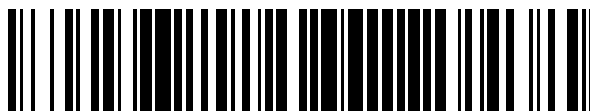


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 897**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2010 E 10768153 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2488523**

54 Título: **N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il) ciclohexil) acetamida, un modulador doble de la actividad del receptor de las quimiocinas, formas cristalinas y procedimientos**

30 Prioridad:

13.10.2009 US 250978 P

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

14.02.2014

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 05843-4000, US**

72 Inventor/es:

**CARTER, PERCY H.;
CHERNEY, ROBERT J.;
ROSSO, VICTOR W. y
LI, JUN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 442 897 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

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, un modulador doble de la actividad del receptor de las quimiocinas, formas cristalinas y procedimientos.

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

La presente invención proporciona N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que tiene una actividad doble deseada inesperada. También se proporcionan formas cristalinas de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y las mismas para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares también es un objetivo de la presente invención, La presente divulgación también proporciona un procedimiento de preparación de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida.

15 En la presente memoria también se proporcionan compuestos que son intermedios útiles e el procedimiento. En la presente memoria también se proporcionan metabolitos de compuestos activos, composiciones farmacéuticas y uso de los mismos.

Descripción de la técnica relacionada

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas de un peso molecular de 6-15 kDa, que son liberadas por una amplia variedad de células para atraer y activar, entre otros tipos celulares, macrófagos, linfocitos T y B, eosinófilos, basófilos y neutrófilos (recapitulación en: Charo y col., New Eng. J. Med., 354:610-621 (2006); Luster, New Eng. J. Med., 338:436-445 (1998); y Rollins, Blood, 90:909-928 (1997)). Hay dos clases principales de quimiocinas, CXC y CC, en función de si las primeras dos cisteínas en la secuencia de aminoácidos están separadas por un solo aminoácido (CXC) o si están adyacentes (CC). Las quimiocinas CXC, tales como la interleucina-8 (IL-8), la proteína activadora de neutrófilos 2 (NAP-2) y la proteína de activación estimuladora del crecimiento del melanoma (MGSA), son quimiotácticas principalmente para neutrófilos y linfocitos T, mientras que las quimiocinas CC, tales como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y MCP-5) y las eotaxinas (1 y 2) son quimiotácticas para, entre otros tipos celulares, macrófagos, linfocitos T, eosinófilos, células dendríticas y basófilos. También existen las quimiocinas linfotactina-1, linfotactina-2 (ambas quimiocinas C) y fractalquina (una quimiocina CX₃C) que no entran dentro de las principales subfamilias de quimiocinas).

Las quimiocinas se unen a receptores específicos de la superficie de las células que pertenecen a la familia de las proteínas con siete dominios transmembrana acopladas a proteína G, (recapitulación en: Horuk, Trends Pharm. Sci., 15:159-165 (1994)) que se denominan "receptores de quimiocinas." Al unirse a sus ligandos afines, los receptores de quimiocinas transducen una señal intracelular a través de las proteínas G triméricas, lo que da como resultado, entre otras respuestas, un rápido incremento de la concentración de calcio intracelular, cambios en la forma de la célula, incrementos de la expresión de las moléculas de adhesión celular, desgranulación y estimulación de la migración celular. Al menos existen diez receptores de quimiocinas que se unen o responden a las quimiocinas CC con los siguientes patrones característicos (recapitulación en Zlotnik y col., Immunity, 12:121 (2000)): CCR-1 (or "CKR-1" or "CC-CKR-1") [MIP-1 α , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch y col., Cell, 72:415-425 (1993), y Luster, New Eng. J. Med., 338:436-445 (1998)); CCR-2A y CCR-2B (o "CKR-2A"/"CKR-2B" or "CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B") [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2752-2756 (1994), y Luster, New Eng. J. Med., 338:436-445 (1998)); CCR-3 (o "CKR-3" o "CC-CKR-3") [eotaxina-1, eotaxina-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere y col., J. Biol. Chem., 270:16491-16494 (1995), y Luster, New Eng. J. Med., 338:436-445 (1998)); CCR-4 (or "CKR-4" o "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power y col., J. Biol. Chem, 270:19495-19500 (1995), y Luster, New Eng. J. Med., 338:436-445 (1998)); CCR-5 (o "CKR-5" o "CC-CKR-5") [MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β] (Samson y col., Biochemistry, 35:3362-3367 (1996)); CCR-6 (o "CKR-6" o "CC-CKR-6") [LARC] (Baba y col., J. Biol. Chem., 272:14893-14898 (1997)); CCR-7 (o "CKR-7" o "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie y col., J. Leukoc. Biol., 62:634-644 (1997)); CCR-8 (o "CKR-8" o "CC-CKR-8") [I-309] (Napolitano y col., J. Immunol., 157:2759-2763 (1996)); CCR-10 (o "CKR-10" o "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini y col., DNA Cell Biol., 16:1249-1256 (1997)); y CCR-11 [MCP-1, MCP-2, y MCP-4] (Schweickart y col., J. Biol. Chem., 275:9550 (2000)).

Además de los receptores de quimiocinas en mamíferos, se ha demostrado que los citomegalovirus, herpesvirus y poxvirus de mamíferos expresan, en células infectadas, proteínas con las propiedades de unión de los receptores de quimiocinas (recapitulación en: Wells y col., Curr. Opin. Biotech., 8:741-748 (1997)). Las quimiocinas CC humanas, tales como RANTES y MCP-3, pueden producir una rápida movilización del calcio a través de estos receptores codificados en los virus. La expresión del receptor permitir la aparición de infecciones al permitir la destrucción de la vigilancia del sistema inmunitario normal y la respuesta a la infección. De forma adicional, los receptores de quimiocinas humanas, tales como CXCR4, CCR-2, CCR-3, CCR-5 y CCR-8, pueden actuar como co-receptores para la infección de células de mamífero por microbios como, por ejemplo, los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Se cree que las quimiocinas y sus receptores afines son mediadores importantes de enfermedades y trastornos inflamatorios, infecciosos e inmunorreguladores, que incluyen asma y enfermedades alérgicas, así como patologías autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide y aterosclerosis; y enfermedades metabólicas tales como aterosclerosis y diabetes (recapitulación en: Charo y col., *New Eng. J. Med.*, 354:610-621 (2006); Gao, Z. y col., *Chem. Rev.*, 103:3733 (2003); Carter, P.H., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6:510 (2002); Trivedi y col., *Ann. Reports Med. Chem.*, 35:191 (2000); Saunders y col., *Drug Disc. Today*, 4:80 (1999); Premack y col., *Nature Medicine*, 2:1174 (1996)). Por ejemplo, la quimiocina quimioatrayente-1 de monocitos (MCP-1) y su receptor, receptor de quimiocinas CC 2 (CCR-2), desempeñan un papel crucial en la atracción de leucocitos a sitios de inflamación y en la activación posterior de estas células. Cuando la quimiocina MIP-1 se une a CCR-2, induce un rápido incremento de la concentración de calcio intracelular, un incremento de la expresión de las moléculas de adhesión celular y la estimulación de la migración de leucocitos. La demostración de la importancia de la interacción MCP-1/CCR-2 se ha proporcionado en experimentos con ratones modificados genéticamente. Los ratones MCP-1 $-/-$ fueron incapaces de reclutar monocitos a los sitios de inflamación después de varios tipos diferentes de desafío inmunitario (Lu, B. y col., *J. Exp. Med.*, 187:601 (1998)). Asimismo, los ratones CCR-2 $-/-$ fueron incapaces de reclutar monocitos o producir interferón- γ cuando se exponen a varios agentes exógenos; además, los leucocitos de ratones atímicos CCR-2 no migraron en respuesta a MCP-1 (Boring, L. y col., *J. Clin. Invest.*, 100:2552 (1997)), de modo que se demostró la especificidad de la interacción MCP-1/CCR-2. Otros dos grupos han notificado de forma independiente resultados con diferentes cepas de ratones CCR-2 $-/-$ (Kuziel, W.A. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12053 (1997), y Kurihara, T. y col., *J. Exp. Med.*, 186:1757 (1997)). La viabilidad y la salud generalmente normal de los animales MCP-1 $-/-$ y CCR-2 $-/-$ es notable en cuanto a que dicha rotura de la interacción MCP-1/CCR-2 no induce crisis fisiológicas. En conjunto, estos datos conducen a la conclusión de que moléculas que bloqueen las acciones de MCP-1/CCR-2 serían útiles en el tratamiento de una serie de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios (recapitulación en: Fera, M. y col., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 16:49 (2006); y Dawson, J. y col., *Exp. Opin. Ther. Targets*, 7:35 (2003)). Esta hipótesis se ha validado ahora en una serie de diferentes modelos de enfermedad en animales, como se describe más adelante.

Se sabe que la MCP-1 está regulada por aumento en pacientes con artritis reumatoide (Koch, A. y col., *J. Clin. Invest.*, 90:772-779 (1992)). Además, en varios estudios preclínicos se ha demostrado el potencial valor terapéutico del antagonismo de la interacción MIP-1/CCR1 en el tratamiento de la artritis reumatoide. Recientemente se ha mostrado que una vacuna de ADN que codifica MCP-1 mejora la artritis crónica inducida por poliadyuvante en ratas (Youssef, S. et al., *J. Clin. Invest.*, 106:361 (2000)). Asimismo, los síntomas de la enfermedad se podrían controlar mediante la administración directa de anticuerpos para MCP-1 a ratas con artritis inducida por colágeno (Ogata, H. y col., *J. Pathol.*, 182:106 (1997)), o artritis inducida por la pared celular de estreptococos (Schimmer, R.C. y col., *J. Immunol.*, 160:1466 (1998)). Quizás lo más significativo es que se ha demostrado que un péptido antagonista de MCP-1, MCP-1 (9-76), previene el inicio de la enfermedad y reduce los síntomas de la enfermedad (dependiendo del momento de la administración) en el modelo de ratón MRL-1pr de artritis (Gong, J.-H. et al., *J. Exp. Med.*, 186:131 (1997)). Además se ha demostrado que la administración de pequeñas moléculas antagonistas de CCR2 reducía la puntuación clínica en modelos de roedores de artritis (Brodmerkel, C.M. y col., *J. Immunol.*, 175:5370 (2005); y Xia, M. y col., publicación de EE.UU. N° 2006/0069123). La administración de un anticuerpo anti-CCR2 tiene efectos variables en la CIA murina, dependiendo del tiempo de administración (Bruhl, H. y col., *J. Immunol.*, 172:890 (2004)). Estudios recientes con ratones CCR2 $-/-$ han sugerido que la delección de CCR2 puede exacerbar los modelos de artritis de roedores en circunstancias experimentales específicas (Quinones, M.P. y col., *J. Clin. Invest.*, 113:856 (2004); Quinones, M.P. y col., *J. Mol. Med.*, 84:503 (2006)).

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

Los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 típicamente exhiben resistencia a la insulina como una de las características distintivas de la enfermedad. La resistencia a la insulina también se asocia con el agrupamiento de anomalías conocidas como el "síndrome metabólico" o "síndrome X", que incluye obesidad, aterosclerosis, hipertensión y dislipidemia (revisado en: Eckel y col., *Lancet*, 365:1415 (2005)). Está bien reconocido que la inflamación desempeña una función en la exacerbación del proceso de enfermedad en la diabetes de tipo 2 y las

patologías del “síndrome X” (revisado en: Chen, H., *Pharmacological Research*, 53:469 (2006); Neels y col., *J. Clin. Invest.*, 116:33 (2006); Danadona y col., *Am. J. Cardiol.*, 90:27G-33G (2002); Pickup y col., *Diabetologia*, 41:1241 (1998)). Se reconoce que la MCP-1 desempeña una función en la resistencia a la insulina inducida por obesidad. En cultivo, los preadipocitos humanos expresaron constitutivamente MCP-1 (Gerhardt, *Mol. Cell. Endocrinology* 2001)).

5 CCR2 se expresa en los adipocitos; la adición de MCP-1 a los adipocitos diferenciados *in vitro* disminuye la captación de glucosa estimulada por insulina y la expresión de varios genes adipogénicos (LpL, adiposina, GLU-4), aP2, el receptor adrenérgico β 3 y PPAR γ (Sartipy, P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6902 (1999)). Los pacientes con diabetes de tipo 2 tuvieron mayores niveles de MCP-1 circulante que los controles no diabéticos (Nomura, y col., *Clin. Exp. Immunol.* 121:437 (2000)) y la liberación de MCP-1 del tejido adiposo se podría reducir

10 mediante el tratamiento con terapias antidiabéticas tales como metformina o tiazolidindionas (Bruun, J.M. y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90:2282 (2005)). De la misma manera, la MCP-1 también estaba sobreexpresada en modelos experimentales murinos de obesidad y estaba principalmente producida por el tejido adiposo (Sartipy y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:7265 (2003)). En ratones obesos, la expresión de MCP-1 precedió y se produjo de forma concurrente con el comienzo de la resistencia a la insulina (Xu, H. y col., *J. Clin. Invest.*, 112:1821 (2003)).

15 En otro estudio se mostró que la expresión de MCP-1 se correlacionaba positivamente con la masa corporal en el tejido adiposo perigonadal de ratones (Weisberg y col., *J. Clin. Invest.*, 112:1796 (2003)). Coherente con estos datos, el desarrollo de la resistencia a insulina en ratones db/db mejoró mediante la eliminación genética de MCP-1 o mediante la expresión inducida por genes de un péptido negativo dominante (Kanda, H. y col., *J. Clin. Invest.*, 116:1494 (2006)). La lógica inversa también se pudo demostrar: la sobreexpresión de MCP-1 en el tejido adiposo estimuló la resistencia a insulina (Kamei, N. y col., *J. Biol. Chem.*, 281:26602 (2006)). También ha aparecido un resultado conflictivo que muestra que la delección genética de MCP-1 no afecta a la resistencia a insulina en ratones db/db (Chow, F.Y. y col., *Diabetologia*, 50:471 (2007)). Coherente con el dato de MCP-1, los estudios directos con CCR2 (el receptor de MCP-1) han mostrado que desempeña una función en la formación de obesidad y en la resistencia a insulina inducida por obesidad. El mantenimiento de una dieta rica en grasas aumentó el número de

20 monocitos inflamatorios CCR2+ circulantes tanto en ratones de tipo silvestre (Tsou, C.L. y col., *J. Clin. Invest.*, 117:902 (2007)) como en ratones ApoE -/- (Tacke, F. y col., *J. Clin. Invest.*, 117:185 (2007)). La eliminación genética de CCR2 redujo el número de macrófagos activados en tejido adiposo murino (Lumeng, C.N. y col., *Diabetes*, 56: 16 (2007)), pero no afectó a una población de macrófagos adiposos M2 que se cree que mantienen el estado “delgado” (Lumeng, C.N. y col., *J. Clin. Invest.*, 117:175 (2007)). La eliminación genética de CCR2 redujo la obesidad inducida por la dieta y mejoró la sensibilidad a insulina en el modelo de obesidad inducida por la dieta (Weisberg, S.P. et al., *J. Clin. Invest.*, 116:115 (2006); Cornelius, P. et al., Publicación PCT N° WO 2006/013427 A2), dependiendo de condiciones experimentales (Chen, A. y col., *Obes Res.*, 13:1311 (2005)). La administración de pequeñas moléculas antagonistas de CCR2 también mejoró la sensibilidad a insulina en este mismo modelo (Weisberg, S.P. y col., *J. Clin. Invest.*, 116:115 (2006)).

35 En dos estudios se ha descrito la importante función de CCR2 en la inflamación vascular inducida por hipertensión, remodelación e hipertrofia (Bush, E. y col., *Hypertension*, 36:360 (2000); Ishibashi, M. et al., *Circ. Res.*, 94:1203 (2004)).

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

Se sabe que la MCP-1 está regulada por aumento en pacientes que desarrollan el síndrome de la bronquiолitis obliterante después del trasplante de pulmón (Reynaud-Gaubert, M. y col., *J. Heart Lung Transplant.*, 21:721-730 (2002); Belperio, J. y col., *J. Clin. Invest.*, 108:547-556 (2001)). En un modelo murino del síndrome de la bronquiолitis obliterante, la administración de un anticuerpo frente a MCP-1 condujo a la atenuación de la obstrucción de las vías respiratorias; de la misma manera, los ratones CCR2 -/- fueron resistentes a la obstrucción de las vías respiratorias en este mismo modelo (Belperio, J. y col., *J. Clin. Invest.*, 108:547-556 (2001)). Estos datos sugieren que el antagonismo de MCP-1/CCR2 puede ser beneficioso en el tratamiento del rechazo de órganos después del trasplante. Además, en los estudios se ha mostrado que la alteración del eje MCP-1/CCR2 era capaz de prolongar la supervivencia del trasplante de islotes (Lee, I. y col., *J. Immunol.*, 171:6929 (2003); Abdi, R. y col., *J. Immunol.*, 172:767 (2004)). En modelos de injerto en ratas, se demostró que CCR2 y MCP-1 estaban regulados por aumento en injertos que desarrollan vasculopatía del injerto (Horiguchi, K. y col., *J. Heart Lung Transplant.*, 21:1090 (2002)). En otro estudio, la terapia génica anti-MCP-1 atenuó la vasculopatía del injerto (Saiura, A. y col., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24:1886 (2004)). En un estudio se describió la inhibición de la formación de la neointima en el

injerto venoso experimental mediante el bloqueo de MCP-1 (Tatewaki, H. y col., *J. Vasc. Surg.*, 45:1236 (2007)).

En otros estudios se ha demostrado el potencial valor terapéutico del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento del asma. El secuestro de MCP-1 con un anticuerpo neutralizante en ratones expuestos a ovoalbúmina dio como resultado una disminución marcada en la hiperrespuesta e inflamación bronquial (Gonzalo, J.-A. y col., *J. Exp. Med.*, 188:157 (1998)). Se ha demostrado que era posible reducir la inflamación alérgica de las vías respiratorias en ratones expuestos a huevos de *Schistosoma mansoni* mediante la administración de anticuerpos contra MCP-1 (Lukacs, N.W. y col., *J. Immunol.*, 158:4398 (1997)). Coherente con esto, los ratones MCP-1 -/- presentaron una respuesta reducida a la exposición a huevos de *Schistosoma mansoni* (Lu, B. y col., *J. Exp. Med.*, 187:601 (1998)).

En otros estudios se ha demostrado el potencial valor terapéutico del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la enfermedad renal. La administración de anticuerpos contra MCP-1 en un modelo murino de glomerulonefritis dio como resultado una marcada disminución de la formación de la media luna glomerular y la deposición del colágeno de tipo I (Lloyd, C.M. et al., *J. Exp. Med.*, 185:1371 (1997)). Además, los ratones MCP-1 -/- con nefritis sérica nefrotóxica inducida mostraron un daño tubular significativamente menor que sus homólogos MCP-1+/+ (Tesch, G.H. et al., *J. Clin. Invest.*, 103:73 (1999)).

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

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

En dos informes se ha descrito la sobreexpresión de MCP-1 en las células epiteliales intestinales y la mucosa de intestino de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (Reinecker, H.C. y col., *Gastroenterology*, 108:40 (1995), y Grimm, M.C. y col., *J. Leukoc. Biol.*, 59:804 (1996)).

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

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

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

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

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

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

En un estudio se describió la función crítica de MCP-1 en la miocardiopatía isquémica (Frangogiannis, N.G. et al., *Circulation*, 115:584 (2007)). En otro estudio se describió la atenuación de la insuficiencia cardíaca experimental después de la inhibición de MCP-1 (Hayashidani, S. y col., *Circulation*, 108:2134 (2003)).

En otros estudios se han proporcionado pruebas de que MCP-1 está sobreexpresada en varios estados de enfermedad que no se han mencionado en lo que antecede. Estos informes proporcionan pruebas correlativas de que los antagonistas de MCP-1 podrían ser tratamientos útiles para tales enfermedades. En otro estudio se ha demostrado la sobreexpresión de MCP-1 en aloinjertos cardíacos en roedores, lo que sugiere una función para MCP-1 en la patogenia de la arteriosclerosis del trasplante (Russell, M.E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6086 (1993)). Se ha observado sobreexpresión de MCP-1 en las células endoteliales pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Antoniades, H.N. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5371 (1992)). De manera similar, la sobreexpresión de MCP-1 se ha observado en la piel de pacientes con psoriasis (Deleuran, M. y col., *J. Dermatol. Sci.*, 13:228 (1996), y Gillitzer, R. y col., *J. Invest. Dermatol.*, 101:127 (1993)); también se han notificado hallazgos correlativos con predominancia de células CCR-2+ (Vestergaard, C. y col., *Acta Derm. Venerol.*, 84:353 (2004)). Por último, en un informe reciente se ha mostrado que MCP-1 se sobreexpresa en los cerebros y el líquido cefalorraquídeo de pacientes con demencia asociada al VIH-1 (Garzino-Demo, A., publicación PCT N° WO 99/46991).

Además, se ha mostrado que el polimorfismo de CCR-2 está asociado con la sarcoidosis al menos en un subconjunto de pacientes (Spagnolo, P. y col., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 168:1162 (2003)).

También debe destacarse que se ha implicado a CCR-2 como un correceptor para algunas cepas de VIH (Doranz, B.J. y col., *Cell*, 85:1149 (1996)). También se ha determinado que el uso de CCR-2 como un correceptor de VIH puede correlacionarse con la progresión de la enfermedad (Connor, R.I. y col., *J. Exp. Med.*, 185:621 (1997)). Este hallazgo es coherente con el hallazgo reciente de que la presencia de un mutante de CCR-2, CCR2-641, se correlaciona positivamente con el comienzo tardío del VIH en la población humana (Smith, M.W. y col., *Science*, 277:959 (1997)). Aunque no se ha implicado a la MCP-1 en estos procedimientos, puede ser que los antagonistas de MCP-1 que actúan mediante la unión a CCR-2 puedan tener efectos terapéuticos beneficiosos en el retraso de la progresión de la enfermedad a SIDA en pacientes infectados por VIH.

Cabe destacar que CCR-2 es también el receptor de las quimiocinas humanas MCP-2, MCP-3 y MCP-4 (Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998)). Dado que los compuestos nuevos de fórmula (I) descritos en la presente memoria son antagonistas de MIP-1 a través de la unión al receptor CCR-2, es posible que estos compuestos de fórmula (I) también sean antagonistas eficaces de las acciones de MCP-2, MCP-3, and MCP-4 mediadas por CCR-2. De acuerdo con esto, cuando en la presente memoria se hace referencia a "antagonismo de MIP-1", debe suponerse que es equivalente a "antagonismo de la estimulación por quimiocinas de CCR-2".

Por consiguiente, los compuestos que modulan la actividad de las quimiocinas podrían demostrar una amplia gama de utilidades en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares. Las publicaciones PCT n° WO 2005/021500 A1 (incorporadas en la presente memoria por

referencia y asignadas al presente solicitante), los documentos WO 2008/01438-1-A1, WO 2008/014360 A1 y WO 2008/014361 A1, divulgan compuestos que modulan la actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4 a través de CCR-2. Las referencias también divulgan varios procedimientos de preparación de estos compuestos, incluida la síntesis de múltiples etapas que incluyen la introducción y posterior eliminación de grupos protectores.

5 Es deseable encontrar compuestos nuevos con mejores características farmacológicas en comparación con moduladores de las quimiocinas. Por ejemplo, es deseable encontrar nuevos compuestos con actividad inhibidora doble equipotencial de CCR-2 en comparación con la selectividad por CCR-2 sola, predominantemente CCR-2 frente a CCR-5 frente a CCR-2 u otros receptores acoplados a proteína G (es decir el receptor 5HT2A). También se desea encontrar compuestos con actividad inhibidora doble equipotencial de CCR-2/5 y características ventajosas en una o más de las siguientes categorías:

- 10
- (a) propiedades farmacéuticas (es decir, solubilidad, permeabilidad, posibilidad de formulaciones de liberación sostenida);
 - b) requisitos de dosificación (por ejemplo, dosis menores y/o dosificación una vez al día);
 - 15 (c) factores que disminuyan las características pico a valle de la concentración sanguínea (es decir la eliminación y/o volumen de distribución);
 - (d) factores que aumentan la concentración de fármaco activo en el receptor (es decir, unión de proteínas, volumen de distribución);
 - (e) Factores que disminuyen el inconveniente de las interacciones clínicas fármaco-fármaco (inhibición o inducción de la enzima del citocromo P450, tales como inhibición de CYP 2D6, véase Dresser, G.K. et al., Clin. Pharmacokinet., 38:41-57 (2000); y
 - 20 (f) factores que disminuyen el potencial para los efectos secundarios adversos (por ejemplo, la selectividad farmacológica más allá de los receptores acoplados a proteínas G, la reactividad potencial química

o metabólica, la penetración limitada en el SNC, la selectividad por canales iónicos). Es especialmente deseable encontrar compuestos que tengan una combinación deseable de las características farmacológicas mencionadas en lo que antecede.

También es deseable en la técnica proporcionar nuevos y/o mejores procedimientos de preparación de dichos compuestos. Estos procedimientos de pueden caracterizar, sin limitaciones, por a) una adaptación fácil a la producción a mayor escala, tales como a escalas de planta piloto o de fabricación; b) etapas y/o técnicas del procedimiento que permitan mejoras en la pureza (incluida la pureza quiral), la estabilidad y/o la facilidad de manipulación de los intermedios y/o compuestos finales; y/o c) menos etapas del procedimiento.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un nuevo antagonista: N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que tiene una actividad doble equipotencial deseada inesperada y actividad inhibidora del receptor CCR-5. Además, la presente invención presenta una nueva e inesperada combinación de características farmacológicas deseables y actividad doble equipotencial de CCR-2/5. También se proporcionan formas cristalinas y metabolitos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y las mismas para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares también es un objetivo de la presente invención, La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida de acuerdo con la reivindicación 15.

La presente divulgación también proporciona el uso de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunitarias, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares.

La presente divulgación proporciona también metabolitos de compuestos activos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, composiciones farmacéuticas de los mismos y dichos metabolitos para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares, en particular diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y/o aterosclerosis.

De acuerdo con esto, en la presente memoria se divulgan nuevos modulares de la actividad de las quimiocinas, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que tienen una combinación inesperada de características farmacológicas deseables.

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

La presente divulgación también proporciona dichos compuestos para uso en el tratamiento de enfermedades

inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares, en particular diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y/o aterosclerosis.

La presente divulgación proporciona un procedimiento de preparación de compuestos divulgados en la presente memoria e intermedios útiles.

- 5 La presente divulgación un los compuestos de la presente invención para uso en terapia.

La presente divulgación proporciona el uso de compuestos de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares.

Breve descripción de las figuras

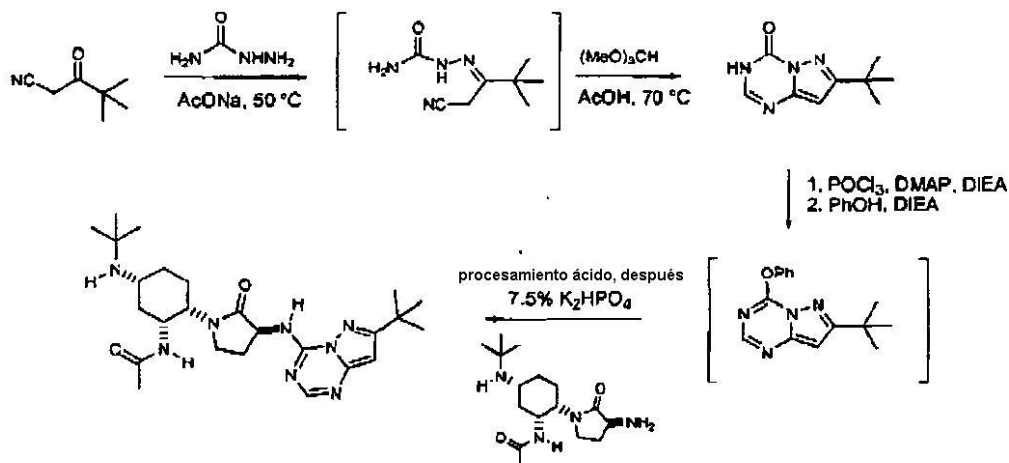
- 10 La Figura 1 divulga los patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida.

La Figura 2 divulga el análisis de calorimetría de barrido diferencial de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-1.

- 15 La Figura 3 divulga el análisis termogravimétrico de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-1.

Descripción detallada de la invención

- La presente invención proporciona un nuevo antagonista: N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que tiene una actividad doble equipotencial deseada inesperada y actividad del receptor CCR-5. Adicionalmente, la presente invención proporciona una nueva combinación de características farmacológicas deseables. También se proporcionan formas cristalinas y metabolitos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y las mismas para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares también es un objetivo de la presente invención. La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, que comprende el procedimiento expuesto en el esquema siguiente.



En la presente memoria también se proporcionan compuestos que son intermedios útiles del procedimiento.

- 30 N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida demuestra inesperadamente actividad inhibidora doble equipotencial del receptor CCR-2/5.

- Adicionalmente, N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida demuestra una combinación deseable de actividad inhibidora doble equipotencial del receptor CCR-2/5 y características farmacológicas, incluyendo un sorprendente elevado grado de biodisponibilidad oral en combinación con indicaciones que es altamente eficaz y tiene excelentes criterios de seguridad.

Los moduladores conocidos de receptores de quimiocinas, tales como los divulgados en las publicaciones de PCT N° WO 2004/071460 A1 y WO 2005/021500 A1 (patente de EE.UU. N° 7.163.937, concedida el 16 de enero de

2007, asignada al presente Solicitante) no son suficientemente eficaces, como se mide mediante su capacidad de unión a CCR-2 or CCR-5 (una medida de eficacia) y/o su falta de criterios adecuados de seguridad como se indica mediante la selectividad de canales iónicos como se mide mediante los estudios de los canales iónicos hERG y Na+.

5 Otros moduladores conocidos de receptores de quimiocinas, tales como los divulgados en las publicaciones de PCT N° WO 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 and WO 2008/014361 A1, son selectivos como antagonistas o agonistas/antagonistas parciales de la actividad del receptor CCR-2. No obstante, estos moduladores conocidos demuestran predominantemente CCR-2 y no son antagonistas dobles equipotenciales, medido mediante su capacidad de unión a CCR-2 y CCR-5.

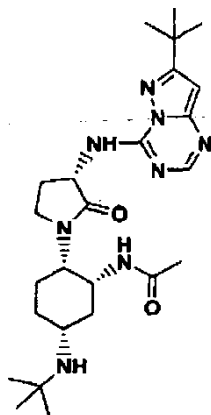
10 Otros moduladores conocidos de receptores de quimiocinas, tales como los divulgados por Carter et al. (American Chemical Society, August 17, 2008) son moduladores dobles de CCR-2/5 pero carecen de criterios adecuados para la seguridad, como se indica mediante la selectividad de los canales iónicos medida mediante estudios de los canales iónicos hERG y Na+.

15 Por el contrario, como se ilustra mediante los datos presentados en la presente memoria en la sección titulada "Características Farmacológicas Comparativas", más adelante, N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-5-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida exhiba sorprendentemente capacidad de unión equipotencial a CCR-5 y CCR-2. Además, N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida demuestra un grado sorprendentemente alto de permeabilidad de membrana y a pesar de todo todavía mantiene una capacidad de unión doble equipotencial a CCR2 junto con la excelente selectividad de los canales iónicos.

20 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona nuevos moduladores de quimiocinas que tienen una capacidad de unión equipotencial a CCR-2 y CCR-5 y características farmacológicas mejoradas que se espera que sean útiles en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares.

Realizaciones

25 En una realización, la divulgación está dirigida a N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida.



y sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

30 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida.

Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, en la que la forma cristalina comprende la Forma N-1, en la que la forma N-1 se caracteriza por parámetros de celda unitaria sustancialmente iguales a los siguientes:

35 Dimensiones de la celda:

$$a = 7,3085(6)$$

$$b = 16,257(1)$$

$$c = 22,688(2)$$

$$\alpha^\circ = 90$$

40 $\beta^\circ = 90$

$$\gamma^\circ = 90$$

Grupo espaciador P_{2,2,2}₁
 Moléculas/celda unitaria (Z): 1
 Densidad, calc. g-cm⁻³: 1,194

en la que dicho cristal está a una temperatura de aproximadamente -70° C.

- 5 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, en la que la forma cristalina comprende la forma N-1 en forma sustancialmente pura.

Otra realización es la forma N-1 caracterizada por (o que tiene) un patrón de difracción de rayos X sustancialmente de acuerdo con la Figura 1.

- 10 Otra realización es la forma N-1 caracterizada por (o que tiene) un termograma de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente de acuerdo con el mostrado en la Figura 2, que tiene una transición endotérmica por encima de aproximadamente 205° C.

Otra realización se caracteriza por (o que tiene) una curva de análisis termogravimétrico de acuerdo con la mostrada en la Figura 3.

- 15 Otra realización es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, que comprende la forma N-1 caracterizada por los parámetros de celda unitaria encontrados en la Tabla 1; y/o un patrón de difracción en polvo de rayos X sustancialmente de acuerdo con la Figura 1.

- 20 Otra realización es una composición farmacéutica, que comprende N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

Otra realización es una composición farmacéutica, que comprende N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 Otras realizaciones es una composición farmacéutica, que comprende N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma y al menos un agente terapéutico adicional.

- 30 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en la modulación de las quimiocinas o la actividad de los receptores de quimiocinas.

Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en la modulación de la actividad de los receptores CCR-2 y CCR-5.

- 35 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en la modulación de la actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1a, MIP-1b y RANTES que está mediada por el receptor CCR-2 y CCR-5.

- 40 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en la modulación de la actividad de MCP-1.

- 45 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno, en el que dicho trastorno se selecciona de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, dolor neuropático, miocardiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esclerodermia, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada al VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis del trasplante, traumatismo cerebral inducido físicamente o químicamente, enfermedad inflamatoria intestinal, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis por suero neurotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia de la neointima venosa, hiperplasia de la neointima de inserción de diálisis, hiperplasia de la íntima de derivación arteriovenosa, trasplante de órganos, nefropatía crónica de aloinjertos y cáncer.

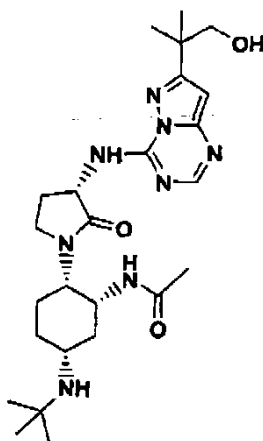
Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno, en el que dicho trastorno se selecciona de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn,

- psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis del trasplante, traumatismo cerebral inducido físicamente o químicamente, enfermedad inflamatoria intestinal, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis por suero neurotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis y artritis reumatoide, reestenosis, trasplante de órganos, cáncer, hiperplasia de la neointima venosa, hiperplasia de la neointima en la inserción de la diálisis e hiperplasia de la neointima por derivación arteriovenosa.
- 5 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno, en el que dicho trastorno se selecciona de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis, trasplante de órganos, hiperplasia de la neointima venosa, hiperplasia de la neointima en la inserción de la diálisis e hiperplasia de la neointima por derivación arteriovenosa.
- 10 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno, en el que dicho trastorno se selecciona de esclerosis múltiple, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, diabetes, hiperplasia de la neointima venosa, hiperplasia de la neointima en la inserción de la diálisis e hiperplasia de la neointima por derivación arteriovenosa.
- 15 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno, en el que dicho trastorno se selecciona de restenosis, trasplante de órganos, cáncer, hiperplasia de la neointima venosa, hiperplasia de la neointima en la inserción de la diálisis e hiperplasia de la neointima por derivación arteriovenosa.
- 20 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la diabetes.
- 25 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn.
- Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 30 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis.
- Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la restenosis.
- 35 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento del trasplante de órganos.
- 40 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento del cáncer, por ejemplo cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de próstata y melanoma.
- Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la hiperplasia de la neointima venosa.
- 45 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la hiperplasia de la neointima en la inserción de diálisis.
- Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de la hiperplasia de la neointima por derivación arteriovenosa.
- 50 Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatoria, alérgica, autoinmune, metabólica y/o cardiovasculares.

Otra realización es N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad que está al menos parcialmente mediada por CCR-2 y CCR-5.

- 5 Otra realización es un procedimiento de utilización de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno, en el que dicho trastorno se selecciona de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, dolor neuropático, miocardiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esclerodermia, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada al VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis del trasplante, traumatismo cerebral inducido físicamente o químicamente, enfermedad inflamatoria intestinal, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis por suero neurotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia de la neointima venosa, hiperplasia de la neointima de inserción de diálisis, hiperplasia de la íntima de derivación arteriovenosa, trasplante de órganos, nefropatía crónica de aloinjertos, cáncer, hiperplasia de la neointima venosa, hiperplasia de la neointima en la inserción de la diálisis e hiperplasia de la neointima por derivación arteriovenosa.

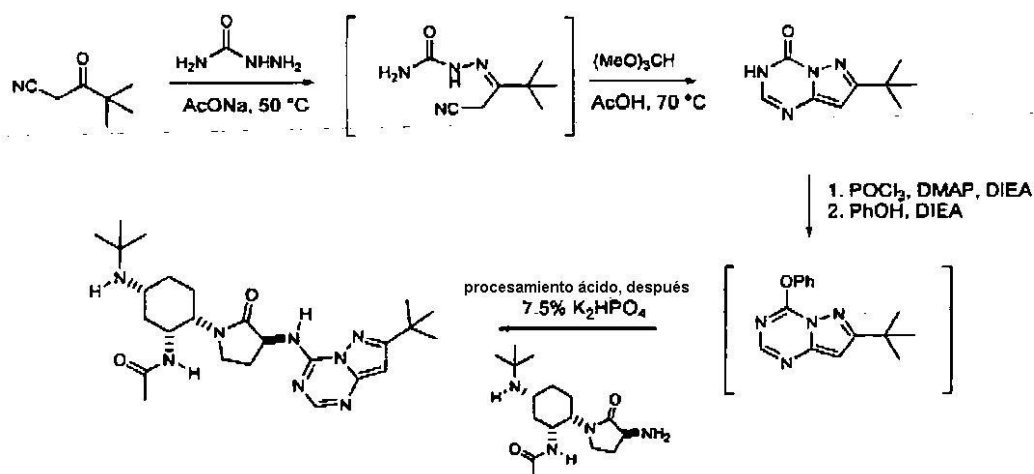
En otra realización más, la divulgación está dirigida a N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida.



- 20 y sales farmacéuticamente aceptables de la misma. Las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y las mismas para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y/o cardiovasculares también es una realización de la presente invención,

Realizaciones del procedimiento

- 25 En una primera realización, la presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, que comprende el procedimiento expuesto en el esquema siguiente.



La presente invención puede estar contemplada en otras formas específicas sin desviarse de las características esenciales de la misma. Por tanto, las realizaciones anteriores no se deben considerar limitantes. Todas y cada una de las realizaciones de la presente invención pueden tomarse junto con cualquier otra realización o realizaciones para describir realizaciones adicionales. Cada elemento individual (p, ej., aspectos preferibles o especiales) de las realizaciones es su propia realización independiente. Además, se pretende que cualquier elemento de una realización se combine con todos y cada uno de los demás elementos de cualquiera de las realizaciones para describir una realización adicional. Además, la presente invención abarca combinaciones de diferentes realizaciones, partes de realizaciones, definiciones, descripciones y ejemplos de la invención indicados en la presente memoria,

Definiciones

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

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo sustituido asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. En la técnica se sabe bien cómo preparar formas ópticamente, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. Se pretenden todas las formas quirales, diaestereoméricas, racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica específica.

Un enantiómero de los compuestos divulgados en la presente memoria puede mostrar una actividad superior en comparación con el otro. Por tanto, todas las estereoquímicas se consideran una parte de la presente invención. Cuando sea necesario se puede conseguir la separación del material racémico mediante HPLC usando una columna quiral o mediante resolución usando un agente de resolución tal como cloruro canfónico, como en Young, S.D. y col., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2602-2605 (1995).

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria descriptiva para hacer referencia a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una razonable proporción de beneficios/riesgos.

Como se usa en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" hacen referencia a derivados de los compuestos divulgados en los que el compuesto parental se modifica fabricando sales de ácidos o bases de los mismos. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos, tales como aminas; y sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternarias del compuesto parental formado, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos, tales como clorhídrico, benzenosulfónico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares,; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, trifluoroacético y similares.

- Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido por procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se pueden preparar mediante la reacción del ácido libre o las formas básicas de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido adecuados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 17 ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, pág. 1418 (1985).
- Con "compuesto estable" y "estructura estable" se quiere indicar un compuesto que es lo suficientemente sólido como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado de pureza útil de una mezcla de reacción y la formulación en un agente terapéutico eficaz. En la presente invención se pretende expresar compuestos estables.
- Con "cantidad terapéuticamente eficaz" se pretende incluir una cantidad de un compuesto de la presente invención solo o una cantidad de la combinación de compuestos reivindicados o una cantidad de un compuesto de la presente invención en combinación con otros principios activos eficaces para inhibir CCR-2 y CCR-5 o eficaces para tratar o prevenir trastornos como se indica en la presente memoria.
- Como se usa en la presente memoria, "tratar" o "tratamiento" cubren el tratamiento de un estado de enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluyen: (a) prevenir que se produzca el estado de enfermedad en un mamífero, en particular cuando dicho mamífero está predispuesto a sufrir el estado de enfermedad pero todavía no se le ha diagnosticado; (b) inhibir el estado de enfermedad, es decir detener su desarrollo; y/o (c) aliviar el estado de enfermedad, es decir producir la regresión del estado de enfermedad.
- Los nombres que se usan en la presente memoria para denominar una forma específica, por ejemplo, "N-1", no deben considerarse limitantes con respecto a ninguna otra sustancia que posea características físicas y químicas similares o idénticas, sino más bien debe entenderse que estas denominaciones son meros identificadores que deben interpretarse de acuerdo con la caracterización de la información también presentada en la presente memoria.
- La presente invención proporciona formas cristalinas de la base libre de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, como material nuevo, en particular en una forma farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones preferidas, las formas cristalinas de la base libre están en forma sustancialmente pura. Realizaciones preferidas de la base libre se divulgan en los ejemplos como la forma N-1. Adicionalmente, se cree que la base libre puede existir como la forma P-1 y/o una combinación de las formas N-1 y P-1.
- Como se usa en la presente memoria, "polimorfo" se refiere a formas cristalinas que tienen la misma composición química pero distintas configuraciones espaciales de las moléculas, átomos y/o iones que forman el cristal.
- Como se usa en la presente memoria, "solvato" se refiere a una forma cristalina de una molécula, átomo y/o iones que además contiene moléculas de un disolvente o disolventes incorporadas en la estructura cristalina. Las moléculas de disolvente pueden estar presentes en el solvato en una configuración regular y/o en una configuración no ordenada. El solvato puede comprender una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de las moléculas de disolvente. Por ejemplo, un solvato con una cantidad no estequiométrica de moléculas de disolvente puede ser el resultado de la pérdida parcial de disolvente del solvato.
- Se pretende que la invención incluya todos los isótopos de los átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Como ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos de carbono incluyen ¹³C y ¹⁴C. Los compuestos marcados con isótopos de la invención generalmente se pueden preparar por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos en la presente memoria, usando un reactivo marcado con isótopo apropiado en lugar del reactivo no marcado que se usa en otros casos.
- Como se usa en la presente memoria, "amorfo" se refiere a una forma sólida de una molécula, átomo y/o iones que no es cristalina. Un sólido amorfo no presenta un patrón de difracción de rayos X definitivo.
- Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente pura", cuando se usa en referencia a una forma cristalina, significa un compuesto que tiene una pureza mayor del 90% en peso, incluyendo mayor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y 99% en peso, y también incluye igual a aproximadamente el 100% en peso del compuesto I, basado en el peso del compuesto. El material restante comprende otra/s forma/s del compuesto y/o las impurezas de la reacción y/o las impurezas del procesamiento que surgen de su preparación. Por ejemplo, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida base libre o sal, puede considerarse sustancialmente pura en cuanto que tiene una pureza mayor del 90% en peso, como se mide por medios que se conocen en este momento y son generalmente aceptados en la técnica, en la que menos del 10% restante de material en peso comprende otra/s forma/s de N-((1R, 2S, 5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, y/o impurezas de la reacción y/o impurezas del procesamiento.
- Las muestras de las formas cristalinas pueden proporcionarse con homogeneidad de fases sustancialmente pura, lo

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

Preferentemente, la forma cristalina tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura como se indica mediante menos del 10%, preferentemente menos del 5% y más preferentemente menos del 2% del área de pico total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los picos extras que están ausentes en el patrón PXRD simulado. Lo más preferente es una forma cristalina que tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura como se indica mediante menos del 1 % del área de pico total en el patrón de PXRD que surge de los picos adicionales que están ausentes en el patrón PXRD simulado.

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

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

Se pueden usar otros medios de caracterizar la forma, tales como resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR), calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. Estos parámetros también se pueden usar en combinación para caracterizar la forma sujeto.

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

En una realización de la invención, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, se proporciona en forma sustancialmente pura. Esta forma cristalina puede emplearse en composiciones farmacéuticas que pueden incluir opcionalmente uno o más de otros componentes seleccionados, por ejemplo, del grupo que consiste en excipientes, vehículos y uno de otros ingredientes farmacéuticamente activos o entidades químicas activas de diferentes estructuras moleculares.

Preferentemente, la forma cristalina tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura como se indica mediante menos del 10%, preferentemente menos del 5% y más preferentemente menos del 2% del área de pico total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los picos extras que están ausentes en el patrón PXRD simulado. Lo más preferente es una forma cristalina que tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura como se indica mediante menos del 1 % del área de pico total en el patrón de PXRD que surge de los picos adicionales que están ausentes en el patrón PXRD simulado.

En otra realización se proporciona una composición que consiste esencialmente en las formas cristalinas de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal. La composición de esta realización puede comprender al menos el 90% en peso de la forma, en base a su peso en la composición.

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

Las formas cristalinas se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos, incluyendo, por ejemplo, la cristalización o recristalización de un disolvente adecuado, la sublimación, el desarrollo a partir de un material

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

Los cristales de fármacos, incluyendo polimorfos, procedimientos de preparación y caracterización de los cristales de los fármacos se analizan en Bym, S.R. y col., *Solid-State Chemistry of Drugs*, 2ª Edición, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

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

En un procedimiento de preparación de cristales, la N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, se suspende y/o se agita en un disolvente adecuado para proporcionar una pasta, que se puede calentar para estimular la disolución. El término "pasta", como se usa en la presente memoria, significa una solución saturada de la base libre, que también puede contener una cantidad adicional del compuesto para proporcionar una mezcla heterogénea del a una temperatura dada. Disolventes adecuados en este sentido incluyen, por ejemplo, disolventes polares apróticos y disolventes polares próticos y mezclas de dos o más de estos, como se divulga en la presente memoria.

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

Una mezcla enfriada puede filtrarse al vacío, y los sólidos aislados pueden lavarse con un disolvente adecuado, tal como disolvente de recristalización frío, y secarse en una purga de nitrógeno para proporcionar la forma cristalina deseada. Los sólidos aislados pueden analizarse con una técnica espectroscópica o analítica adecuada, tal como SSNMR, DSC, PXRD o similar, para asegurar la formación de la forma cristalina preferida del producto. La forma cristalina resultante se produce típicamente en una cantidad de más de aproximadamente el 70% en peso de rendimiento aislado, pero preferentemente más del 90% en peso en base al peso de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, empleada inicialmente en el procedimiento de cristalización. El producto puede co-molerse o pasarse a través de un tamiz de malla para desaglomerar el producto, si es necesario.

Las formas cristalinas pueden prepararse directamente a partir del medio de reacción de la etapa de proceso final para preparar N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal. Esto puede conseguirse, por ejemplo, empleando en la etapa de proceso final un disolvente o mezcla de disolventes a partir de la cual puede cristalizarse el compuesto. Como alternativa, las formas cristalinas pueden obtenerse mediante técnicas de destilación o de adición de disolvente. Los disolventes adecuados para este propósito incluyen cualquiera de los disolventes descritos en la presente memoria, incluyendo disolventes próticos polares, tales como alcoholes, y disolventes apróticos polares, tales como cetonas.

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

ajusta a aproximadamente el 50% en peso, punto en el que típicamente se forma una pasta.

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

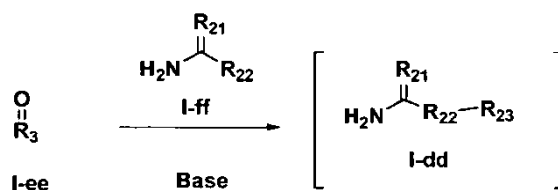
Las diversas formas descritas en la presente memoria pueden distinguirse entre sí mediante el uso de varias técnicas analíticas conocidas por un experto en la técnica. Dichas técnicas incluyen, entre otras, difracción de rayos X en polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y/o análisis termogravimétrico (TGA). Como alternativa, las formas se pueden caracterizar y distinguir usando una sola difracción de rayos X por cristales, que está basada en mediciones de celdas unitarias de un solo cristal de una forma dada a una temperatura analítica fijada. Una descripción detallada de las celdas unitarias se proporciona en Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968). Específicamente, la única configuración de átomos en la relación espacial dentro de la red cristalina se puede caracterizar de acuerdo con las coordenadas atómicas fraccionales observadas. Otro medio para caracterizar la estructura cristalina es por análisis de difracción de rayos X en polvo en el que el perfil de difracción observado se compara con un perfil simulado generado a partir de datos de la estructura cristalina sencilla. Las mediciones de la difracción en polvo de rayos X para la forma sujeto se caracterizan como una serie de valores 2θ (normalmente cuatro o más).

Se pueden usar otros medios de caracterizar la forma, tales como resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR), calorimetría diferencial de barrido, termografía y examen macroscópico de la morfología cristalina o amorfa. Estos parámetros también se pueden usar en combinación para caracterizar la forma sujeto.

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

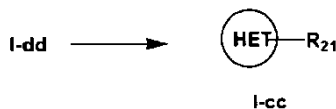
Síntesis

Esquema 1: Preparación de la hidrazona I-dd

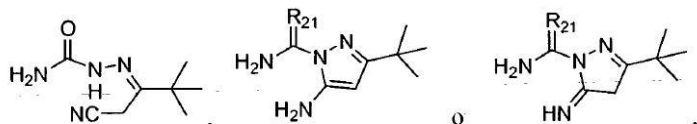


Una carbazida de fórmula If, tal como semicarbazida clorhidrato, se condensó con un compuesto de fórmula I-ee, tal como pivaloil acetonitrilo, en un disolvente, por ejemplo etanol, 2-propanol, 1-propanol y metanol, preferentemente etanol, en presencia de una base, por ejemplo acetato sódico, acetato potásico, trietilamina y *N-N*-diisopropil-*N*-etilamina, preferentemente acetato sódico, a una temperatura en el intervalo de 20-60° C, preferentemente en el intervalo de 25-55° C, para proporcionar el compuesto hidrazona de fórmula I-dd, en el que R₂₁ es =O; R₂₂ es -NH-NH₂; y R₂₃ es cianoalquilo, o R₂₂ y R₂₃ se pueden tomar juntos para formar un anillo de 5 a 8 miembros, en el que el anillo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de amino, alquilo, arilo o heteroarilo y opcionalmente puede contener 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en N, S o O.

Esquema 2: Preparación de la hidrazina de fórmula I-cc



Un compuesto hidrazona de fórmula I-dd, tal como



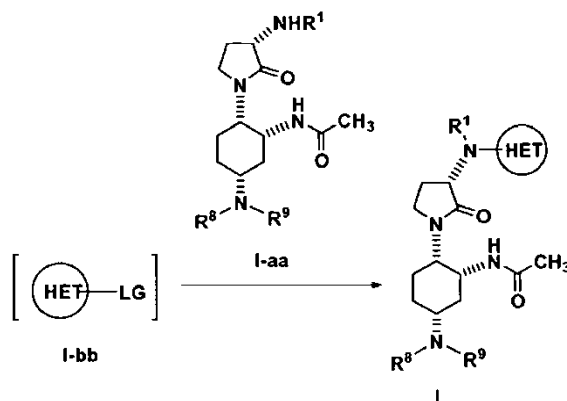
5 Se hizo reaccionar con un ortoformiato, por ejemplo trimetilortoformiato, trietilortoformiato y tripropilortoformiato, preferentemente trimetilortoformiato, ortoformiato en presencia de un ácido, por ejemplo ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico y ácido metanosulfónico, preferentemente ácido acético, a temperatura elevada, tal como 40-90° C, preferentemente a 40-75° C, dando el compuesto hidrazona de fórmula I-cc, en la que R₂₁ = O y R₂₂ y R₂₃ son como se ha indicado anteriormente.

10 **Esquema 3: Conversión del compuesto I-cc**

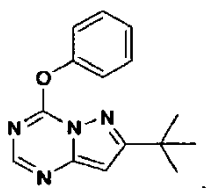


15 Un compuesto hidrazina de fórmula I-cc se convierte en un compuesto de fórmula I-bb, en la que LG es OR₁₆, en el que R₁₆ es alquilo C₁₋₆, fenilo, un heteroarilo de 5 a 7 miembros en el que el heteroarilo tiene uno o más átomos seleccionados de N, S u O, o un cicloalquilo de 3 a 7 miembros, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 grupos seleccionados de halógeno, CF₃ o alquilo C₁₋₆, haciendo reaccionar el compuesto hidrazona de fórmula I-cc, por ejemplo 7-*terc*-butil-3H-pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ona, con un agente acilante, un nucleófilo, tal como dimetil-4-aminopiridina (DMAP), y/o una base de amina terciaria, en un disolvente, por ejemplo acetonitrilo, diclorometano y oxicloriguro de fósforo puro, seguido de intercepción con (i) un alcohol en presencia de una segunda base amina terciaria o (ii) un alcóxido para formar el compuesto de fórmula I-bb. Ejemplos de agentes acilantes que se pueden usar son oxicloriguro de fósforo (POCl₃), cloruro de oxalilo, cloruro de tionilo y fosgeno. Un agente acilante preferido es POCl₃. Trietilamina, *N,N*-diisopropil-*N*-etilamina (DIEA), tri-*n*-propilamina, *N*-metilmorfolina y 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) son ejemplos de bases de amina terciaria que se pueden usar en la conversión. Una base de amina terciaria preferida es DIEA. Generalmente, la cantidad de nucleófilo usada en la reacción es de 2,0 a 4,0, preferentemente 3,0 equivalentes. Ejemplos de alcoholes o alcóxidos que se pueden usar en la conversión son fenol, pentafluorofenol, metanol, etanol, metóxido sódico y fenolato sódico, siendo el fenol el alcohol preferido. Generalmente, la reacción e intercepción se pueden llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de la temperatura ambiente a 70 °C.

Esquema 4: Preparación de un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo

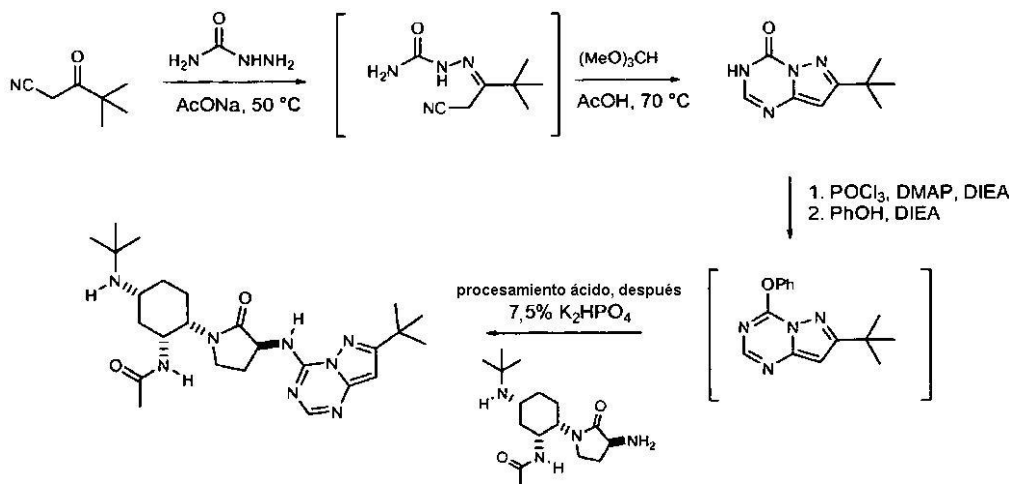


30 Un compuesto de fórmula I-bb, por ejemplo



se acopla con un compuesto de fórmula I-aa, preparado de un modo similar al descrito en el documento WO 2008/014381 A1, en la que R₁ es de forma independiente hidrógeno o un grupo protector de amina seleccionado de un grupo carbobenciloxi (Cbz), un grupo terc-butiloxicarbonilo (BOC), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), un grupo bencilo (Bn) y un grupo p-metoxibencilo (PMB), preferentemente hidrógeno; R₈ and R₉ son de forma independiente hidrógeno o alquilo C₁₋₆; R₂₁ es =O; HET es un heterociclo o anillo bicíclico heteroarilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido que tiene al menos un heteroátomo de nitrógeno, preferentemente de dos a cuatro heteroátomos totales, especialmente cuatro átomos de nitrógeno ; y LG es -OR₁₆, en la que R₁₆ es alquilo C₁₋₆; fenilo, un heteroarilo de 5- a 7 miembros que tiene uno o más átomos seleccionados de N, S u O, o un cicloalquilo de 3 a 7 miembros, todos ellos opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 grupos seleccionados de halógeno, CF₃ o alquilo C₁₋₆, para obtener el correspondiente compuesto de fórmula I, por ejemplo N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-3-(7-*terc*-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal de la misma. El acoplamiento se puede realizar mediante procedimientos de acoplamiento habitualmente conocidos en la técnica o, como alternativa, a través de un procesamiento ácido, seguido de la adición de una base. Ejemplos de ácidos que se pueden usar en el procesamiento ácido son ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glicólico y ácido clorhídrico. Ejemplos de bases que se pueden añadir son K₂HPO₄, Na₂HPO₄, NaHCO₃ y KHCO₃.

Específicamente, la N-((1R,2S,5R)-5-(*terc*-butilamino)-2-((S)-3-(7-*terc*-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida se puede preparar según el esquema siguiente:



Para el procedimiento de la presente invención, los materiales de partida están disponibles comercialmente o un experto en la técnica los puede preparar con facilidad. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente según sea adecuado los disolventes, temperaturas, presiones, materiales de partida que tienen los grupos deseados y otras condiciones de la reacción. El procedimiento se puede realizar a mayor escala con el fin de preparar cantidades más grandes del compuesto de fórmula I, tal como en una instalación de producción comercial.

25 Ejemplos

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

Según sea adecuado, las reacciones se realizaron en una atmósfera de nitrógeno seco (o argón). Para las reacciones anhidras se utilizaron disolventes DRISOLV® de EM. Para otras reacciones, se utilizaron disolventes de calidad reactiva o de calidad HPLC. A menos que se indique otra cosa, todos los reactivos que se obtuvieron en el mercado se usaron tal como se recibieron.

Las mediciones de CL/EM se obtuvieron usando un sistema de espectrómetro de masas cuadrupolo único híbrido Shimadzu HPLC/Waters ZQ. Los datos para el pico de interés se indican a partir de ionización por electronebulización en modo positivo. Los espectros RMN (resonancia magnética nuclear) se obtuvieron típicamente en instrumentos Bruker o JEOL de 400 MHz y 500 MHz en los disolventes indicados. Todos los desplazamientos químicos se indican en ppm a partir de tetrametilsilano con la resonancia del disolvente como patrón interno. Los

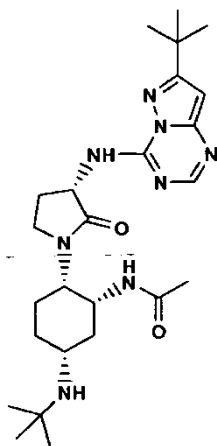
datos de los espectros RMN ^1H se indican típicamente del siguiente modo: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, s a = singlete ancho, d = doblete, dd = doblete de dobletes, t = triplete, c = cuadruplete, sept. = septuplete, m = multiplete, ap. = aparente), constantes de acoplamiento (Hz) e integración.

Un experto en la técnica reconocerá las abreviaturas convencionales usadas en la presente memoria Para facilidad de referencia, las abreviaturas incluyen, pero no se limitan necesariamente a: Hg = mercurio; sat. = saturado, HPLC = cromatografía de líquidos de alto rendimiento, PA = porcentaje de área, KF = Karl– Fischer, TA = temperatura ambiente (a menos que se indique lo contrario, la TA es una temperatura de aproximadamente 22°C), mmol = milimoles, EMAR = espectroscopía de masas de alta resolución. °C= grados centígrados, kg= kilogramo o kilogramos, g= gramo o gramos, mg = miligramo o miligramos, l = litro o litros, ml = mililitro o mililitros, h = hora u horas, M = molar, N = normal, min = minuto o minutos, MHz = megaherzio, v/v = relación volumen : volumen, y % p/p= porcentaje en peso/peso, nm= nanómetro o nanómetros, PPD= pérdida por desecación.

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

Ejemplo 1

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida



Ejemplo 1, Etapa 1: A un matraz de fondo redondo de 3 l se añadió semicarbazida clorhidrato 100,0 g, 0,89 moles), pivaloil acetonitrilo (112,2 g, 0,89 moles) y etanol (1 l) a 22-25° C. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se enfrió hasta 12-15° C y se añadió acetato sódico anhidro (73,5 g, 0,89 moles). La adición del acetato sódico anhidro fue endotérmica, de modo que se elevó la temperatura hasta 22-25°C. La mezcla de reacción se mantuvo a 22-25° C y se agitó durante 60-90 minutos. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC, lo que indicó que la formación de la hidrazona intermedia se había completado.

Ejemplo 1, Etapa 2: Después, la mezcla de reacción se calentó hasta aproximadamente 68-72° C y se añadió trimetilortoformiato (475,7 g, 4,48 moles) durante un periodo de aproximadamente 5-10 minutos. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta 40-45° C y después se añadió ácido acético (53,8 g, 0,89 moles) durante un periodo de 15-20 minutos. Después de completar la adición, la temperatura se elevó hasta 70 \pm 2° C durante un periodo de 20-25 minutos. Una vez a la temperatura prescrita, la mezcla de reacción se agitó durante 18-20 horas. Al final de este periodo, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC, lo que indicó que la formación de la pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina se había completado.

Ejemplo 1, Etapa 3: la pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazina del Ejemplo 1, etapa 2, se concentró a 50-55° C a presión reducida (~0,66-1,33 kPa)(~5-10 mmHg), dando un residuo. Al residuo se añadió tetrahidrofurano (THF, 2 l) y acetona (2 l) y la mezcla resultante se agitó a 50-55° C durante 90 minutos. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de Buckner para eliminar el cloruro sódico (NaCl) resultante y precipita acetato sódico (NaOAc). El filtrado resultante se concentró hasta sequedad a 50 – 55 °C a presión reducida (-53,33-59,85 kPa)(- 400-450 mm Hg), dando un residuo. El residuo se suspendió en 2-metilortoformiato (2-metil-THF, 450 ml) y la mezcla resultante se agitó a 22-55° C durante dos (2) horas. Al finalizar este periodo, la mezcla de reacción se filtró y después se lavó por rociado con 2-metil-THF (100 ml), seguido de éster terc-butilmetílico (MTBE, 200 ml). El producto resultante se secó a 45-50° C a presión reducida (~53,33-59,85 kPa) (~400-450 mm Hg), dando 7-terc-butilpirazolo[1,5-a]triazin-4(3H)-ona (107,0 g, 62,1 % en p/p, pureza HPLC: 99,2 PA a 220 nm). Las etapas 1 a 3 se repitieron a mayor escala para producir cantidades en kilogramos de 7-terc-butilpirazolo[1,5-a]triazin-4(3H)-ona.

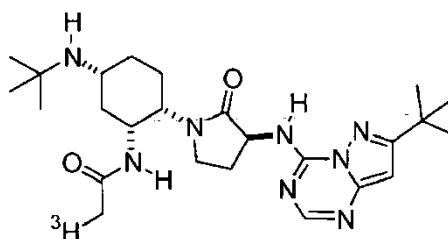
Ejemplo 1, Etapa 4: A un reactor revestido de vidrio se añadió 7-terc-butilpirazolo[1,5-a]triazin-4(3H)-ona (1,0 kg, 5,2 moles), dimetil-4-aminopiridina (1,27 kg, 10,4 moles), acetonitrilo (10 l), y diisopropiletilamina (0,672 kg, 5,2 moles). La pasta resultante se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante un periodo no inferior a

15 minutos hasta formar una solución transparente. La solución transparente se añadió lentamente a un segundo reactor revestido de vidrio que contenía acetonitrilo (6,0 l) y oxiclورو de fósforo (POCl₃, 0,822 kg, 5,3 moles). Después de completada la adición, la mezcla resultante se agitó a menos de 35°C durante 2 horas. Al final de este periodo, la reacción se analizó mediante HPLC, lo que indicó que la formación se había completado. Se añadieron fenol (0,64 kg, 6,8 mole) and diisopropiletamina (0,87 kg) y la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura durante no menos de 1 hora. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC, lo que indicó que la reacción e había completado. A la mezcla de reacción se añadió 1-metil-THF (20 l), seguido de agua (10 l). Las fases orgánica y acuosa se separaron y se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se lavó con una solución de ácido cítrico-salmuera (5% en peso, 10 l) y las fases orgánicas y acuosas resultantes se separaron y la fase acuosa se desechó de nuevo. El lavado con solución de ácido cítrico-salmuera anterior se repitió dos veces más. Tras la finalización de los lavados con solución de ácido cítrico-salmuera se añadió una solución a base de fosfórico potásico (K₂HPO₄, 7,5 % en peso, 10 l). Las fases orgánica y acuosa se separaron y se desechó la fase acuosa. El lavado con solución de K₂HPO₄ anterior se repitió una vez más hasta llegar a pH 8.

Ejemplo 1, Etapa 5: A la fase orgánica básica del Ejemplo 1, etapa 4 se añadió N-[2-(3-amino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-terc-butilamino-ciclohexil]-acetamida (preparada de un modo similar a lo descrito en la publicación de EE.UU. N° 2008/0027083 A1, 1,05 kg). Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Al final de este periodo, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC, lo que indicó que la reacción se había completado. A la mezcla de reacción se añadió agua (20 l), seguido de ácido acético (AcOH, 0,406 kg) y las capas orgánicas y acuosas resultantes se separaron. La capa acuosa se extrajo con 2-metil-THF (10 l). Las capas orgánicas se combinaron y se añadió AcOH (0,406 kg). La mezcla resultante se lavó con agua (10 l) y las capas orgánica y acuosa resultantes se separaron. Esta capa acuosa se extrajo de nuevo con 2-metil-THF (10 l). Las capas acuosas se combinaron de nuevo y añadió diclorometano (DCM, 15 l). Se añadió hidróxido sódico (NaOH, 10 N, 1,04 l) para ajustar el pH a ~ 13,0. Después de finalizada la adición, las capas orgánica y acuosa se separaron de nuevo y la capa de DCM rica en producto se apartó. La capa acuosa se extrajo con diclorometano adicional (10 l). Las capas orgánicas combinadas ricas en DCM se combinaron y lavaron con agua (10 l). La solución resultante rica en DCM se concentró al vacío hasta un volumen mínimo. Se añadió acetato de etilo (EtOAc) y el DCM residual y el agua se destilaron de forma continua, dando una pasta (volumen final ~ 5 l). Se añadió MTBE (15 l) y la pasta resultante se agitó durante no menos de 1 hora. Después de este tiempo, la pasta se filtró y la torta húmeda del filtró se lavó con MTBE adicional (5 l). La torta húmeda se secó a 55 °C al vacío hasta PPD ≤ 0,5 % en peso, dando la base libre amorfa del Ejemplo 1 (rendimiento 0,9 kg, 55 M %, pureza HPLC: 99,5 PA). RMN de ¹H (600,13 MHz, DMSO-d₆) δ 1,04 (s, 9H), 1,34 (s, 9H), 1,58 (m, 3H), 1,64 (m, 2H), 1,81 (s, 3H), 2,05 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 2,36 (m, 1H), 2,93 (s a, 1H), 3,48 (m, 2H), 3,84 (m, 1H), 4,26 (s a, 1H), 4,86 (t, J = 8,9 Hz, 1H), 6,39 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,94 (s a, 1H); ¹³C NMR (125,8 MHz, DMSO-d₆) δ 21,3, 23,3, 25,9, 29,3, 30,0, 32,2, 32,6, 35,5, 43,1, 46,5, 47,7, 50,7, 51,7, 52,5, 92,3, 148,7, 148,8, 152,9, 167,3, 168,5, 171,2; HRMS calcd para C₂₅H₄₀N₈O₂ (M+1) 485,3274, hallado 485,3343.

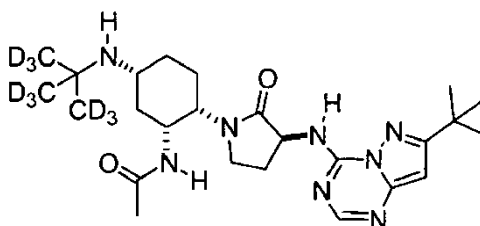
Ejemplo 2

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida marcada con tritio



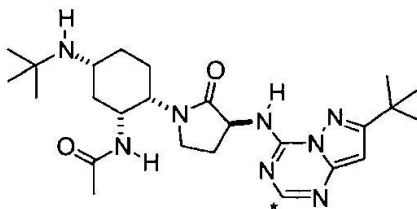
Ejemplo 3

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida marcada con deuterio



Ejemplo 4

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida marcada con carbono 14



*=Posición de marcador ^{14}C

5 Ejemplo 5

Forma cristalina N-1 de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida

Una forma cristalina de base libre de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, incluyendo las formas en sal y solvatos de la misma, se preparó y se caracterizó como se describe a continuación.

Procedimientos para caracterizar las formas

Datos de un monocristal

Los datos se recogieron en un difractoro Bruker–Nonius (Bruker AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711, EE.UU) de serie CAD4. Los parámetros de celda unitaria se obtuvieron a través de análisis por mínimos cuadrados de los ajustes del difractoro experimental de 25 reflexiones de ángulo alto. Las intensidades se midieron usando radiación Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a una temperatura constante con la técnica de barrido variable de $\theta-2\theta$ y se corrigieron sólo para los factores de polarización de Lorentz. Los recuentos de fondo se recogieron en los extremos del barrido para la mitad del tiempo del barrido. Como alternativa, se recogieron los datos de un monocristal en un sistema Bruker–Nonius Kappa CCD 2000 usando radiación Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). La indexación y el procesamiento de los datos de intensidad medidos se realizaron con el paquete de software HKL2000 (Otwinowski, Z. et al. in Macromolecular Crystallography, Carter, W.C., Jr. y col., eds., Academic, NY, publ., Vol. 276, pág, 307-326 (1997)) en el conjunto de programas Collect. (Collect Data collection and processing user interface: Collect: Data collection software, R. Hoof, Nonius B.V., 1998.) Como alternativa, se recogieron los datos de un monocristal en un sistema Bruker-AXS APEX2 CCD usando radiación Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). La indexación y el procesamiento de los datos de intensidad medida se llevaron a cabo con el paquete de software APEX2 /programa suite (Recolección de datos APEX2 e interfaz de usuario para procesamiento: Manual de usuario APEX2, v1,27; BRUKER AXS, INC., 5465 East Cheryl Parkway, Madison, WI 53711 EE.UU.).

Cuando fué conveniente, los cristales se enfriaron en la corriente fría de un sistema Oxford cryo (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: Cosier, J. et al., J. Appl. Cryst., 19:105 (1986)) durante la recogida de datos.

Las estructuras se disolvieron mediante procedimientos directos y se refinaron en base a las reflexiones observadas usando el paquete de software SDP (SDP, Structure Determination Package, Enraf–Nonius, Bohemia NY 11716, Factores de dispersión, incluyendo f' y f'' , en el programa SDP se tomaron "International Tables for Crystallography", Kynoch Press, Birmingham, Inglaterra, Vol. IV, Tablas 2.2A y 2.3.1) con pequeñas modificaciones locales o los paquetes cristalográficos MAXUS (solución maXus y refinamiento de paquete de software: Mackay, S. y col., maXus: un programa informático para la solución y refinamiento de estructuras de cristales a partir de datos de difracción o SHELXTL4. Los parámetros atómicos de derivación (factores de coordinación y temperatura) se refinaron a través de una matriz de mínimos cuadrados completa. La función minimizada en los refinados fue $\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2$, R se define como $\sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$, mientras que $R_w = [\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2 / \sum_w |F_o|^2]^{1/2}$, en la que w es una función ponderada adecuada en base a los errores en las intensidades observadas. Los mapas de diferencia de Fourier se analizaron en todas las etapas de refinado. Se introdujeron hidrógenos en posiciones ideales con factores de temperatura isotrópicos, pero no se variaron los parámetros de hidrógeno.

Difracción de rayos X en polvo (PXRD)

Los datos PXRD se obtuvieron usando un Bruker C2 GADDS. La radiación era Cu K α (40 KV, 50 mA). La distancia entre la muestra y el detector era de 15 cm. Las muestras en polvo se colocaron en capilares de vidrio sellados de 1 mm o menos de diámetro; el capilar se hizo rotar durante la recogida de datos. Los datos se recogieron durante $3 \leq 2 \theta \leq 35^\circ$ con un tiempo de exposición de muestra de al menos 2.000 segundos. Los arcos de difracción bidimensionales resultantes se integraron para crear un patrón PXRD unidimensional con un tamaño de etapa de

0,02 grados 2θ en el intervalo de 3 a 35 grados 2θ . Aproximadamente 200 mg se empaquetaron en un portador de muestras para difracción de rayos X en polvo (PXRD Philips. La muestra se transfirió a una unidad Philips MPD (45 KV, 40 mA, Cu K α). Los datos se recogieron a temperatura ambiente en el intervalo de 2 a 32 2θ (modo de barrido continuo, velocidad de barrido 0,03 grados/s, autodivergencia y hendiduras antidispersión, hendidura receptora: 0,2 mm, centrifugador de muestras: ON)

Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

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

Análisis termogravimétrico (TGA):

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

Preparación y análisis de las formas

Los datos de celda unitaria y otras propiedades de estos ejemplos se presentan en la Tabla 1. Los parámetros de celda unitaria se obtuvieron a partir de análisis cristalográfico por rayos X de un monocristal. Una descripción detallada de las celdas unitarias se puede encontrar en el capítulo 3 de Stout y col., X-Ray Structure Determination: a Practical Guide, Macmillan (1968).

Finalmente, la Figuras 1 presenta el patrón de PXRD para el Ejemplo 5. Las Figuras 2 y 3 divulgan los análisis de DSC y TGA, respectivamente, del ejemplo 5.

Preparación de las Formas, caracterización por XRD, DSC y TGA

25 **Ejemplo 5, Forma N-1, base libre**

N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, forma N-1, se cristalizó en acetato de etilo y MTBE. La Forma N-1 es una forma pura (sin moléculas de agua ni de disolvente de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida. La Forma N-1 se caracterizó por un patrón XRD que se corresponde con el patrón simulado generado a partir de los datos de la estructura del monocristal. La Forma N-1 se caracterizó por termograma de DSC que tenía una endotermia de fusión/descomposición con un inicio típicamente a aproximadamente 205 °C. La forma N-1 se caracterizó por una curva térmica TGA que tenía una pérdida de peso de hasta aproximadamente 210° C.

TABLA 1

| Parámetros de la celda unitaria | |
|---------------------------------|-----------|
| Compuesto | Exp. 5 |
| Estructura | Base |
| Forma | N-1 |
| T | -70 |
| a(Å) | 7,3085(6) |
| b(Å) | 16,257(1) |
| c(Å) | 22,688(2) |
| α° | 90 |
| β° | 90 |
| γ° | 90 |
| V(Å ³) | 2695,4(4) |

| | |
|-------|---|
| Z' | 1 |
| Vm | 673 |
| Sg | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ |
| Dcalc | 1,194 |

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

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

5 V = volumen de celda unitaria

Z' = número de moléculas de fármaco por unidad asimétrica

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

Sg= grupo espaciador

dcalc = densidad de cristal calculada

10 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS COMPARATIVAS

Los ensayos y los datos que comparan las características farmacológicas del Ejemplo 1 y los compuestos que se encuentran en los documentos WO 2005/021500 A1, WO 2008/014381 A1 and WO 2008/014360 A1 se presentan a continuación.

Unión de células mononucleares de sangre periférica humana

15 Véase también: Yoshimura y col., J. Immunol., 145:292 (1990). El ensayo de unión a CCR2 humano se estableció con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCh) usando ¹²⁵I-MCP-1 humana como el ligando indicador. Las PBMCh se aislaron a partir del leukopak humano (Biological Specialty Inc.) usando un protocolo convencional con Ficoll-Hypaque (Mediatech CELLGRO®). Las PBMCh aisladas se lavaron y diluyeron hasta 1 x 10⁷/ml en tampón de unión (RPMI-1640, BSA al 0,1%, Hepes 20 mM, pH 7,4). ¹²⁵I-MCP-1 (NEN/Perkin Elmer) se diluyó hasta 0,45 nM en tampón de unión. El compuesto se diluyó en tampón de unión a 3 veces las concentraciones usadas en el ensayo de unión. Ensayo de unión se realizó usando una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore). La unión total de ¹²⁵I-MCP-1 se evaluó de la siguiente manera: a cada reacción de un volumen total de 150 µl se le añadieron 5 x 10⁵ células, ¹²⁵I-MCP-1 0,15 nM y compuestos de modo que la concentración final varió desde 0 hasta 100 nM. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido de tres lavados con RPMI-1640, BSA al 0,1%, NaCl 0,4 M, Hepes 20 mM, pH 7,4 usando una filtración por colector de vacío (Millipore). Después de lavar, la placa se secó por aire durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se añadió 25µl de Microscint 20 en cada pocillo. La placa se selló y se contó en el Trilux durante 1 minuto. La unión inespecífica se determinó en presencia de MCP-1 300 nM fría (PeptoTech Inc.). La ¹²⁵I-MCP-1 específica se calculó como la diferencia entre la unión total y la no específica. Todas las condiciones se analizaron por duplicado. La CI₅₀ se define como la concentración del compuesto en competencia necesaria para reducir la unión específica en un 50 %.

El procedimiento usado para el ensayo de unión a CCR-5 de linfocitos T fue similar a los usados para el ensayo de unión a CCR-2 de PBMCh a excepción de que se usaron linfocitos T de sangre periférica humana como fuente de CCR-5 (véase más adelante) y ¹²⁵I-MIP-1β como marcador (Amersham).

35 Aislamiento de linfocitos T periféricos

En un informe reciente se indica que la expresión de CCR-5 en linfocitos T varía considerablemente entre los individuos (Desmetz, C. y col., "The strength of the chemotactic response to a CCR-5 binding chemokine is determined by the level of cell surface CCR-5 density", Immunology, 119(4):551-561 (2006)). Por tanto, se sometió a una detección selectiva previa de los donantes de sangre según la expresión alta en linfocitos T de CCR-5. Las PBMCh se aislaron primero de sangre entera humana mediante un protocolo convencional con Ficoll-Hypaque. Después se usó análisis por citometría de flujo usado para medir la expresión de CCR-5 en linfocitos T tras la tinción con anticuerpo anti-CCR-5 más anticuerpo anti-CD4 o anticuerpo anti-CD8. Se requirió a los donantes de sangre en los que >5 % de los linfocitos T periféricos (CD4⁺ y CD8⁺) expresan CCR-5 que proporcionaran sangre de nuevo para aislar PBMCh y, después, linfocitos T usando una técnica de roseteo en E convencional que depende de la capacidad única de los linfocitos T para unirse a los hematíes de carnero (RBC).

Quimiotaxis de CCR2

El ensayo de quimiotaxis de CCR2 humano se realizó con la línea celular monocítica humana THP-1. Las células THP-1 se marcaron primero con el colorante fluorescente Calceína-AM en RPMI-1640 sin BSA y sin rojo fenol (pH 7,4) a 37°C durante 30 minutos con mezclado suave cada 15 minutos. Las células marcadas se lavaron después y se resuspendieron a 1 x 10⁵/ml en tampón de quimiotaxis (RPMI-1640 sin rojo fenol, BSA al 0,1%, pH 7,4). El

compuesto de ensayo se diluyó en tampón de quimiotaxis de modo que la concentración final del ensayo variaba desde 0,01 nM a 1 M. El ligando de MCP-1 (PeprTech Inc.) se diluyó hasta 20 nM en tampón de quimiotaxis. Para realizar el ensayo se mezcló un volumen igual de diluciones de compuestos de ensayo con un volumen igual de células marcadas THP-1 (Mezcla 1) y un volumen igual de diluciones de compuestos de ensayo se mezcló con un volumen igual de ligando MCP-1 (Mezcla 2). Se incubaron ambas mezclas independientemente a 37°C durante 10 minutos, seguido de mezclado suave. La quimiotaxis inducida por MCP-1 se midió después en una placa de quimiotaxis (Becton Dickinson) mediante la colocación de 50 µl de la Mezcla 1 en la cámara superior y 225 µl de Mezcla 2 en la cámara inferior. Se cubrió la placa con una tapa y se incubó a 37°C durante 30 minutos. 30 minutos más tarde, se leyó la placa en un CYTOFLUOR. Todas las condiciones se analizaron por duplicado. Para la señal de la determinación del ruido se colocaron 50 µl de células THP-1 marcadas solas (5×10^4 /pocillo) en la cámara superior y 225 µl de ligando de MCP-1 solo se colocó en la cámara inferior (concentración final de 10 nM). La inhibición que se consiguió mediante concentraciones diferentes del compuesto de ensayo se calculó como un porcentaje del control MCP-1 sin compuesto. La CI_{50} se define como la concentración del compuesto de ensayo necesaria para alcanzar una inhibición del 50% de la quimiotaxis celular.

15 Quimiotaxis de CCR5

Se adoptó un procedimiento similar al expuesto anteriormente, excepto porque como células de expresión de CCR-5 se usaron linfocitos T periféricos aislados y MIP-1β (50 nM, PeprTech Inc.) era el ligando.

Flujo hERG

20 Las células HEK293 que expresaban de forma estable los canales hERG (37°C, al 5% de CO₂) en medio Eagle Modificado de Dulbecco suplementado con 10% de suero bovino fetal Sigma, aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM y 500 µg/ml de G418, en incubador. Se usó tampón de disociación celular para extraer las células de los matraces, que después se sembraron en placas de 384 pocillos CORNING® negras/transparentes revestidas con poli-D-lisina a una densidad de 2×10^4 células por pocillo (20 µl) en 10% de medio de suero y se incubaron durante 15 – 24 horas a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ hasta que se obtuvo una monocapa de células confluente.

25 Una solución madre de colorante BTC-AM 2 mM (Molecular Probes, Eugene, OR) se preparó en DMSO al 100% y después se añadió 1:1 de ácido plurónico al 10% (p/v) en DMSO el día del ensayo. Después se diluyó el colorante en tampón externo hERG EP (NaCl 140 mM, KCl 4,0 mM, CaCl₂, 1,8 mM, MgCl₂, 1,0 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3 y glucosa 10 mM; todos los componentes del tampón se obtuvieron de Sigma Chemical). Esta mezcla de colorante BTC (30 µl) se añadió a las células y produjo una concentración de carga final 2,5 M. Las células se incuban a 21°C durante 45 minutos.

30 El compuesto de ensayo se diluyó hasta DMSO 10 mM en 60 µl. Después, el compuesto se diluyó en serie en una proporción de 1:2 en DMSO en las columnas 1 – 10 y 11 – 20 de una placa de 384 pocillos. Las placas de lectura de los ensayos se generaron mediante el estampado de 2,5 µl de la placa diluida en serie de DMSO, que se preparó en el Velocity 11 BIOCEL®. Las placas acuosas se crearon añadiendo 48 µl de tampón EP y después se diluyeron 30–45 minutos antes de que se leyera el ensayo en el FLIPR®. Después de la carga del colorante, los compuestos en dilución acuosa se añadieron a las células de las tres placas replicadas (10 µl) produciendo un intervalo de concentración de diez puntos de 80 µM a 0,156 nM. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 1%. Las placas acuosas de lectura del ensayo se prepararon y diluyeron en un manipulador de líquidos Cybio.

40 Las células cargadas con el colorante se leyeron en el FLIPR®384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que excita el colorante usando la longitud de onda de 488 nm de un láser de argón. Se filtró la emisión usando un filtro de paso banda de 540 ± 30 nm. Los canales hERG se estimulan para abrirse mediante la adición de 20 µl/pocillo de tampón EP que contiene K₂SO₄ 66 mM y TI₂SO₄ 1,3 mM (Sigma/Aldrich). Para cada placa, se recogieron los datos cada segundo durante un periodo de 12 segundos, a los que se añadió el tampón de estímulo que contiene TI⁺. La recogida de datos transcurrió cada segundo durante 48 segundos y después continuó cada tres segundos durante dos minutos adicionales.

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

Canal de sodio, ensayo de unión al sitio 2

Véase también: Catterall, W.A. y col., J. Biol. Chem., 256:8922 (1981). El tampón de unión convencional contenía HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, cloruro de Colina 130 mM, KCl 5,4 mM, MgCl₂ 0,8 mM, glucosa 5,5 mM, 40 µg/ml de LqT. Las reacciones de unión se iniciaron mediante la adición de sinaptosomas (preparado a partir de cerebro de rata Wistar) a la mezcla de reacción que contenía [³H]-Batracotoxina 5 nM en un tampón de unión convencional y el compuesto a analizar a la concentración deseable. Después se mezclaron las muestras y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de lavado helado que contenía HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,8 mM y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina. Los sinaptosomas se recogieron de manera inmediata en filtros de fibra de vidrio y se lavaron tres veces con tampones de lavado. La radiactividad de [³H]-Batracotoxina que permaneció en los filtros se recontó usando espectrómetros de centelleo líquido.

Ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralelo (PAMPA)

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

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

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

Pinzamiento de membrana con hERG

Se usó un pinzamiento de membrana de células enteras para medir directamente las corrientes de hERG en células HEK-293 que expresan de forma estable la subunidad α del canal de potasio hERG clonada. El compuesto se analizó en un tampón acuoso con pH 7,4 a temperatura ambiente. Se aplicaron pulsos de ensayo repetidos (0,05 Hz) desde un potencial de retención de -80 mV a +20 mV durante 2 segundos y se provocaron corrientes de cola tras los pulsos de ensayo aumentando la tensión a -65 mV. Los efectos del compuesto se calcularon midiendo la inhibición de la corriente de cola máxima.

Pinzamiento zonal del canal de sodio

Se usó un pinzamiento de membrana de células enteras para medir directamente las corrientes de entrada de sodio en células HEK-293 que expresan el canal de sodio cardíaco humano, SCN5A. El compuesto se analizó en un tampón acuoso sin proteínas. Para determinar la inhibición en el estado estacionario, se indujeron corrientes de sodio cada cinco segundos usando el siguiente protocolo tensión: las células se mantuvieron a un potencial de -90 mV y se aumentaron hasta -20 mV durante 60 ms. Los efectos se calcularon midiendo la inhibición de la corriente de pico durante el pulso de ensayo hasta -20 mV. La dependencia de la velocidad de la inhibición se evaluó mediante estimulación a frecuencias de 1 Hz y 4 Hz.

Farmacocinética de una sola dosis en ratas

En el estudio se usaron ratas macho Sprague-Dawley (250-300 g) para los estudios farmacocinéticos. Se mantuvo a las ratas en ayuno durante una noche antes de administrar la dosis por vía oral y se alimentaron cuatro horas después de la dosis. Las muestras de sangre (~0,3 ml) se recogieron de la vena yugular y se introdujeron en tubos que contenían K₂EDTA y después se centrifugaron a 4°C (1.500 – 2.000 xg) para obtener plasma. En un estudio de biodisponibilidad oral, 2 grupos de animales (N = 2 – 3 por grupo) recibieron el compuesto de ensayo como infusión intravenosa i.v.) (durante 10 min.) a través de la vena yugular o mediante una sonda oral. Las muestras de sangre en serie se obtuvieron a 0,17 (sólo para i.v.), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h después de la dosis. Las muestras de plasma, obtenidas mediante centrifugación a 4°C (1.500 – 2.000 xg), se almacenaron a -20°C hasta el análisis por CL/EM/EM.

Farmacocinética de una sola dosis en monos

La farmacocinética de varios compuestos de ensayos se evaluó en monos *Cynomolgus* en un diseño cruzado. Se mantuvo a las monos en ayuno durante una noche antes de administrar la dosis por vía oral y se alimentaron cuatro horas después de la dosis. Un grupo de 1 – 3 animales (3 a 5 kg) recibió el compuesto por infusión i.v. (durante 10 min.) mediante una vena femoral y por sonda oral, con un descanso de 1 semana entre tratamientos. Las muestras de sangre en serie (~0,3 ml) se recogieron de una arteria femoral a 0,17 (sólo IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h después de la dosis y se centrifugaron a 4°C (1.500 – 2.000 xg) para obtener plasma. Las muestras se almacenaron a –20°C hasta el análisis mediante CL/EM/EM.

Análisis de datos para los ensayos farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron mediante el análisis no compartimental de los datos de la concentración en plasma frente al tiempo (software Kinetica, Versión 4,2, InnaPhase Corporation, Filadelfia, PA). La concentración de pico ($C_{m\acute{a}x}$) y el tiempo para $C_{m\acute{a}x}$ se registraron directamente a partir de observaciones experimentales. El área bajo la curva desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo (AUC(0–T)) se calculó usando una combinación de las sumas trapezoidales lineales y logarítmicas. El aclaramiento plasmático total (CLTp), el volumen de distribución del estado estacionario (Vss), la semivida de eliminación aparente (T1/2) y el tiempo medio de residencia (TMR) se estimaron después de la administración i.v. Las estimaciones del T1/2 se hicieron usando un mínimo de 3 puntos de tiempo con concentraciones cuantificables. La biodisponibilidad oral absoluta (F) se estimó como el porcentaje de valores de AUC de dosis normalizadas después de las dosis orales e i.v.

20 Movilización de calcio en CCR-2

El ensayo de flujo de calcio intracelular mediado por CCR-2 humano se estableció con la línea celular monocítica humana THP-1. Primero, las células THP-2 se cargaron con fluoróforo resuspendiéndolas en un PBS tamponado con glucosa y HEPES (pH 7,4) que contenía fluo-3 4 μ M (Molecular Probes) y probenecida 1,25 mM, y después se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Después de lavar una vez para eliminar el exceso de fluo-3, las células se resuspendieron en tampón de lavado (que contenía RPMI sin rojo fenol) con probenecida 1,25 mM y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 2 x 10⁵/pocillo. La placa se colocó en un FLIPR®-1 (Molecular Devices) que usa un láser de argón para excitar las células y robóticamente añade el compuesto de ensayo y MCP-1 humano mientras se monitorizan los cambios de la fluorescencia. A cada pocillo se añadieron diluciones del compuesto de ensayo con un intervalo de concentraciones de 0 a 100 nM o tampón solo, se centrifugaron y se incubaron durante 10 minutos. La MCP-1 recombinante (PeproTech Inc.) se añadió después hasta una concentración final de 10 nM. El desplazamiento de la fluorescencia se monitorizó y la desviación base al pico se computó de forma automática. Todas las condiciones se analizaron por duplicado. La inhibición que se consiguió mediante concentraciones diferentes del compuesto se calculó como un porcentaje del control MCP-1 sin compuesto.

Movilización de calcio en CCR-5

Se adoptó un procedimiento similar al de la movilización de calcio en CCR-2 indicado anteriormente a excepción de que MIP-1 β (50 nM) era el ligando y la línea celular era HT1080/CCR-5 en la que el CCR-5 endógeno se regula por aumento mediante activación aleatoria de la tecnología de la expresión génica (RAGE).

Intercambio de GTP- γ S en CCR-2

La unión dependiente de MCP-1 de [³⁵S]-GTP γ S a CCR-2 se determinó usando membranas preparadas a partir de la línea celular humana HT 1080 en la que el CCR-2 endógeno se reguló por aumento mediante tecnología RAGE (Athersys). Cada reacción (200 μ l) contenía Na-HEPES 20 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, 0,1% de BSA (Sigma), 1% de DMSO y GDP 10 μ M (pH 7,4). La CE₅₀ para la unión dependiente de MCP-1 de [³⁵S]-GTP γ S se determinó variando las concentraciones de MCP-1 de 1 pM a 1 μ M. Las reacciones se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente y los complejos [³⁵S]-GTP γ S/G α i se recogieron en una placa de filtro de 96 pocillos Millipore MAFC. La inhibición de la unión dependiente de MCP-1 de [³⁵S]-GTP γ S a membranas de CCR-2 por el compuesto de ensayo se determinó a 1 nM de MCP-1 en condiciones idénticas. Los datos se analizaron usando el software de unión a ligando de Graphpad Prism 4.

Intercambio de GTPP- γ S en CCR-5

Se adoptó un procedimiento similar al procedimiento de intercambio de GTP- γ S en CCR-2 indicado anteriormente, a excepción de que MIP-1 α /LD78 β fue el ligando y la línea celular fue CCR-5/HT1080. MIP-1 α /LD78 β se usó como el ligando de CCR-5 porque proporcionaba una proporción señal-ruido mayor que MIP-1 β .

Regulación por aumento de la integrina de sangre entera (CD11b) en CCR-2

Se estableció un ensayo de regulación por aumento de CD11b dependiente de CCR-2 con sangre entera humana. La sangre entera (100 μ l) se preincubó con un intervalo de concentraciones del Ejemplo 1 a 37°C durante 10 minutos. Después se añadió MCP-1 recombinante humana (10 μ l of 100nM) a cada reacción hasta una

5 concentración final de 10nM, a excepción de las reacciones control sin estimular. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de incubar, se añadió 1 ml de tampón de FACS (PBS con 10% de FBS) helado y las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 50 µl de tampón de FACS. Después, las células se incubaron con 20 µl de solución anti-CD 14-FITC/anti-CD11b-PE durante 20 minutos en hielo en oscuridad, seguido de la adición de 1 ml de 1x solución de lisado de FACS (Becton Dickinson) a cada reacción. Después, las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo en oscuridad. Tras la fijación y la lisis de los glóbulos rojos, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µl de solución de lisado de FACS. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un plazo de 1 hora desde la tinción usando un citómetro de flujo FACSCalibur. La adquisición y el análisis de los datos se realizaron con el software CellQuestPro. Se usó una estrategia de retención secuencia para analizar la población de monocitos CD14^{alto} CD11b⁺. Para el análisis, el CD11b se midió como mediana de la intensidad de la fluorescencia (MIF).

Regulación por aumento de CD11b en CCR-5

Se adoptó un procedimiento similar al de la regulación por aumento de CD11b de sangre entera en CCR-2 expuesto anteriormente a excepción de que como ligando se usó MIP-1β (50 nM).

15 A continuación se exponen datos para compuestos comparados (véanse los documentos WO 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 and WO 2008/014361 A1). Los datos comparativos muestran la combinación inesperada de la actividad doble equipotencial inhibidora de CCR-2 y CCR-5 y las características farmacológicas deseables.

TABLA 2

| Datos comparativos <i>in vitro</i> | | | | | |
|------------------------------------|---|---|---|---|----------------------------|
| Compuesto | Cl ₅₀ (nM) de la unión a CCR-2 | Cl ₅₀ (nM) de la unión a CCR-5 | Cl ₅₀ (nM) del flujo en hERG | Unión a los canales de Na ⁺ (% inhibición) | Permeabilidad PAMPA (nm/s) |
| Ejemplo 12as WO 2005/021500 | 0,27 (1) | No disponible | 2,800 | No disponible | No disponible |
| Ejemplo 12aj WO 2005/021500 | 0,43 ± 0,06 (2) | No disponible | 770 | No disponible | No disponible |
| Ejemplo 2k WO 2005/021500 | 0,7 ± 0,3 (23) | 2,3 ± 1,8 | 51,000 | 97 %, 10.000 nM | 529 ± 157 (9) |
| Ejemplo 12bd WO 2005/021500 | 1,15 ± 0,07 (2) | No disponible | > 80.000 | 54 %, 10.000 nM | 392 |
| Ejemplo 8a WO 2005/021500 | 1,83 ± 0,80 (12) | No disponible | > 80.000 | 3 %, 10.000 nM 33 %, 30.000 nM | 94 ± 58 (10) |
| Ejemplo 8e WO 2005/021500 | 2,20 ± 0,03 (2) | No disponible | >80.000 | 6 %, 10.000 nM | 2 ± 2 (2) |
| Ejemplo 9c WO 2005/021500 | 0,96 ± 0,26 (19) | No disponible | >80.000 | 48 %, 10.000 nM 75 %, 30.000 nM | 145 ± 71 (8) |
| Ejemplo 1 WO 2008/014381 | 1,4 ± 0,5 (18) | 23,6 ± 12,0 | > 80.000 | 0 %, 10.000 nM; 21 %, 30.000 nM | 443 ± 114 (8) |
| Ejemplo 1 WO 2008/014360 | 2,74 ± 1,34 (15) | 6,3 ± 1,5 | >80.000 | 13 %, 10.000 nM 32 %, 30.000 nM | 560 ± 86 (5) |
| Ejemplo 1 La presente invención | 6,2 ± 2,7 | 3,6 ± 1,8 | >80.000 | 46 %, 30.000 nM | 336 |

TABLA 3

| Datos comparativos adicionales <i>in vitro</i> | | | | |
|--|--|--|--------------------------------------|--|
| Compuesto | Cl ₅₀ (nM) de la quimiotaxis de CCR-2 | Cl ₅₀ (nM) de la quimiotaxis de CCR-5 | Pinzamiento zonal con hERG (% Inhb.) | Pinzamiento zonal de los canales de Na+(% Inhb.) |
| Ejemplo 2k Patente de EE.UU. N° 7163937 | 0,24 ± 0,16 (12) | No disponible | 83 %, 10.000 nM | 52 %, 10.000 nM 90 %, 30.000 nM |
| Ejemplo 8a WO 2005/021500 | 2,63 ± 1,24 (4) | No disponible | 4 %, 10.000 nM | 22 %, 10.000 nM 49 %, 30.000 nM |
| Ejemplo 9c WO 2005/021500 | 0,21 | No disponible | 4 %, 10.000 nM | 19 %, 10.000 nM 39 %, 30.000 nM |
| Ejemplo 1 WO 2008/014381 | 0,71 ± 0,16 (22) | No disponible | 33 %, 10.000 nM 61 %, 30.000 nM | 17 %, 10.000 nM 19 %, 30.000 nM |
| Ejemplo 1 WO 2008/014360 | 0,8 ± 0,5 (16) | 1,1 ± 0,7 | 12 %, 10.000 nM 19 %, 30.000 nM | 29 %, 30.000 nM |
| Ejemplo 1 La presente invención | 0,8 ± 0,8 | 1,1 ± 0,6 | 1,2 %, 10.000 nM 9,2 %, 30.000 nM | 15-20 %, 10.000 nM 13-16 %, 30.000 nM |

TABLA 4

| Datos comparativos adicionales <i>in vitro</i> | | | | |
|--|--|--|--|--|
| Compuesto | Cl ₅₀ (nM) del flujo de Ca ²⁺ en CCR-2 | Cl ₅₀ (nM) del flujo de Ca ²⁺ en CCR-5 | Cl ₅₀ (nM) de GTP-γS en CCR-2 | Cl ₅₀ (nM) de GTP-γS en CCR-5 |
| Ejemplo 2k Patente de EE.UU. N° 7163937 | No disponible | No disponible | No disponible | No disponible |
| Ejemplo 1 WO 2008/014381 | 0,9 | 24,0 | 5 | 111,0 |
| Ejemplo 1 WO 2008/014360 | 0,8 ± 0,6 | 5,9 ± 3,3 | 3,5 ± 1,9 | 5,4 ± 3,2 |
| Ejemplo 1 la presente invención | 2,9 ± 1,5 | 2,0 ± 1,4 | 3,5 ± 1,9 | 6,1 ± 1,2 |

5

TABLA 5

Datos comparativos adicionales *in vitro*

| Compuesto | CCR-2CDIIBC ₅₀ (nM) | CCR-5CDIIBC ₅₀ (nM) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| Ejemplo 2k Patente de EE.UU. N° 7.163.937 | 4,7 ± 0,9 | 4,3 ± 4,4 |
| Ejemplo 1 WO 2008/014381 | 0,77 ± 0,40 | No disponible |
| Ejemplo 1 WO 2008/014360 | 2,6 ± 2,2 | 34.7 ± 11,0 |
| Ejemplo 1 Presente invención | 4,8 | 5.7 |

Datos farmacocinéticos comparativos *in vivo* en ratas

| Compuesto | Dosis i.v./oral(mg/kg) | Cl (ml /min/kg) | F% | AUC _{oral} (nM*h) |
|---------------------------------|------------------------|-----------------|-----|----------------------------|
| Ejemplo 2k WO 2005/021500 | 2,5/25 | 40 | 68 | 9294 |
| Ejemplo 8a WO 2005/021500 | 6/72 | 42 | 1,4 | 690 |
| Ejemplo 9c WO 2005/021500 | 4/43 | 54 | 14 | 1855 |
| Ejemplo 1 WO 2008/014381 | 2/ 10 | 43 | 51 | 3794 |
| Ejemplo 1 WO 2008/014360 | 2/10 | 25 | 79 | 10169 |
| Ejemplo 1 Presente invención | 2/10 | 49,7 | 94 | 6500 |

TABLA 7

| <i>Datos farmacocinéticos comparativos in vivo en monos</i> | | | | |
|---|-----------------------------|----------------|-----|-----------------|
| Compuesto | Dosis i.v./vía oral (mg/kg) | Cl (ml/min/kg) | F % | AUC oral (nM*h) |
| Ejemplo 2k WO 2005/021500 | 1/1,4 | 25 | 46 | 862 |
| Ejemplo 8a WO 2005/021500 | 1/11 | 14 | 9,4 | 1896 |
| Ejemplo 9c WO 2005/021500 | 1/10 | 12 | 26 | 6763 |
| Ejemplo 1 WO 2008/014381 | 1/1,3 | 23 | 47 | 836 |
| Ejemplo 1 WO 2008/014360 | 1/1 | 12 | 95 | 2352 |
| Ejemplo 1 La presente invención | 1/1 | 16.4 | 63 | 1300 |

- 5 Sorprendentemente, se descubrió que el Ejemplo 1 de la presente invención no es predominantemente activo contra CCR-2 o CCR-5, sino que son antagonistas dobles equipotenciales, medido mediante la capacidad de unión a CCR-2 y a CCR-5 y plantea características farmacológicas beneficiosas. Véanse las Tablas 2 a 5. Por ejemplo, véase la Tabla 5, en la que el Ejemplo 1 es equipotencial contra CCR-2 y a CCR-5 mientras que los Ejemplos 1 de los documentos WO 2008/014381 y WO 2008/014360 son predominantemente activos contra CCR-2.

10 Utilidad

Se muestra que los compuestos representativos de los ejemplos son moduladores de la actividad del receptor de quimiocinas usando ensayos que conocen los expertos en la técnica. En esta sección, se describen estos ensayos y se dan sus referencias bibliográficas. En la presente memoria se describen más ensayos en la sección denominada "Características Farmacológicas Comparativas", anteriormente. Al exhibir actividad en estos ensayos de antagonismo de MCP-2, cabe esperar que los compuestos de los ejemplos sean útiles en el tratamiento de enfermedades humanas asociadas con las quimiocinas y sus receptores afines. La definición de la actividad en estos ensayos es un compuesto que demuestra un valor Cl_{50} de 30 μ M o una concentración menor cuando se mide en un ensayo particular.

Antagonismo de la entrada de calcio inducida por MCP-1

- 20 (Sullivan y col., *Methods Mol. Biol.*, 114:125-133 (1999))

Al menos uno compuesto descrito en los ejemplos tiene actividad en el ensayo de antagonismo de la entrada de calcio inducida por MCP-1 descrito en la presente memoria.

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

Los receptores de quimiocinas de mamíferos proporcionan una diana para interferir o estimular la función de las células inmunitarias en un mamífero, tal como un ser humano. Los compuestos que inhiben o estimulan la función del receptor de las quimiocinas son particularmente útiles para modular la función de las células inmunitarias con fines terapéuticos. De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a compuestos que son útiles en la prevención y/o tratamiento de una amplia variedad de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunorreguladoras, incluidas el asma y las enfermedades alérgicas, infecciones por microbios patógenos (que, por definición, incluye virus), así como patologías autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y arterosclerosis.

Por ejemplo, un presente compuesto que inhibe una o más funciones de un receptor de quimiocinas de mamífero (p. ej., un receptor de quimiocinas humano) se puede administrar para inhibir (es decir, reducir o prevenir) la inflamación o la enfermedad infecciosa. Como resultado, se inhibe uno o más procesos inflamatorios, tales como migración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis (p. ej., de enzimas, histamina) o la liberación del mediador inflamatorio.

De forma similar, un presente compuesto, que estimula una o más funciones del receptor de quimiocinas de mamífero (p. ej., una quimiocina humana) se administra para estimular (inducir o potenciar) una respuesta inmunitaria o inflamatoria, tal como emigración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis (p. ej., de enzimas, histamina) o la liberación del mediador inflamatorio. Lo que tiene como resultado la estimulación beneficiosa de los procesos inflamatorios. Por ejemplo, se puede reclutar eosinófilos para combatir las infecciones parasitarias. Además, también se puede contemplar el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunitarias mencionadas con anterioridad para un presente compuesto, que estimula una o más funciones del receptor de quimiocinas de mamífero si se contempla la liberación de suficiente compuesto como para provocar la pérdida de expresión del receptor sobre células a través de la inducción de la internalización del receptor de quimiocinas o la liberación del compuesto de un modo que de lugar a la dirección incorrecta de la migración de las células.

Además de los primates, tales como seres humanos, se puede tratar a diversos otros mamíferos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, se pueden tratar mamíferos, incluidos, entre otros, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otras especies bovinas, ovinas, équidos, caninas, felinas, roedores o murinas. No obstante, el procedimiento también se puede practicar en otras especies, tal como especies de aves. El sujeto tratado en los procedimientos anteriores es un mamífero, macho o hembra, en el que se desea la modulación de la actividad de los receptores de quimiocinas. Con "Modulación", como se usa en la presente memoria, se pretende abarcar antagonismo, agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

Ensayo Funcional basado en el Lector de Placa de Imagen Fluorométrica (FLIPR®)

Las células HT1080 (clon 3559.1.6) se sembraron en placas de 384 pocillos a 10.000 células/pocillo (30 microlitros) (Biocoat PDL de fondo negro/blanco, Beckton Dickinson) y se cargaron con 30 microlitros/pocillo de colorante fluorescente Fluro-4 AM (preparado por disolución de 1 mg de Fluro-4 AM en 440 microlitros de DMSO y diluyendo con 100 microlitros de solución plurónica antes de diluir más con 10 ml de tampón de Hanks). Las células se incubaron a 37°C con el 5% de CO_2 durante 30 minutos antes de lavarse tres veces y suspenderse en Tampón de Ensayo (HEPES 20 mM, CaCl_2 1,2 mM, MgCl_2 5 mM, Probenecida 2,5 mM, 0,5% de BSA 1x Hanks). El producto de ensayo se diluyó en serie en DMSO y después se diluyó A 1:10 con Tampón de Ensayo antes de añadirse a las células (10 microlitros/pocillo). Usando FLIPR, se leyeron las placas (10-70 s.) para la inducción del flujo (es decir la actividad agonista). Después, las células se cargaron con Solución de Agonista (30 microlitros/pocillo; se prepararon mediante la dilución de 30 microlitros de MIP-1 beta 100 microMolar en 100 ml de Tampón de Ensayo; este protocolo suministra al ensayo una concentración final de 5 nM de MIP-1 beta) y las placas se leyeron usando

FLIPR® durante un minuto. La actividad antagonista del producto de ensayo se determinó en relación con el control negativo de 0,4% de DMSO/Tampón control negativo.

Ensayo(s) *in vivo* y eficacia

5 La N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida (también denominada como "Ejemplo 1) se evaluó en el ensayo *in vivo* que se describe a continuación.

Modelo de peritonitis inducida por tioglicolato (TG) de 48 horas en ratones hCCR2 KI

10 Se inyectó intraperitonealmente 1 ml de tioglicolato (TG) (Hardy Diagnostics) a los ratones hCCR2 KI (C57BL/(-SVJ129). Para cada estudio, se usaron ocho ratones macho por grupo. El Ejemplo 1 se dosificó por vía oral 1 hora antes de la inyección de TG. El vehículo usado fue HCl 0,01N en agua. Cuarenta y ocho horas después de la inyección de TG se realizaron lavados peritoneales inyectando 5 ml PBS/EDTA 10 mM/10% de BSA en la cavidad peritoneal.

15 Para el estudio de peritonitis por TG de 48 horas, el Ejemplo 1 se administró dos veces al día, con la primera dosis una hora antes de la inyección de TG. Los recuentos celulares peritoneales totales se obtuvieron en células aisladas mediante un contador celular. Se realizaron citocentrifugados para determinar los recuentos de leucocitos diferenciales. Las células se tiñeron durante 3 minutos con tinción de Wright-Giemsa (Sigma-Aldrich) y después se aclararon con agua desionizada durante 5 minutos. Los recuentos diferenciales se calcularon basándose en un total de 200 células contadas por muestra. También se recogieron la sangre del seno retroorbital al final de cada estudio en EDTA para determinar la concentración de fármaco.

20 Para el análisis citométrico de flujo, las células exudadas peritoneales (1×10^6) se lavaron una vez con tampón FACS (PBS/0,5% de BSA) y se resuspendieron en tampón FACS. Las células se incubaron con un anticuerpo bloqueante de Fc (BD Pharmingen) en hielo durante 15 minutos, seguido de la adición de los siguientes anticuerpos (BD Pharmingen): anti-F4/80 conjugado con FE, anti-Ly6C conjugado con FITC y anti-hCCR2 conjugado con Alexa 647. Después de 45 min. en hielo, se fijaron las células mediante BD Cytfix durante 15 minutos en hielo, se lavaron 25 dos veces con tampón FACS y se resuspendieron en 200 μ l de tampón FACS. Los acontecimientos celulares (40.000) se adquirieron para cada muestra y se analizaron los datos usando el software FloJo (TreeStar). Se configuró una puerta FSC/SSC para incluir a todos los monocitos (SSC bajo, FSC más alto) mientras que se excluían los granulocitos del análisis. Esta población acotada se analizó después para la expresión de Ly6C (FITC) y F4/80 (PE). Los números de monocitos/macrófagos peritoneales se determinaron multiplicando los recuentos 30 celulares peritoneales totales obtenidos mediante el contador celular y el porcentaje de monocitos/macrófagos identificados mediante células F4/80⁺ de la citometría de flujo. La significación estadística de las diferencias entre las medias se analizó usando el ensayo t pareado de dos colas con significancia fijada a p-valores inferiores a 0,05.

Resultados

35 El Ejemplo 1 se evaluó en el modelo de peritonitis por TG de ratón hCCR2 KI para determinar su CE₅₀ en la inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos. Se administró a los ratones tioglicolato y se dosificaron por vía oral con el Ejemplo 10, 50 o 160 mg/kg dos veces al día. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento con TG, se obtuvo el lavado peritoneal para el análisis de infiltración celular mediante citometría de flujo.

40 Se observó una inhibición dependiente de la dosis de la infiltración de monocitos/macrófagos (Figura 4). Las dosis de 10, 50, y 160 mg/kg dieron una inhibición del 25 %, 54 % y 63 %, respectivamente. De los cuatro estudios separados con múltiples dosis, la inhibición máxima alcanzada fue 70 % y se estimó que el promedio de la CE₅₀ para la inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos mediante este análisis era de 4,9 nM, que se correlaciona bien con la CI₅₀ *in vitro* (5,8 \pm 2,3 nM) para la inhibición del Ejemplo 1 de la unión de ¹²⁵I-MCP-1 de ratón a las células que expresan CCR-2 (PBMCh).

45 Para evaluar el nivel *in vivo* de la ocupación de receptores por el Ejemplo 1 en el modelo de peritonitis por tioglicolato de 48 horas usando el ratón hCCR-2 KI se midieron los niveles plasmáticos tanto del Ejemplo 1 como el ligando de CCR2 de ratón MCP-1. El inconveniente de esta estimación es que sólo CCR2 y su ligando principal, la MCP-1, se tuvieron en cuenta. La ocupación del receptor por un ligando en presencia de un inhibidor competitivo se define por la ecuación de Gaddum:

$$50 \quad \frac{[RL]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_d / [L]) (1 + [I] / K_i)}$$

Puesto que el Ejemplo 1 es un inhibidor competitivo de la unión de MCP-1 a CCR2, las cantidades de tanto el complejo receptor MCP-1/CCR2 de ratón como el complejo receptor Ejemplo 1/CCR2 se pueden determinar usando

5 los niveles séricos de tanto el MCP-1 de ratón como de la proteína no unida del Ejemplo 1 en plasma. La K_d para la unión del MCP-1 de ratón a hCCR2 es 0,91 +/- 0,08 nM (n = 8) que se determinó en experimentos de competición de unión de ligando en frío usando 125 I-MCP-1 humana. La K_i promedio para la unión del Ejemplo 1 a hCCR2 es 2,0 nM. La fracción de complejo receptor de MCP-1/CCR2 de ratón se determina usando la forma de la ecuación descrita anteriormente. Para determinar la fracción de complejos Ejemplo 1/CCR2 la ecuación se redefine como:

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

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

10 $[CCR2]_{total} = [CCR2]_{libre} + [ratón\ MCP-1/CCR2] + [Ejemplo\ 1/CCR2]$

Como se muestra en la Tabla 8, el porcentaje de inhibición de la infiltración de monocitos/macrófagos en el peritoneo a las 48 h refleja el porcentaje de complejo receptor del Ejemplo 1/CCR2.

TABLA 8

| Determinación de la ocupación del receptor <i>in vivo</i> en sangre de ratones hCCR-2 KI en el modelo de peritonitis por TG de 48 horas | | | | | | |
|---|--|---|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|--|
| Dosis mg/kg | Concentración de MCP-1 de ratón en plasma (nM) | Concentración Del Ejemplo 1 libre en plasma (nM) (número de veces la CI90 de unión a CCR-2) | % de CCT-2 unido a MCP-1 de ratón | % de CCR-2 unido al ejemplo 1 | % de CCR-2 libre | % inhibición de la infiltración ^a de monocitos/macrófagos |
| 200 ^a | 0,068 | 136,4 | 0,11 | 98,45 | 1,44 | 71 |
| 160 | 0,046 | 62,0 | 0,16 | 96,72 | 3,12 | 63 |
| 50 | 0,048 | 16,6 | 0,56 | 88,74 | 10,69 | 54 |
| 10 | 0,021 | 1,9 | 1,17 | 48,15 | 50,68 | 25 |
| 0 | 0,022 | 0,0 | 2,36 | 0,00 | 97,64 | 0 |

^a la dosis se seleccionó de un estudio diferente de otras dosis en la tabla para proporcionar un ejemplo de inhibición máxima. Esta dosis proporcionó una concentración libre en plasma de 1,9 veces la CI90 la unión de hCCR-2 KI.

15 En conjunto, estos estudios demuestran claramente que el ejemplo 1 es un bloqueante potente de la infiltración de monocitos/macrófagos con una CD50 de - 4,9 nM. La inhibición máxima de la infiltración monocitos/macrófagos por el ejemplo 1 se puede conseguir mediante la ocupación del 98,5% del CCR-2 con este compuesto. Notablemente, en los estudios se ha demostrado una reducción similar ((~ 70 - 80 %) de la infiltración de monocitos/macrófagos en ratones deficientes en CCR-2.

20 Enfermedades o afecciones del ser humano u otras especies que se pueden tratar con inhibidores de la función de los receptores de quimiocinas incluyen, entre otras: Enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, que incluyen enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades de hipersensibilidad pulmonar, neumonitis por hipersensibilidad, celulitis eosinófila (p. ej., síndrome de Well), neumonías eosinófilas (p. ej., síndrome de Loeffler, neumonía eosinófila crónica), fascitis eosinófila (p. ej., síndrome de Shulman), hipersensibilidad retardada, enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) (p. ej., fibrosis pulmonar idiopática o EPI asociadas con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis y dermatomiositis), anafilaxia sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (p. ej., penicilina, cefalosporina), síndrome de eosinofilia-mialgia debido a la ingestión de triptófano
25 contaminado, alergias a picaduras de insectos; enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, diabetes de inicio juvenil; glomerulonefritis, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet; rechazo de injertos (p. ej., en trasplantes),
30

5 incluidos el rechazo de aloinjertos o la enfermedad del injerto contra el huésped; enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; esclerodermia; psoriasis (incluida la psoriasis mediada por linfocitos T) y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria; vasculitis (p. ej., vasculitis necrotizante, cutánea y por hipersensibilidad); miositis eosinófila; fascitis eosinófila; cánceres con infiltración leucocitaria de la piel o los órganos. Se pueden tratar otras enfermedades o afecciones en las que se han de inhibir las respuestas inflamatorias, incluidas, entre otras, vasculitis, placas vulnerables, hiperplasia de la neointima venosa, lesión por 10 reperfusión, hiperplasia de la neointima en la inserción de la diálisis, hiperplasia íntima en la derivación arteriovenosa, aterosclerosis, ciertas neoplasias malignas hematológicas, toxicidad inducida por citocinas (p. e., shock séptico, shock endotóxico), polimiositis, dermatomiositis. Enfermedades o afecciones infecciosas del ser humano u otras especies que se pueden tratar con inhibidores de la función de los receptores de quimiocinas incluyen, entre otras, VIH.

15 Enfermedades o afecciones del ser humano u otras especies que se pueden tratar con estimuladores de la función de los receptores de quimiocinas incluyen, entre otras: Inmunosupresión, tal como la de individuos con síndromes de inmunodeficiencia, tales como SIDA u otras infecciones virales, individuos sometidos a radioterapia, quimioterapia, terapia para una enfermedad autoinmunitaria o terapia farmacológica (p. ej., terapia con corticosteroides), que producen inmunosupresión; inmunosupresión debida a la deficiencia congénita de la función de los receptores u otras causas; y enfermedades infecciosas, tales como enfermedades parasitarias, incluidas, entre otras, infecciones 20 por helmintos, tales como nematodos (nematelmintos); (tricurosis, enterobiasis, ascariasis, anquilostomosis, estrongiloidiasis, triquinosis, filariasis); trematodos (duelas) (esquistosomiasis, clonorquiasis), cestodos (tenias) (equinococcosis, *Taeniasis saginata*, cisticercosis); gusanos viscerales, larva migratoria visceral (p.ej., *Toxocara*), gastroenteritis eosinófila (p.ej., *Anisaki sp.*, *Phocanema sp.*), larva migratoria cutánea (*Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*). De acuerdo con esto, los compuestos de la presente invención son útiles en la prevención y tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y trastornos inflamatorios, infecciosos e inmunorreguladores.

25 Además, también se puede contemplar el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunitarias mencionadas con anterioridad para estimuladores de la función del receptor de quimiocinas si se contempla la liberación de suficiente compuesto como para provocar la pérdida de expresión del receptor sobre células a través de la inducción de la internalización del receptor de quimiocinas o la liberación del compuesto de un modo que de lugar a la dirección incorrecta de la migración de las células.

30 En otro aspecto, la presente invención se puede usar para evaluar los posibles agonistas o antagonistas específicos de un receptor acoplado a proteína G. La presente invención está dirigida al uso de estos compuestos en la preparación y ejecución de ensayos de detección selectiva de compuestos que modulan la actividad de los receptores de quimiocinas. Además, los compuestos de la presente invención es útil para establecer o determinar el sitio de unión de otros compuestos a los receptores de quimiocinas, por ejemplo mediante inhibición competitiva o 35 como referencia en un ensayo para comparar su actividad conocida con la de un compuesto con actividad desconocida. Al desarrollar nuevos ensayos o protocolos, los compuestos de acuerdo con la presente invención podrían usarse para comprobar su eficacia. Específicamente, dichos compuestos se puede proporcionar en un kit comercial para su uso en, por ejemplo investigación farmacéutica que implique las enfermedades mencionadas con anterioridad. Los compuestos de la presente invención también son útiles para la evaluación de posibles 40 moduladores específicos de los receptores de quimiocinas. Además, se podría usar los compuestos de la presente invención para analizar la especificidad de los receptores acoplados a proteína G que no se piensa que sean receptores de quimiocinas, sirviendo como ejemplos de compuestos que no se unen o como variantes estructurales de los compuestos activos sobre estos receptores, que pueden ayudar a definir sitios específicos de interacción.

45 Los compuestos divulgados en la presente memoria son útiles para tratar o prevenir trastornos seleccionados de artritis reumatoide, osteoartritis, shock séptico, arteroesclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, shock hemodinámico, síndrome séptico, lesión por reperfusión tras isquemia, malaria, enfermedad de Crohn, enfermedades intestinales inflamatorias, infección por micobacterias, meningitis, psoriasis, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades fibróticas, caquexia, rechazo de injerto, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias de la piel, esclerosis múltiple, daños por radiación, lesión alveolar hiperóxica, VIH, demencia por VIH, 50 diabetes mellitus no insulina dependiente, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, fibrosis pulmonar idiopática, penfigoide ampolloso, infecciones parasitarias por helmintos, colitis alérgica, eccema, conjuntivitis, trasplante, eosinofilia familiar, celulitis eosinófila, neumonías eosinófilas, fascitis eosinófila, gastroenteritis eosinófila, eosinofilia inducida por fármaco, fibrosis quística, síndrome de Churg-Strauss, linfoma, enfermedad de Hodgkin, carcinoma colónico, síndrome de Felty, sarcoidosis, uveítis, Alzheimer, glomerulonefritis y lupus eritematoso sistémico, 55 carcinoma de células escamosas del esófago, dolor neuropático y obesidad.

En otro aspecto, los compuestos son útiles para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias seleccionadas de artritis reumatoide, osteoartritis, arteroesclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, enfermedad de Cronin, enfermedades intestinales inflamatorias, psoriasis, insuficiencia cardíaca congestiva, esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias de la piel.

60 En otro aspecto, los compuestos se usan para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias seleccionadas de artritis reumatoide, osteoartritis, arteroesclerosis, enfermedad de Crohn, enfermedades intestinales inflamatorias y

esclerosis múltiple.

En otro aspecto, los ejemplos divulgados en la presente memoria pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de cánceres, incluyendo, entre otros, los siguientes

- 5 carcinoma incluyendo el de vejiga (incluyendo el cáncer de vejiga acelerado y metastático), de mama, de colon (incluyendo el cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y el adenocarcinoma pulmonar), ovario, próstata, testículos, tracto génito-urinario, sistema linfático, del recto, de la laringe, páncreas, linfoma de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin, linfoma de células peludas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkett's;
- 10 tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas, el síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica;
- tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neurolastoma, glioma y schwannomas;
- 15 tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluidos melanoma, xeroderma pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

En otra realización, divulgada en la presente memoria están los compuestos para su uso en el tratamiento contra el cáncer, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata y melanoma. Adicionalmente, los compuestos divulgados en la presente memoria pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer de ovarios y el mieloma múltiple

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

La terapia combinada para prevenir y tratar enfermedades y trastornos inflamatorios, infecciosos e inmunorreguladores, incluidos asma y enfermedades alérgicas, así como enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y arterosclerosis, y las patologías indicadas anteriormente, se ilustra por la combinación de los

25 compuestos de la presente invención y otros compuestos que se conocen para tales utilidades. Por ejemplo, en el tratamiento o prevención de la inflamación, los presentes compuestos pueden emplearse en combinación con agentes antiinflamatorios o analgésicos, tales como un agonista opiáceo, un inhibidor de la lipoxigenasa, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2, un inhibidor de interleucina, tal como un inhibidor de la interleucina-1, un inhibidor del factor de necrosis tumoral, un antagonista de NMDA, un inhibidor de óxido nítrico o un inhibidor de la síntesis de óxido

30 nítrico, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un inhibidor de la fosfodiesterasa o un agente antiinflamatorio supresor de citocinas, por ejemplo con un compuesto tal como acetaminofén, aspirina, codeína, fentanilo, ibuprofeno, indometacina, ketorolac, morfina, naproxeno, fenacetina, piroxicam, un analgésico esteroideo, sufentanilo, sunlindac, interferón alfa y similares. De forma similar, los presentes compuestos se pueden administrar con un analgésico; un potenciador tal como cafeína; un antagonista de H₂, simeticona, aluminio o hidróxido de

35 magnesio; un descongestivo, tal como fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina, oximetazolina, epinefrina, nafazolina, xilometazolina, propilhexedrina, o levo-desoxi-efedrina; un antitusivo tal como codeína, hidrocodona, caramifeno, carbetapentano o dexametorfano; un diurético; y un antihistamínico sedante o no sedante. Asimismo, los compuestos divulgados en la presente memoria se pueden usar en combinación con otros fármacos que se usan en la prevención/tratamiento/supresión o alivio de las enfermedades o afecciones para las que el compuesto de la

40 presente invención es útil. Estos otros fármacos se pueden administrar por una vía y en una cantidad usadas normalmente para ello, de forma simultánea o secuencial con un compuesto de la presente invención. Cuando un compuesto se usa simultáneamente con uno o más fármacos distintos, se puede usar una composición farmacéutica en forma de monodosis que contenga tales fármacos además del compuesto de la presente invención. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas incluyen las que también contienen uno o más ingredientes activos,

45 además de un compuesto de la presente divulgación.

Ejemplos de otros ingredientes activos que se pueden combinar con un compuesto de la presente invención, administrados por separado o en las mismas composiciones farmacéuticas, incluyen, entre otros: (a) antagonistas de la integrina, tales como de selectinas, ICAM e VLA-4; (b) esteroides, tales como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona e hidrocortisona; (c) inmunosupresores, tales como, ciclosporina, tacrolimus, rapamicina y otros inmunosupresores del tipo FK-506; (d) antihistamínicos (antagonistas de la histamina H₁), tales como bromofeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, triprolidina, clemastina, difenhidramina, difenilpiralina, tripelennamina, hidroxizina, metildiazina, prometazina, trimeprazina, azatadina, ciproheptadina, antazolina, feniramina pirilamina, astemizol, terfenadina, loratadina, cetirizina, fexofenadina, descarboetoxiloratadina, y similares; (e) antiasmáticos no esteroideos, tales como agonistas b₂ (terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetarina, albuteral, bitolterol, y pirbuterol), teofilina, cromolina sódica, atropina, bromuro de ipratropio, antagonistas de leucotrienos (zafirlukast, montelukast, pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-102,203), inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos (zileuton, BAY-1005); (f) agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tal como derivados de ácido propiónico (alminoprofeno, benxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, miroprofeno, naproxen, oxaprozina, piroprofeno, pranoprofeno, suproprofeno, ácido tiaproféenico y tioxaprofeno), derivados de ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenac, clidanac, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclozico, fentiazac, furofenac, ibufenac,

60

isoxepac, oxpinac, sulindac, tiopinac, tolmetina, zidometacina y zomepirac), derivados de ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico), derivados de ácido bifencilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetilsalicílico, sulfasalazina) y las pirazonas (apazona, bezpiperilona, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona); (g) inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2); (h) inhibidores de la fosfodiesterasa de tipo IV (PDE-IV); (i) otros antagonistas de los receptores de quimiocinas; (j) agentes reductores de colesterol, tales como inhibidores de la HMG-COA reductasa (lovastatina, simvastatina y pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, y otras estatinas), secuestrantes (colestiramina y colestipol), ácido nicotónico, derivados de ácido fenofibrato (gemfibrozilo, clofibrat, fenofibrato y benzafibrato), y probucol; (k) agentes antidiabéticos, tales como insulina, sulfonilureas, biguanidas (metformina), inhibidores de la α -glucosidasa (acarbose) y glitazonas (troglitazona y pioglitazona); (l) preparaciones de interferones (interferón alfa-2a, interferón-2B, interferón alfa-N3, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón gamma-1b); (m) compuestos antivirales, tales como efavirenz, nevirapina, indinavir, ganciclovir, lamivudina, famciclovir, y zalcitabina; (o) otros compuestos, tales como ácido 5-aminosalicílico y profármacos del mismo, anti-metabolitos, tales como azatioprina y 6-mercaptapurina, y agentes citotóxicos quimioterapéuticos contra el cáncer. La proporción en peso entre el compuesto de la presente invención y el segundo principio activo se puede variar y dependerá de las dosis eficaces de cada ingrediente.

En general se usará una dosis eficaz de cada uno. Por tanto, por ejemplo, cuando el compuesto se combina con un AINE, la proporción en peso entre el compuesto de la presente invención y el AINE variará, en general, de aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 1:1000, o, como alternativa, de aproximadamente 200:1 a aproximadamente 1:200. En general, las combinaciones de un compuesto de la presente invención y otros principios activos también estarán dentro del intervalo mencionado en lo que antecede, pero, en cada caso, se usará una dosis eficaz de cada principio activo.

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

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

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

agentes alquilantes, (incluyendo mostazas de nitrógeno, alquilsulfonatos, nitrosoureas, derivados de etileniminas y triazenos); antiangiogénicos (incluyendo inhibidores de las metaloproteinasas de matriz); antimetabolitos (incluyendo inhibidores de la adenosina desaminasa, antagonistas del ácido fólico, análogos de purina y análogos de pirimidina); antibióticos o anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos CTLA-4, antraciclina); inhibidores de la aromataasa; modificadores de la respuesta del ciclo celular; enzimas; inhibidores de la proteína farnesil transferasa; agentes hormonales y antihormonales y esteroides (incluyendo análogos sintéticos, glucocorticoides, estrógenos/antiestrógenos [por ejemplo, MSRE], andrógenos/antiandrógenos, progestinas, agonistas de los receptores de progesterona y agonistas y antagonistas de la liberación de la hormona luteinizante [LHRH]); los moduladores del sistema de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF)/receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR) (incluyendo los inhibidores IGFR1 I); los inhibidores de la señalización por integrinas; inhibidores de quinasa (incluyendo multiquinasa y/o inhibidores de la quinasa Src o Src/abl, inhibidores de la quinasa dependiente de ciclinas [CDK], anticuerpos panHer, Her-1 y Her-2, inhibidores de VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF, inhibidores de EGFR, inhibidores de la proteína activada por mitógeno [MAP], inhibidores de MEK, inhibidores de quinasa Aurora, inhibidores de PDGF y otros inhibidores de tirosina quinasas o inhibidores de serina/treonina quinasas; agentes de alteración de los microtúbulos, tales como ecteinascidinas o sus análogos o derivados: agentes estabilizantes de microtúbulos tales como taxanos y los epotilonas que se producen de forma natural y sus análogos sintéticos y semisintéticos; agentes de unión y desestabilizantes de microtúbulos (incluyendo alcaloides de la vinca) e inhibidores de topoisomerasas; inhibidores de la proteína prenil transferasa; complejos coordinadores de platino; inhibidores de la transducción de la señal; y otros agentes usados como agentes anticáncer y

citotóxicos tales como modificadores de la respuesta biológica, factores de crecimiento y moduladores inmunológicos.

Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden formular o coadministrar con otros agentes terapéuticos que se seleccionan por su utilidad al dirigir los efectos secundarios asociados con las afecciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden formularse con agentes para prevenir las náuseas, la hipersensibilidad y la irritación gástrica, tales como antieméticos y antihistamínicos H₁ y H₂.

Los otros agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, se pueden usar en, por ejemplo, las cantidades indicadas en el Physicians' Desk Reference (PDR) o como determine un experto en la técnica.

Los compuestos se administran a un mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad del compuesto de fórmula I que, cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a un mamífero, es eficaz para prevenir o mejorar la enfermedad o la progresión de la enfermedad.

Forma de dosificación y formulación

Los compuestos de la presente divulgación se pueden administrar en formas de dosificación oral, tales como comprimidos, cápsulas (cada una de las cuales incluye formulaciones de liberación sostenida o de liberación controlada), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Asimismo, se puede administrar por vía intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas usando formas de dosificación bien conocidas por los expertos en las técnicas farmacéuticas. Se pueden administrar de forma individual, pero, en general, se administrarán con un vehículo farmacéutico seleccionado en base a la vía de administración escogida y la práctica farmacéutica convencional.

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

A modo de guía general, la forma de dosificación oral diaria de cada principio activo, cuando se usa para los efectos indicados, variará entre aproximadamente 0,001 a 1.000 mg/kg de peso corporal o entre aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg/día de peso corporal al día, o, como alternativa, entre aproximadamente 1,0 a 20 mg/kg/día. Por vía intravenosa, las dosis variarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg/minuto durante una infusión a velocidad constante. Los compuestos de la presente invención se puede administrar a una única dosis diaria o la forma de dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. En una realización, la dosis oral diaria del principio activo está entre 3 y 600 mg administrados una vez al día o en dosis divididas administradas dos veces al día. Como alternativa, el principio activo se puede administrar una dosis de 10-20 mg administrados dos veces al día o 40 to 100 mg administrados una vez al día. Como alternativa, el principio activo se puede administrar a una dosis de 12,5 mg dos veces al día o 75 mg una vez al día. Como alternativa, el principio activo se puede administrar una dosis de 3, 10, 30, 100, 300, and 600 mg administrados una o dos veces al día.

Los compuestos de la presente invención se puede administrar en forma intranasal mediante uso tópico de vehículos intranasales adecuados, por vías transdérmicas, usando parches cutáneos transdérmicos. Cuando se administra en forma de un sistema de liberación transdérmico, la administración de la dosis será, por supuesto, continua y no intermitente durante toda la pauta de dosificación.

Normalmente, los compuestos se administran en forma de una mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (en conjunto, denominados en la presente memoria vehículos farmacéuticos), seleccionados de forma adecuada con respecto a la forma de administración prevista, es decir comprimidos, cápsulas, elixires, jarabes orales y similares, y consistente con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato cálcico, manitol, sorbitol y similares; para administración oral en forma líquida, los componentes del fármaco oral se pueden combinar con cualquier vehículo oral, inerte, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar agentes aglutinantes, lubricantes, disgregantes y colorantes adecuados a la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, goma de tragacanto o alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitaciones, almidón, metilcelulosa, agar,

bentonita, goma de xantano y similares.

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Se pueden formar liposomas a partir de diversos fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

- 5 Los compuestos de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol o poli(óxido de etileno)-polilisina sustituida con restos palmitoílo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse con una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poliepsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles anfipáticos o reticulados.

- 15 Las formas de dosificación (composiciones farmacéuticas) adecuadas para administración pueden contener de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 100 miligramos de principio activo por unidad de dosis. En estas composiciones farmacéuticas, normalmente el principio activo estará presente en una cantidad de 0,5-95 % en peso en base al peso total de la composición.

- 20 Las cápsulas de gelatina pueden contener el principio activo y vehículos en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Se pueden usar diluyentes similares para formar pastillas comprimidas. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar en forma de productos de liberación sostenida, para proporcionar la liberación continua de medicación durante un periodo de horas. Las pastillas comprimidas pueden estar recubiertas con azúcar o recubiertas con película para enmascarar el gusto y proteger el comprimido de la atmósfera, o con recubrimiento entérico para la disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal.

- 25 Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener agentes colorantes y aromatizantes para aumentar la aceptación por el paciente.

- 30 En general, son vehículos adecuados para soluciones parenterales agua, un aceite adecuado, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicoles. Las soluciones para administración parenteral pueden contener una sal hidrosoluble del principio activo, agentes estabilizantes adecuados y, en caso necesario, sustancias tampón. Agentes antioxidantes, tales como bisulfito sódico, sulfito sódico o ácido ascórbico, bien de forma individual o combinados, son agentes estabilizantes adecuados. También se usan ácido cítrico y sus sales, y EDTA sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil o propilparaben y clorobutanol.

- 35 Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, texto de referencia habitual en este campo.

Formas de dosificación farmacéuticas representativas útiles para administración de los compuestos de la presente invención se pueden ilustrar del siguiente modo:

Cápsulas

- 40 Se pueden preparar un gran número de cápsulas unitarias cargando cápsulas de gelatina dura convencionales de dos piezas con 100 miligramos de principio activo en polvo, 150 miligramos de lactosa, 50 miligramos de celulosa y 6 miligramos de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda

- 45 Se puede preparar una mezcla de ingrediente activo en un aceite digerible, tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva, e inyectar por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina, para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen 100 miligramos de principio activo. Las cápsulas se lavarán y secarán.

Comprimidos

- 50 Los comprimidos se pueden preparar mediante procedimientos convencionales, de modo que la unidad de dosis sea de 100 miligramos del principio activo, 0,2 miligramos de dióxido de sílice coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 miligramos de celulosa microcristalina, 11 miligramos de almidón y 98,8 miligramos de lactosa. Se pueden aplicar recubrimientos adecuados para incrementar la palatabilidad o retrasar la absorción.

Inyectables

Se puede preparar una composición parenteral adecuada para administración mediante inyección agitando 1,5 % en

peso del principio activo en 10 % en volumen de propilenglicol y agua. La solución se convertirá en isotónica con cloruro sódico y se esterilizará.

Suspensión

5 Se puede preparar una suspensión acuosa para administración oral, de modo que cada 5 ml contienen 100 mg de principio activo finamente dividido, 200 mg de carboximetilcelulosa sódica, 5 mg de benzoato sódico, 1,0 g de solución de sorbitol, U.S.P., y 0,025 ml de vainillina.

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

15 Cuando con el compuesto de los ejemplos se administran dos o más de los anteriores segundos agentes terapéuticos, generalmente, la cantidad de cada componente en dosis diaria habitual y forma de dosificación habitual se pueden reducir con respecto a la dosis habitual del agente cuando se administra solo, a la luz del efecto aditivo o sinérgico de los agentes terapéuticos cuando se administran combinados.

20 Particularmente, cuando se proporcionan en monodosis, existe el potencial de que se produzcan interacciones químicas entre los principios activos combinados. Por este motivo, cuando el compuestos de los ejemplos y un segundo agente terapéutico se combinan en una monodosis, se formulan de un modo tal que, aunque los principios activos se combinen en una monodosis, el contacto físico entre los principios activos se minimiza (es decir, se reduce). Por ejemplo, un principio activo puede tener recubrimiento entérico. Mediante el recubrimiento entérico de uno de los principios activos, es posible, no solo minimizar el contacto entre los principios activos sino también es posible controlar la liberación de uno de estos componentes en el tracto gastrointestinal, de modo que uno de estos componentes no se libere en el estómago sino que se libere en el intestino. Uno de los principios activos también se puede recubrir con un material que realice una liberación sostenida a lo largo del tracto gastrointestinal, y también sirve para minimizar el contacto físico entre los principios activos combinados. Además, el componente de liberación sostenida estar recubierto adicionalmente con recubrimiento entérico, de modo que la liberación de este componente sólo se produzca en el intestino. Otro enfoque más implicaría la formulación de un producto de combinación en el que un componente esté recubierto con un polímero de liberación sostenida y/o entérico, y el otro componente también está recubierto con un polímero, tal como una hidroxipropilcelulosa (HPMC) de bajo grado de viscosidad u otros materiales adecuados conocidos en la técnica, con el fin de separar más los componentes activos. El recubrimiento polimérico sirve para formar una barrera adicional para interaccionar con el otro componente.

35 Éstos, además de otros modos de minimizar el contacto entre los componentes de productos de combinación de la presente invención, se administren en forma de dosificación única o se administren en formas separadas pero al mismo tiempo y del mismo modo, serán evidentes para los expertos en la técnica, una vez han obtenido la presente divulgación.

40 Adicionalmente, ciertos compuestos divulgados en la presente memoria pueden ser útiles como metabolitos de otros compuestos. Por lo tanto, en una realización, los compuestos pueden ser útiles como un compuesto sustancialmente puro, que puede también incorporarse después en una composición farmacéutica o puede ser útil como metabolito que se genera después de la administración del profármaco de ese compuesto. En una realización, un compuesto puede ser útil como un metabolito siendo útil para el tratamiento de trastornos como se divulga en la presente memoria

45 "Sustancialmente puro" como se usa en la presente memoria pretende incluir un compuesto que tiene una pureza mayor de aproximadamente el 90 por ciento incluyendo aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 por cien.

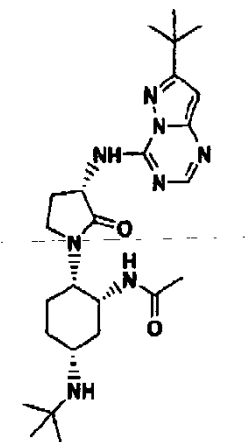
Como un ejemplo, un compuesto divulgado en la presente memoria puede ser sustancialmente puro en tanto que tiene una pureza mayor de aproximadamente el 90 por ciento (en peso), en el que el menos de aproximadamente 10 por ciento restante de material comprende otros metabolitos del compuesto, un profármaco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

50 Obviamente, numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención son posibles en vista de las enseñanzas anteriores. Por tanto, debe entenderse que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de una manera distinta a la que se describe específicamente en la presente memoria.

55

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5 o una sal del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, que no está en forma de sal.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, que es una forma cristalina de dicho compuesto.

4. El compuesto de la reivindicación 2 en una forma cristalina, que comprende la forma N-1, en el que la forma N-1 es caracterizada por parámetros de celda unitaria sustancialmente iguales a los siguientes:

10 Dimensiones de la celda:

$$a = 7,3085(6)$$

$$b = 16,257(1)$$

$$c = 22,688(2)$$

$$\alpha^\circ = 90$$

15 $\beta^\circ = 90$

$$\gamma^\circ = 90$$

Grupo espaciador P2₁2₁2₁

Moléculas/celda unitaria (Z): 1

Densidad, calc. g-cm⁻³: 1,194

20 en el que dicho cristal está a una temperatura de aproximadamente -70° C.

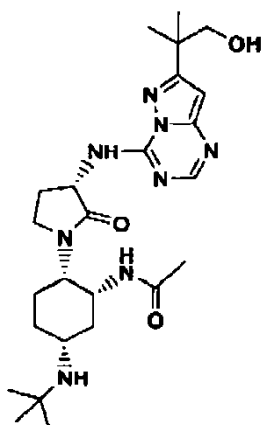
5. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha forma N-1 está en forma sustancialmente pura.

6. La forma cristalina como se define en la reivindicación 4, **caracterizada por** un patrón de difracción en polvo de rayos X (PXRD) sustancialmente de acuerdo con lo mostrado en la Figura 1.

25 7. La forma cristalina como se define en la reivindicación 4, que se **caracteriza por** un termograma de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente de acuerdo con lo mostrado en la Figura 2, que tiene una transición endotérmica por encima de aproximadamente 205° C.

8. La forma cristalina como se define en la reivindicación 4, **caracterizada por** una curva termogravimétrica de acuerdo con lo mostrado en la Figura 3.

30 9. Un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal del mismo.

10. Una composición farmacéutica, que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, que además comprende al menos un agente terapéutico adicional.

12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en terapia.

10 13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que dicho trastorno es seleccionado de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, dolor neuropático, miocardiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esclerodermia, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada al VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis del trasplante, traumatismo cerebral inducido física o químicamente, enfermedad inflamatoria intestinal, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis por suero neurotóxico, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia de la neoíntima venosa, hiperplasia de la neoíntima de inserción de diálisis, hiperplasia de la íntima de derivación arteriovenosa, trasplante de órganos, nefropatía crónica de aloinjertos, cáncer, hiperplasia de la neoíntima venosa, hiperplasia de la neoíntima en la inserción de la diálisis e hiperplasia de la neoíntima por derivación arteriovenosa.

15 14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cancerosas y cardiovasculares.

20 15. Un procedimiento de preparación N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, que comprende el procedimiento expuesto en el esquema siguiente.

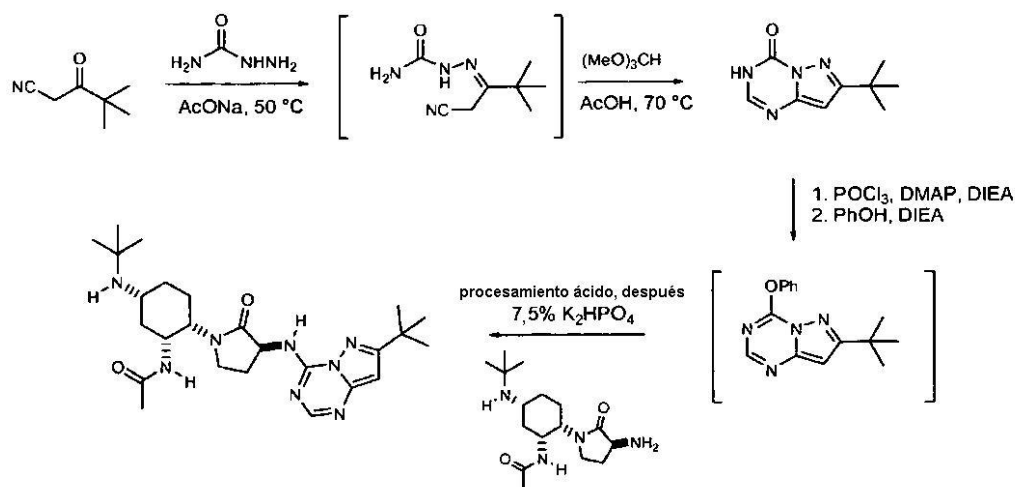


FIG. 1

Patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida (Ejemplo 5)

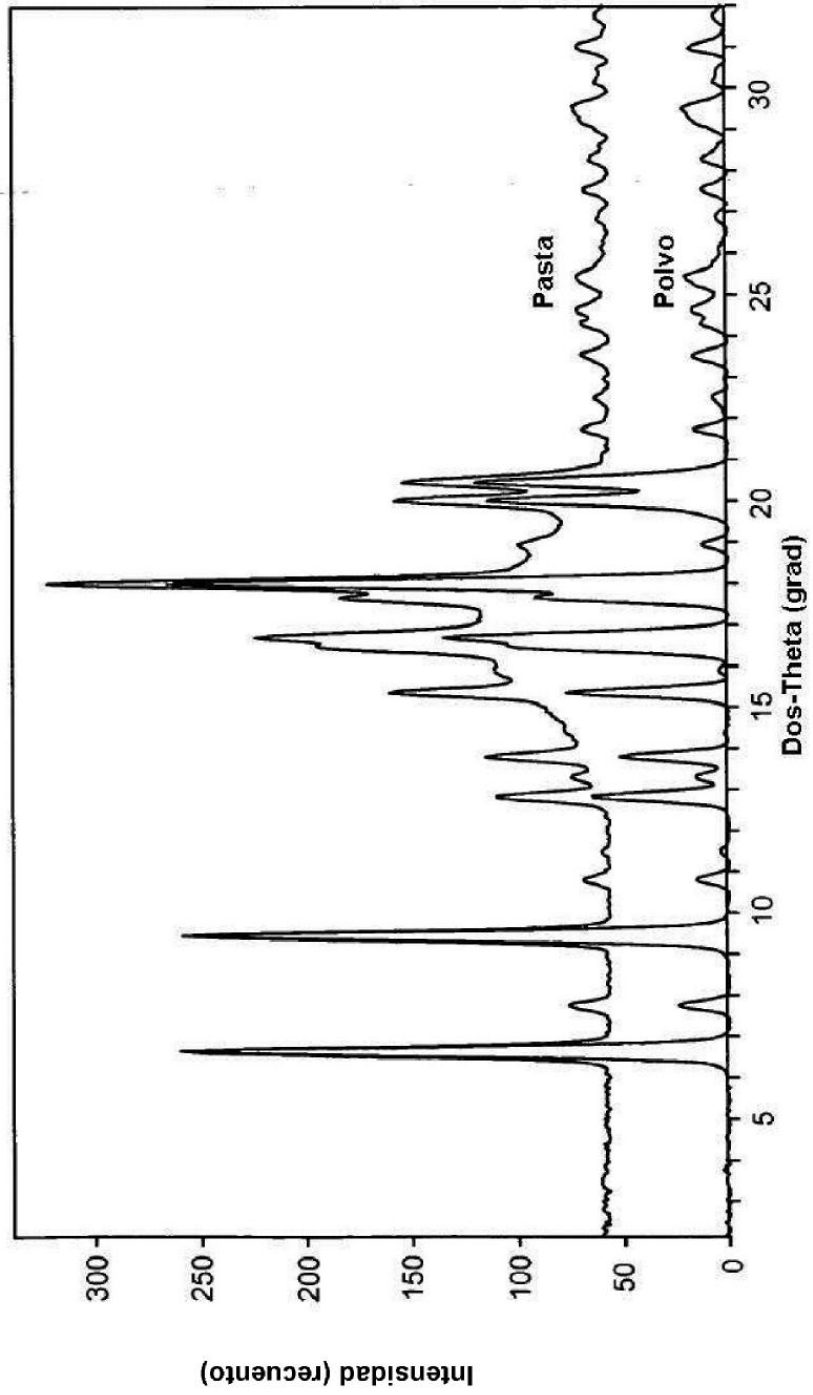


FIG. 2

DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazololo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il) ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-1 (Ejemplo 5)

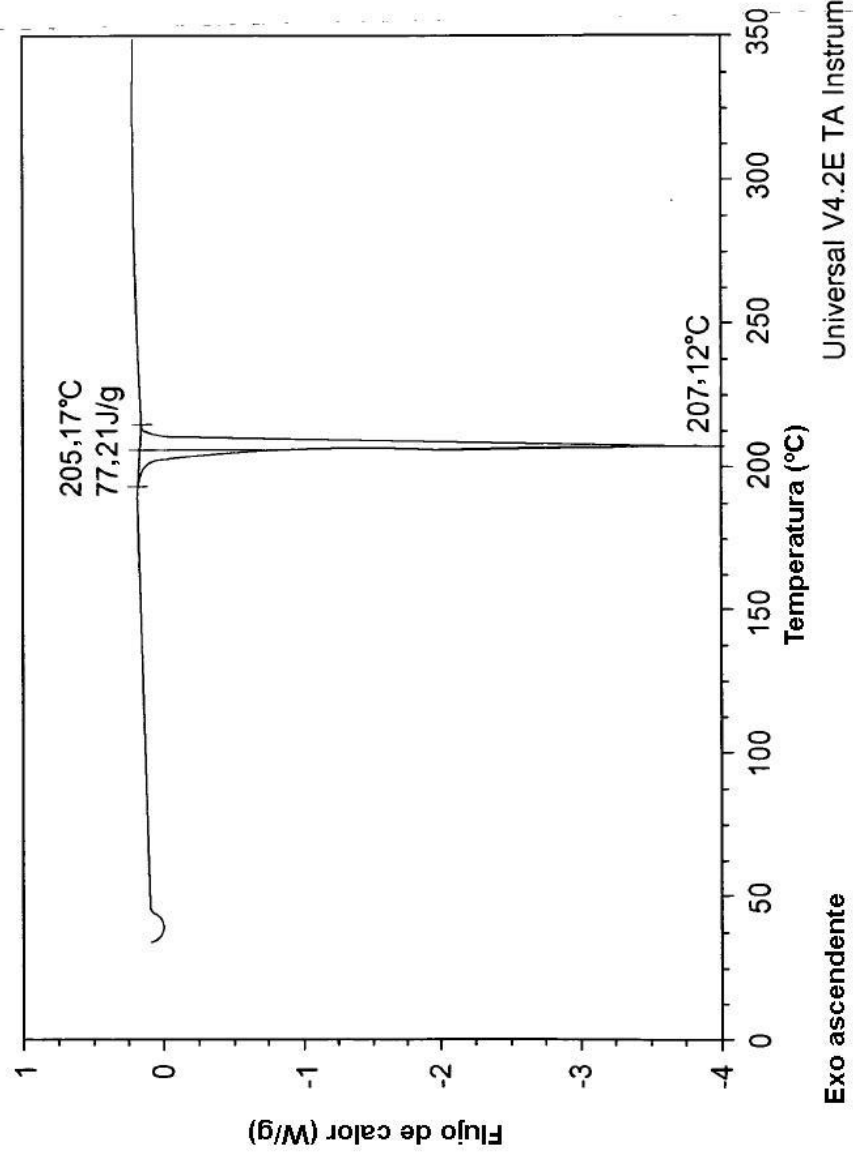


FIG. 3

TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(terc-butilamino)-2-((S)-3-(7-terc-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-1 (Ejemplo 5)

