generales

Las reacciones no se realizaron bajo una atmósfera inerte a menos que se especifique. Cuando los productos se purificaron mediante una cromatografía en columna sobre sílice, "sílice" se refiere a gel de sílice para cromatografía, de 0,035 a 0,070 mm (malla 230 a 400), y se aplicó una presión de nitrógeno de hasta 68,95 kPa para acelerar la elución de la columna. Cuando la separación se realiza utilizando un cartucho RediSep® Si, se emplea un sistema de cromatografía automática (compañero CombiFlash®), junto con una columna de polipropileno precargada (RediSep®) que contiene sílice con un tamaño medio de partícula de 35-70 µm (malla 230-400). Todos los disolventes y los reactivos del mercado se utilizaron tal cual se recibieron.

Procedimientos de LC-MS analíticos*Procedimiento de LC-MS 1*

Waters Micromass ZMD con una columna de fase inversa C18 (30 x 4,6 mm Phenomenex Luna, tamaño de partícula 3 µm), elución con A: agua + ácido fórmico al 0,1%; B: metanol + ácido fórmico al 0,1%. Gradiente:

Gradiente-tiempo	caudal ml/min	% de A	% de B
0,00	2,0	95	5
0,50	2,0	95	5
4,50	2,0	5	95
5,50	2,0	5	95
6,00	2,0	95	5

Detección - MS, ELS, UV (200 µl dividido para fuente de ESI con detección DAD Waters 996 en línea)

ES 2 399 908 T3

Procedimiento de ionización de MS - electronebulización (ion positivo y negativo)

Procedimiento de LC-MS 2

Waters Micromass ZMD con una columna de fase inversa C18 (30 x 4,6 mm Phenomenex Luna, tamaño de partícula 3 µm), elución con A: agua + ácido fórmico al 0,1%; B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%. Gradiente:

Gradiente-tiempo	caudal ml/min	% de A	% de B
0,00	2,0	95	5
0,50	2,0	95	5
4,50	2,0	5	95
5,50	2,0	5	95
6,00	2,0	95	5

5 Detección - MS, ELS, UV

Procedimiento de ionización de MS - electronebulización (ion positivo y negativo)

Procedimiento de LC-MS 3

Waters Quattro Micro con una columna C18 LC (100 x 3,0 mm Higgins Clipseus, tamaño de partícula 5 µm), elución con A: agua + ácido fórmico al 0,1%; B: metanol + ácido fórmico al 0,1%. Gradiente:

Gradiente-tiempo	caudal ml/min	% de A	% de B
0,00	1,0	85	15
1,00	1,0	85	15
13,00	1,0	5	95
20,00	1,0	5	95
22,00	1,0	85	15
25,00	1,0	85	15

10 Detección - MS, ELS, UV (100 µl dividido para MS con detector de UV en línea)

Procedimiento de ionización de MS - electronebulización (ion positivo y negativo)

Procedimiento de LC-MS 4

Waters Micromass ZQ2000 con una columna de fase inversa C18 (100 x 2,1 mm Acquity BEH con un tamaño de partícula de 1,7 µm) mantenida a 40 °C, elución con A: agua + ácido fórmico al 0,1%; B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%. Gradiente:

15

Gradiente-tiempo	caudal ml/min	% de A	% de B
0,00	0,4	95	5

0,40	0,4	95	5
6,00	0,4	5	95
6,80	0,4	5	95
7,00	0,4	95	5
8,00	0,4	95	5

Detección - MS, UV PDA

Procedimiento de ionización de MS - electronebulización (ion positivo/negativo)

Procedimientos de LC quiral

Procedimiento de LC quiral 1 (analítico)

- 5 CHIRALPAK® IC 5 μm - 250 x 4,6 mm eluyendo con n-heptano al 10%, EtOH al 90%, dietilamina al 0,1%. Caudal = 0,7 ml/min. Detección UV a 250 nm.

Procedimiento de LC quiral 2 (preparativo)

CHIRALPAK® IC 20 μm - 250 x 76 mm eluyendo con n-heptano al 30%, EtOH al 70%, dietilamina al 0,1%. Caudal = 270 ml/min. Detección UV a 330 nm.

- 10 *Procedimiento de LC quiral 3 (analítico)*

CHIRALPAK® IA 5 μm - 250 x 4,6 mm eluyendo con IPA al 20%, n-heptano al 80%, TFA al 0,1%. Caudal = 1 ml/min. Detección UV a 254 nm.

Determinación del punto de fusión

Los puntos de fusión se determinaron utilizando un aparato Buchi B540.

- 15 Rotación óptica

Se obtuvieron los valores de $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ en un polarímetro automático Optical Activity Ltd AA-10R utilizando una célula de 25 mm y una bombilla de sodio como fuente. Las muestras se ensayaron en metanol aproximadamente al 1% en p/v. Las mediciones se tomaron por duplicado.

Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

- 20 Las mediciones de DSC se realizaron en un Mettler Toledo DSC823e equipado con un robot de muestras Mettler Toledo TS0801 RO y un carrusel de muestras automático. Las muestras se prepararon en bandejas de aluminio de 40 μl , las tapas de las muestras fueron perforadas de modo automático por el robot, y el análisis se realizó entre 30 °C y 250 °C a 10 °C/min. Generalmente, se utilizaron 1-3 mg para el análisis, y el experimento se realizó bajo nitrógeno seco purgado a 50 mlmin⁻¹. El instrumento se calibró para la energía y la temperatura utilizando indio certificado.
- 25

Difractómetros de polvo de rayos X (XRPD)

Sistema 1

- 30 Los datos se recogieron utilizando un difractómetro Siemens D5000 utilizando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro θ - θ , divergencia de V20 y ranuras receptoras, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. Se comprobó la actuación del instrumento utilizando un patrón Corundum certificado (NIST 1976). El programa informático utilizado para la recogida de datos fue Diffrac Plus XRD Commander v2.3.1, y los datos se

analizaron y se presentaron utilizando Diffrac *Plus* EVA v11.0.0.3. Las muestras se ensayaron en condiciones ambientales como especímenes de placa plana utilizando polvo como receptor. La muestra se cargó con cuidado en una cavidad excavada en una oblea de silicio pulida de fondo cero (510). La muestra se rotó en su propio plano durante el análisis. Los datos se recogieron entre 2 a 42 °2 θ , utilizando un tamaño de etapa de 0,05 °2 θ , y un tiempo de recogida de 4 s.etapa¹.

Sistema 2

Los datos se recogieron utilizando un difractómetro Bruker D8 utilizando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro θ -2 θ , con un detector Lynxeye equipado con un monocromador Ge. Se comprobó la actuación del instrumento utilizando un patrón Corundum certificado (NIST 1976). El programa informático utilizado para la recogida de datos fue Diffrac *Plus* XRD Commander v2.5.0, y los datos se analizaron y se presentaron utilizando Diffrac *Plus* EVA v11.0.0.2 o v13.0.0.2. Las muestras se ensayaron en condiciones ambientales como especímenes de placa plana utilizando polvo como receptor. Los datos se recogieron entre 2 a 42 °2 θ , utilizando un tamaño de etapa de 0,05 °2 θ , y un tiempo de recogida de 0,5 s.etapa¹.

Sorción dinámica de vapores (DVS)

El análisis de DVS se realizó en un analizador de sorción de humedad intrínseca-DVS de Surface Measurement Systems (SMS). El instrumento se controló mediante el programa informático SMS Analysis Suite (DVS-Intrinsic Control v1.0.0.30). El análisis de los datos se realizó utilizando Microsoft Excel 2007 junto con DVS Standard Analysis Suite (v6.0.0.7). La temperatura de la muestra se mantuvo a 25 °C, y se obtuvo la humedad de la muestra mezclando corrientes de nitrógeno húmedo y seco a un caudal total de 200 mlmin⁻¹. La humedad relativa se midió utilizando una sonda Rotronic calibrada (intervalo dinámico 1-100% de humedad relativa (HR)) colocada cerca de la muestra. El cambio de peso de la muestra como función de la proporción de HR se controló constantemente con la microbáscula (precisión $\pm$ 0,005 mg). Entonces se colocaron 20 mg de la muestra en un cesto de malla de acero inoxidable tarado bajo condiciones ambientales. La muestra se cargó y se descargó a 40% de HR y 25 °C (condiciones ambientales típicas), y la muestra se sometió a un régimen de DVS graduado a través de 2 ciclos utilizando los parámetros mostrados en la tabla 1. Se calculó una isoterma de DVS a partir de estos datos.

Tabla 1: Parámetros del procedimiento para el experimento de DVS

Parámetro	Ajuste
Sorción - ciclo 1 (% de HR)	40-90
Desorción - ciclo 1 (% de HR)	90-0
Sorción - ciclo 2 (% de HR)	0-90
Desorción - ciclo 2 (% de HR)	90-0
Sorción - ciclo 3 (% de HR)	0-40
Intervalos (% de HR)	10
dmdt (%min ⁻¹)	0,002
Temperatura de la muestra (°C)	25

Rayos X de monocristales

El análisis de rayos X de monocristales se realizó en un sistema de ánodos en rotación Bruker-Nonius FR591 equipado con una cámara Bruker-Nonius Roper CCD utilizando rayos X a 0,71073 angstroms de MoK utilizando un monocromador de grafito. Los datos se recogieron a una temperatura de -153,15 °C (120 °K). Los datos se recogieron con COLLECT (Hoof, R.W.W, 1998), el refinamiento de células con DENZO (Otwinowski y Minor,

1997) y COLLECT (Hoof, R.W.W., 1998), la estructura de la disolución y el refinamiento con SHELX (Sheldrick, 2008).

Espectrómetros de RMN

- 5 Las RMN se realizaron en un espectrómetro Varian Unity Inova 400 MHz o en un espectrómetro Bruker Avance DRX 400 MHz.

Abreviaturas que se emplean en la siguiente sección experimental:

DCM = diclorometano

DIPEA = diisopropiletilamina

- 10 DMF = *N,N*-dimetilformamida

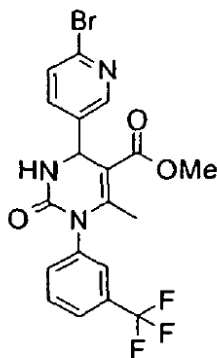
TA = temperatura ambiente

Tr = tiempo de retención

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

- 15 **Intermedio 1**

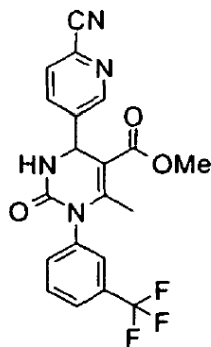


- 20 Se añadió 2-bromopiridin-5-carboxaldehído (170,0 g, 913 mmol), (3-trifluorometilfenil)urea (185 g, 906 mmol) y acetoacetato de metilo (106 g, 913 mmol) a una suspensión en agitación de ácido polifosfórico (500 g) en THF seco (1500 ml) y la reacción se agitó a reflujo durante 5 horas. La disolución se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió sobre agua (2,5 l). El producto se extrajo en acetato de etilo, y la capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo. Las capas orgánicas reunidas se lavaron con agua, después con salmuera, y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó para producir una goma naranja que se disolvió en un volumen mínimo de éter dietílico y se dejó cristalizar. El producto es un sólido blanco.

Rendimiento: 283,3 g (66%)

LC-MS (Procedimiento 1): Tr = 3,83 min, m/z = 470/472 [M+H]⁺

- 25 **Intermedio 2**

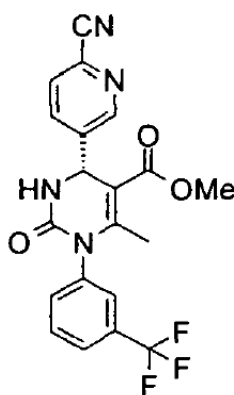


- 5 Un matraz de tres bocas se cargó con el intermedio 1 (128,0 g, 271 mmol), yoduro cuproso (58,2 g, 310 mmol) y DMF (1250 ml). La mezcla de reacción se calentó con agitación hasta que la temperatura interna de la reacción alcanzó 50 °C. Entonces se añadió cianohidrina acetona (45 ml, 178 mmol) y DIPEA (83,7 ml, 178 mmol) y se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta 150 °C y se agitó durante 6 horas. La disolución se enfrió hasta la temperatura ambiente y se diluyó con DCM (2,5 l). La disolución se lavó con agua (x 3) y salmuera (x 1), después se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de una filtración y de la eliminación del disolvente a un vacío elevado, el material bruto se purificó mediante una cromatografía de resolución rápida sobre gel de sílice (malla 230-400), eluyendo con éter dietílico para producir el producto del título como un sólido blanco.

Rendimiento = 74,2 g (65%)

- 10 LC-MS (Procedimiento 1): Tr = 4,06 min, m/z = 417 [M+H]⁺

Intermedio 3a, (R)-enantiómero



Procedimiento 1

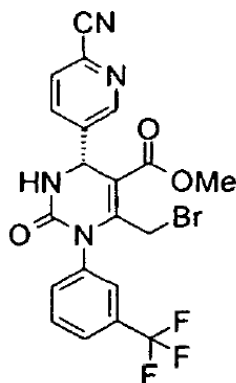
- El intermedio 2 (53,1 g) se separó en dos enantiómeros utilizando el procedimiento de LC quiral 2.
Se obtuvo el intermedio 3a, (R)-enantiómero [la estereoquímica se determinó mediante cristalografía de rayos X del producto de la bromación (intermedio 4)]:
15 Recuperación = 26,0 g (49%)
HPLC (Procedimiento de LC quiral 1): 5,8 min (>98,6% e.e.)
Rotación óptica -12,8°
También se recuperó el intermedio 3b, (S)-enantiómero:
20 Recuperación = 23,8 g (45%)
HPLC (Procedimiento de LC quiral 1): 10,0 min (>99,5% e.e.)
Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} +10,6^\circ$

Procedimiento 2

- 25 El intermedio 9 (140 mg, 0,32 mmol) se disolvió en DCM (1,5 ml) y se añadió DMF (0,05 ml, catalítico), seguido de oxidloruro de fósforo (0,3 ml, 3,2 mmol). La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 días, después se extinguió con agua y el producto se extrajo en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, después con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se retiró mediante filtración y la disolución se evaporó hasta la sequedad produciendo una espuma marrón. Esta se purificó con un cartucho RediSep® Si utilizando acetato de etilo al 50-100%/pentano como eluyente. Las fracciones apropiadas se reunieron para proporcionar el producto requerido como una espuma pálida.
30 Rendimiento: 19 mg (14%)
LC-MS (Procedimiento 1): Tr = 4,04 min, m/z = 417,29 [M+H]⁺

Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} -10,0^\circ$. Se confirmó que la estereoquímica era (R) mediante comparación con el intermedio 3a preparado mediante el procedimiento 1.

Intermedio 4



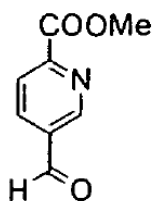
5 Una disolución de bromo (41,6 g, 260 mmol) en cloroformo (200 ml) se añadió gota a gota a lo largo de 30 min a una disolución agitada del intermedio 3a (104 g, 250 mmol) en cloroformo (1 l) que contenía carbonato de potasio sólido (74,0 g, 530 mmol). Después de agitar durante 1 h, la suspensión se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida para dejar una espuma de color amarillo pálido. Esta se disolvió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se diluyó con éter dietílico. El producto cristalizó como un sólido blanco que se retiró mediante filtración, se lavó con acetato de etilo al 10%/éter dietílico, y se secó al vacío.

10 Rendimiento = 54 g (44%). Un segunda recolección aumentó el rendimiento hasta 85%.

LC-MS (Procedimiento 2): Tr = 4,19 min, m/z = 495/497 $[M+H]^+$

Se confirmó que la estereoquímica era (R) mediante cristalografía de rayos X de monocristales con un grupo espaciador P1 triclinico, un factor R de 0,0518, GOF 1,038, parámetro de Flack 0,042 (d.e. $\pm 0,007$) y parámetro de Hooft 0,083 (d.e. $\pm 0,007$).

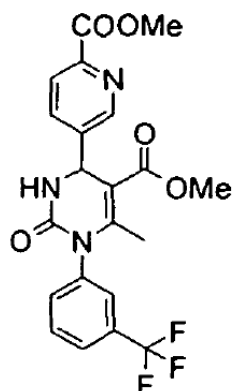
15 Intermedio 5



20 Se disolvió 2-bromopiridin-5-carboxaldehído (1,86 g, 100 mmol) en una mezcla de metanol (10 ml) y DMF (10 ml) y se añadió trietilamina (2,75 ml, 20 mmol). A esta disolución se le añadió acetato de paladio(II) (56 mg, 0,25 mmol) y 1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno (0,28 g, 0,5 mmol). La mezcla se desgasificó mediante burbujeo a través de monóxido de carbono gaseoso y después se mantuvo bajo una atmósfera de monóxido de carbono a presión atmosférica utilizando un balón. La mezcla se calentó a 55 °C durante 48 horas, después se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). La fase orgánica se lavó con agua (x 2) y salmuera, y después se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se retiró mediante filtración y la disolución se evaporó hasta la sequedad para producir un sólido oscuro. Este se purificó mediante una cromatografía en un cartucho RediSep® Si utilizando acetato de etilo al 0-40% en DCM como eluyente. Las fracciones apropiadas se reunieron para proporcionar el producto requerido como un sólido de color rosa pálido.

Rendimiento = 750 mg (45%)

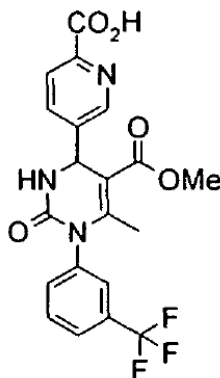
RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 4,06 (s, 3H), 8,32 (m, 2H), 9,20 (m, 1H), 10,22 (s, 1H).

Intermedio 6

A una disolución de ácido polifosfórico (2,9 g) en THF (20 ml) se le añadió el intermedio 5 (0,85 g, 5,15 mmol), (3-trifluorometilfenil)urea (1,05 g, 5,15 mmol) y acetoacetato de metilo (0,60 g, 5,15 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 horas, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se separó y se lavó con agua, después con salmuera, y por último se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se retiró mediante filtración y el filtrado se evaporó hasta la sequedad para proporcionar una espuma de color amarillo pálido. La purificación se logró mediante una cromatografía en un cartucho RediSep® Si utilizando acetato de etilo como eluyente. Las fracciones apropiadas se reunieron para proporcionar el producto requerido como una espuma incolora.

Rendimiento = 1,2 g (53%)

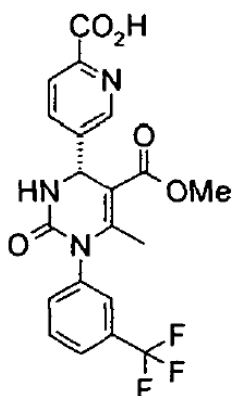
LC-MS (Procedimiento 1): Tr = 4,02 min, m/z = 450,35 [M+H]⁺

Intermedio 7

A una disolución del intermedio 6 (1,2 g, 2,67 mmol) en THF (30 ml) se le añadió una disolución de hidróxido de sodio 1 M (3,0 ml, 3,0 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se redujo a la mitad del volumen y se añadió una disolución de ácido clorhídrico 1 M (12 ml). La disolución se extrajo con DCM (3 x 50 ml) y los extractos reunidos se lavaron con agua, después con salmuera y por último se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se retiró mediante filtración y el filtrado se evaporó hasta la sequedad para producir una espuma incolora.

Rendimiento = 1,11 g (95%)

LC-MS (Procedimiento 1): Tr = 3,90 min, m/z = 436,33 [M+H]⁺

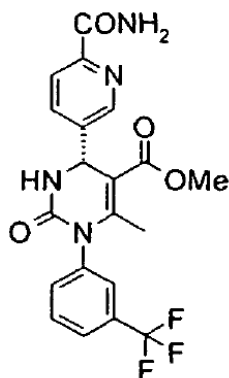
Intermedio 8

El intermedio 7 (1,1 g, 2,52 mmol) y (+)-cinchonina (740 mg, 2,52 mmol) se disolvieron en etanol caliente (6,5 ml). Se dejó que la disolución se enfriase hasta la temperatura ambiente durante la noche y el sólido cristalino se retiró mediante filtración (0,78 g, 84% del teórico). Esta sal se suspendió en HCl 1 N (20 ml) y se extrajo en acetato de etilo (3 x 20 ml). Los extractos reunidos se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron para producir una espuma blanca.

Rendimiento = 370 mg (67%)

HPLC (Procedimiento de LC quiral 3): Tr = 24,5 min. Esto se corresponde con el enantiómero que eluyó en segundo lugar cuando se compara con la mezcla racémica (Tr = 15 min y 24,5 min).

Se confirmó la estereoquímica mediante la conversión en el intermedio 3a a través del intermedio 9.

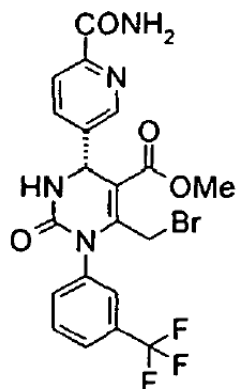
Intermedio 9

El intermedio 8 (0,92 g, 2,11 mmol) se disolvió en THF (10 ml) y se añadió 1,1-carbonildiimidazol (0,69 g, 4,22 mmol). Esta disolución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, después se añadió una disolución de amoníaco acuoso al 33% (10 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min más. Después de esto se añadió agua (25 ml) y el producto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua (x 2), después con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se retiró mediante filtración y la disolución se evaporó hasta la sequedad para producir una espuma incolora.

Rendimiento = 0,84 g (93%)

LC-MS (Procedimiento 2): Tr = 3,90 min, m/z = 435 [M+H]⁺

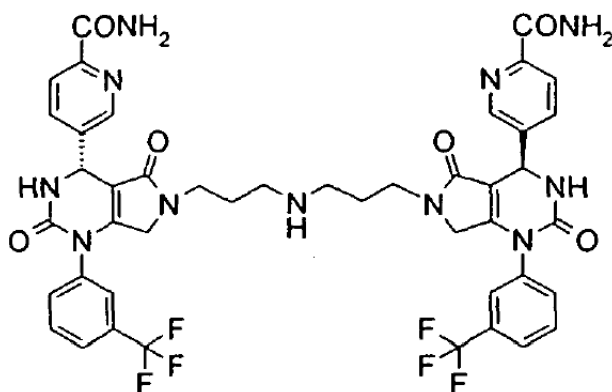
Se confirmó la estereoquímica mediante la conversión en el intermedio 3a.

**Intermedio 10**

5 El intermedio 9 (0,84 g, 1,93 mmol) se disolvió en cloroformo. Se añadió una disolución de bromo (0,48 g, 3,48 mmol) en cloroformo (2 ml) a la suspensión en agitación a lo largo de 10 min, y después se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se retiró mediante evaporación a presión reducida y el residuo se repartió entre acetato de etilo y una disolución de carbonato de potasio acuosa al 10%. La fase orgánica se lavó con agua, después con salmuera, y por último se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se retiró mediante filtración y el filtrado se evaporó hasta la sequedad.

Rendimiento = 0,93 g (94%)

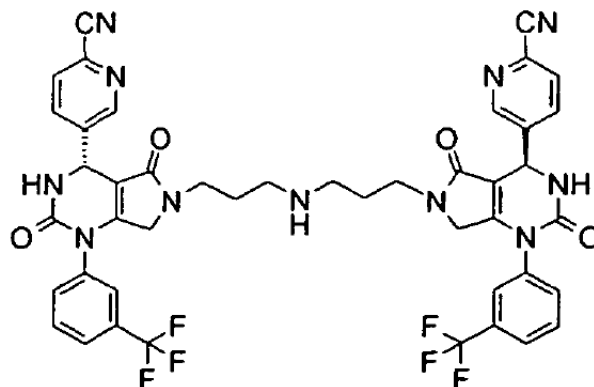
LC-MS (Procedimiento 2): Tr = 3,61 min, m/z = 513/515 [M+H]⁺

10 **Intermedio 11**

15 El intermedio 10 (0,93 g, 1,81 mmol) se disolvió en THF (15 ml) y se añadió trietilamina (1,0 ml, 7,24 mmol), seguido de bis-(3-aminopropil)amina (0,25 ml, 1,81 mmol). La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas, después se retiró el disolvente y el residuo se purificó mediante una cromatografía utilizando un cartucho RediSep® Si y amoniaco 2 M al 0-15% en metanol/DCM como eluyente. Las fracciones apropiadas se reunieron para proporcionar el producto requerido como una espuma pálida.

Rendimiento = 420 mg (50%)

LC-MS (Procedimiento 2): Tr = 2,30 min, m/z = 932,34 [M+H]⁺

Compuesto (IA) y sales 1-5**Procedimiento 1**

A una disolución del intermedio 4 (54,0 g, 109 mmol) en THF (650 ml) se le añadió trietilamina (43,7 ml, 436 mmol) y la disolución se agitó a 25 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se disolvió bis-(3-aminopropil)amina (14,3 g, 2,28 ml, 109 mmol) en THF (50 ml) y se añadió a la disolución en una porción. La mezcla después se agitó a 25 °C durante 22 horas. La disolución de reacción se redujo en volumen hasta aproximadamente 150 ml y se repartió entre acetato de etilo (1 l) y agua (500 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se reextrajo con acetato de etilo (200 ml). Las capas orgánicas reunidas se lavaron con agua (500 ml) y salmuera (500 ml) y después se secaron sobre sulfato de sodio. La disolución se filtró y el filtrado se evaporó hasta la sequedad para producir 53,0 g de una espuma de color pálido. La espuma se disolvió en MeOH al 10%/EtOAc (500 ml) y se añadió una disolución de ácido 4-toluensulfónico monohidrato (11,0 g, 58 mmol) en MeOH al 10%/EtOAc (50 ml). La disolución transparente se agitó durante 2 horas, durante las cuales la sal tosilato (sal 1) precipitó como un sólido cristalino incoloro. Este entonces se retiró mediante filtración, se lavó muy bien con MeOH al 10%/EtOAc y se secó a 3 mbar a 45 °C.

Rendimiento = 37,35 g (64%)

La sal (15 g) recrystalizó en MeOH y el producto cristalino blanco se retiró mediante filtración, se lavó con un poco de MeOH frío y se secó al vacío a 45 °C.

Recuperación = 10 g

p.f. = 188-190 °C

LC-MS (Procedimiento 3): Tr = 7,46 min, m/z = 896,39 [M+H]⁺, y Tr = 3,26, m/z = 171,10 [TsO]

RMN de ¹H (400 MHz, d₆-DMSO) δ = 1,59 (m, 4H), 2,96 (s, 3H), 2,65 (m, 4H), 3,09-3,27 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,55 (d, 2H), 7,06 (m, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,65-7,80 (m, 6H), 7,92 (s a, 2H), 7,96-8,09 (m, 4H), 8,13 (dd, 2H), 8,20 (d, 2H), 8,84 (d, 2H).

Rotación óptica [α]_D²⁵ -58,3°

Se confirmó la estereoquímica como (R,R) mediante la estructura cristalina de rayos X del intermedio 4.

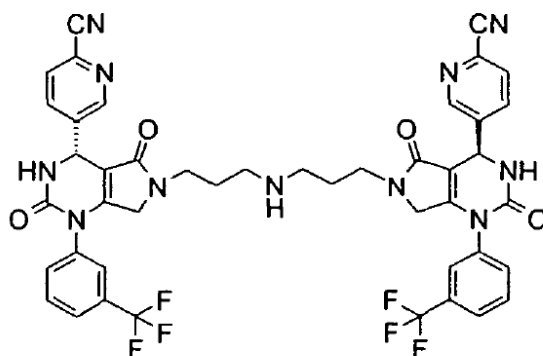
Higroscopicidad

Desorción (cambio en la masa (%)) - ref. a 35 °C y HR al 80%) = 3,6

Análisis de DSC - Una única endoterma de fusión que aparece a aproximadamente 185 °C

5 XRPD (sistema 1) - Los ocho picos principales (definidos como los que tienen las mayores intensidades relativas) del patrón de difracción de XRPD que caracterizan a la sal 4-metilbencensulfonato cristalina del compuesto IA son, en grados 2 θ : entre 6,15 y 6,25; entre 18,59 y 18,69; entre 17,59 y 17,69; entre 12,30 y 12,40; entre 16,70 y 16,80; entre 24,90 y 25,00; entre 21,67 y 21,77; y entre 13,55 y 13,65. En esta evaluación, los picos fueron (en grados 2 θ) 6,20, 18,64, 17,64, 12,35, 16,75, 24,95, 21,72, y 13,60.

Procedimiento 2



10 El intermedio 11 (420 mg, 0,45 mmol) se disolvió en DMF (6 ml) y la disolución se enfrió hasta 0,5 °C en un baño de hielo. Se añadió oxiclورو de fósforo (0,2 ml, 2,14 mmol) gota a gota y la disolución se dejó en agitación a 0,5 °C durante 15 min. La disolución después se vertió en una mezcla de hielo y agua y se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente. El pH se ajustó a 8-9 con una disolución de carbonato de potasio diluida y el producto sólido se retiró mediante filtración, se lavó muy bien con agua y se secó al vacío.

Rendimiento = 185 mg (46%)

LC-MS (Procedimiento 2): Tr = 2,51 min, m/z = 896,53 [M+H]⁺

15 El producto de esta reacción (185 mg) se disolvió en metanol al 10%/acetato de etilo (2 ml) y se añadió ácido 4-toluensulfónico (40 mg, 1,02 equivalentes). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante la noche y la sal precipitada se retiró mediante filtración, se lavó con un poco de metanol al 10%/acetato de etilo, y se secó al vacío a 50 °C.

Rendimiento = 95 mg (44%)

LC-MS (Procedimiento 4): Tr = 3,56 min, m/z = 896,35

20 Rotación óptica [α]_D²⁵ -53,3°

Se confirmó la estereoquímica como (*R,R*) mediante comparación con el compuesto IA preparado mediante el procedimiento 1.

Sales 2 - 5

25 A una disolución/suspensión del ácido (1,1 equivalentes) en el disolvente (0,5 ml) se le añadió una disolución del compuesto IA (100 mg, 0,11 mmol) en el mismo disolvente (1 ml) con agitación. Las mezclas se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. La sal se filtró, se lavó con una pequeña cantidad de disolvente frío, y se secó al vacío.

Sal	Ácido	Disolvente	Higroscopicidad*
2	sulfúrico	MeOH	7,8
3	bencensulfónico	THF	5,6

4	2,5-dihidroxibenzoico	THF	3,7
5	fumárico	MeCN	3,0
* Desorción (cambio en la masa (%)) - ref. a HR al 80%			

Sal 2

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 1,59 (m, 4H), 2,65 (m, 4H), 3,09-3,27 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,55 (d, 2H), 7,65-7,80 (m, 6H), 7,92 (s a, 2H), 7,96-8,09 (m, 4H), 8,13 (dd, 2H), 8,20 (d, 2H), 8,84 (d, 2H).

5 DSC - No se funde antes de la descomposición a aproximadamente 240 °C.

10 XRPD (sistema 2) - Los ocho picos principales (definidos como los que tienen las mayores intensidades relativas) del patrón de difracción de XRPD que caracterizan a la sal bisulfato cristalina del compuesto IA son, en grados 2 θ : entre 6,38 y 6,48; entre 17,78 y 17,88; entre 13,95 y 14,05; entre 19,36 y 19,46; entre 17,29 y 17,39; entre 12,81 y 12,91; entre 20,18 y 20,28; y entre 22,03 y 22,13. En esta evaluación, los picos fueron (en grados 2 θ) 6,43, 17,83, 14,00, 19,41, 17,34, 12,86, 20,23 y 22,08.

Sal 3

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 1,59 (m, 4H), 2,65 (m, 4H), 3,09-3,27 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,55 (d, 2H), 7,23-7,30 (m, 3H), 7,52-7,57 (m, 2H), 7,65-7,80 (m, 6H), 7,92 (s a, 2H), 7,96-8,09 (m, 4H), 8,13 (dd, 2H), 8,20 (d, 2H), 8,84 (d, 2H).

15 DSC - Una única endoterma de fusión que aparece a aproximadamente 160 °C

20 XRPD (sistema 2) - Los ocho picos principales (definidos como los que tienen las mayores intensidades relativas) del patrón de difracción de XRPD que caracterizan a la sal bencensulfonato cristalina del compuesto IA son, en grados 2 θ : entre 6,23 y 6,33; entre 17,63 y 17,73; entre 21,65 y 21,75; entre 17,01 y 17,11; y entre 18,94 y 19,04; entre 22,10 y 22,20; entre 19,59 y 19,69; y entre 25,20 y 25,30. En esta evaluación, los picos fueron (en grados 2 θ) 6,28, 17,68, 21,70, 17,06, 18,99, 22,15, 19,64 y 25,25.

Sal 4

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 1,59 (m, 4H), 2,65 (m, 4H), 3,09-3,27 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,55 (d, 2H), 6,43 (d, 1H), 6,59 (dd, 1H), 7,09 (d, 1H), 7,65-7,80 (m, 6H), 7,92 (s a, 2H), 7,96-8,09 (m, 4H), 8,13 (dd, 2H), 8,20 (d, 2H), 8,84 (d, 2H).

25 DSC - Una única endoterma de fusión que aparece a aproximadamente 178 °C

30 XRPD (sistema 2) - Los ocho picos principales (definidos como los que tienen las mayores intensidades relativas) del patrón de difracción de XRPD que caracterizan a la sal 2,5-dihidroxibenzoato cristalina del compuesto IA son, en grados 2 θ : entre 22,70 y 22,80; entre 11,26 y 11,36; entre 16,46 y 16,56; entre 21,74 y 21,84; entre 23,16 y 23,26; entre 18,63 y 18,73; entre 16,96 y 17,06; y entre 20,64 y 20,74. En esta evaluación, los picos fueron (en grados 2 θ) 22,75, 11,31, 16,51, 21,79, 23,21, 18,68, 17,01, 20,69.

Sal 5

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 1,59 (m, 4H), 2,65 (m, 4H), 3,09-3,27 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,55 (d, 2H), 6,42 (s, 2H), 7,65-7,80 (m, 6H), 7,92 (s a, 2H), 7,96-8,09 (m, 4H), 8,13 (dd, 2H), 8,20 (d, 2H), 8,84 (d, 2H).

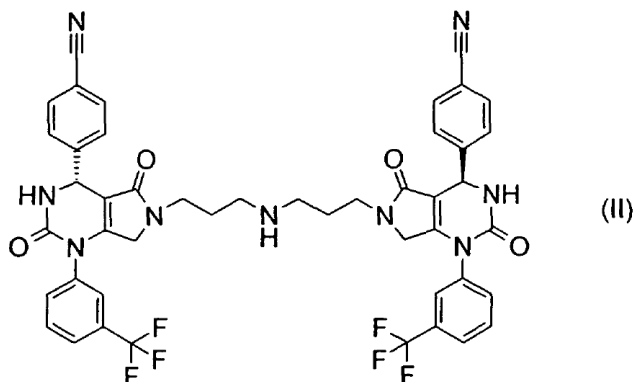
DSC - Una única/doble endoterma de fusión que aparece a aproximadamente 176 °C

35 XRPD (sistema 2) - Los ocho picos principales (definidos como los que tienen las mayores intensidades relativas) del patrón de difracción de XRPD que caracterizan a la sal fumarato cristalina del compuesto IA son, en grados 2 θ : entre 23,68 y 23,78; entre 22,51 y 22,61; entre 5,76 y 5,86; entre 11,75 y 11,85; entre 10,10 y 10,20; entre 20,32 y

20,42; entre 21,17 y 21,27; y entre 24,64 y 24,74. En esta evaluación, los picos fueron (en grados 2 θ) 23,73, 22,56, 5,81, 11,80, 10,15, 20,37, 21,22, 24,69.

B. Ensayos biológicos

El compuesto del ejemplo 18 del documento WO 2007/129060 tiene la fórmula estructural (II).



- 5 El compuesto (II) se diferencia de la estructura del compuesto (I) de la invención en que en (II) están presentes anillos de fenilo sustituidos con ciano, mientras que en (I) están presentes anillo de piridilo sustituidos con ciano.

El compuesto (II) se preparó como en el ejemplo 18 del documento WO 2007/129060 y se ensayó junto con el compuesto (IA) de la invención en los siguientes ensayos. Ambos compuestos se ensayaron como la base libre.

Ensayos de inhibición enzimática

10 *Utilización de un sustrato peptídico fluorescente*

- Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos a un volumen de ensayo total de 100 μ l. La concentración final de la enzima (elastasa de leucocitos humana, Sigma E8140) fue de 0,00036 unidades/pocillo. Se empleó un sustrato peptídico (MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-ValAMC, Calbiochem n° 324745), a una concentración final de 100 μ M. La concentración final de DMSO fue del 1% en el tampón de ensayo (Tris.HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 0,1 M, CaCl₂ 0,1 M, Brij-35 al 0,0005%).

- La reacción enzimática comenzó mediante la adición de la enzima. La reacción enzimática se realizó a temperatura ambiente y después de 30 min se detuvo mediante la adición de 50 μ l de inhibidor de tripsina de soja (Sigma T-9003) a una concentración final de 50 μ g/pocillo. La fluorescencia se leyó en una estación FLEXstation (Molecular Devices) utilizando unos filtros de excitación de 380 nm y de emisión de 460 nm. La potencia de los compuestos se determinó a partir de una serie de concentración de 10 concentraciones en el intervalo de 1000 nM a 0,051 nM. Los resultados son la media de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.

Los resultados son la media de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.

Las CI_{50} de los compuestos (IA) y (II) en el anterior ensayo fueron de 8,4 nM y 2,1 nM, respectivamente.

Hemorragia pulmonar inducida por HNE en la rata

- 25 La instilación de elastasa de neutrófilos humana (HNE) en el pulmón de rata provoca lesiones pulmonares agudas. El grado de esta lesión puede evaluarse midiendo la hemorragia pulmonar.

Las ratas Sprague-Dawley macho (175-220 g) se obtuvieron en Harlan UK Ltd., fueron criadas totalmente en barrera y se certificó que estaban exentas de microorganismos especificados en el momento de su recepción. Los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento (7-12 animales por grupo).

- 30 El vehículo utilizado fue DMSO al 1%/disolución salina. Los inhibidores se disolvieron en DMSO al 1% antes de la adición de disolución salina al 0,9%.

Los animales en cada estudio se utilizaron para determinar la eficacia de los inhibidores de elastasa administrados de modo local al pulmón mediante una diversidad de vías. Las ratas se anestesiaron con el anestésico inhalado isoflurano (al 4%) cuando la dosis se administra de 30 minutos a 6 horas antes de la administración de la elastasa de neutrófilos humana (HNE) o se anestesiaron hacia el final con Hypnorm:Hynpovel:agua (1,5:1:2 a 2,7 mg/kg) cuando la predosis se administra menos de 30 minutos antes de la administración de HNE y se dosifica por vía intratraqueal (i.t.) mediante administración transoral utilizando un micropulverizador Penn Century, o por vía intranasal (i.n.) echando gotas del fluido en las fosas nasales. Los animales recibieron vehículo o compuesto a un volumen de dosis de 0,5 ml/kg.

Los animales que se había dejado que se recuperasen después de la dosificación se anestesiaron hacia el final con Hypnorm:Hynpovel:agua (1,5:1:2 a 2,7 mg/kg). Cuando estaban suficientemente anestesiados se administró HNE (600 unidades/ml) o disolución salina estéril mediante instilación traqueal transoral a un volumen de 100 µl utilizando un micropulverizador Penn Century. Los animales se mantuvieron calientes en una caja de temperatura controlada y se les administraron más dosis de anestesia según fueron necesarias para asegurar una anestesia continua hasta la terminación.

Los animales se sacrificaron (de 0,5 ml a 1 ml de pentobarbitona sodio) una hora después de la exposición a HNE. La traquea se expuso y se realizó una incisión pequeña entre dos anillos traqueales para poder insertar una cánula (calibre 10, D.O. 2-10 mm, Portex Ltd.) aproximadamente 2 cm hacia el interior de la tráquea en dirección al pulmón. Esta se mantuvo en su sitio con una ligadura de algodón. Después los pulmones se lavaron (BAL) tres veces con partes alícuotas frescas de 4 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) heparinizada (10 unidades/ml). El BALF resultante se mantuvo en hielo hasta que se centrifugó.

El BALF se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga enfriada entre 4 °C y 10 °C. El sobrenadante se rechazó y el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de CETAB al 0,1%/PBS para lisar las células. Los lisados celulares se congelaron hasta que pudo realizarse el análisis espectrofotométrico para el contenido en sangre. Se prepararon patrones fabricando disoluciones de sangre de rata completa en CETAB al 0,1%/PBS.

Después de descongelar, se colocaron 100 µl de cada suspensión celular lisada en un pocillo distinto de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Todas las muestras se ensayaron por duplicado y se incluyeron 100 µl de CETAB al 0,1%/PBS en la placa como blanco. La DO de los contenidos de cada pocillo se midió a 415 nm utilizando un Spectramax 250 (Molecular Devices).

Se construyó una curva patrón midiendo la DO (a 415 nm) de diferentes concentraciones de sangre en CETAB al 0,1%/PBS (30, 10, 7, 3, 1, 0,3, 0,1 µl/ml).

La cantidad de sangre en cada muestra experimental se calculó mediante comparación con la curva patrón. Los datos después se analizaron como se indica a continuación:

1) Se calculó la media de la DO para los duplicados.

2) Se restó el valor para el blanco del valor para el resto de las muestras.

3) Los datos se evaluaron para determinar la normalidad de la distribución.

Los compuestos (IA) y (II) mostraron una reducción estadísticamente significativa en la hemorragia del 95% y 88%, respectivamente, con relación al control cuando se administran a 100 µg/kg i.t., 6 horas antes de HNE.

Comparación de las semividas en el pulmón del compuesto de la invención y el compuesto del ejemplo 18 del documento WO 2007/129060

Ensayo de PK

Se formuló el material de ensayo a 20 µg/ml en Tween 80 al 0,2% en disolución salina. Las disoluciones se sonicaron y se calentaron en un baño de agua a 40 °C antes de la dosificación. Las ratas Sprague-Dawley macho recibieron una única administración intratraqueal del material de ensayo a través de una aguja de dosificación Penn-Century al nivel de dosis nominal de 10 µg/kg. Después de la dosificación, cinco ratas de cada grupo se anestesiaron hacia el final con pentobarbitona sodio a las 1, 2, 4, 8, 24, 72 y 96 horas para el compuesto (IA) (base libre), y a las 1, 4, 8, 24, 72, 96, 168, 264 y 336 para el compuesto (II) (base libre) después de la dosis. Se

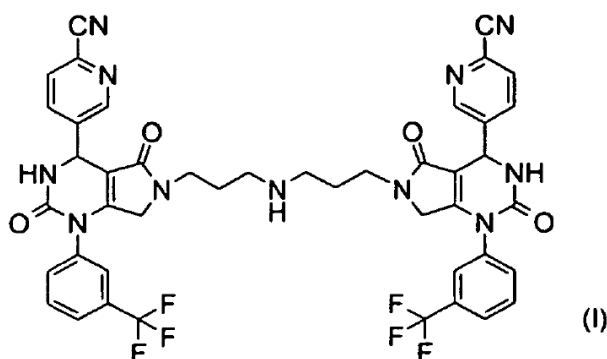
5 tomaron muestras de sangre de la vena de la cola, tras lo cual se abrió el pecho, el animal se exanguinó mediante perfusión, y los pulmones se retiraron y se congelaron en el acto. Después de recoger las muestras de sangre, estas se centrifugaron (10000 x g, 2 min a 4 °C). Se retiró el plasma y ambos se conservaron congelados a -20 °C. Los pulmones de rata se homogeneizaron en agua (sobre hielo) para proporcionar una proporción de 1 parte de pulmón:2 partes de agua (en p/v). Se extrajo una parte alícuota de 100 µl de cada homogeneizado mediante la adición de 200 µl de acetonitrilo que contenía un patrón interno analítico. Después de un mezclado en vórtice y una centrifugación (10000 x g, 5 min a 4 °C), una parte alícuota de 100 µl del sobrenadante se reunió con 50 µl de agua en un vial de LC de volumen pequeño. Las muestras se mezclaron a fondo y se ensayaron para los compuestos de ensayo mediante LC-MS-MS frente a una serie de patrones de curva de calibración con la misma matriz, preparados sembrando homogeneizado de pulmón de rata control y extrayendo partes alícuotas de 1000 µl utilizando el procedimiento descrito para las anteriores muestras.

15 El material de ensayo se analizó en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (AB Sciex API 3000) equipado con una bomba de LC y un automuestrador (Reliance). El material de ensayo se detectó en el modo de ion positivo Turbo Ion Spray. La separación analítica del material de ensayo se realizó en una columna analítica de 5 µm C18 de fase inversa (Higgins, Clipeus, 50 x 3 mm) utilizando una fase móvil de ácido fórmico al 0,5%, agua y acetonitrilo a un caudal de 1 ml/min. Las condiciones iniciales consistieron en ácido fórmico al 0,5% en agua al 90%, acetonitrilo al 10%, que se mantuvieron durante 1 minuto antes de iniciar un gradiente lineal. El contenido en agua de la fase móvil disminuyó hasta 10% a lo largo de 2 minutos, con un aumento concomitante en acetonitrilo. Las condiciones finales se mantuvieron durante 1 minuto más antes de volver a las condiciones iniciales.

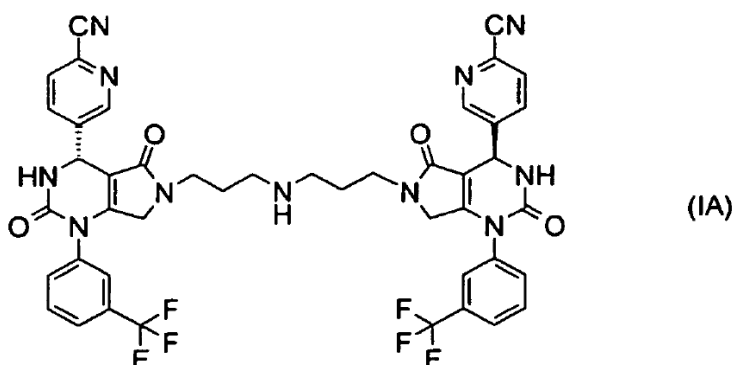
20 El $t_{1/2}$ en pulmón final observado del compuesto (IA) de la invención fue de 37 horas, con un intervalo de confianza de 31-46 h. Este es significativamente más corto que el compuesto de comparación del ejemplo 18 del documento WO 2007/129060, que tiene un $t_{1/2}$ en pulmón final de 94 horas, con un intervalo de confianza de 85-140 h.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable:



2.- Un compuesto según la reivindicación 1, en el que la estereoconfiguración R-R, mostrada en la fórmula (IA), predomina frente a la configuración R-S y/o S-S:



3.- Una composición farmacéutica, adaptada para la administración a los pulmones mediante inhalación, que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

4.- Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento mediante inhalación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la bronquitis crónica, la fibrosis pulmonar, la neumonía, el síndrome de insuficiencia respiratoria agudo (ARDS), el enfisema pulmonar, el enfisema inducido por tabaquismo o la fibrosis quística.

5.- El uso de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para la fabricación de una composición inhalable para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la bronquitis crónica, la fibrosis pulmonar, la neumonía, el síndrome de insuficiencia respiratoria agudo (ARDS), el enfisema pulmonar, el enfisema inducido por tabaquismo o la fibrosis quística.