

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 183**

51 Int. Cl.:

**C07D 413/14** (2006.01)

**A61K 31/5377** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 08795304 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2190841**

54 Título: **Derivados de oxazolidinonas sustituidas**

30 Prioridad:

**14.08.2007 US 964693 P**

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

**11.10.2013**

73 Titular/es:

**CONCERT PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)  
99 HAYDEN AVENUE, SUITE 500  
LEXINGTON, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**MASSE, CRAIG, E.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 425 183 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

Derivados de oxazolidinonas sustituidas

**Solicitud relacionada**

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos nº 60/964.693, presentada el 14 de agosto de 2007. La totalidad de las enseñanzas de la aplicación anterior se han incorporado por referencia en el presente documento.

**Antecedente de la invención**

10 Rivaroxaban, también conocido también como 5-cloro-N-[2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il)fenil]oxazolidin-5(S)-ilmetil]tiofeno-2-carboxamida, actúa por inhibición de la forma activa del factor de coagulación Xa y se ha descrito en el documento DE 10 2005 047 564.

Rivaroxaban es objeto en la actualidad de ensayos clínicos para embolia pulmonar, ictus, tromboembolia, trombosis venosa profunda, trombosis, y síndrome coronario agudo (<http://clinicaltrials.gov/>).

15 Rivaroxaban se convierte in vivo en dos metabolitos principales, CYP3A4, el producto mediado de la oxidación del anillo de morfolinona (M1), y el producto de la hidrólisis de la clorotiofenilamida y posterior conjugación con glicina (M4). Ninguno de los metabolitos es activo. (Weinz, C y col., Drug Metab Rev, 2004, 36 (supl. 1): 98).

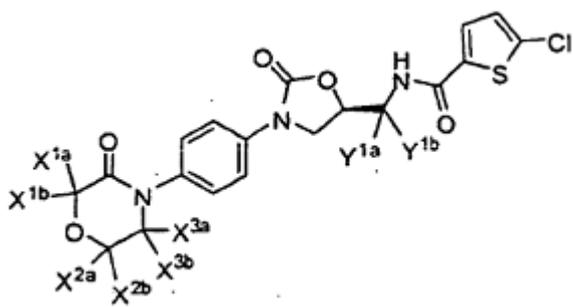
Los acontecimientos adversos asociados con el uso de rivaroxaban incluyen, pero no se limitan a, ageusia (pérdida del gusto), equimosis (aparición de hematomas) y dolor de cabeza (Kubitza, D y col., CI Pharmacol Therapeutics, 2005, 78(4): 412-421).

20 A pesar de las actividades beneficiosas del rivaroxaban, existe una necesidad continuada de compuestos nuevos para tratar las enfermedades y dolencias anteriormente citadas.

**Resumen de la invención**

25 La presente invención se refiere a compuestos novedosos que son derivados de oxalidinonas sustituidas y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos novedosos de oxalidinonas que son derivados de rivaroxaban. La invención también proporciona composiciones exentas de pirógenos que comprenden uno o más compuestos de la invención y un vehículo, y el uso de los compuestos y composiciones divulgados en procedimientos para tratar enfermedades y dolencias que se traten de forma beneficiosa administrando un inhibidor selectivo del factor Xa, tal como el rivaroxaban.

Los compuestos de la invención se han representado mediante la Fórmula I:



30 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:  
 $X^{1a}$ ,  $X^{1b}$ ,  $X^{2a}$ ,  $X^{2b}$ ,  $X^{3a}$ , y  $X^{3b}$  son simultáneamente deuterio y cada uno de  $Y^{1a}$  e  $Y^{1b}$  se han seleccionado independientemente entre hidrógeno y deuterio.

35 Los compuestos, sus sales farmacéuticamente aceptables y las composiciones de la invención, son útiles para tratar enfermedades que se traten de una forma eficaz mediante un compuesto que inhiba el factor de coagulación Xa, tal como el rivaroxaban. Así, la presente invención incluye los compuestos para su uso en el tratamiento de una enfermedad que sea susceptible al tratamiento mediante un compuesto que inhiba el factor de coagulación Xa, tal como rivaroxaban, que comprende administrar a un paciente necesitado del mismo una cantidad eficaz de: (i) un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o (ii) una composición exenta de pirógenos (por ejemplo, una composición farmacéutica), descrita en el presente documento.

40 Las enfermedades y dolencias susceptibles al tratamiento mediante un compuesto que inhiba el factor de coagulación Xa, tal como el rivaroxaban, incluyen, pero no se limitan a, embolia pulmonar, ictus, tromboembolia, trombosis venosa profunda, trombosis, síndrome coronario agudo, trastornos de coagulación, microangiopatía y

trastornos asociados tales como púrpura trombocitopénica.

Los compuestos y composiciones de la invención también son útiles como reactivos en procedimientos para determinar la concentración de rivaroxaban en solución, examinar el metabolismo del rivaroxaban y otros estudios analíticos. Una utilidad adicional de cualquiera de las fórmulas del presente documento incluye su uso como patrones internos para determinar las concentraciones verdaderas de rivaroxaban en matrices biológicas, tales como plasma.

### **Descripción detallada de la invención**

Los términos "mejorar" y "tratar" se utilizan de forma indistinta e incluyen tanto el tratamiento terapéutico como el tratamiento profiláctico (reducción de la posibilidad de desarrollo). Ambos términos significan disminuir, suprimir, atenuar, disminuir, detener, o estabilizar el desarrollo o la evolución de una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad o trastorno detallado en el presente documento), disminuir la gravedad de una enfermedad o mejorar los síntomas asociados a la enfermedad.

"Enfermedad" significa cualquier dolencia o trastorno que dañe o interfiera con el funcionamiento normal de una célula, tejido, u órgano.

Se reconocerá que se produce alguna variación en la abundancia isotópica natural en un compuesto sintético dependiendo del origen de los materiales químicos usados en la síntesis. De esta manera, una preparación de rivaroxaban contendrá inherentemente pequeñas cantidades de isotopólogos deuterados. La concentración de los isótopos estables del hidrógeno y el carbono naturalmente estables, entendiendo esta variación, es pequeña y sin importancia en comparación con el grado de sustitución isotópica estable de los compuestos de la presente invención. Consúltese, por ejemplo, Wada E y col., Seikagaku 1994, 66:15; Ganes LZ y col., Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol 1998, 119:725. En un compuesto de la presente invención, cuando se designa que una posición concreta contiene deuterio, se entiende que la abundancia de deuterio en dicha posición es sustancialmente mayor que la abundancia natural de deuterio, que es del 0,015 %. Una posición designada como que contiene deuterio tiene de forma típica un factor de enriquecimiento isotópico mínimo de al menos 3340 (incorporación de deuterio del 50,1 %) en cada átomo designado como deuterio en dicho compuesto.

El término "factor de enriquecimiento isotópico", tal como se utiliza en el presente documento, significa la relación entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo especificado.

En otras realizaciones, un compuesto de la presente invención tiene un factor de enriquecimiento isotópico para cada átomo de deuterio designado de al menos 3500 (incorporación de deuterio del 52,5 % en cada átomo de deuterio designado), al menos 4000 (incorporación de deuterio del 60 %), al menos 4500 (incorporación de deuterio del 67,5 %), al menos 5000 (75 % de deuterio), al menos 5500 (incorporación de deuterio del 82,5 %), al menos 6000 (incorporación de deuterio del 90 %), al menos 6333,3 (incorporación de deuterio del 95 %), al menos 6466,7 (incorporación de deuterio del 97 %), al menos 6600 (incorporación de deuterio del 99 %), o al menos 6633,3 (incorporación de deuterio del 99,5 %).

En los compuestos de la presente invención cualquier átomo no designado específicamente como un isótopo particular se entiende que representan cualquier isótopo estable de dicho átomo. Salvo que se indique de otra forma, cuando una posición se designa específicamente como "H" o "hidrógeno", se entiende que la posición tiene un hidrógeno en su composición isotópica natural. Análogamente, salvo que se indique de otra forma, cuando una posición se designa específicamente como "D" o "deuterio", se entiende que la posición tiene deuterio a una abundancia que es al menos 3340 veces mayor que la abundancia natural del deuterio, que es del 0,015 % (es decir, una incorporación de deuterio de al menos el 50,1 %).

El término "isotopólogo" se refiere a una especie que se diferencia de un compuesto específico de la presente invención solamente en su composición isotópica.

El término "compuesto", cuando hace referencia a los compuestos de la invención, se refiere a una colección de moléculas que tienen una estructura química idéntica, excepto en que puede existir variación isotópica entre los átomos constituyentes de las moléculas. De esta manera, será evidente para el experto en la técnica que un compuesto representado por una estructura química particular que contiene los átomos de deuterio indicados, contendrá también menos cantidades de isotopólogos que tengan átomos de hidrógeno en una o más de las posiciones designadas de deuterio en dicha estructura. La cantidad relativa de dichos isotopólogos en un compuesto de la presente invención dependerá de numerosos factores entre los que se incluyen la pureza isotópica de los reactivos deuterados utilizados para preparar el compuesto y la eficacia de incorporación de deuterio en las diferentes etapas de síntesis utilizadas para preparar el compuesto. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, la cantidad relativa de dichos isotopólogos será inferior al 49,9 % del compuesto. El término "compuesto", tal como se usa en el presente documento, también está previsto que incluya cualesquiera sales, solvatos o hidratos del mismo.

Una sal de un compuesto de la presente invención se forma entre un ácido y un grupo básico del compuesto, tal como un grupo funcional amino, o una base y un grupo ácido del compuesto, tal como un grupo funcional carboxilo.

De acuerdo con otra realización, es compuesto es una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un componente que es, según el criterio médico establecido, adecuado para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y otros mamíferos sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y está en consonancia con una relación beneficio/riesgo razonable. Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal no tóxica que, tras su administración a un receptor, sea capaz de proporcionar, de forma tanto directa como indirecta, un compuesto de la presente invención. Un "contraión farmacéuticamente aceptable" es una parte iónica de una sal que no es tóxica cuando se libera desde la sal tras su administración a un receptor.

Los ácidos habitualmente utilizados para formar sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como el bisulfuro de hidrógeno, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, así como ácidos orgánicos tales como el ácido para-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido bitartárico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido besílico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido glucourónico, ácido fórmico, ácido glutámico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido para-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico y ácido acético, así como ácidos orgánicos e inorgánicos relacionados. Por tanto, dichas sales farmacéuticamente aceptables incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caprato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, 1,4-dioato de butino, 1,6-dioato de hexino, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, tereftalato, sulfonato, xileno sulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato,  $\mu$ -hidroxibutirato, glicolato, maleato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y otras sales. En una realización, las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico, y especialmente las formadas con ácidos orgánicos tales como ácido maleico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "hidrato" significa un compuesto que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

Tal como se usa en el presente documento, el término "solvato" significa un compuesto que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente tal como agua, acetona, etanol, metanol, diclorometano, 2-propanol, o similares, unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

Los compuestos de la presente invención (por ejemplo, los compuestos de Fórmula I), pueden contener un átomo de carbono asimétrico, por ejemplo, como resultado de la sustitución por deuterio o por otra cosa. De este modo, los compuestos de la presente invención pueden existir bien como enantiómeros individuales, o mezclas de los dos enantiómeros. De acuerdo con ello, un compuesto de la presente invención puede existir bien como una mezcla racémica o una mezcla no racémica, o bien en forma de los respectivos estereoisómeros individuales que están prácticamente exentos de cualquier otro posible estereoisómero. El término "prácticamente exentos de cualquier otro posible estereoisómero" tal como se utiliza en el presente documento significa que está presente menos del 25 % de otros estereoisómeros, preferentemente menos del 10 % de otros estereoisómeros, más preferentemente menos del 5 % de otros estereoisómeros y con más preferencia menos del 2 % de otros estereoisómeros, o menos del "X" % de otros estereoisómeros (en donde X es un número entre 0 y 100, inclusive). Los procedimientos para obtener o sintetizar un enantiómero individual de un compuesto dado son conocidos en la técnica y se pueden aplicar según sea adecuado a los compuestos finales o a los materiales de partida o a los compuestos intermedios.

Salvo que se indique de otra forma, cuando un compuesto divulgado se nombra o se representa gráficamente por una estructura sin especificar la estereoquímica y tiene uno o más centros quirales, se entiende que representa todos los posibles estereoisómeros del compuesto.

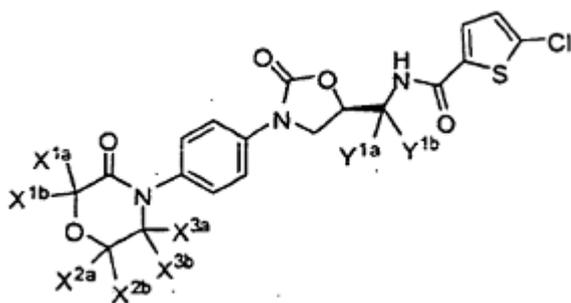
El término "compuestos estables", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que tienen estabilidad suficiente para permitir su fabricación y que mantienen la integridad del compuesto durante un periodo de tiempo suficiente para que sea útil para los fines detallados en el presente documento (por ejemplo, la formulación en productos terapéuticos, compuestos intermedios para uso en la producción de compuestos terapéuticos, compuestos intermedios aislables o que se pueden almacenar, para tratar una enfermedad o dolencia que responde a los agentes terapéuticos).

"D" se refiere a deuterio. "Estereoisómero" se refiere tanto a enantiómeros como a diastereómeros. Cada uno de "terc", "t", y "t-" se refieren a terciario. "US" se refiere a los Estados Unidos de América.

En toda esta memoria descriptiva, una variable se puede citar de manera general (por ejemplo, "cada R") o bien se puede citar de forma específica (por ejemplo, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, etc.). Salvo que se indique de otra forma, cuando una variable se cita de manera general, se entiende que incluye todas las realizaciones específicas de dicha variable particular.

**Compuestos terapéuticos**

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



I

- 5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:  
 $X^{1a}$ ,  $X^{1b}$ ,  $X^{2a}$ ,  $X^{2b}$ ,  $X^{3a}$  y  $X^{3b}$  son simultáneamente deuterio y cada uno de  $Y^{1a}$  e  $Y^{1b}$  se han seleccionado independientemente entre hidrógeno y deuterio.

La invención proporciona un compuesto en el que  $X^{1a}$ ,  $X^{1b}$ ,  $X^{2a}$ ,  $X^{2b}$ ,  $X^{3a}$  y  $X^{3b}$  son simultáneamente deuterio. En un aspecto de esta realización, cada variable Y es hidrógeno. En otro aspecto, cada variable Y es deuterio.

Los ejemplos de compuestos específicos de Fórmula I se muestran en la Tabla 1 siguiente.

10

Tabla 1: Ejemplos de compuestos de Fórmula I

Compuesto	$X^{1a}$	$X^{1b}$	$X^{2a}$	$X^{2b}$	$X^{3a}$	$X^{3b}$	$Y^{1a}$	$Y^{1b}$
100	D	D	D	D	D	D	D	D
101	D	D	D	D	D	D	H	H

En otro conjunto de realizaciones, cualquier átomo no designado como de deuterio en cualquiera de las realizaciones definidas anteriormente está presente con su abundancia isotópica natural.

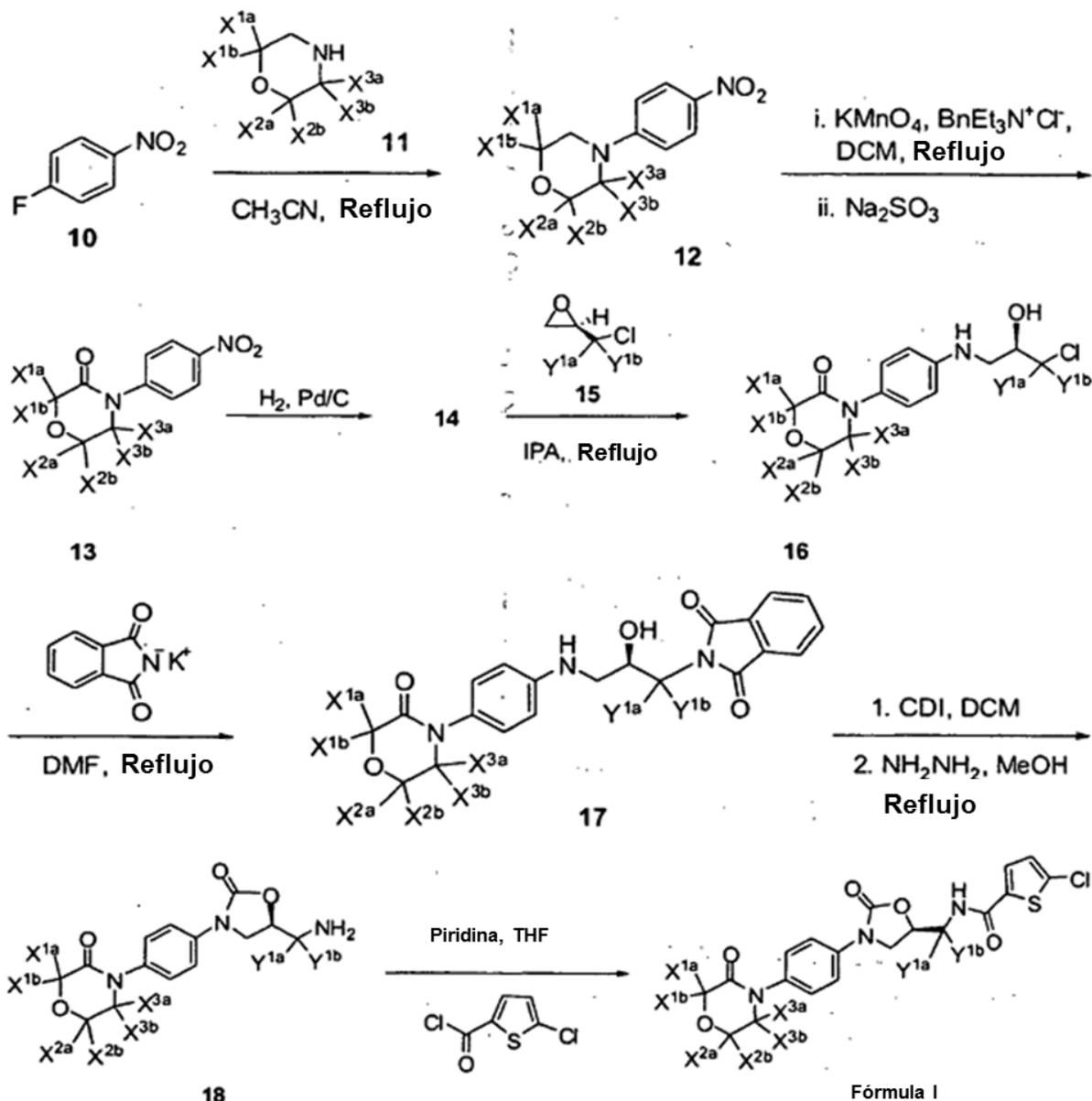
- 15 La síntesis de compuestos de Fórmula I se puede conseguir fácilmente mediante los químicos sintéticos normalmente expertos en la técnica. Se divulgan procedimientos y compuestos intermedios relevantes, por ejemplo en las publicaciones PCT WO 03/000256 y WO 2005/068456A1; la publicación de la OEP EP 1479675; y en Roehrig, S y col., J Med Chem 2005, 48:5900.

- 20 Dichos procedimientos se pueden llevar a cabo utilizando los correspondientes reactivos deuterados y, opcionalmente, reactivos que contienen otros isótopos y/o compuestos intermedios para sintetizar los compuestos detallados en el presente documento, o invocar protocolos sintéticos normalizados conocidos en la técnica para introducir átomos isotópicos en una estructura química. Algunos compuestos intermedios se pueden utilizar con o sin purificación (por ejemplo, filtración, destilación, sublimación, cristalización, trituración, extracción en fase sólida, y cromatografía).

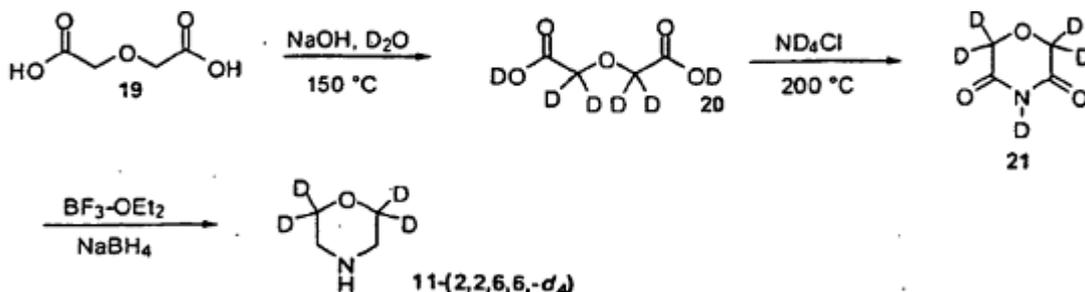
**Síntesis ilustrativas**

- 25 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los esquemas descritos a continuación.

Esquema 1. Síntesis de un compuesto de Fórmula I.

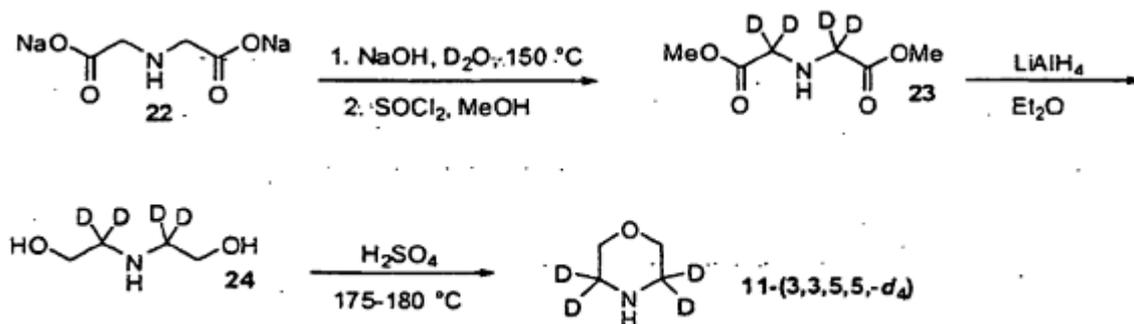


El esquema 1 anterior muestra una ruta general para preparar compuestos de Fórmula I. La morfolina comercial y la 2,2,3,3,5,5,6,6-*d*<sub>8</sub> morfolina se pueden utilizar indistintamente como el reactivo 11 para preparar el compuesto intermedio 12 1-nitro-4-morfolinobenceno a partir de 1-nitro-4-fluorobenceno (10). El reactivo 11 de predeuteromorfolina da como resultado un compuesto de Fórmula I en el que X<sup>1a</sup>, X<sup>1b</sup>, X<sup>2a</sup>, X<sup>2b</sup>, X<sup>3a</sup> y X<sup>3b</sup> son simultáneamente deuterio. Alternativamente, se pueden utilizar 2,2,6,6-*d*<sub>4</sub> morfolina o 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub> morfolina como el reactivo 11.

Esquema 2. Síntesis de 2,6,6-*d*<sub>4</sub> morfolina

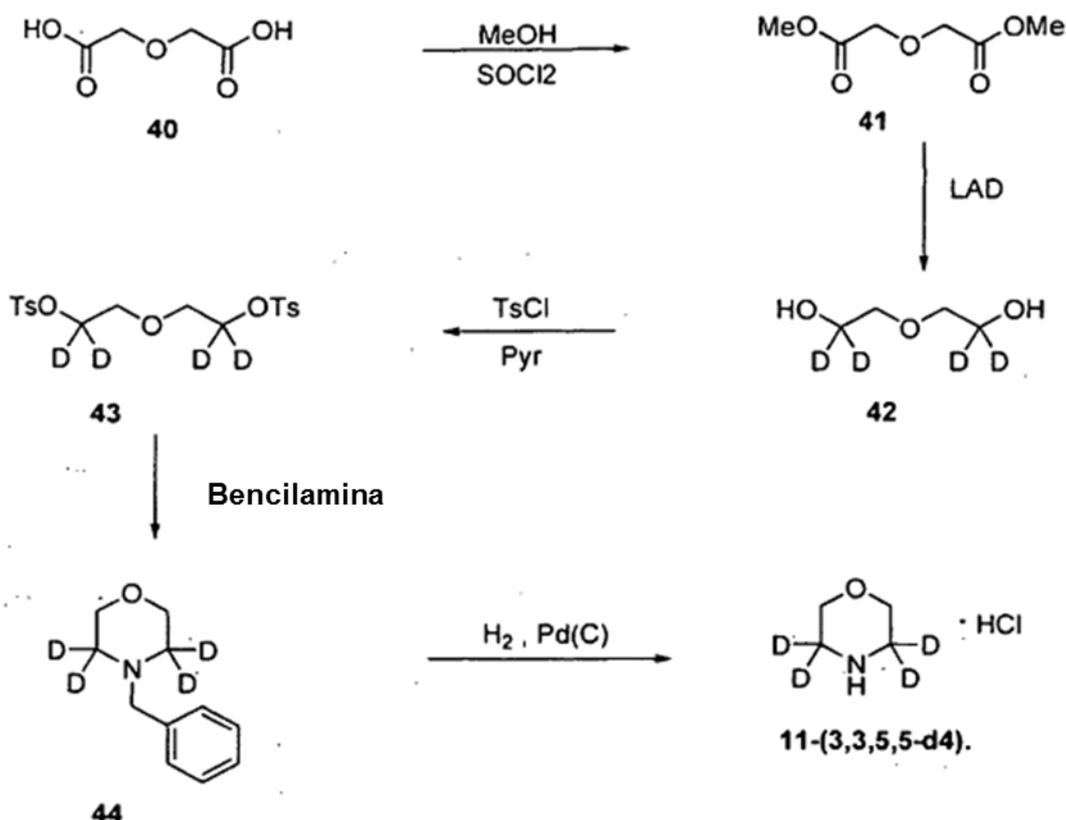
5 El esquema 2 muestra una ruta para preparar 2,6,6-*d*<sub>4</sub> morfolina 11-(2,2,6,6-*d*<sub>4</sub>). El tratamiento del ácido glicólico (19) comercialmente disponible con hidróxido de sodio en agua deuterada de acuerdo con el procedimiento descrito por Cam, PL y col., *Chemica Scripta* 1971, 1:65-68 da como resultado el glicolato 20. La condensación con cloruro de amonio-*d*<sub>4</sub> comercialmente disponible con calentamiento da como resultado la *d*<sub>5</sub> diglicolimidina 21. La reducción de la imida 21 con diborano generado in situ da como resultado 11-(2,2,6,6-*d*<sub>4</sub>). El uso de 2,2,6,6-*d*<sub>4</sub>-morfolina como reactivo 11 en el Esquema 1 proporciona un compuesto comparativo de Fórmula I en el que X<sup>1a</sup>, X<sup>1b</sup>, X<sup>2a</sup> y X<sup>2b</sup> son simultáneamente deuterio, y X<sup>3a</sup> y X<sup>3b</sup> son simultáneamente hidrógeno.

Esquema 3A. Síntesis de 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub> morfolina



10 El esquema 3 muestra una ruta para preparar 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub> morfolina 11-(3,3,5,5-*d*<sub>4</sub>). El tratamiento de iminodiacetato de disodio (22) comercialmente disponible con hidróxido de sodio en agua deuterada (D<sub>2</sub>O), seguido por el tratamiento con metanol seco y cloruro de tionilo utilizando el procedimiento descrito por Cam, PL y col., *Chemica Scripta* 1971, 1:65-68, da como resultado el dimetil éster tetradeuterado 23. La posterior reducción del diéster con hidruro de aluminio y litio da como resultado la *d*<sub>4</sub>-dietaanolamina 24. La etapa final implica una ciclación térmica catalizada por ácido para dar 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub>-morfolina 11-(3,3,5,5-*d*<sub>4</sub>). El uso de 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub>-morfolina como reactivo 11 en el Esquema 1 produce un compuesto comparativo de Fórmula I en el que X<sup>1a</sup>, X<sup>1b</sup>, X<sup>2a</sup> y X<sup>2b</sup> son simultáneamente hidrógeno, y X<sup>3a</sup> y X<sup>3b</sup> son simultáneamente deuterio.

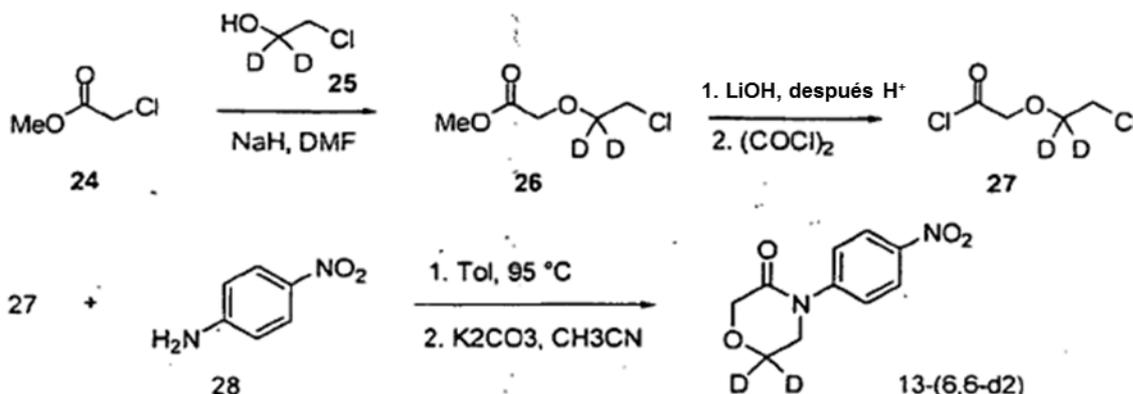
Esquema 3B. Síntesis alternativa de 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub> morfolina



En el Esquema 3B se representa una síntesis alternativa de la 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub>-morfolina. De esta manera, el ácido glicólico 40 se convierte en el correspondiente diéster 41 usando cloruro de tionilo en metano. La reducción LAD del diéster 41 proporciona 2,2'-oxidietanol 42, que se convierte en el correspondiente ditosilato 43 en condiciones convencionales mediante cloruro de tosilo y piridina. El tratamiento del ditosilato 43 con bencilamina proporciona la N-bencilmorfolina 44, que se desprotege en condiciones de hidrogenolisis para proporcionar la 3,3,5,5-*d*<sub>4</sub>-morfolina 11-(3,3,5,5-*d*<sub>4</sub>) deseada.

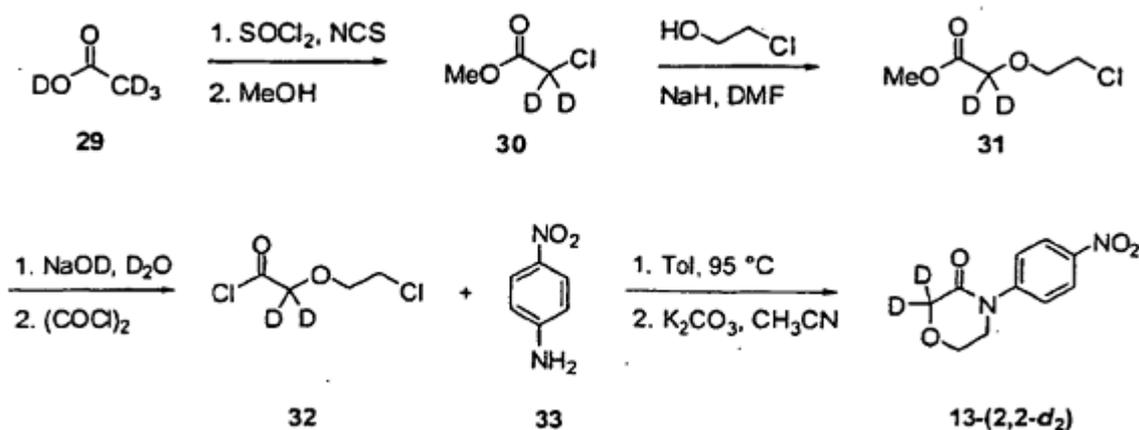
Los compuestos adicionales de Fórmula I se sintetizan utilizando rutas alternativas para preparar formas deuteradas del compuesto intermedio 13, como se muestra en los esquemas siguientes. Estos compuestos intermedios son útiles en las etapas posteriores definidas en el Esquema 1.

10 Esquema 4. Síntesis de 4-(4-nitrofenil)-6,6-*d*<sub>2</sub>-morfolin-3-ona



El Esquema 4 anterior muestra una ruta para obtener la 4-(4-nitrofenil)-6,6-*d*<sub>2</sub>-morfolin-3-ona (13). El tratamiento del cloroacetato de metilo (24) comercialmente disponible con 1,2-*d*<sub>2</sub>-cloroetanol 25 (preparado mediante el protocolo descrito por McManus, S P y col., J Org Chem 1993, 58:6466-6469) en presencia de hidruro de sodio de acuerdo con el procedimiento descrito por Maruyama, T y col., Bioorg Med Chem 2002, 10:975-988 da como resultado el éster metílico dideuterado 26. La saponificación del éster metílico 26 y la exposición del ácido resultante a cloruro de oxalilo proporcionan el cloruro de ácido correspondiente 27. La acilación de la 4-nitroanilina (28) comercialmente disponible con el cloruro de ácido 27 va seguida de la posterior ciclación a la morfolinona 13-(6,6-*d*<sub>2</sub>) tras el tratamiento con carbonato de potasio usando el procedimiento descrito por Mederski, WWKR y col., Bioorg Med Chem Lett 2004, 14:5817-5822. El uso de 4-(4-nitrofenil)-6,6-*d*<sub>2</sub>-morfolin-3-ona como reactivo 13 en el Esquema 1 produce un compuesto comparativo de Fórmula I, en el que X<sup>1a</sup>, X<sup>1b</sup>, X<sup>3a</sup> y X<sup>3b</sup> son simultáneamente hidrógeno, y X<sup>2a</sup> y X<sup>2b</sup> son simultáneamente deuterio.

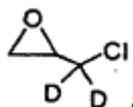
Esquema 5. Síntesis de 4-(4-nitrofenil)-2,2-*d*<sub>2</sub>-morfolin-3-ona



El Esquema 5 muestra una ruta para preparar la 4-(4-nitrofenil)-2,2-*d*<sub>2</sub>-morfolin-3-ona 13-(2,2-*d*<sub>2</sub>). El tratamiento del ácido *d*<sub>4</sub>-acético comercialmente disponible (29) con cloruro de tionilo y N-clorosuccinimida (NCS), seguido por dilución con metanol utilizando el protocolo descrito por Baldwin, JE y col., J Am Chem Soc 1992, 114:9401-9408 da como resultado el cloroacetato-2,2-*d*<sub>2</sub> de metilo 30. El tratamiento del dideutero-cloroacetato 30 con 2-cloroetanol en presencia de hidruro de sodio de acuerdo con el procedimiento descrito por Maruyama, T y col., Bioorg Med Chem 2002, 10:975-988 da como resultado el éster metílico dideuterado 31. La saponificación del éster metílico 31 con una solución de deuteróxido de sodio y la exposición del ácido resultante a cloruro de oxalilo proporciona el cloruro de

ácido correspondiente 32. La acilación de la 4-nitroanilina (33) comercialmente disponible con el cloruro de 2,2-*d*<sub>2</sub>-(2-cloroetoxi) acetilo 32 va seguida de la posterior ciclación a la morfolinona 13-(2,2-*d*<sub>2</sub>) tras el tratamiento con carbonato de potasio usando el procedimiento descrito por Mederski, WWKR y col., Bioorg Med Chem Lett 2004, 14:5817-5822. El uso de 4,(4-nitrofenil)-2,2-*d*<sub>2</sub>-morfolin-3-ona como reactivo 13 en el Esquema 1 produce un compuesto comparativo de Fórmula I, en el que X<sup>2a</sup>, X<sup>1b</sup>, X<sup>3a</sup> y X<sup>3b</sup> son simultáneamente hidrógeno, y X<sup>1a</sup> y X<sup>1b</sup> son simultáneamente deuterio.

Los compuestos de Fórmula I en los que Y<sup>1a</sup> e Y<sup>1b</sup> son simultáneamente deuterio se sintetizaron utilizando un reactivo 15



10 comercialmente disponible del Esquema 1.

No se pretende que los enfoques y compuestos específicos que se muestran anteriormente sean limitantes. Las estructuras químicas de los esquemas del presente documento representan variables que se han definido en la presente memoria de acuerdo con las definiciones de los grupos químicos (restos, átomos, etc.) de la posición correspondiente en las fórmulas de los compuestos del presente documento, ya estén identificados por el mismo nombre de la variable (es decir, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, etc.) o no. La adecuabilidad de un grupo químico en la estructura de un compuesto para usar en la síntesis de otro compuesto se encuentra comprendida en el conocimiento normal de una persona normalmente experta en la técnica. Los procedimientos adicionales para sintetizar los compuestos de Fórmula I y sus precursores sintéticos, incluyendo aquellos cuyas rutas se han mostrado explícitamente en los esquemas del presente documento, se encuentran entre los conocimientos de los químicos normalmente expertos en la técnica. Los procedimientos para optimizar las condiciones de reacción y, si es necesario, minimizar los subproductos competidores, son conocidos en la técnica. Además de las referencias sintéticas citadas en el presente documento, los esquemas y protocolos de reacción se pueden determinar por el técnico experto mediante el uso de programas informáticos comerciales que permiten búsquedas de estructuras en bases de datos comercialmente disponibles, por ejemplo, SciFinder® (división CAS de la American Chemical Society), STN® (división CAS de la American Chemical Society), CrossFire Beilstein® (Elsevier MDL), o motores de búsqueda en Internet tales como Google® o bases de datos por palabra clave tales como la base de datos de textos de la oficina estadounidense de patentes y marcas.

Los procedimientos descritos en el presente documento también pueden incluir adicionalmente etapas, tanto anteriores como posteriores a las etapas específicamente descritas en el presente documento, para añadir o retirar grupos protectores adecuados para facilitar finalmente la síntesis de los compuestos del presente documento. Además, varias etapas sintéticas se pueden llevar a cabo en una secuencia u orden alternativo para dar los compuestos deseados. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles para sintetizar los compuestos de la solicitud son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos en Larock R, Comprehensive. Organic Transformations, VCH Publishers (1989); Greene TW y col., Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>a</sup> Ed., John Wiley and Sons (1999); Fieser L y col., Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y Paquette L, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) y ediciones posteriores de los mismos.

Las combinaciones de sustituyentes y variables previstas por la presente invención son únicamente las que dan como resultado la formación de compuestos estables.

#### 40 COMPOSICIONES

La invención también proporciona composiciones exentas de pirógenos que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I (por ejemplo, incluyendo cualquiera de las formulas del presente documento), o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto; y un vehículo aceptable. Preferentemente, una composición de la presente invención se formula para uso farmacéutico ("una composición farmacéutica"), en la que el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo o vehículos son "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el resto de ingredientes de la formulación y, en el caso de un vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, no ser perjudiciales para el receptor de la misma en una cantidad utilizada en el medicamento.

Los vehículos, adyuvantes y portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tal como albúmina sérica humana, sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de aceites grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sódico, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Si es necesario, la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención en las composiciones farmacéuticas se puede potenciar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Un procedimiento incluye el uso de excipientes líquidos en la formulación. Consulte "Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)," David J. Hauss, ed. Informa Healthcare, 2007; y "Role of Lipid Excipients in Modifying Oral and Parenteral Drug Delivery: Basic Principles and Biological Examples," Kishor M. Wasan, ed. Wiley-Interscience, 2006.

Otro procedimiento conocido para mejorar la biodisponibilidad es el uso de una forma amorfa de un compuesto de la presente invención formulado de manera opcional con un poloxámero, tal como LUTROL™ y PLURONIC™ (BASF Corporation), o copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno. Consulte la patente de los Estados Unidos 7.014.866, y las publicaciones de patentes estadounidenses 20060094744 y 20060079502.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen las adecuadas para administración por vía oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). En algunas realizaciones, el compuesto de las fórmulas del presente documento se administran por vía transdérmica (por ejemplo, mediante el uso de parches transdérmicos o técnicas iontoforéticas). Otras formulaciones se pueden presentar convenientemente como formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, comprimidos, cápsulas de liberación continua, y en liposomas, y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica farmacéutica. Consulte, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA (17ª ed. 1985).

Dichos procedimientos preparativos incluyen la etapa de asociar la molécula a administrar a ingredientes tales como el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. Por lo general, las composiciones se preparan asociando de forma uniforme y estrecha los principios activos con vehículos líquidos, liposomas o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y a continuación, si es necesario, conformar el producto.

En algunas realizaciones, los compuestos se administran por vía oral. Las composiciones de la presente invención adecuadas para su administración por vía oral se pueden presentar en unidades discretas tales como cápsulas, sobrecillos, o comprimidos, conteniendo cada uno de ellos una cantidad predeterminada del principio activo; un polvo o gránulos; una solución o suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso; una emulsión líquida de aceite-en-agua; una emulsión líquida de agua-en-aceite; empaquetada en liposomas; o en forma de bolo, etc. Las cápsulas de gelatina blanda pueden ser útiles para contener suspensiones, que aumentan de forma beneficiosa la tasa de absorción del compuesto.

En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se utilizan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio, de forma típica. Para administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir algunos agentes endulzantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

Las composiciones adecuadas para la administración oral incluyen comprimidos masticables que comprenden los ingredientes con una base aromatizada, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles para inyección acuosas y no acuosas que pueden comprender antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que convierten la formulación en isotónica con respecto a la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales precintados, y se pueden almacenar en forma criodesecada (liofilizada) que solamente requiera la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones improvisadas para inyección a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

Dichas soluciones para inyección pueden estar en la forma, por ejemplo, de una suspensión inyectable estéril acuosa u oleaginosas. La suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica mediante el uso de agentes dispersantes o hidratantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes suspensores. La preparación estéril inyectable puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles, se utilizan de forma convencional como medio disolvente o de suspensión. Con este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo fácil de digerir incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus glicéridos derivados son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva y aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxi-etilenadas. Estas soluciones o suspensiones oleosas pueden también contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en forma de supositorios para administración por vía rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de la presente invención con un excipiente adecuado no irritante que sea sólido a temperatura ambiente pero que sea líquido a temperatura rectal y por tanto se funda en el recto para liberar los principios activos. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.
- 10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en forma de aerosol o inhalación nasal. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión. Consulte, por ejemplo: Rabinowitz JD y Zaffaroni AC, la patente de los Estados Unidos 6.803.031, asignada a Alexza Molecular Delivery Corporation.
- 15 La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de la presente invención es especialmente útil cuando el tratamiento deseado afecta áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica. Para aplicar a la piel por vía tópica, la composición farmacéutica se debería formular con una pomada adecuada que contiene los principios activos suspendidos o disueltos en un vehículo. Los vehículos para la administración tópica de los compuestos de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera para emulsión, y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica se puede formular con una loción o crema adecuada que contiene el principio activo suspendido o disuelto en un vehículo. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polysorbate 60, ésteres de cetilo de cera, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico, y agua. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden aplicar de forma típica al tracto intestinal inferior mediante una formulación para supositorio rectal o en una formulación adecuada para enema. Los parches transdérmicos de aplicación tópica e iontoforética también se incluyen en la presente invención.
- 20
- 25 La aplicación del compuesto terapéutico al paciente puede ser local, de forma que se pueda administrar en el punto de interés. Se pueden utilizar diferentes técnicas para proporcionar al paciente las composiciones en el punto de interés, tales como la inyección, el uso de catéteres, trócares, proyectiles, gel plurónico, endoprótesis, polímeros de liberación sostenida de fármacos u otros dispositivos que permitan el acceso interno.
- 30 De esta manera, de acuerdo con otra realización más, los compuestos de la presente invención se pueden incorporar a composición para revestir un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, prótesis endovasculares, o catéteres. Los revestimientos adecuados y la preparación general de dispositivos implantables recubiertos son conocidos en la técnica y se han ilustrado en las Patentes de los Estados Unidos 6.099.562; 5.886.026; y 5.304.121. Los revestimientos son de forma típica materiales poliméricos biocompatibles tales como un polímero de hidrogel, polimetilidisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, poli(ácido láctico), etileno acetato de vinilo, y mezclas de los mismos. Los revestimientos pueden estar adicionalmente recubiertos de manera opcional con una capa protectora de fluorosilicano, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos para transmitir características de liberación controlada a la composición. Los revestimientos para dispositivos invasivos se deben incluir en la definición de vehículo, adyuvante y portador farmacéuticamente aceptable, ya que dichos términos se utilizan en el presente documento.
- 35
- 40 De acuerdo con otra realización, la invención proporciona un procedimiento para revestir un dispositivo médico implantable que comprende la etapa de poner en contacto dicho dispositivo con la composición de revestimiento anteriormente descrita. Será evidente para los expertos en la técnica que el revestimiento del dispositivo se producirá antes de su implante en un mamífero.
- 45 De acuerdo con otra realización, la invención proporciona un procedimiento para impregnar un dispositivo para liberación de fármaco que comprende la etapa de poner en contacto dicho dispositivo para liberación de fármaco con un compuesto o composición de la presente invención. Los dispositivos de liberación de fármaco implantables incluyen, pero no se limitan a, cápsulas o lingotes de polímero biodegradable, cápsulas no degradables, de polímeros difusibles y obleas de polímero biodegradable.
- 50 De acuerdo con otra realización, la invención proporciona un dispositivo médico implantable revestido con un compuesto o una composición que comprende un compuesto de la presente invención, de forma que dicho compuesto sea terapéuticamente activo.
- 55 De acuerdo con otra realización, la invención proporciona un dispositivo para liberación de fármaco impregnado o que contiene un compuesto o una composición que comprende un compuesto de la presente invención, de forma que dicho compuesto se libere desde dicho dispositivo y sea terapéuticamente activo.
- 55 Cuando un órgano o tejido sea accesible porque se haya extraído del paciente, dicho órgano o tejido puede sumergirse en un medio que contiene la composición de la presente invención, se puede pintar el órgano con una composición de la presente invención, o se puede aplicar una composición de la presente invención de cualquier otra forma conveniente.

En otra realización, una composición de la presente invención comprende además un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico se puede seleccionar de cualquier compuesto o agente terapéutico conocido por tener o haber demostrado propiedades ventajosas cuando se administra con un compuesto que tiene el mismo mecanismo de acción que rivaroxaban. Dichos agentes indicados como útiles en combinación con rivaroxaban, incluyen pero no se limitan a, los descritos en los documentos WO 2003000256, y WO 2007039134.

Preferentemente, el segundo agente terapéutico es un agente útil en el tratamiento o prevención de una enfermedad o dolencia seleccionada entre embolia pulmonar, ictus, tromboembolia, trombosis venosa profunda, trombosis, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, trastornos de coagulación, y microangiopatía y trastornos asociados tales como púrpura trombocitopénica.

En una realización, el segundo agente terapéutico es aspirina.

En otra realización, la invención proporciona formas farmacéuticas independientes de un compuesto de la presente invención y uno o más de cualquiera de los agentes terapéuticos secundarios anteriormente descritos, en donde el compuesto y el segundo agente terapéutico estén asociados entre sí. La expresión "asociados entre sí" tal como se utiliza en el presente documento significa que las formas farmacéuticas independientes se han envasado juntas o se han unido entre sí de cualquier otra forma de manera que sea fácilmente evidente que las formas farmacéuticas independientes están previstas para comercializarse y administrarse juntas (con una separación entre sí inferior a 24 horas, de forma consecutiva o simultánea).

En las composiciones farmacéuticas de la invención, el compuesto de la presente invención se presenta en una cantidad eficaz. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que, cuando se administra en una pauta de dosificación adecuada, es suficiente para tratar (de forma terapéutica o profiláctica) el trastorno diana. Por ejemplo, una cantidad eficaz es suficiente para reducir o mejorar la gravedad, la duración o el progreso del trastorno que está siendo tratado, evitar el avance del trastorno que está siendo tratado, ocasionar la regresión del trastorno que está siendo tratado, o potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento.

La interrelación entre las dosis para seres humanos y animales (en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) se ha descrito en Freireich y col., (1966) Cancer Chemother. Rep 50: 219. El área de superficie corporal se puede determinar aproximadamente a partir del peso y la altura del paciente. Consulte, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y., 1970, 537.

En una realización, una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención puede estar comprendida entre aproximadamente 0,025 y 300 mg por tratamiento. En realizaciones más específicas, el intervalo es de aproximadamente 0,25 a 150 mg o de 0,5 a 60 mg o lo más específicamente de aproximadamente 2,5 a 30 mg por tratamiento. El tratamiento se administra de forma típica de aproximadamente una a dos veces por día.

Las dosis eficaces también variarán, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de las enfermedades tratadas, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, el sexo, edad y estado de salud general del paciente, uso de excipientes, la posibilidad de uso simultáneo con otros tratamientos terapéuticos tal como el uso de otros agentes y el criterio del médico a cargo del tratamiento. Por ejemplo, las guías para seleccionar una dosis eficaz se pueden determinar por referencia a la información de prescripción para rivaroxaban.

Para las composiciones farmacéuticas que comprenden un segundo agente terapéutico, la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico está comprendida entre aproximadamente el 20 % y el 100 % de la dosis normalmente utilizada en una pauta de monoterapia usando dicho agente. Preferentemente, la cantidad eficaz está comprendida entre aproximadamente el 70 % y el 100 % de la dosis de monoterapia normal. Las dosis monoterapéuticas normales de estos segundos agentes terapéuticos son bien conocidas en la técnica. Consulte, por ejemplo, Wells y col., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2ª Edición, Appleton y Lange, Stamford, Conn. (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000), cada una de dichas referencias se ha incorporado por referencia en su totalidad en el presente documento.

Se espera que algunos de los segundos agentes terapéuticos a los que se ha hecho referencia anteriormente actuarán de forma sinérgica con los compuestos de la presente invención. Si esto sucede, esto permitirá que la dosis eficaz del segundo agente terapéutico y/o el compuesto de la presente invención se reduzcan desde el necesario en la monoterapia. Esto tiene la ventaja de minimizar los efectos secundarios tóxicos del segundo agente terapéutico de un compuesto de la presente invención, con una mejora sinérgica de la eficacia, facilidad de administración o uso mejorado y/o reducción de los gastos globales de preparación de la formulación del compuesto.

## TRATAMIENTO

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I para uso en la inhibición de la actividad del factor de coagulación Xa en una célula, que comprende poner en contacto una célula con uno o más compuestos de Fórmula I del presente documento.

De acuerdo con otra realización, la invención proporciona el compuesto para usar en el tratamiento de una enfermedad que se trate de forma ventajosa con rivaroxaban en un paciente necesitado del mismo que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto o composición de la presente invención. Dichas enfermedades son bien conocidas en la técnica y se han descrito, pero sin limitación, en las siguientes patentes y aplicaciones publicadas: WO 2001047919, WO 2003000256, WO 2007042146, WO 2007039122. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, embolia pulmonar, ictus, tromboembolia, trombosis venosa profunda, trombosis, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, trastornos de coagulación, y microangiopatía y trastornos asociados tales como púrpura trombocitopénica.

En una realización particular, el compuesto de la presente invención se utiliza para tratar una enfermedad o dolencia seleccionada entre embolia pulmonar, ictus, tromboembolia, trombosis venosa profunda, trombosis, infarto de miocardio, y síndrome coronario agudo en un paciente necesitado del mismo.

Los usos detallados en el presente documento también incluyen aquellos en los que el paciente se ha identificado como en necesidad de dicho tratamiento a juicio del paciente o de un profesional sanitario y pueden ser subjetivos (por ejemplo, una opinión) u objetivos (por ejemplo, medibles por un ensayo o un procedimiento diagnóstico).

En otra realización, cualquiera de los tratamientos anteriores comprende la etapa adicional de administrar simultáneamente a dicho paciente uno o más segundos agentes terapéuticos. La selección del segundo agente terapéutico puede realizarse entre cualquier segundo agente terapéutico conocido por ser útil para administrarlo simultáneamente con rivaroxaban. La selección del segundo agente terapéutico también depende de la enfermedad o dolencia concreta a tratar. Los ejemplos del segundo agente terapéutico que se puede emplear en los procedimientos de la presente invención son los definidos anteriormente para uso con composiciones de combinación que comprenden un compuesto de la presente invención y un segundo agente terapéutico.

En particular, las terapias de combinación de la presente invención incluyen administrar simultáneamente un compuesto de Fórmula I y aspirina para el tratamiento del síndrome coronario agudo.

El término "administrar simultáneamente" tal como se usa en el presente documento significa que el segundo agente terapéutico se puede administrar junto con un compuesto de la presente invención como parte de una forma farmacéutica unitaria (tal como una composición de la presente invención que comprende un compuesto de la invención y un segundo agente terapéutico como se ha descrito anteriormente) o en formas farmacéuticas independientes múltiples. Alternativamente, el agente adicional se puede administrar antes de, consecutivamente con, o después de la administración de un compuesto de la presente invención. En dicho tratamiento de terapia de combinación, tanto los compuestos de la presente invención como el(los) segundo(s) agente(s) terapéutico(s) se administran mediante procedimientos convencionales. La administración de una composición de la presente invención, que comprende tanto un compuesto de la invención como un segundo agente terapéutico, a un paciente no impide la administración independiente del mismo agente terapéutico, cualquier otro segundo agente terapéutico o cualquier compuesto de la presente invención a dicho paciente en otro momento durante el curso del tratamiento.

Las cantidades eficaces de estos segundos agentes terapéuticos son bien conocidas del experto en la técnica y se pueden encontrar guías de dosificación en patentes y solicitudes de patente publicadas a las que se ha hecho referencia en el presente documento, así como en Wells y col., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2ª Edición, Appleton y Lange, Stamford, Conn. (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000), y otros textos médicos. Sin embargo, está correctamente incluido en el ámbito del experto en la técnica determinar el intervalo de cantidad eficaz óptima del segundo agente terapéutico.

En una realización de la invención, cuando se administra un segundo agente terapéutico al sujeto, la cantidad eficaz del compuesto de la presente invención es inferior a la cantidad eficaz que se utilizaría de no administrarse el segundo agente terapéutico. En otra realización, la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico es inferior a la cantidad eficaz que se utilizaría de no administrarse el compuesto de la presente invención. De esta forma, se pueden minimizar los efectos secundarios indeseados asociados con dosis elevadas de cualquiera de los agentes. Otras ventajas potenciales (incluyendo sin limitación pautas de dosificación mejoradas y/o reducción en el coste del fármaco) serán evidentes para los expertos en la técnica.

En otro aspecto más, la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I solo o junto con uno o más de los segundos agentes terapéuticos anteriormente descritos en la fabricación de un medicamento, tanto en una composición unitaria como en formas farmacéuticas independientes, para el tratamiento o prevención en un paciente, de una enfermedad, trastorno o síntoma definido anteriormente. Otro aspecto de la invención es un compuesto de Fórmula I para uso en el tratamiento o prevención en un paciente de una enfermedad, trastorno o síntoma de los mismos detallado en el presente documento.

## MÉTODOS Y KITS DIAGNÓSTICOS

Los compuestos y composiciones de la presente invención también son útiles como reactivos en procedimientos para determinar la concentración de rivaroxaban en solución o en una muestra biológica tal como plasma, examinar el metabolismo del rivaroxaban y otros estudios analíticos.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona un procedimiento para determinar la concentración, en una solución o en una muestra biológica, de rivaroxaban, que comprende las etapas de:

- 5 a) añadir una concentración conocida de un compuesto de Fórmula I a la solución de la muestra biológica;
- b) someter la solución o muestra biológica a un dispositivo medidor que distinga rivaroxaban de un compuesto de Fórmula I;
- 10 c) calibrar el dispositivo medidor para correlacionar la cantidad detectada del compuesto de Fórmula I con la concentración conocida del compuesto de Fórmula I añadido a la muestra biológica o solución; y
- d) medir la cantidad de rivaroxaban en la muestra biológica con dicho dispositivo medidor calibrado; y
- e) determinar la concentración de rivaroxaban en la solución de muestra usando la correlación entre la cantidad detectada y la concentración obtenida para un compuesto de Fórmula I.

Los dispositivos medidores que pueden distinguir rivaroxaban del correspondiente compuesto de Fórmula I incluyen cualquier dispositivo medidor que pueda distinguir entre dos compuestos que se diferencian entre sí simplemente por su abundancia isotópica. Los dispositivos medidores ilustrativos incluyen espectrómetros de masas, espectrómetro de RMN, o espectrómetro de IR.

- 15 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para evaluar la estabilidad metabólica de un compuesto de Fórmula I que comprende las etapas de poner en contacto el compuesto de Fórmula I con una fuente de enzima metabolizante durante un periodo de tiempo y comparar la cantidad de compuesto de Fórmula I con los productos metabólicos del compuesto de Fórmula I tras dicho período de tiempo.

- 20 En una realización relacionada, la invención proporciona un procedimiento para evaluar la estabilidad metabólica de un compuesto de Fórmula I tras la administración del compuesto de Fórmula I. Este procedimiento comprende las etapas de obtener una muestra de suero, orina o heces del paciente tras la administración del compuesto de Fórmula I al sujeto; y comparar la cantidad del compuesto de Fórmula I con los productos metabólicos del compuesto de Fórmula I en la muestra de suero, orina o heces.

- 25 La presente invención también proporciona kits para uso en el tratamiento de embolia pulmonar, ictus, tromboembolia, trombosis venosa profunda, trombosis, infarto de miocardio, y síndrome coronario agudo. Estos kits comprenden (a) una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo, en el que dicha composición farmacéutica está en un envase; y (b) instrucciones que describen un procedimiento para usar la composición farmacéutica para tratar la embolia pulmonar, ictus, tromboembolia, trombosis venosa profunda, trombosis, y síndrome coronario agudo.

- 30 El recipiente puede ser cualquier envase o cualquier otro equipo precintado o precintable que pueda contener dicha composición farmacéutica. Los ejemplos incluyen frascos, ampollas, frascos con soportes divididos o de cámaras múltiples, en donde cada división o cámara comprende una dosis única de dicha composición, un envase plegado dividido en donde cada división comprende una dosis única de dicha composición, o un dispensador que dispense dosis únicas de dicha composición. El recipiente puede tener cualquier forma o configuración convencional conocida en la técnica que esté fabricado con un material farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una caja de papel o cartoncillo, un frasco o botella de vidrio o plástico, una bolsa reprecintable (por ejemplo, para contener una "recarga" de comprimidos a colocar en un recipiente diferente), o un envase blíster para dosis individuales que se extraen del envase por presión de acuerdo con un calendario terapéutico. El recipiente empleado puede depender de la forma farmacéutica exacta implicada, por ejemplo, una caja de cartoncillo convencional no se utiliza por lo general para contener una suspensión líquida. Es factible que se puede utilizar más de un recipiente simultáneamente en un único envase para comercializar una forma farmacéutica única. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar contenidos en un frasco, que a su vez está dentro de una caja. En una realización, el recipiente es un envase blíster.

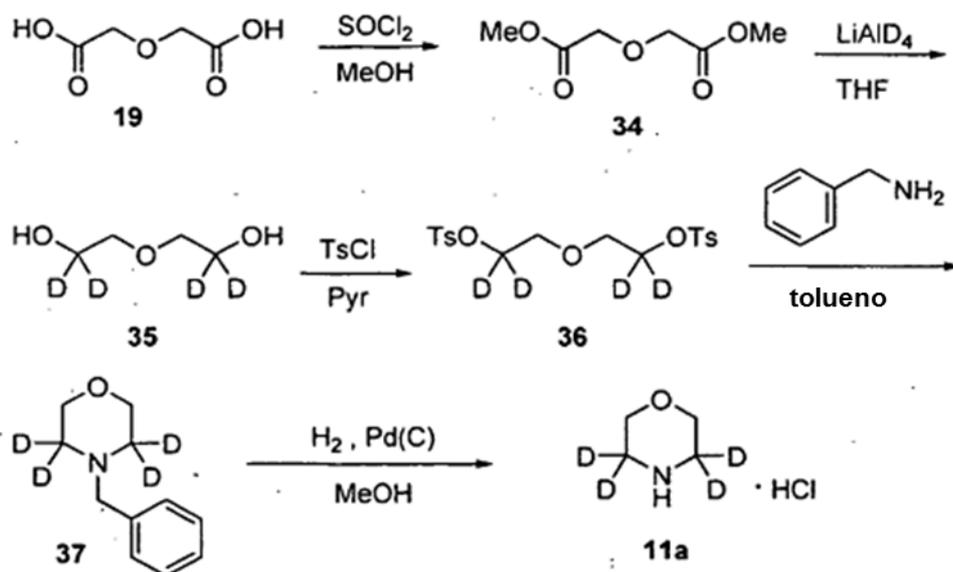
- 45 Los kits de la invención pueden comprender también un dispositivo para administrar o medir una dosis unitaria de la composición farmacéutica. Dicho dispositivo puede incluir un inhalador si dicha composición es una composición inhalable; una jeringa y aguja si dicha composición es una composición inyectable; una jeringa, esponja, bomba, o un recipiente con o sin marcas de volumen si dicha composición es una composición líquida oral; o cualquier otro dispositivo de medición o administración adecuado a la formulación de la dosis de la composición presente en el kit.

- 50 En determinadas realizaciones, los kits de la presente invención pueden comprender un envase separado en el recipiente con una composición farmacéuticas que comprende un segundo agente terapéutico, tal como uno de los listados anteriormente para uso en la administración simultánea con un compuesto de la presente invención.

### Parte experimental

**Ejemplo 1. Síntesis de 3,3,5,5-d<sub>4</sub>-morfolina (11a).** El compuesto intermedio **11a**, se preparó como se ha detallado en el Esquema 6, como se muestra a continuación. Los detalles de la síntesis se definen a continuación.

Esquema 6. Síntesis de 11a



**Síntesis de 2,2'-oxidiacetato de dimetilo (34).** Una solución de ácido diglicólico 19 (17,40 g, 129,76 mmol) en 100 ml de metanol anhidro se agitó bajo atmósfera de nitrógeno y a continuación se enfrió a 0 °C. Se añadió cloruro de tionilo (21,72 ml, 35,51 g, 2,3 eq) gota a gota durante 10 minutos (min). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente (ta) y se agitó durante toda la noche. El disolvente se eliminó a vacío y el aceite resultante se secó con alto vacío para obtener 21,1 g (100 %) de 34 en forma de un sólido cristalino de color blanco.

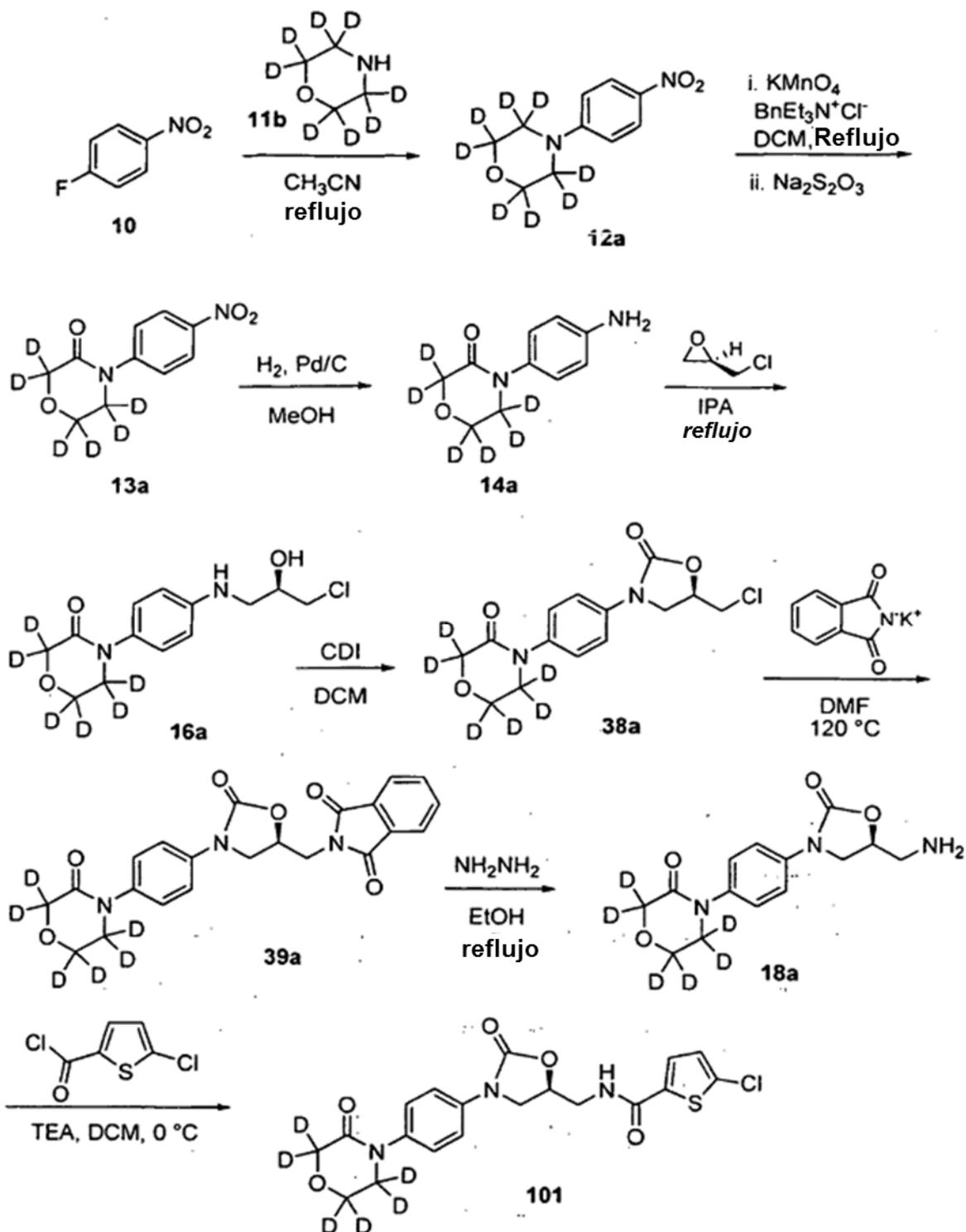
**Síntesis de 2,2'-oxibis(1,1-d<sub>2</sub>-etanol) (35).** A una solución de LiAlD<sub>4</sub> (40,0 g, 0,953 mol, 2,3 eq) (Cambridge Isotope, 98 % en átomos D) en THF anhidro (700 ml) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno se añadió 34 (67,2 g, 0,414 mol, 1,0 eq) en 800 ml de THF gota a gota durante 2 horas (h). La mezcla de reacción se agitó en condiciones de temperatura de reflujo durante 2 h y a continuación se enfrió a 0 °C. A esta mezcla se añadieron 40 ml de agua, 40 ml de una solución acuosa de NaOH al 15 %, a continuación 40 ml de agua en porciones con agitación. Después de 30 min, el sólido se eliminó por filtración y se añadió agua en porciones con agitación. Después de 30 min, el sólido se eliminó por filtración y se aclaró con THF (500 ml). El filtrado se concentró a vacío para dar 29,1 g (64 %) de 35 como un aceite de color amarillo.

**Síntesis de 2,2'-oxibis(1,1-d<sub>2</sub>-etano-2,1-diil) bis(4-metilbencenosulfonato) (36).** A una solución de 35 (29,1 g, 0,264 mol) en piridina (500 ml) a 0 °C se añadió cloruro de p-toluensulfonilo gota a gota (115,9 g, 0,608 mol, 2,3 eq) en porciones durante 10 min. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a 0 °C, y a continuación se vertió sobre 600 ml de salmuera y se agitó durante 10 min. El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua, y a continuación se secó a vacío para dar 96,4 g (87 %) de 36 como un sólido de color blanco.

**Síntesis de 4-bencil-3,3,5,5-d<sub>4</sub>-morfolina (37).** Al bis bis-sulfonato 36 (96,4 g, 0,230 mol) en 1,5 l de tolueno anhidro bajo atmósfera de nitrógeno se añadió bencilamina (252 ml, 246,8 g, 2,303 mmol, 10 eq). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 18 h y a continuación se dejó enfriar a Ta. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el exceso de bencilamina se eliminó mediante destilación a vacío para dar 32,12 g del licor madre que contenía 37, que se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

**Síntesis de 3,3,5,5-d<sub>4</sub>-morfolina (11a).** A una solución de 37 (32,12 g, obtenidos en la etapa anterior) en metanol (150 ml) se añadió Pd(OH)<sub>2</sub> (4 g) al 20 %. La mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a 30 psi (206,7 kPa) durante 2 días, a continuación se filtró con Celite y el sólido se lavó con metanol. El filtrado se concentró a vacío, y a continuación el aceite resultante se disolvió en 300 ml de éter anhidro y se trató con 44 ml de HCl 4N para formar un precipitado de color blanco. El éter se decantó y el sólido se lavó de nuevo con éter. El disolvente se decantó y el sólido se secó a vacío para dar 18,54 g (64 % en 2 etapas) de 11a como un sólido de color blanco.

**Ejemplo 2. Síntesis de (S)-5-Cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)fiófeno-2-carboxamida (101).** El compuesto 101 se preparó como se ha detallado en el Esquema 1 anterior, y en el Esquema 7 siguiente. Los detalles de la síntesis son de la siguiente forma.

Esquema 7. Síntesis de **101**.

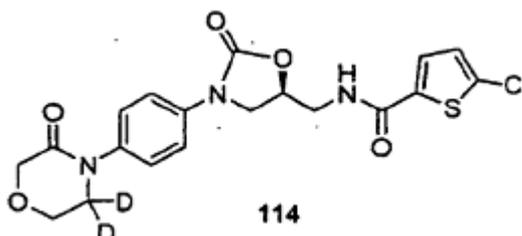
5 **Síntesis de 4-(4-nitrofenil)morfolina-d<sub>8</sub> (12a).** A una solución agitada de 1-fluoro-3-nitrobenzeno **10** (13,47 g, 95,49 mmol) en 100 ml de acetonitrilo bajo atmósfera de nitrógeno se añadió morfolina-d<sub>8</sub> **11b** (10,0 g, 105,04 mmol, 1,1 eq) (Cambridge Isotope, 98 % en átomos D) seguido por trietilamina (14,64 ml, 106,33 mmol, 1,1 eq). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 16 horas, y a continuación se enfrió a ta. A continuación la mezcla se vertió en 400 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (2 x 400 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron con sulfato de sodio, se concentraron a vacío, y a continuación se secaron a vacío para dar 19,1 g (92 %) de 12a como un sólido de color amarillo.

10

- 5 **Síntesis de 4-(4-nitrofenil)-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (13a).** A una solución de 12a (14,00 g, 64,74 mmol) en 500 ml de diclorometano se añadió permanganato de potasio (30,70 g, 194,20 mmol, 3 eq) y cloruro de benciltrietilamonio (44,20 g, 194,20 mmol, 3 eq) con agitación. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura de reflujo durante 15 h y a continuación se enfrió a ta y se lavó con 350 ml de tiosulfato de sodio al 10 % en agua. La capa acuosa se extrajo con 400 ml de diclorometano y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 300 ml de salmuera y a continuación se secaron con sulfato de sodio y se concentraron a vacío. El aceite oscuro resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol en diclorometano (gradiente de 0-10 %) para dar 5,76 g (39 %) de **13a** como un sólido de color amarillo-naranja. Las fracciones que contenían el material de partida y trazas de producto (-7 g en total) se volvieron a someter a las condiciones de oxidación.
- 10 **Síntesis de 4-(4-aminofenil)-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (14a).** A una solución de **13a** (10,41 g, 45,60 mmol) en 300 ml de metanol bajo atmósfera de nitrógeno se añadieron 2,0 g de Pd(C) 20 %/ H<sub>2</sub>O 50 %. La mezcla se puso bajo hidrógeno a 1 atmósfera (101,3 kPa) durante 30 minutos y a continuación se filtró a través de Celite. El sólido se lavó con metanol y el filtrado se concentró a vacío y se trituró a continuación con metanol para eliminar las impurezas. El sólido se secó a vacío para dar 6,60 g (73 %) de **14a** como un sólido de color marrón oscuro. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5,13 (s, 2H), 6,54 (d, J = 8,8, 1H), 6,95 (d, J = 8,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 114,34, 127,11, 130,90, 148,06, 166,48. **HPLC** (procedimiento: columna Zorbax 4,6 x 50 mm SB-Aq 3,5 μm - procedimiento de gradiente 2 a 98 % de ACN + ácido fórmico al 0,1 % en 6.0 min; 0,63 ml/min; Longitud de onda: 254 nm): tiempo de retención: 2,17 min; 98,0 % de pureza. **MS** (M+H): 199,1. **Análisis elemental** (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>D<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): Calculado: C = 60,59, H = 6,10; N = 14,13. Encontrado: C = 60,34, H = 6,09, N = 13,97.
- 15 **Síntesis de (R)-4-(4-(3-cloro-2-hidroxiopropilamino)fenil)-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (16a).** A una solución de **14a** (7,00 g, 35,31 mmol) en 40 ml de isopropanol se añadió (R)-epiclorohidrina (4,14 ml, 4,90 g, 52,96 mmol, 1,5 eq). La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura de reflujo durante 16 h. El disolvente se eliminó a continuación a vacío y el sólido oscuro se utilizó directamente en la siguiente etapa.
- 20 **Síntesis de (R)-4-(4-(5-(clorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)fenil)-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (38a).** Una solución de **16a** (de la etapa anterior) en 100 ml de diclorometano se puso bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió carbonildiimidazol (17,18 g, 105,93 mmol, 3 eq) con agitación. La mezcla se dejó agitar a ta durante 3 h y a continuación se concentró a vacío. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía utilizando gel de sílice eluido con metanol en diclorometano (gradiente 0-10 %). Las fracciones que contenían **38a** se combinaron y concentraron a vacío, y a continuación se trituraron con metanol durante 30 minutos a ta. El metanol se decantó y el sólido remanente se secó a vacío a 50 °C durante la noche para dar 3,27 g (29 % en 2 etapas) de **38a** como un sólido de color beige.
- 25 **Síntesis de (S)-2-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)isoindolina-1,3-diona (39a).** A una solución de **38a** (3,20 g, 10,10 mmol) en 20 ml de DMF anhidro se añadió ftalimida de potasio (3,74 g, 20,21 mmol, 2 eq). La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a 120 °C durante 2 h., a continuación a ta durante la noche (14 h). La mezcla se calentó a continuación a 125 °C y se agitó durante 4 horas antes de añadir más ftalimida de potasio (1,87 g, 1 eq). La agitación continuó durante 2 h más a 125 °C, la mezcla se enfrió a ta, y a continuación se vertió en 300 ml de metanol. Después de 30 minutos se formó un precipitado de color blanco. El sólido resultante se filtró y se secó a vacío para obtener 2,39 g (55 %) de **39a** como un sólido de color beige.
- 30 **(S)-4-(4-(5-(aminometil)-2-oxooxazolidin-3-il)fenil)-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (18a).** A una solución de **39a** (2,36 g, 5,52 mmol) en 50 ml de etanol se añadió hidrazina (0,69 g, 13,81 mmol, 2,5 eq). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 4,5 horas, y a continuación se dejó enfriar a ta. El precipitado recientemente formado se filtró y se lavó con etanol. El filtrado se concentró a vacío para obtener 900 mg de **18a** como un sólido de color blanco que contenía trazas del subproducto ftalazina. El material se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 35 **Síntesis de (S)-5-cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)fiófeno-2-carboxamida (101).** A una solución de ácido 5-clorotiofeno-2-carbónico (738 mg, 4,54 mmol, 1,5 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (540 mg, 0,33 ml, 4,54 mmol, 1,5 eq). Se añadieron cinco gotas de DMF para catalizar la reacción. La mezcla de reacción se analizó periódicamente usando una alícuota inactivada con metilamina. Después de 2 h se añadieron 0,33 ml más de cloruro de tionilo, se continuó la agitación durante 2 h y se añadió una tercera porción de cloruro de tionilo (0,38 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a ta y a continuación el disolvente se eliminó a vacío. El aceite resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano y esta solución se añadió a una solución de **18a** (900 mg, 3,03 mmol, 1 eq) y trietilamina (1,27 ml, 919 mg, 9,08 mmol, 3 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a ta toda la noche (16 h) a continuación se vertió en 120 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas conminadas se lavaron con salmuera (150 ml), y se secaron a continuación con sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró a vacío y el sólido resultante se recristalizó en metanol para dar 740 mg (56 %) de compuesto 101 como un sólido de color blanco. El licor madre se concentró y la recristalización en metanol produjo 130 mg (10 %) de una segunda cosecha de compuesto 101. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 3,60 (t, J = 5,6, 2H), 3,84 (dd, J<sub>1</sub> = 9,3, J<sub>2</sub> = 6,4, 1H), 4,18 (t, J = 9,1, 1H), 4,79-4,88 (m, 1H), 7,19 (d, J = 4,1, 1H), 7,41 (d, J = 8,8, 2H), 7,55 (d, J = 8,8, 2H), 7,69 (d, J = 4,1, 1H), 8,99 (t, J = 5,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 42,90, 48,11, 72,02, 119,01, 126,61, 128,88, 129,14, 133,96, 137,15, 137,73, 139,16, 154,80, 161,49, 166,70. **HPLC** (procedimiento:
- 40 **Síntesis de (S)-5-cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)fiófeno-2-carboxamida (101).** A una solución de ácido 5-clorotiofeno-2-carbónico (738 mg, 4,54 mmol, 1,5 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (540 mg, 0,33 ml, 4,54 mmol, 1,5 eq). Se añadieron cinco gotas de DMF para catalizar la reacción. La mezcla de reacción se analizó periódicamente usando una alícuota inactivada con metilamina. Después de 2 h se añadieron 0,33 ml más de cloruro de tionilo, se continuó la agitación durante 2 h y se añadió una tercera porción de cloruro de tionilo (0,38 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a ta y a continuación el disolvente se eliminó a vacío. El aceite resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano y esta solución se añadió a una solución de **18a** (900 mg, 3,03 mmol, 1 eq) y trietilamina (1,27 ml, 919 mg, 9,08 mmol, 3 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a ta toda la noche (16 h) a continuación se vertió en 120 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas conminadas se lavaron con salmuera (150 ml), y se secaron a continuación con sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró a vacío y el sólido resultante se recristalizó en metanol para dar 740 mg (56 %) de compuesto 101 como un sólido de color blanco. El licor madre se concentró y la recristalización en metanol produjo 130 mg (10 %) de una segunda cosecha de compuesto 101. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 3,60 (t, J = 5,6, 2H), 3,84 (dd, J<sub>1</sub> = 9,3, J<sub>2</sub> = 6,4, 1H), 4,18 (t, J = 9,1, 1H), 4,79-4,88 (m, 1H), 7,19 (d, J = 4,1, 1H), 7,41 (d, J = 8,8, 2H), 7,55 (d, J = 8,8, 2H), 7,69 (d, J = 4,1, 1H), 8,99 (t, J = 5,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 42,90, 48,11, 72,02, 119,01, 126,61, 128,88, 129,14, 133,96, 137,15, 137,73, 139,16, 154,80, 161,49, 166,70. **HPLC** (procedimiento:
- 45 **Síntesis de (S)-5-cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)fiófeno-2-carboxamida (101).** A una solución de ácido 5-clorotiofeno-2-carbónico (738 mg, 4,54 mmol, 1,5 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (540 mg, 0,33 ml, 4,54 mmol, 1,5 eq). Se añadieron cinco gotas de DMF para catalizar la reacción. La mezcla de reacción se analizó periódicamente usando una alícuota inactivada con metilamina. Después de 2 h se añadieron 0,33 ml más de cloruro de tionilo, se continuó la agitación durante 2 h y se añadió una tercera porción de cloruro de tionilo (0,38 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a ta y a continuación el disolvente se eliminó a vacío. El aceite resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano y esta solución se añadió a una solución de **18a** (900 mg, 3,03 mmol, 1 eq) y trietilamina (1,27 ml, 919 mg, 9,08 mmol, 3 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a ta toda la noche (16 h) a continuación se vertió en 120 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas conminadas se lavaron con salmuera (150 ml), y se secaron a continuación con sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró a vacío y el sólido resultante se recristalizó en metanol para dar 740 mg (56 %) de compuesto 101 como un sólido de color blanco. El licor madre se concentró y la recristalización en metanol produjo 130 mg (10 %) de una segunda cosecha de compuesto 101. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 3,60 (t, J = 5,6, 2H), 3,84 (dd, J<sub>1</sub> = 9,3, J<sub>2</sub> = 6,4, 1H), 4,18 (t, J = 9,1, 1H), 4,79-4,88 (m, 1H), 7,19 (d, J = 4,1, 1H), 7,41 (d, J = 8,8, 2H), 7,55 (d, J = 8,8, 2H), 7,69 (d, J = 4,1, 1H), 8,99 (t, J = 5,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 42,90, 48,11, 72,02, 119,01, 126,61, 128,88, 129,14, 133,96, 137,15, 137,73, 139,16, 154,80, 161,49, 166,70. **HPLC** (procedimiento:
- 50 **Síntesis de (S)-5-cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)fiófeno-2-carboxamida (101).** A una solución de ácido 5-clorotiofeno-2-carbónico (738 mg, 4,54 mmol, 1,5 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (540 mg, 0,33 ml, 4,54 mmol, 1,5 eq). Se añadieron cinco gotas de DMF para catalizar la reacción. La mezcla de reacción se analizó periódicamente usando una alícuota inactivada con metilamina. Después de 2 h se añadieron 0,33 ml más de cloruro de tionilo, se continuó la agitación durante 2 h y se añadió una tercera porción de cloruro de tionilo (0,38 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a ta y a continuación el disolvente se eliminó a vacío. El aceite resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano y esta solución se añadió a una solución de **18a** (900 mg, 3,03 mmol, 1 eq) y trietilamina (1,27 ml, 919 mg, 9,08 mmol, 3 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a ta toda la noche (16 h) a continuación se vertió en 120 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas conminadas se lavaron con salmuera (150 ml), y se secaron a continuación con sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró a vacío y el sólido resultante se recristalizó en metanol para dar 740 mg (56 %) de compuesto 101 como un sólido de color blanco. El licor madre se concentró y la recristalización en metanol produjo 130 mg (10 %) de una segunda cosecha de compuesto 101. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 3,60 (t, J = 5,6, 2H), 3,84 (dd, J<sub>1</sub> = 9,3, J<sub>2</sub> = 6,4, 1H), 4,18 (t, J = 9,1, 1H), 4,79-4,88 (m, 1H), 7,19 (d, J = 4,1, 1H), 7,41 (d, J = 8,8, 2H), 7,55 (d, J = 8,8, 2H), 7,69 (d, J = 4,1, 1H), 8,99 (t, J = 5,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 42,90, 48,11, 72,02, 119,01, 126,61, 128,88, 129,14, 133,96, 137,15, 137,73, 139,16, 154,80, 161,49, 166,70. **HPLC** (procedimiento:
- 55 **Síntesis de (S)-5-cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)fiófeno-2-carboxamida (101).** A una solución de ácido 5-clorotiofeno-2-carbónico (738 mg, 4,54 mmol, 1,5 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (540 mg, 0,33 ml, 4,54 mmol, 1,5 eq). Se añadieron cinco gotas de DMF para catalizar la reacción. La mezcla de reacción se analizó periódicamente usando una alícuota inactivada con metilamina. Después de 2 h se añadieron 0,33 ml más de cloruro de tionilo, se continuó la agitación durante 2 h y se añadió una tercera porción de cloruro de tionilo (0,38 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a ta y a continuación el disolvente se eliminó a vacío. El aceite resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano y esta solución se añadió a una solución de **18a** (900 mg, 3,03 mmol, 1 eq) y trietilamina (1,27 ml, 919 mg, 9,08 mmol, 3 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a ta toda la noche (16 h) a continuación se vertió en 120 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas conminadas se lavaron con salmuera (150 ml), y se secaron a continuación con sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró a vacío y el sólido resultante se recristalizó en metanol para dar 740 mg (56 %) de compuesto 101 como un sólido de color blanco. El licor madre se concentró y la recristalización en metanol produjo 130 mg (10 %) de una segunda cosecha de compuesto 101. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 3,60 (t, J = 5,6, 2H), 3,84 (dd, J<sub>1</sub> = 9,3, J<sub>2</sub> = 6,4, 1H), 4,18 (t, J = 9,1, 1H), 4,79-4,88 (m, 1H), 7,19 (d, J = 4,1, 1H), 7,41 (d, J = 8,8, 2H), 7,55 (d, J = 8,8, 2H), 7,69 (d, J = 4,1, 1H), 8,99 (t, J = 5,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 42,90, 48,11, 72,02, 119,01, 126,61, 128,88, 129,14, 133,96, 137,15, 137,73, 139,16, 154,80, 161,49, 166,70. **HPLC** (procedimiento:
- 60 **Síntesis de (S)-5-cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-2,2,5,5,6,6-d<sub>6</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)fiófeno-2-carboxamida (101).** A una solución de ácido 5-clorotiofeno-2-carbónico (738 mg, 4,54 mmol, 1,5 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (540 mg, 0,33 ml, 4,54 mmol, 1,5 eq). Se añadieron cinco gotas de DMF para catalizar la reacción. La mezcla de reacción se analizó periódicamente usando una alícuota inactivada con metilamina. Después de 2 h se añadieron 0,33 ml más de cloruro de tionilo, se continuó la agitación durante 2 h y se añadió una tercera porción de cloruro de tionilo (0,38 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a ta y a continuación el disolvente se eliminó a vacío. El aceite resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano y esta solución se añadió a una solución de **18a** (900 mg, 3,03 mmol, 1 eq) y trietilamina (1,27 ml, 919 mg, 9,08 mmol, 3 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a ta toda la noche (16 h) a continuación se vertió en 120 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas conminadas se lavaron con salmuera (150 ml), y se secaron a continuación con sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró a vacío y el sólido resultante se recristalizó en metanol para dar 740 mg (56 %) de compuesto 101 como un sólido de color blanco. El licor madre se concentró y la recristalización en metanol produjo 130 mg (10 %) de una segunda cosecha de compuesto 101. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 3,60 (t, J = 5,6, 2H), 3,84 (dd, J<sub>1</sub> = 9,3, J<sub>2</sub> = 6,4, 1H), 4,18 (t, J = 9,1, 1H), 4,79-4,88 (m, 1H), 7,19 (d, J = 4,1, 1H), 7,41 (d, J = 8,8, 2H), 7,55 (d, J = 8,8, 2H), 7,69 (d, J = 4,1, 1H), 8,99 (t, J = 5,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): □ 42,90, 48,11, 72,02, 119,01, 126,61, 128,88, 129,14, 133,96, 137,15, 137,73, 139,16, 154,80, 161,49, 166,70. **HPLC** (procedimiento:

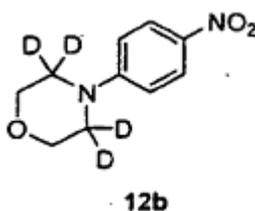
columna C18-RP 20 mm procedimiento de gradiente ACN 2 a 95 % + ácido fórmico al 0,1 % en 3,3 min con 1,7 min mantenidos con ACN al 95 %; Longitud de onda: 254 nm): tiempo de retención: 2,93 min; 98,2 % de pureza. MS (M+H): 442,2. Análisis elemental (C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>D<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S): Calculado: C = 51,64, H = 4,11, N = 9,51, Cl = 8,02, S = 7,26. Encontrado: C = 51,74, H = 3,76, N = 9,45, Cl = 8,29, S = 7,35.

- 5 **Ejemplo comparativo 3.** Síntesis de (S)-5-Cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-5,5-d<sub>2</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)tiofeno-2-carboxamida (**114**).



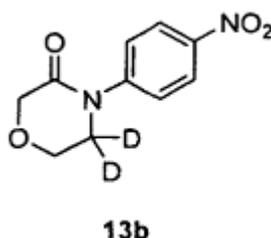
El compuesto 114 se preparó como se ha detallado en el Esquema 7 anterior con la excepción de que se utilizó 3,3,5,5-d<sub>4</sub>-morfolina (**11a**) en lugar de morfolina-d<sub>8</sub> (**11b**). Los detalles de la síntesis son de la siguiente forma.

- 10 **Síntesis de 4-(4-nitrofenil)-3,3,5,5-d<sub>4</sub>-morfolina (12b).**

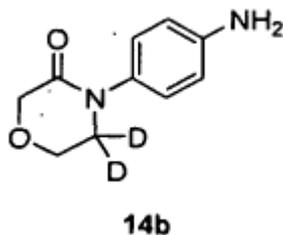


- 15 A una solución agitada de 1-fluoro-3-nitrobenzono 10 (12,16 g, 86,17 mmol, 1,1 eq) en 100 ml de acetonitrilo bajo atmósfera de nitrógeno se añadió 11a (10,0 g, 78,34 mmol) seguido por trietilamina (32,76 ml, 23,78 g, 235,01 mmol, 3,0 eq). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 16 horas, y a continuación se enfrió a ta. A continuación la mezcla se vertió en 400 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (2 x 700 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron con sulfato de sodio, se concentraron a vacío. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol en diclorometano (gradiente de 0-10 %) para dar 14,94 g (90 %) de **12b** como un sólido de color amarillo.

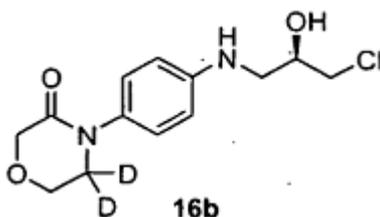
**Síntesis de 4-(4-nitrofenil)-5-d<sub>2</sub>-morfolina (13b).**



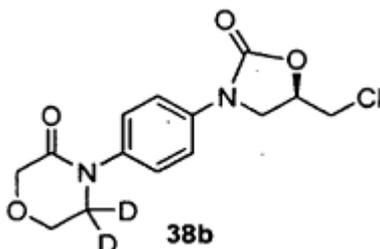
- 20 A una solución agitada de **12b** (16,20 g, 76,32 mmol) en 700 ml de diclorometano se añadió permanganato de potasio (36,18 g, 228,96 mmol, 3 eq) y cloruro de benciltrietilamonio (52,15 g, 228,96 mmol, 3 eq). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura de reflujo durante 24 h y se añadieron otros 36 g de permanganato de potasio. Tras 24 h más, la reacción se enfrió a ta y se lavó con 350 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10 % en agua. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 400 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 300 ml de salmuera y a continuación se secaron con sulfato de sodio y se concentraron a vacío. El aceite oscuro resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol en diclorometano (gradiente de 0-10 %) para dar 4,56 g (27 %) de **13b** como un sólido de color amarillo-naranja. Las fracciones que contenían el material de partida y trazas de producto (-7 g en total) se volvieron a someter a las condiciones de oxidación citadas anteriormente:
- 25
- 30

**Síntesis de 4-(4-aminofenil)-5,5-d<sub>2</sub>-morfolina (14b).**

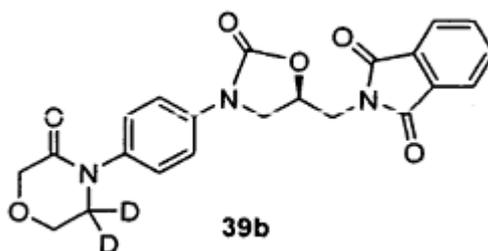
5 A una solución agitada de **13b** (4,50 g, 20,07 mmol) en 100 ml de metanol bajo atmósfera de nitrógeno se añadieron 1,0 g de Pd(C) 20 %/ H<sub>2</sub>O 50 %. La mezcla se puso bajo hidrógeno a 1 atmósfera (101,3 kPa) durante 2 h y a continuación se filtró a través de Celite. El sólido se lavó con metanol y el filtrado se concentró a vacío para dar 3,57 g (91 %) de **14b** como un sólido de color marrón oscuro.

**Síntesis de (R)-4-(4-(3-cloro-2-hidroxiopropilamino)fenil)-5,5-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (16b).**

10 A una solución de **14b** (3,41 g, 17,56 mmol) en 20 ml de isopropanol se añadió (R)-epiclorohidrina (2,06 ml, 2,44 g, 26,33 mmol, 1,5 eq). La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura de reflujo durante 16 h. El disolvente se eliminó a continuación a vacío y el sólido oscuro se utilizó directamente en la siguiente etapa.

**Síntesis de (R)-4-(4-(5-(clorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)fenil)-5,5-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (38b).**

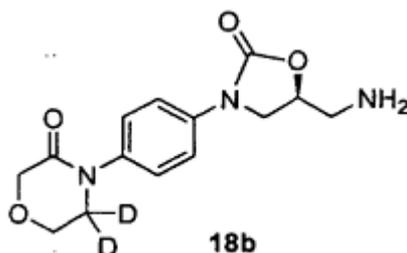
15 Una solución de **16b** (de la etapa anterior) en 50 ml de diclorometano se puso bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió carbonildiimidazol (8,56 g, 52,67 mmol, 3 eq) con agitación. La mezcla se dejó agitar a ta durante 3 h y a continuación se concentró a vacío. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol en diclorometano (gradiente de 0-10 %) para dar 1,62 g (30 % en dos etapas) de **38b** como un sólido de color beige.

**Síntesis de (S)-2-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-5,5-d<sub>2</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)isoindolina-1,3-diona (39b).**

20 A una solución de **38b** (1,60 g, 5,12 mmol) en 10 ml de DMF anhidro se añadió ftalimida de potasio (2,81 g, 15,35 mmol, 3 eq). La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a 120 °C durante 3,5 h, y a continuación se enfrió a ta.

El disolvente se eliminó *a vacío* y el sólido remanente se trituroó con metanol, se filtró, y se secó a vacío para dar 1,22 g (56 %) de **39b** como un sólido de color beige.

**(S)-4-(4-(5-(aminometil)-2-oxooxazolidin-3-il)fenil)-5,5-d<sub>6</sub>-morfolin-3-ona (18b).**



- 5 A una solución de **39b** (1,57 g, 3,75 mmol) en 40 ml de etanol se añadió hidrazina (0,47 g, 9,39 mmol, 2,5 eq). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 2 horas, y a continuación se dejó enfriar a ta. El precipitado recientemente formado se filtró y se lavó con etanol. El filtrado se concentró a vacío para obtener 758 mg de **18b** como un sólido de color blanco que contenía trazas del subproducto ftalazina. El material se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 10 **Síntesis de (S)-5-cloro-N-((2-oxo-3-(4-(3-oxo-5,5-d<sub>2</sub>-morfolino)fenil)oxazolidin-5-il)metil)tiofeno-2-carboxamida (114).** A una solución de ácido 5-clorotiofeno-2-carbónico (628 mg, 3,86 mmol, 1,5 eq) en 15 ml de diclorometano a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (1,53 g, 0,94 ml, 12,88 mmol, 5 eq). Se añadieron cinco gotas de DMF para catalizar la reacción. La mezcla de reacción se analizó periódicamente usando una alícuota inactivada con metilamina. Después de 2 h, se añadieron 2,16 ml de cloruro de tionilo más y la agitación continuó durante 2 h. El disolvente se eliminó *a vacío*, el aceite resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano y esta solución se añadió a una solución de **18b** (758 mg, 2,58 mmol, 1 eq) y trietilamina (1,08 ml, 782 mg, 7,73 mmol, 3 eq) en 10 ml de diclorometano a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a ta toda la noche (16 h) a continuación se vertió en 120 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas conminadas se lavaron con salmuera (150 ml), y se secaron a continuación con sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró *a vacío* y el sólido resultante se recrystalizó en metanol para dar 215 mg (13 %) de compuesto **114** como un sólido de color blanco. El licor madre se concentró y la recrystalización adicional en metanol produjo 110 mg de una segunda cosecha de compuesto **114** que contenía impurezas importantes. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,60 (t, J = 5,4, 2H), 3,84 (dd, J<sub>1</sub> = 9,2, J<sub>2</sub> = 5,8, 1H), 3,95 (s, 2H), 4,15-4,21 (m, 3H), 4,79-4,88 (m, 1H), 7,19 (d, J = 4,2, 1H), 7,40 (d, J = 8,3, 2H), 7,55 (d, J = 8,3, 2H), 7,68 (d, J = 4,2, 1H), 8,97 (t, J = 5,8, 1H). **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 42,90, 48,11, 64,02, 68,40, 72,00, 119,00, 126,58, 128,84, 129,12, 133,93, 137,14, 137,72, 139,13, 154,77, 161,47, 166,64. **HPLC** (procedimiento: columna C18 Waters Atlantis T3 2,1 x 50 mm 3 μm procedimiento de gradiente ACN 5 a 95 % ACN + ácido fórmico al 0,1 % en 14 min, con 4 min mantenidos con ACN al 95 %; 1,0 ml/min; Longitud de onda: 254 nm): tiempo de retención: 5,03 min; 99,4 % de pureza. **MS** (M+H): 438,0. **Análisis elemental** (C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>D<sub>2</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S): Calculado: C = 52,12, H = 4,14, N = 9,60, Cl = 8,10, S = 7,32. Encontrado: C = 52,02, H = 4,01, N = 9,47, Cl = 7,92, S = 7,10.
- 25
- 30

**Ejemplo 4. Evaluación de la estabilidad metabólica en microsomas.** En las siguientes referencias se han descrito algunos estudios del metabolismo hepático *in vitro*, cada una de las cuales se ha incorporado por referencia en su totalidad en el presente documento: Obach, RS, Drug Metab Disp, 1999, 27:1350; Houston, JB y col., Drug Metab Rev, 1997, 29:891; Houston, JB, Biochem Pharmacol, 1994, 47:1469; Iwatsubo, T y col., Pharmacol Ther, 1997, 73:147; y Lave, T, y col., Pharm Res, 1997, 14:152.

35

**Ensayo microsomal:** La estabilidad metabólica de los compuestos de Fórmula I se ensayó mediante incubaciones combinadas de microsomas hepáticos. A continuación, se llevó a cabo un análisis de LC-MS con barrido completo para detectar los metabolitos principales. Las muestras de los compuestos de ensayo, expuestas a microsomas hepáticos humanos combinados, se analizaron mediante detección HPLC-MS (o MS/MS). Para determinar la estabilidad metabólica, se ha utilizado la monitorización de reacciones múltiples (MRM, por sus siglas en inglés) para medir la desaparición de los compuestos de ensayo. Para la detección de metabolitos, se utilizaron barridos completos Q1 como barridos de supervisión para detectar metabolitos principales.

40

Procedimientos experimentales: Los microsomas hepáticos humanos se han obtenido de una fuente comercial (por ej., Absorption Systems L.P. (Extón, PA)). Las mezclas de incubación se prepararon de la siguiente forma: Composición de la mezcla de reacción

45

	Microsomas hepáticos	1,0 mg/ml
	NADPH	1 mM
	Fosfato de potasio, pH 7,4	100 mM
	Cloruro de magnesio	10 mM
50	Compuesto de ensayo	1 μM.

*Incubación de los compuestos de ensayo con microsomas hepáticos:* Se preparó la mezcla de reacción, excepto, los cofactores. Una alícuota de la mezcla de reacción (sin los cofactores) se incubó en un baño de agua agitado a 37 °C durante 3 minutos. Otra alícuota de la mezcla de reacción se preparó como el control negativo. El compuesto de ensayo se añadió tanto a la mezcla de reacción como al control negativo a una concentración final de 1 µM. Una alícuota de la mezcla de reacción se preparó como el blanco control, por adición de disolvente orgánico puro (sin el compuesto de ensayo). La reacción se inició por la adición de cofactores (no en los controles negativos), y a continuación se incubaron en un baño de agua agitado a 37 °C. Se retiraron alícuotas (200 µl) por triplicado en varios puntos temporales (por ejemplo, 0, 15, 30, 60, y 120 minutos) y se combinaron con 800 µl de agua/hielo 50/50 acetonitrilo/dH<sub>2</sub>O para finalizar la reacción. Los controles positivos, testosterona y propranolol, así como rivaroxaban, se analizaron simultáneamente con los compuestos de ensayo en reacciones independientes.

Todas las muestras se analizaron mediante LC-MS (o MS/MS). Se ha utilizado un procedimiento LC-MRM-MS/MS se utiliza para determinar la estabilidad metabólica. Asimismo, se llevaron a cabo procedimientos LC-MS con barrido completo de Q1 sobre la matriz de blanco y las muestras en las que se incubó el compuesto de ensayo. Los barridos Q1 sirven como barridos de supervisión para identificar cualesquiera picos únicos de la muestra que pudieran representar los posibles metabolitos. Las masas de los metabolitos potenciales se pueden determinar a partir de los barridos Q1.

*Ensayo SUPERSOMES™.* Se adquirieron diferentes citocromos específicos de P450 humanos SUPERSOMES™ de Gentest (Woburn, MA, EE.UU.). 1,0 ml de mezcla de reacción que contiene 25 pmol de SUPERSOMES™, NADPH 2,0 mM, MgCl 3,0 mM, y 1 µM de un compuesto de ensayo en tampón fosfato de potasio (pH 7,4) 100 mM se incubaron a 37 °C por triplicado. Los controles positivos contienen 1 µM de rivaroxaban en lugar de compuesto de ensayo. Los controles negativos usaron citosol de célula de insecto de control (microsomas de células de insectos que carecen de cualquier enzima metabólica humana) adquiridas de GenTest (Woburn, MA, EE.UU.). Se extrajeron alícuotas (50 µL) de cada muestra y se colocaron en los pocillos de una placa multipocillo en diferentes puntos temporales (por ejemplo, 0, 2, 5, 7, 12, 20, y 30 minutos) y se añadió a cada alícuota 50 µl de acetonitrilo enfriado en hielo con haloperidol 3 µM como patrón interno para detener la reacción.

Las placas que contenían las alícuotas extraídas se colocaron en un congelador a -20 °C durante 15 minutos para enfriamiento. Tras el enfriamiento, se añadieron 100 µL de agua desionizada a todos los pocillos de la placa. Las placas se hicieron girar en la centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm. A continuación, se retiró una porción del sobrenadante (100 µL), se colocó en una nueva placa y se analizó mediante espectrometría de masas.

**Ejemplo 6. Evaluación de la farmacocinética de los compuestos 101 en ratas Sprague Dawley macho tras la administración por vía oral.** Se prepararon soluciones independientes de rivaroxaban y Compuesto 101 utilizando etanol al 20 %, PEG400 al 60 %, dimetil isosorbida al 20 % para proporcionar una concentración de 10 mg/ml. La concentración de cada solución se confirmó antes del uso mediante HPLC. Se preparó una dosis de combinación de rivaroxaban y Compuesto 101 mezclando las dos soluciones en una relación 1,09:1 para dar una concentración final de 5,45 mg/ml de rivaroxaban y 5 mg/ml de Compuesto 101.

Dos ratas Sprague Dawley macho se dosificaron mediante sonda gástrica con la dosis de combinación que contenía rivaroxaban (5,45 mg/kg) y compuesto 101 (5 mg/kg). Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 0,25 ml) retroorbitalmente tras la administración por vía oral a los 0 minutos (min) (pre-dosis), 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h y 24 h después de la dosis. Las muestras de sangre se almacenaron sobre hielo y se centrifugaron en los 15 minutos siguientes a su extracción para cosechar el plasma. El plasma se decantó inmediatamente y se congeló a -20 °C hasta su análisis.

Los análisis de las muestras de plasma se realizaron mediante un procedimiento de cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas (HPLC/MS/MS). El sistema LC comprendía un cromatógrafo líquido Agilent (Agilent Technologies Inc. USA) equipado con bomba isocrática (serie 1100), un automuestreador (serie 1100) y un desgasificador (serie 1100). El análisis mediante espectrometría de masas se llevó a cabo en un instrumento API3000 (triple-cuadripolo) de AB Inc (Canadá) con interfaz ESI. El sistema de control y adquisición de datos se creó mediante el programa informático Analyst 1.4 de ABI Inc. Los datos de rivaroxaban se corrigieron multiplicando por un factor de 0,91 para compensar la cantidad aumentada en un 9 % administrada en comparación con el Compuesto 101.

Los resultados se representan gráficamente en la tabla siguiente.

Tabla 2. Valores farmacocinéticos calculados para el Compuesto 101 y Rivaroxaban tras dosificación simultánea por vía oral a ratas

Compuesto	ABC <sup>∞</sup> (ng-h/ml)	C <sub>máx</sub> (ng/ml)
Rivaroxaban	2926,95	842
Compuesto 101	3424,33	962

Los datos anteriores muestran que el Compuesto 101 demostró un aumento superior al 16 % en el ABC y un aumento superior al 14 % en la C<sub>máx</sub> comparado con rivaroxaban.

5 Sin descripción adicional, se cree que una persona normalmente experta en la técnica puede, usando la descripción y los ejemplos ilustrativos anteriores, preparar y utilizar los compuestos de la presente invención y llevar a la práctica los procedimientos reivindicados. Deberá entenderse que la discusión y ejemplos anteriores presentan simplemente una descripción detallada de algunas realizaciones preferidas.

