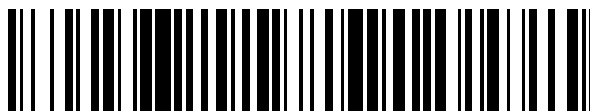


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 041**

51 Int. Cl.:

C07D 211/58	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)
A61K 31/444	(2006.01)	C07D 401/12	(2006.01)
A61K 31/4468	(2006.01)	A61K 31/5377	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 31/4545	(2006.01)
A61P 11/06	(2006.01)	A61K 31/454	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)	C07D 401/06	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)	C07D 405/06	(2006.01)
A61P 31/18	(2006.01)	A61K 31/453	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)	C07D 405/14	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)	C07D 401/14	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2005 E 05785808 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 1790637**

54 Título: **Derivados de N-4-piperidilurea y medicamentos que los contienen como principio activo**

30 Prioridad:

13.09.2004 JP 2004264855
26.04.2005 JP 2005127359

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2014

73 Titular/es:

ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
1-5, DOSHOMACHI 2-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 541-8526, JP

72 Inventor/es:

TAKAOKA, YOSHIKAZU;
SHIBAYAMA, SHIRO y
NISHIZAWA, RENA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 457 041 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de N-4-piperidilurea y medicamentos que los contienen como principio activo

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con un derivado heterocíclico que contiene nitrógeno que es útil como medicamento y con un fármaco que lo contiene como principio activo. Para explicar con más detalle la presente invención, ésta se relaciona con 5-[[butil{1-[(2-metil-6-{4-[(metilsulfonil)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil}amino)carbonil]amino]-2,4-difluorobenzamida, una sal de la misma, un N-óxido de la misma o un solvato de la misma y con una composición farmacéutica que contiene el compuesto.

Antecedentes de la invención

15 La quimioquina es conocida como una proteína básica endógena que tiene capacidades quimiotácticas y activadoras de leucocitos y fuertes capacidades de unión a heparina. Actualmente, se considera que la quimioquina está relacionada no sólo con el control de la infiltración de leucocitos específicos en el momento de la inflamación y de la respuesta inmune, sino también con el desarrollo y la conducción de linfocitos en condiciones fisiológicas y con la migración de células precursoras de hemocitos y de células somáticas.

20 La diferenciación, proliferación y muerte celular de los hemocitos están controladas por diversos tipos de citoquinas. En el organismo vivo, se producen inflamaciones tóxicas, y la diferenciación, maduración y similares de los linfocitos ocurren en determinados sitios especificados. Es decir, que diversas células necesarias migran a determinados sitios especificados y se acumulan en ellos, para provocar una serie de inflamaciones y de respuestas inmunes. Por consiguiente, la migración de las células es también un fenómeno indispensable además de la diferenciación, proliferación y muerte de las células.

30 La migración de hemocitos en el organismo vivo se inicia primeramente en la etapa de desarrollo mediante el cambio de la hematopoyesis iniciada en la región AGM a hematopoyesis permanente en la médula ósea a través del hígado fetal. Además, las células precursoras de las células T y las células dendríticas del timo migran del hígado fetal a la médula ósea y luego a la glándula del timo y se citodiferencian bajo el ambiente del timo. Las células T que recibieron la selección de clones migran a tejidos linfoides secundarios y participan en la respuesta inmune en la periferia. Las células de Langerhans de la piel activadas y diferenciadas por captura de un antígeno migran a la región de las células T de un nódulo linfático tóxico y activan las células T naíf que hay en él como células dendríticas. Las células T de memoria realizan su repatriación de nuevo al nódulo linfático a través de los vasos linfáticos y sanguíneos. Además, las células B, las células T del epitelio intestinal, las células T $\gamma\delta$, las células NKT y las células dendríticas migran desde la médula ósea sin pasar a través de la glándula del timo y se diferencian para participar en la respuesta inmune.

40 La quimioquina tiene una gran participación en la migración de dichas diversas células. Los receptores de quimioquinas están muy relacionados con el control de la inflamación y las respuestas inmunes a través de un mecanismo en el cual se expresan en ciertos períodos especificados en células específicas variadas, y las células efectoras se acumulan en una región en la que se produce quimioquina.

45 Por ejemplo, se ha publicado una investigación en modelos animales, tales como el ratón con eliminación de CCR5, que sugiere que CCR5 como receptor de quimioquinas juega un papel significativo en el rechazo en el trasplante de órganos o en la enfermedad autoinmune, etc. (Transplantation, Vol. 72(7), 1199-1205 (2001); Diabetes, Vol. 51 (8), 2489-2495 (2002); Journal of Virology, Vol. 77(1), 191-198 (2003); Journal of Immunology, Vol. 164(12), 6303-6312 (2000)). También se ha publicado una comparación del riesgo de desarrollar varias enfermedades y la duración de la supervivencia del injerto trasplantado, etc. entre un humano que tiene CCR inactivo y un humano que tiene uno de tipo salvaje (Ref. The Lancet, Vol. 357, 1758-1761 (2001); Arthritis & Rheumatism, Vol. 42(5), 989-992 (1999); The Lancet, Vol. 354, 1264-1265 (1999); European Journal of Immunogenetics, Vol. 29(6) 525-528 (2002)). Se sugiere que CCR5 está relacionado con varias enfermedades, pero no hacen referencia al efecto de fármacos que antagonicen el CCR en sus informes.

55 Actualmente, se proporciona un tratamiento inmunosupresor para enfermedades en el área de los trasplantes. Es decir, se usa un inhibidor de la calcineurina, tal como ciclosporina o tacrolimus (FK506), principalmente con diversos tipos de agentes inmunosupresores, por ejemplo, un inhibidor de TOR ("target of rapamycin", diana de la rapamicina), tal como sirolimus (rapamicina), un antiflogístico inespecífico, tal como corticosteroides, un fármaco antiproliferativo, tal como azatioprina, micofenolato mofetilo, etc. Pero frecuentemente causa un rechazo crónico o un efecto colateral severo, por lo que se desea un nuevo agente inmunosupresor útil que prolongue la supervivencia del injerto trasplantado y reduzca los efectos colaterales en comparación con los fármacos existentes.

Se usa un fármaco antiinflamatorio o un fármaco que modula la función inmune, tal como un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que tiene una actividad inhibitoria frente a la ciclooxigenasa (COX), un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FARME), esteroides, etc., para el tratamiento de la enfermedad autoinmune o de enfermedades alérgicas. Cuanto más efectivo sea un fármaco, más severo será el efecto colateral que cause, y se sugiere que el tratamiento con estos fármacos no es un remedio subyacente para la enfermedad, sino un mero tratamiento sintomático.

Al mismo tiempo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (al que en adelante se hará aquí referencia como "SIDA"), que está inducido por el virus de la inmunodeficiencia humana (al que en adelante se hará aquí referencia como "VIH"), es una de las enfermedades para las que se han deseado más seriamente métodos terapéuticos en los últimos años. Una vez se ha completado la infección por el VIH en una célula CD4-positiva, que es una célula diana principal, el VIH repite su proliferación en el organismo del paciente y, antes o después, destruye por completo la célula T que se hace cargo de la función inmunológica. Durante este proceso, la función inmunológica se reduce gradualmente, para causar fiebre, diarrea, aumento de los nódulos linfáticos y diversas afecciones de inmunodeficiencia similares, que pueden causar complicaciones tales como neumonía por *Pneumocystis carinii* y diversas infecciones oportunistas similares. Dichas afecciones constituyen el inicio del SIDA y es bien sabido que inducen y empeoran el sarcoma de Kaposi y tumores malignos similares.

Como métodos preventivos y/o terapéuticos recientes para el SIDA, se han hecho intentos para, v.g., (1) inhibir el crecimiento del VIH mediante la administración de un inhibidor de la transcriptasa inversa o un inhibidor de proteasas y (2) prevenir o aliviar las infecciones oportunistas mediante la administración de un fármaco que tiene actividad inmunopotenciadora.

Las células T helper que se hacen cargo del sistema inmune central se infectan principalmente con VIH. Se sabe desde 1985 que el VIH utiliza la proteína de membrana CD4 que se expresa sobre la membrana de las células T en la infección (Cell, 52, 631 (1985)). La molécula de CD4 está compuesta por 433 residuos de aminoácidos y se puede encontrar su expresión en macrófagos, algunas células B, células endoteliales vasculares, células de Langerhans en los tejidos cutáneos, células dendríticas en los tejidos linfoides, células de la glía del sistema nervioso central y similares, además de en las células T helper maduras. Sin embargo, como se ha revelado que la infección por el VIH no se completa por la molécula de CD4 sola, se ha sugerido la posibilidad de la presencia de factores aparte de la molécula de CD4 que están relacionados con la infección de las células por el VIH.

También se usa CCR5, que es un receptor de RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β , en el momento de la infección con un VIH trópico de macrófagos (R5) (Science, 272, 1955 (1996)).

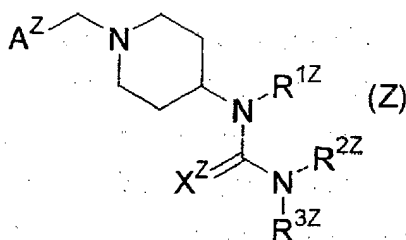
Por consiguiente, sustancias que puedan competir con CCR5 por el VIH o que puedan unirse al virus VIH, haciendo así que el virus no sea capaz de unirse a CCR5, podrían convertirse en inhibidores de la infección por el VIH.

También se habla de la posibilidad de usar el CCR5 en la infección por el Virus Sincitial Respiratorio (al que en adelante se hará aquí referencia como "VSR").

Se dice que CCR5 se expresa en la placa arteriosclerótica, por lo que se considera que los moduladores de los receptores de quimioquinas son también útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

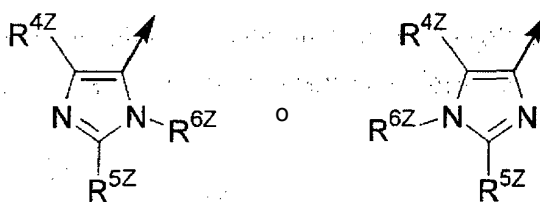
En base a lo anterior, se considera que los receptores de quimioquinas (por ejemplo, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , etc.), especialmente CCR5, están estrechamente relacionados con la inflamación, con enfermedades inmunológicas, con enfermedades infecciosas (infección por VIH, infección por VSR, etc.) y con enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, se considera que están relacionados con diversas enfermedades inflamatorias (asma, nefritis, nefropatía, hepatitis, artritis, artritis reumatoide, rinitis, conjuntivitis, enfermedad inflamatoria del intestino, tal como colitis ulcerativa, etc.), enfermedades inmunológicas (enfermedades autoinmunes, rechazo en el trasplante de órganos (rechazo de injertos de órganos sólidos, rechazo de injertos de células de los islotes pancreáticos en la terapia para la diabetes, enfermedad del injerto contra el huésped, etc.), inmunosupresión, psoriasis, esclerosis múltiple, etc.), enfermedades infecciosas (infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, infección por VSR, etc.), enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, urticaria, aspergilosis alérgica broncopulmonar, gastroenteritis alérgica eosinofílica, etc.), enfermedades cardiovasculares (arteriosclerosis, lesión por isquemia y reperfusión, etc.), síndrome del distrés respiratorio agudo, shock acompañante de la infección bacteriana, diabetes mellitus, metástasis cancerosa y similares.

Se dice que los derivados aminopiperidina representados por la fórmula (Z)



(donde R^{1Z} es un átomo de hidrógeno o alquilo C_{1-12} , R^{2Z} y R^{3Z} son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo C_{1-12} , X^Z es un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno, A^Z es

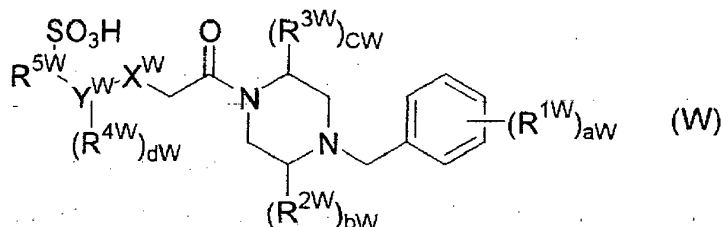
5



(donde R^{4Z} es un átomo de hidrógeno, alquilo C_{1-12} , cicloalquilo C_{3-8} , arilo, arilo sustituido, aril-C(=O)- o aril-CH(OH)-; R^{5Z} es hidrógeno, alquilo C_{1-12} , alcoxi C_{1-4} , halógeno o COR; R^{6Z} es hidrógeno, alquilo C_{1-12} o alquilo C_{1-4} sustituido, con la condición de que la definición de cada símbolo sea un extracto parcialmente) son útiles como inhibidores de los receptores de quimioquinas (ref. memoria descriptiva de WO02/079186).

10

Se describe que los compuestos ácido sulfónico representados por la fórmula (W)



15

(donde X^W es -O-, -S-, -CH₂- o -NR⁶-; Y^W es arilo C_{6-10} o heteroarilo C_{2-9} ; R^{1W} es seleccionado entre el grupo consistente en: H-, HO-, halo-, alquilo C_{1-8} eventualmente sustituido con 1-3 átomos de flúor, etc.; R^{2W} y R^{3W} son seleccionados entre el grupo consistente en: H-, oxo, alquilo C_{1-8} eventualmente sustituido con 1-3 átomos de flúor, etc.; R^{4W} es seleccionado entre el grupo consistente en: H-, HO-, halo-, NC-, etc.; R^{5W} es alquilo C_{1-8} ; aW es 0-5; bW es 0-2; cW es 0-2; y dW es 0-4, con la condición de que la definición de cada símbolo sea un extracto parcialmente), sus sales farmacológicamente aceptables y sus profármacos son antagonistas selectivos de CCR1 (ref. memoria descriptiva de WO02/102787).

20

Más aún, se describen derivados 1-(4-piridil)piperazina como antagonistas de CCR5 (ref. memoria descriptiva de EE.UU. 6.391.865).

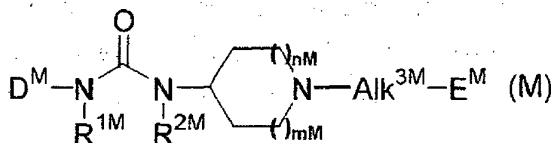
25

Por otro lado, se dice que los derivados triazaespiro[5.5]undecano, sus sales de amonio cuaternario o sus N-óxidos, o sus sales farmacológicamente aceptables, regulan el efecto de la quimioquina/receptor de quimioquina, por lo que se usan para la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, del asma, de la dermatitis atópica, de la urticaria, de enfermedades alérgicas (aspergilosis alérgica broncopulmonar o gastroenteritis alérgica eosinofílica, etc.), de la nefritis, de la nefropatía, de la hepatitis, de la artritis, de la artritis reumatoide, de la psoriasis, de la rinitis, de la conjuntivitis, del trastorno por isquemia-reperusión, de la esclerosis múltiple, de la colitis ulcerativa, del síndrome de distrés respiratorio agudo, del shock citotóxico, de la diabetes, de la enfermedad autoinmune, de las reacciones de rechazo de órganos trasplantados, de la inmunosupresión, de la metástasis cancerosa y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (ref. memoria descriptiva de WO01/40227).

30

35

Se describe que los compuestos representados por la fórmula (M)



(donde mM y nM , que son iguales o diferentes, son cada uno cero o un número entero de 1 ó 2; Alk^{3M} es un enlace covalente o una cadena de alquileo C_{1-6} lineal o ramificada; R^{1M} y R^{2M} , que son iguales o diferentes, son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6} lineal o ramificado; D^M es un grupo de anillo aromático o heteroaromático eventualmente sustituido; y E^M es un grupo cicloalquilo C_{7-10} , cicloalqueno C_{7-10} o policicloalifático C_{7-10} eventualmente sustituido) son moduladores de CXCR3 (ref. memoria descriptiva de WO03/070242).

10 Divulgación de la invención

El compuesto que tiene actividad antagonista frente a CCR5 es útil en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR5. Por lo tanto, se desea desarrollar antagonistas seguros de CCR5.

15 Con objeto de encontrar un compuesto que se una específicamente al receptor de quimioquina, especialmente CCR5, y que tenga actividad antagonista contra él, los presentes inventores han realizado estudios intensivos y han visto, como resultado de los mismos, que se pueden alcanzar estos objetivos mediante el siguiente compuesto, y de este modo se ha logrado la presente invención.

20 La presente invención se relaciona con:

1. un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en (150) 5-[[[butil{1-[(2-metil-6-{4-[(metilsulfonyl)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil]amino}carbonil]amino]-2,4-difluorobenzamida, una sal de la misma, un N-óxido de la misma o un solvato de la misma;
- 25 2. el compuesto según el anteriormente descrito 1, donde el compuesto es clorhidrato de 5-[[[butil{1-[(2-metil-6-{4-[(metilsulfonyl)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil]amino}carbonil]amino]-2,4-difluorobenzamida o dihidroclorhidrato de 5-[[[butil{1-[(2-metil-6-{4-[(metilsulfonyl)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil]amino}carbonil]amino]-2,4-difluorobenzamida;
3. una composición farmacéutica que contiene el compuesto según los anteriormente descritos 1 ó 2, una sal del mismo, un N-óxido del mismo o un solvato del mismo.

Sales:

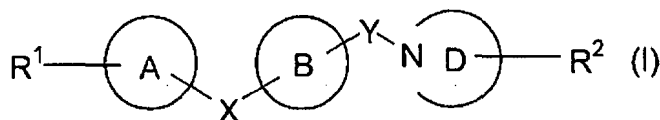
La sal del compuesto de la invención incluye cualquier sal no tóxica o sal farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las sales farmacéuticamente aceptables, se prefieren las que son poco tóxicas e hidrosolubles. Son ejemplos de sales apropiadas del compuesto de la invención las sales con metales alcalinos (tales como potasio, sodio y litio), las sales con metales alcalinotérreos (tales como calcio y magnesio), las sales de amonio (tales como la sal de tetrametilamonio y la sal de tetrabutilamonio), las sales con aminas orgánicas (tales como trietilamina, metilamina, dimetilamina, ciclopentilamina, bencilamina, fenetilamina, piperidina, monoetanolamina, dietanolamina, tris(hidroximetil)metilamina, lisina, arginina y N-metil-D-glucamina) y las sales de adición de ácido [tales como las sales de ácidos inorgánicos (v.g., clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, fosfato y nitrato) y las sales de ácidos orgánicos (v.g., acetato, trifluoroacetato, lactato, tartrato, oxalato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluensulfonato, isotionato, glucuronato y gluconato), etc.]. La sal del compuesto de la presente invención también incluye solvatos, y también solvatos con las sales de metales alcalino(térreos), sales de amonio, sales de aminas orgánicas y sales de adición de ácido antes mencionadas. El solvato es preferiblemente poco tóxico e hidrosoluble. Son ejemplos de un solvato apropiado los solvatos con agua y con solventes alcohólicos (tales como etanol). Los compuestos de la presente invención se convierten en sales poco tóxicas o sales farmacéuticamente aceptables por métodos conocidos.

Más aún, la sal incluye una sal de amonio cuaternario. La sal de amonio cuaternario del compuesto de la invención es un compuesto en el que su nitrógeno está cuaternizado con R^0 (R^0 es alquilo C_{1-8} o alquilo C_{1-8} sustituido por fenilo).

La sal también incluye un N-óxido. El compuesto de la presente invención puede convertirse en un N-óxido por métodos conocidos. El N-óxido es un compuesto en el que el nitrógeno del compuesto de la invención está oxidado.

Procedimientos para la preparación del compuesto de la presente invención

Se ilustra la preparación del compuesto de la invención mediante la preparación de compuestos de fórmula general (I) según sea apropiado.



5 donde R^1 representa (1) $-N(R^{1A})SO_2-R^{1B}$, (2) $-SO_2NR^{1C}R^{1D}$, (3) $-COOR^{1E}$, (4) $-OR^{1F}$, (5) $-S(O)_mR^{1G}$, (6) $-CONR^{1H}R^{1J}$, (7) $-NR^{1K}CO^{1L}$ o (8) ciano, donde m es 0, 1 ó 2; R^{1A} , R^{1B} , R^{1C} , R^{1D} , R^{1E} , R^{1F} , R^{1G} , R^{1H} , R^{1J} , R^{1K} y R^{1L} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarbonado que puede tener un sustituyente(s) o un grupo heterocíclico de 3 a 15 miembros que puede tener un sustituyente(s), y donde R^{1C} y R^{1D} o R^{1H} y R^{1J} pueden formar un grupo heterocíclico que contiene nitrógeno que puede tener un sustituyente(s) junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos;

10 X e Y representan cada uno independientemente un enlace o un espaciador que contiene de 1 a 3 átomos como cadena principal;

15 el anillo A y el anillo B, que son iguales o diferentes, representan cada uno un grupo carbocíclico o grupo heterocíclico de 3 a 15 miembros que puede tener un sustituyente(s);

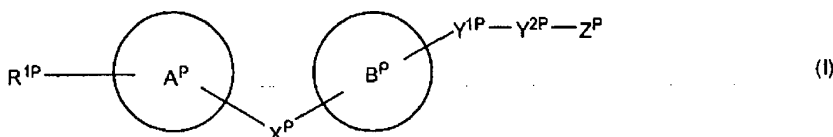
el anillo D es un grupo heterocíclico que contiene nitrógeno de 3 a 15 miembros que puede tener un sustituyente(s);

20 R^2 es (1) un átomo de hidrógeno, (2) un grupo hidrocarbonado que puede tener un sustituyente(s), (3) un grupo ciano, (4) un grupo hidroxilo que puede estar protegido, (5) un grupo amino que puede tener un sustituyente(s), (6) un grupo oxo, (7) un grupo heterocíclico de 3 a 15 miembros que puede tener un sustituyente(s) o (8) $=N-OR^6$, donde R^6 representa un átomo de hidrógeno o alquilo C_{1-4} ;

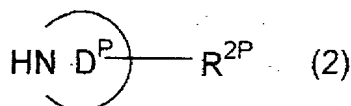
una sal de de los mismos, un N-óxido de los mismos o un solvato de los mismos.

25 El compuesto de la presente invención puede ser preparado por métodos que mejoran y combinan apropiadamente métodos conocidos, tales como los métodos descritos a continuación, los métodos descritos en los Ejemplos o los métodos descritos en *Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations*, 2ª Edición (Richard C. Larock, John Wiley & Sons Inc., 1999). En cada método descrito a continuación, se puede usar un material de partida como una sal del mismo. Un ejemplo de la sal incluye una sal del compuesto de fórmula (I) antes descrito.

30 Entre los compuestos representados por la fórmula (I), se puede preparar un compuesto en el que un espaciador que está adyacente al anillo D es $-CH_2-$, $-CO-$ o $-SO_2-$ por alquilación, amidación o sulfonamidación mediante un compuesto representado por la fórmula (1)



35 (donde Z es un grupo hidroxilo o un grupo saliente (v.g., un átomo de halógeno, un grupo p-toluensulfonilo, un grupo metanosulfonilo, un grupo trifluorometanosulfonilo, etc.); Y^{1P} es un enlace o un espaciador que contiene 1 ó 2 átomos como cadena principal; Y^{2P} es $-CH_2-$, $-CO-$ o $-SO_2-$, y R^{1P} , X^P , el anillo A^P y el anillo B^P tienen los mismos significados que R^1 , X, el anillo A y el anillo B, respectivamente, con la condición de que el grupo carboxi, el grupo hidroxilo, el grupo amino o el grupo mercapto en R^{1P} , X^P , Y^{1P} , Y^{2P} , el anillo A^P o el anillo B^P puedan estar protegidos, si es necesario. Otros símbolos tienen el mismo significado que el antes descrito) y un compuesto representado por la fórmula (2)



45 (donde R^{2P} y el anillo D^P tienen los mismos significados que R^2 y D, respectivamente, con la condición de que el grupo carboxi, el grupo hidroxilo, el grupo amino o el grupo mercapto en R^{2P} o el anillo D^P puedan estar protegidos, si es necesario, si es necesario, seguido de eliminación del grupo protector.

50

La alquilación es bien conocida. Por ejemplo, se puede llevar a cabo en un solvente orgánico (*v.g.*, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo), en presencia de un álcali (*v.g.*, carbonato de potasio, carbonato de sodio, trietilamina, *etc.*) y en presencia o ausencia de yoduro de sodio o yoduro de potasio a una temperatura de aproximadamente 0 a 150°C.

5

La amidación es conocida. Por ejemplo, incluye un método

- (1) a través de un haluro de acilo,
- (2) a través de un anhídrido de ácido mixto,
- (3) usando un agente condensante.

10

Se explican estos métodos como sigue.

(1) El método a través de un haluro de acilo puede ser llevado a cabo, por ejemplo, por reacción de ácido carboxílico con un haluro de acilo (*v.g.*, cloruro de oxalilo o cloruro de tionilo) en un solvente orgánico (*v.g.*, cloroformo, diclorometano, éter dietílico o tetrahidrofurano) o sin solvente a una temperatura de aproximadamente -20°C a la temperatura de reflujo, y luego se puede hacer reaccionar el derivado haluro de acilo obtenido con amina en un solvente orgánico (*v.g.*, cloroformo, diclorometano, éter dietílico o tetrahidrofurano) en presencia de una base (*v.g.*, piridina, trietilamina, dimetilaminopiridina o diisopropiletilamina, *etc.*) a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C. Como alternativa, se puede hacer reaccionar el derivado haluro de acilo obtenido con una amina en un solvente orgánico (*v.g.*, dioxano, tetrahidrofurano) usando una solución acuosa alcalina (*v.g.*, hidrógeno carbonato de sodio, hidróxido de sodio) a una temperatura de aproximadamente -78 a 40°C.

15

20

(2) El método a través de un anhídrido de ácido mixto puede ser llevado a cabo, por ejemplo, por reacción de ácido carboxílico con un haluro de acilo (*v.g.*, cloruro de pivaloilo, cloruro de p-toluensulfonilo o cloruro de metanosulfonilo) o un derivado de ácido (*v.g.*, cloroformiato de etilo o cloroformiato de isobutilo) en un solvente orgánico (*v.g.*, cloroformo, diclorometano, éter dietílico, tetrahidrofurano) o sin solvente, en presencia de una base (*v.g.*, piridina, trietilamina, dimetilaminopiridina o diisopropiletilamina), a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C, y se puede hacer reaccionar luego el derivado anhídrido de ácido obtenido con una amina en un solvente orgánico (*v.g.*, cloroformo, cloruro de metileno, éter dietílico o tetrahidrofurano), a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C.

25

30

(3) El método que utiliza un agente condensante puede ser llevado a cabo, por ejemplo, por reacción de ácido carboxílico con amina en un solvente orgánico (*v.g.*, cloroformo, diclorometano, dimetilformamida, éter dietílico o tetrahidrofurano) o sin solvente, en presencia o ausencia de una base (*v.g.*, piridina, trietilamina, dimetilaminopiridina), usando un agente condensante (*v.g.*, 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC), 1,1'-carbodiimidazol (CDI), yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio o anhídrido cíclico del ácido 1-propanofosfónico (PPA)), en presencia o ausencia de 1-hidroxibenzotiazol (HOBt), a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C.

35

40

La reacción descrita en (1), (2) y (3) puede ser llevada a cabo en un gas inerte (*v.g.*, argón, nitrógeno) para evitar el agua y obtener un resultado preferible.

La sulfonamidación es bien conocida. Por ejemplo, puede ser llevada a cabo por reacción de ácido sulfónico con un haluro de acilo (*v.g.*, cloruro de oxalilo o cloruro de tionilo, pentacloruro de fósforo o tricloruro de fósforo) en un solvente orgánico (*v.g.*, cloroformo, diclorometano, dicloroetano, éter dietílico, tetrahidrofurano o *tert*-butil metil éter) o sin solvente, a una temperatura de aproximadamente -20°C a la temperatura de reflujo, y luego se puede hacer reaccionar el derivado haluro de sulfonilo obtenido con una amina en un solvente orgánico (*v.g.*, cloroformo, diclorometano, éter dietílico o tetrahidrofurano) en presencia de una base (*v.g.*, diisopropiletilamina, piridina, trietilamina, dimetilaminopiridina, *etc.*) a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C.

45

50

La eliminación del grupo protector es conocida y puede ser realizada mediante el siguiente método.

El grupo protector de carboxilo incluye, por ejemplo, metilo, etilo, alilo, *tert*-butilo, tricloroetilo, bencilo (Bn) o fenacilo, *etc.*

55

El grupo protector de hidroxilo incluye, por ejemplo, metilo, tritilo, metoximetilo (MOM), 1-etoxietilo (EE), metoxietoximetilo (MEM), 2-tetrahidropiranilo (THP), trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), *tert*-butildimetilsililo (TBDMS), *tert*-butildifenilsililo (TBDPS), acetilo (Ac), pivaloilo, benzoilo, bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo, aliloxicarbonilo (Alloc) y 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc), *etc.*

60

El grupo protector de amino incluye, por ejemplo, benciloxicarbonilo, *tert*-butoxicarbonilo, aliloxicarbonilo (Alloc), 1-metil-1-(4-bifenil)etoxicarbonilo (Bpoc), trifluoroacetilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo, benciloximetilo (BOM) o 2-(trimetilsilil)etoxicimetilo (SEM), *etc.*

El grupo protector de mercapto incluye, por ejemplo, bencilo, metoxibencilo, metoximetilo (MOM), 2-tetrahidropiraniolo (THP), difenilmetilo y acetilo (Ac), *etc.*

5 Con respecto al grupo protector para carboxilo, hidroxilo, amino y mercapto, no hay ninguna limitación particular a los anteriores, siempre que sea un grupo capaz de separarse fácil y selectivamente. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una reacción de desprotección por un método mencionado en "T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Inc., 1999".

10 La reacción para eliminar el grupo protector para carboxilo, hidroxilo, amino o mercapto es conocida y son ejemplos de la misma los siguientes:

- (1) una reacción de desprotección por hidrólisis con un álcali;
- (2) una reacción de desprotección en condiciones ácidas;
- (3) una reacción de desprotección por hidrogenólisis;
- 15 (4) una reacción de desprotección de sililo;
- (5) una reacción de desprotección utilizando un metal, y
- (6) una reacción de desprotección utilizando un complejo metálico.

20 Se ilustrarán esos métodos específicamente como sigue.

(1) Se lleva a cabo una reacción de desprotección usando un álcali, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C, usando un hidróxido de metal alcalino (tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de litio), un hidróxido de metal alcalinotérreo (tal como hidróxido de bario e hidróxido de calcio), un carbonato (tal como carbonato de sodio y carbonato de potasio), una solución acuosa de los mismos o una mezcla de los mismos, en un solvente orgánico (tal como metanol, tetrahidrofurano y dioxano, *etc.*).

25 (2) Se lleva a cabo una reacción de desprotección en condiciones ácidas, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 0 a 100°C, en un ácido orgánico (*v.g.*, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico o ácido p-toluensulfónico), un ácido inorgánico (*v.g.*, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico) o una mezcla de los mismos (tal como bromuro de hidrógeno/ácido acético), en un solvente orgánico (tal como diclorometano, cloroformo, dioxano, acetato de etilo y anisol, *etc.*).

30 (3) Se lleva a cabo una reacción de desprotección por hidrogenólisis, por ejemplo, a una temperatura de 0 a 200°C, en una atmósfera de hidrógeno a presión ordinaria o a alta presión o en presencia de formiato de amonio, en presencia de un catalizador (tal como paladio-carbono, negro de paladio, hidróxido de paladio, óxido de platino y níquel Raney), en un solvente [tal como de tipo éter (tal como tetrahidrofurano, dioxano, dimetoxietano y éter dietílico), de tipo alcohol (tal como metanol y etanol), de tipo benceno (tal como benceno y tolueno), de tipo cetona (tal como acetona y metilacetona), de tipo nitrilo (tal como acetonitrilo), de tipo amida (tal como dimetilformamida), agua, acetato de etilo, ácido acético o un solvente mixto consistente en dos o más de ellos].

35 (4) Se lleva a cabo una reacción de desprotección de sililo, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C, usando fluoruro de tetrabutilamonio en un solvente orgánico miscible con agua (tal como tetrahidrofurano y acetonitrilo, *etc.*).

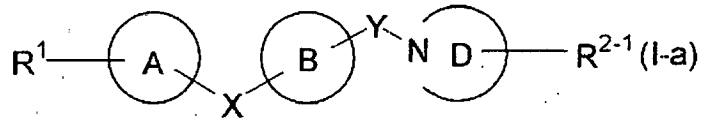
40 (5) Se lleva a cabo una reacción de desprotección usando un metal, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C, con o sin ondas ultrasónicas, en presencia de zinc en polvo, en un solvente ácido (tal como ácido acético, un tampón de pH 4,2 a 7,2 y una solución mixta de una solución de los mismos con un solvente orgánico, tal como tetrahidrofurano).

45 (6) Se lleva a cabo una reacción de desprotección usando un complejo metálico, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C, usando un complejo metálico [tal como tetrakis(trifenilfosfinop)paladio (0), dicloruro de bis(trifenilfosfino)paladio (II), acetato de paladio (II) y cloruro de tris(trifenilfosfino)rodio (I)], en presencia o ausencia de un agente fosfina (tal como trifenilfosfina), en presencia de un reactivo atrapador (tal como hidruro de tributilestaño, trietilsilano, dimedona, morfolina, dietilamina y pirrolidina), un ácido orgánico (tal como ácido acético, ácido fórmico y ácido 2-etilhexanoico) y/o una sal de ácido orgánico (tal como 2-etilhexanoato de sodio y 2-etilhexanoato de potasio), en un solvente orgánico (tal como diclorometano, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetato de etilo, acetonitrilo, dioxano y etanol), agua o un solvente mixto de los mismos.

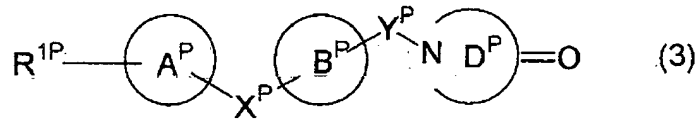
55 Aparte de lo anterior, la desprotección puede ser también efectuada, por ejemplo, según los métodos descritos en T.W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1999.

Como pueden entender fácilmente los expertos en la técnica, se puede producir fácilmente el compuesto deseado de la presente invención usando las apropiadas entre las reacciones de desprotección anteriores.

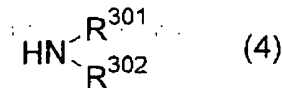
60 Entre los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), se puede preparar un compuesto donde R² es un grupo amino que puede tener un sustituyente(s), es decir, un compuesto representado por la fórmula (I-a)



(donde R^{2-1} es un grupo amino que puede tener un sustituyente(s) y los otros símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente), por aminación reductora de un compuesto representado por la fórmula (3)



(donde todos los símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente) con un compuesto representado por la fórmula (4)

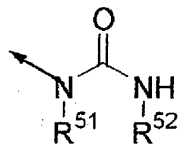


(donde R^{301} y R^{302} , que son iguales o diferentes, son cada uno un átomo de hidrógeno o tienen los mismos significados que los "sustituyentes" del "grupo amino que puede tener un sustituyente(s)" antes descrito, y los otros símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente, con la condición de que el grupo carboxi, el grupo hidroxilo, el grupo amino o el grupo mercapto en R^{301} o R^{302} puedan estar protegidos, si es necesario, si es necesario, seguido de eliminación del grupo protector.

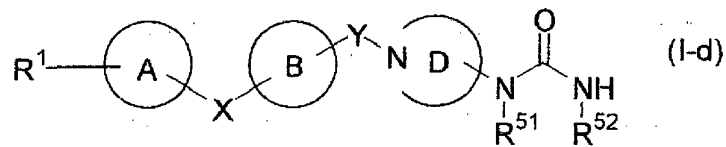
La aminación reductora es bien conocida. Por ejemplo, puede ser llevada a cabo con un agente reductor (v.g., triacetoxiborohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio) a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C, en un solvente orgánico (v.g., dicloroetano, diclorometano o dimetilformamida), en presencia o ausencia de una amina terciaria (v.g., trietilamina o diisopropilamina), en presencia o ausencia de ácido acético.

Se puede realizar la eliminación del grupo protector por el método antes descrito.

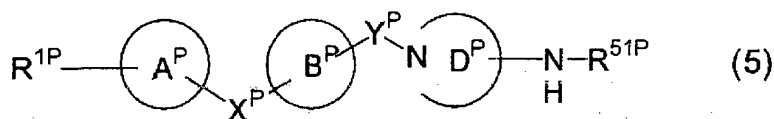
Entre los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), se puede preparar un compuesto donde R^2 es



(donde todos los símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente), es decir, un compuesto representado por la fórmula (I-d)



(donde todos los símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente), mediante la reacción siguiente usando un compuesto representado por la fórmula (5)



5 (donde R^{51P} tiene el mismo significado que R^{51} y los otros símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente, con la condición de que el grupo carboxi, el grupo hidroxilo, el grupo amino o el grupo mercapto en R^{51P} puedan estar protegidos, si es necesario) y un compuesto representado por (6)

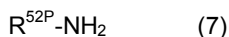


10 (donde R^{52P} tiene el mismo significado que R^{52} y los otros símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente, con la condición de que el grupo carboxi, el grupo hidroxilo, el grupo amino o el grupo mercapto en R^{52P} puedan estar protegidos, si es necesario), si es necesario, seguido de eliminación del grupo protector.

15 La reacción es bien conocida. Por ejemplo, puede ser llevada a cabo en un solvente orgánico (v.g., N,N-dimetilformamida, tolueno o tetrahidrofurano) con una base (v.g., piridina, trietilamina, dimetilaminilina, dimetilaminopiridina o diisopropiltilamina) a una temperatura de aproximadamente 20 a 120°C.

Se puede realizar la eliminación del grupo protector mediante el método antes descrito.

20 Más aún, el compuesto representado por la fórmula (I-d) puede ser preparado por una reacción de formación de urea usando el compuesto representado por la fórmula (5) y un compuesto representado por la fórmula (7)

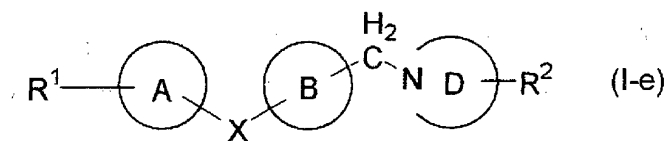


25 (donde el símbolo tiene el mismo significado que el descrito anteriormente), si es necesario, seguido de eliminación del grupo protector.

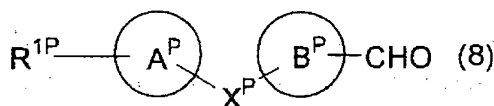
30 La reacción es bien conocida. Por ejemplo, puede ser llevada a cabo en un solvente orgánico (v.g., tetrahidrofurano o N,N-dimetilformamida), en presencia de trifosgeno con una base (v.g., trietilamina), a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C. Más aún, puede ser llevada a cabo en un solvente orgánico (v.g., diclorometano o N,N-dimetilformamida), en presencia de 1,1'-carbonilbis-1H-imidazol (CDI) con una base (v.g., trietilamina o N-metilmorfolina) o sin base, a una temperatura de aproximadamente 0 a 80°C.

Se puede realizar la eliminación del grupo protector por el método antes descrito.

35 Entre los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), se puede preparar un compuesto donde Y es metileno, es decir, un compuesto representado por la fórmula (I-e)



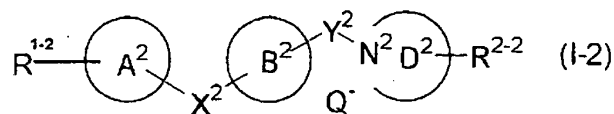
40 (donde todos los símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente) por aminación reductora de un compuesto representado por la fórmula (8)



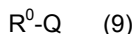
45 (donde todos los símbolos tienen los mismos significados que los descritos anteriormente) y el compuesto representado por la fórmula (2), si es necesario, seguido de eliminación del grupo protector.

La aminación reductora y la eliminación del grupo protector pueden ser llevadas a cabo por el método antes descrito.

50 Entre los compuestos representados por la fórmula (I), se puede preparar un compuesto donde al menos un átomo de nitrógeno es una sal de amonio cuaternario, es decir, un compuesto de fórmula (I-2)



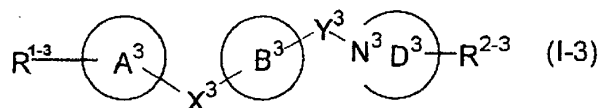
(donde R^{1-2} , R^{2-2} , X^2 , Y^2 , el anillo A^2 , el anillo B^2 y el anillo D^2 tienen los mismos significados que R^1 , R^2 , X , Y , el anillo A, el anillo B y el anillo D, respectivamente, y N^2 es un átomo de nitrógeno, con la condición de que al menos un átomo de nitrógeno sea una sal de amonio cuaternario, y Q^- es un ion halógeno), por reacción del compuesto de fórmula (I) con el compuesto de fórmula (9)



(donde R^0 es alquilo C_{1-8} o alquilo C_{1-8} sustituido por fenilo y Q es halógeno).

La reacción es bien conocida y puede ser llevada a cabo, por ejemplo, en un solvente orgánico (acetona, dimetilformamida o metiletilcetona, etc.) a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C.

Entre los compuestos de fórmula (I), se puede preparar un compuesto en el que al menos un nitrógeno es N-óxido, es decir, un compuesto de fórmula (I-3)



(donde R^{1-3} , R^{2-3} , X^3 , Y^3 , el anillo A^3 , el anillo B^3 y el anillo D^3 tienen los mismos significados que R^1 , R^2 , X , Y , el anillo A, el anillo B y el anillo D, respectivamente, y N^3 es un átomo de nitrógeno, con la condición de que al menos un átomo de nitrógeno represente N-óxido), por oxidación de un compuesto de fórmula (I).

La oxidación es bien conocida y puede ser llevada a cabo, por ejemplo, en un solvente orgánico adecuado (v.g., diclorometano, cloroformo, benceno, hexano o alcohol *terc*-butílico), en presencia de un exceso de reactivo oxidante (peróxido de hidrógeno, peryodato de sodio, nitrito de acilo, perborato de sodio, ácido peroxidado (por ejemplo, ácido 3-cloroperbenzoico o ácido peracético, etc.), OXONE (marca comercial, OXONE es una abreviatura para peroximonosulfato de potasio), permanganato de potasio o ácido crómico, etc.), a una temperatura de aproximadamente 20 a 60°C.

El compuesto de la presente invención puede ser preparado por estas reacciones o por reacciones modificadas en parte.

Otros compuestos de partida o compuestos usados como reactivos son compuestos conocidos, que pueden ser fácilmente preparados por combinación de métodos conocidos, por ejemplo los métodos descritos en Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations, 2ª Edición (Richard C. Larock, John Wiley & Sons, Inc., 1999), o en Elmer J. Rauckman *et al.*, J. Org. Chem., Vol. 41, N° 3, 1976, pp. 564-565, etc.

En cada reacción de la memoria descriptiva, las reacciones con calentamiento, como será obvio para los expertos en la técnica, pueden ser llevadas a cabo con un baño de agua, un baño de aceite, un baño de arena y microondas.

En cada reacción de la memoria descriptiva, se puede usar un reactivo de fase sólida soportado por un polímero (por ejemplo, poliestireno, poliacrilamida, polipropileno o polietilenglicol, etc.).

En cada reacción de la memoria descriptiva, los productos obtenidos pueden ser purificados por técnicas convencionales. Por ejemplo, la purificación puede ser llevada a cabo por destilación a presión atmosférica o reducida, por cromatografía líquida de alto rendimiento con gel de sílice o silicato de magnesio, por cromatografía en capa fina, por resinas de intercambio iónico, por resinas depuradoras, por cromatografía en columna, por lavado o por recristalización. Se puede realizar la purificación en cada reacción o después de varias reacciones.

En una reacción que utiliza la resina de poliestireno de la memoria descriptiva, se pueden purificar los productos obtenidos por técnicas convencionales. Por ejemplo, se puede realizar la purificación aclarándolos con un solvente (dimetilformamida, diclorometano, metanol, tetrahidrofurano, tolueno, ácido acético/tolueno, etc.) más de una vez.

Toxicidad

5 Toxicidad: La toxicidad del compuesto de la invención, de su sal, de su N-óxido o de su solvato (a los que en adelante se hará aquí referencia como "el compuesto de la presente invención") es muy baja y, por lo tanto, se puede considerar que son seguros para uso farmacéutico.

Aplicación a productos farmacéuticos

10 El compuesto de la presente invención tiene buena solubilidad y absorbibilidad. Y el compuesto de la presente invención tiene una débil actividad inhibitoria frente a enzimas metabolizadoras de fármacos. Esta naturaleza se corresponde con las propiedades físicas, químicas y farmacéuticas requeridas para los fármacos, y los compuestos de la presente invención tienen las condiciones apropiadas para ser excelentes fármacos [Ref. (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy (17ª Ed.), Merck & Co.)].

15 Se puede determinar que el compuesto de la presente invención es útil como fármaco por diversos métodos experimentales que se describen a continuación, por los métodos descritos en los Ejemplos Biológicos y por estos métodos apropiadamente mejorados. También se puede determinar fácilmente que el compuesto de la presente invención tiene buenas propiedades farmacocinéticas, tales como la duración de la semivida sérica, la estabilidad en el tracto gastrointestinal, la absorción de las preparaciones orales, la biodisponibilidad, etc., por métodos conocidos, por ejemplo, el método descrito en "Yakubutsu bioavailability (Hyouka to kaizen no kagaku), 6 de julio de 1998, Gendaiiryou-sha", etc.

20 (I) Experimento de evaluación de la actividad inhibitoria frente a enzimas metabolizadoras de fármacos del compuesto de la presente invención

25 (i) Actividad inhibitoria frente a CYP2C9 humano

30 Se puede evaluar la actividad inhibitoria frente a CYP2C9 humano del compuesto de la presente invención por el método de Sato *et al.* (Yakubutsudotai (Xenobio. Metabol. and Dispos.), 16(2), 115-126 (2001)), mejorado en cuanto a la exactitud del ensayo y/o la sensibilidad del ensayo.

(ii) Actividad inhibitoria frente a CYP3A4 humano

35 Se puede evaluar la actividad inhibitoria frente a CYP3A4 humano del compuesto de la presente invención por un método mejorado descrito en Drug Metabolism and Disposition, Vol. 28(12), 1440-1448 (2000).

40 Por ejemplo, se prepara una solución de reacción consistente en tampón fosfato de potasio (pH 7,4) (concentración final 200 mM), cloruro de magnesio hexahidrato (concentración final 5 mM), substrato (7-benciloxiquinolona (7-BQ), concentración final 40 µM) y microsomas de sistema de expresión (Daiichikagakuyakuhin, concentración final 0,25 mg/ml). Se dispensan 100 µl de la solución de reacción en una placa de 96 pocillos y se añaden 50 µl de una solución acuosa que contiene un compuesto de ensayo y acetonitrilo al 0,8%, para llevar a cabo una preincubación durante 10 minutos a 37°C. Se añaden 50 µl de un nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH, 4 mM) para iniciar la reacción. Se mide la intensidad de fluorescencia de cada pocillo en el momento en que se añade el NADPH y después de incubar durante 30 minutos. Se miden la longitud de onda de excitación a 409 nm y la longitud de onda de emisión a 530 nm del quinolinol, que es un metabolito del substrato. Se calcula el índice de inhibición (%) del compuesto de ensayo mediante la siguiente fórmula de cálculo, para obtener el valor de la CI₅₀:

50 Índice de inhibición (%) = $[1 - \frac{\text{valor medido cuando se añade un compuesto de ensayo} - \text{valor del blanco}}{\text{valor del control} - \text{valor del blanco}}] \times 100$

(II) Experimento de evaluación de la toxicidad del compuesto de la presente invención

(i) Ensayo de toxicidad aguda simple en rata

55 Se administra el compuesto de ensayo a ratas Crj: CD (SD) de seis semanas por dosis intravenosa única o administración oral única. Se puede evaluar la toxicidad contrastando con el valor obtenido sin añadir el compuesto de ensayo. Se puede hacer la evaluación básica de la toxicidad, por ejemplo, por observación del estado de rendimiento o de la actividad locomotriz, etc.

60 (ii) Evaluación de la actividad del compuesto de la presente invención frente a la corriente I_{Kr} de hERG

Según el informe de Zou *et al.* (Biophys. J., Vol. 74, 230-241 (1998)), utilizando células HEK293 que sobreexpresan el gen humano relacionado con éter-a-go-go (hERG), se mide la máxima corriente en cola de la corriente I_{Kr} de

hERG inducida por un pulso de despolarización, seguido de un pulso de repolarización, por registro zonal. Se calcula el índice de cambio (índice de inhibición) por comparación de la máxima corriente en cola entre antes de la adición del compuesto de ensayo y 10 minutos después. Se puede evaluar la influencia del compuesto de ensayo frente a la corriente I_{Kr} de hERG por el índice de inhibición.

5 Los compuestos de la presente invención tienen actividad antagonista frente a los receptores de quimioquinas, especialmente CCR5, en animales, incluidos los humanos, especialmente en los humanos, por lo que son útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR5, por ejemplo, diversas enfermedades inflamatorias (asma, nefritis, nefropatía, hepatitis, artritis, artritis reumatoide, rinitis, conjuntivitis, enfermedad inflamatoria del intestino, tal como colitis ulcerativa, *etc.*), enfermedades inmunológicas (enfermedades autoinmunes, rechazo en el trasplante de órganos (rechazo de injertos de órganos sólidos, rechazo de injertos de células de los islotes pancreáticos en la terapia de la diabetes, GVHD (enfermedad del injerto contra el huésped), *etc.*), inmunosupresión, psoriasis, esclerosis múltiple, *etc.*), enfermedades infecciosas (infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, infección por VSR, *etc.*), enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, urticaria, aspergilosis alérgica broncopulmonar, gastroenteritis alérgica eosinofílica, *etc.*), enfermedades cardiovasculares (arteriosclerosis, lesión por isquemia-reperfusión, *etc.*), síndrome del distrés respiratorio agudo, shock acompañante de la infección bacteriana, diabetes, metástasis cancerosa, *etc.*

20 Los compuestos de la presente invención tienen actividad inhibitoria frente a la migración celular en animales, incluidos los humanos, especialmente en los humanos, por lo que son útiles en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias (asma, nefritis, nefropatía, hepatitis, artritis, artritis reumatoide, rinitis, conjuntivitis, enfermedad inflamatoria del intestino, tal como colitis ulcerativa, *etc.*), enfermedades inmunológicas (enfermedades autoinmunes, rechazo en el trasplante de órganos (rechazo de injertos de órganos sólidos, rechazo de injertos de células de los islotes pancreáticos en la terapia de la diabetes, GVHD, *etc.*), inmunosupresión, psoriasis, esclerosis múltiple, *etc.*), enfermedades infecciosas (infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, infección por VSR, *etc.*), enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, urticaria, aspergilosis alérgica broncopulmonar, gastroenteritis alérgica eosinofílica, *etc.*), enfermedades cardiovasculares (arteriosclerosis, lesión por isquemia-reperfusión, *etc.*), síndrome del distrés respiratorio agudo, shock acompañante de la infección bacteriana, diabetes, metástasis cancerosa, *etc.*

30 Para los fines antes descritos, los compuestos de la presente invención pueden ser normalmente administrados sistémica o localmente, habitualmente por administración oral o parenteral.

35 Las dosis que se han de administrar son determinadas dependiendo de, por ejemplo, la edad, el peso corporal, los síntomas, el efecto terapéutico deseado, la vía de administración y la duración del tratamiento. En un adulto humano, las dosis por individuo son generalmente de 1 mg a 1.000 mg por administración oral hasta varias veces al día, y de 1 mg a 100 mg por administración parenteral (preferiblemente, administración intravenosa) hasta varias veces al día, o por administración continua de 1 a 24 horas al día por vena.

40 Como se ha mencionado anteriormente, las dosis que se han de utilizar dependen de diversos factores. Por lo tanto, hay casos en que se pueden usar dosis inferiores o superiores a los rangos antes especificados.

45 Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados, por ejemplo, en formas sólidas para administración oral, en formas líquidas para administración oral o en inyecciones, linimentos o supositorios para administración parenteral.

Las formas sólidas para administración oral incluyen tabletas comprimidas, píldoras, cápsulas, polvos dispersables y gránulos. Las cápsulas incluyen cápsulas duras y cápsulas blandas.

50 En dichas formas sólidas, se pueden mezclar uno o más de los compuestos activos con vehículos (tales como lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina o almidón), ligantes (tales como hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona o metasilicato aluminato de magnesio), disintegrantes (tales como glicolato de celulosa y calcio), lubricantes (tales como estearato de magnesio), agentes estabilizantes y adyuvantes de solución (tales como ácido glutámico o ácido aspártico) y prepararlos según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las formas sólidas pueden ser revestidas, si se desea, con agentes de revestimiento (tales como azúcar, gelatina, hidroxipropilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa), o ser revestidas con dos o más películas. Y, además, el revestimiento puede incluir la contención en cápsulas de materiales absorbibles, tales como gelatina.

60 Las formas líquidas para administración oral incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. En dichas formas, se pueden disolver, suspender o emulsionar uno o más de los compuestos activos en un diluyente(s) comúnmente utilizado(s) en la técnica (tal como agua purificada, etanol o una mezcla de éstos). Además, dichas formas líquidas pueden también incluir algunos aditivos, tales como agentes humectantes, agentes suspensores, agentes emulsionantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, aromas,

conservantes o agentes tamponantes.

5 Las inyecciones para administración parenteral incluyen suspensiones y emulsiones acuosas estériles y formas sólidas que se disuelven o suspenden en un solvente(s) para inyección inmediatamente antes de su uso. En el caso de las inyecciones, se pueden disolver, suspender o emulsionar uno o más de los compuestos activos en un solvente(s). Los solventes pueden incluir agua destilada para inyección, suero salino, aceite vegetal, propilenglicol, polietilenglicol, un alcohol, tal como etanol, o una mezcla de los mismos. Las inyecciones pueden incluir algunos aditivos, tales como agentes estabilizantes, adyuvantes de solución (tales como ácido glutámico, ácido aspártico o POLYSORBATE 80 (marca registrada)), agentes suspensores, agentes emulsionantes, agentes calmantes, agentes tamponantes y conservantes. Se pueden esterilizar en una etapa final o se pueden preparar según métodos estériles. También se pueden fabricar como formas sólidas estériles, tales como productos liofilizados, que pueden disolverse en agua estéril o algún otro diluyente estéril para inyección inmediatamente antes de su uso.

15 Otras formas para administración parenteral incluyen líquidos para uso externo, ungüentos y linimentos endérmicos, inhalaciones, sprays, supositorios y supositorios vaginales que contienen uno o más de los compuestos activos y pueden ser preparados por métodos conocidos *per se*.

20 Los sprays pueden contener sustancias adicionales, aparte de diluyentes, usadas comúnmente, tales como estabilizadores, como el hidrógeno sulfito de sodio, y tampones capaces de impartir isotonicidad, por ejemplo, tampones isotónicos, como el cloruro de sodio, el citrato de sodio o el ácido cítrico.

25 Los compuestos de la presente invención pueden ser usados junto con otros fármacos, por ejemplo, un fármaco(s) preventivo(s) y/o terapéutico(s) para la infección por VIH (en particular, agentes para la prevención y/o el tratamiento del SIDA), o un agente(s) para el rechazo en el trasplante de órganos y/o las enfermedades autoinmunes. En ese caso, se puede mezclar el fármaco como tal con un excipiente, ligante, agente desintegrante, lubricante, estabilizador, solubilizador, diluyente, *etc.*, farmacológicamente aceptable, ya sea por separado o simultáneamente, para producir una preparación farmacéutica, que se puede administrar oral o parenteralmente como una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la infección por el VIH, del rechazo en el trasplante de órganos y/o de las enfermedades autoinmunes.

30 Los compuestos de la presente invención tienen una actividad inhibitoria de la infección por VIH que ha adquirido resistencia a otros agentes para la prevención y/o el tratamiento de la infección por el VIH (en particular, agentes para la prevención y/o el tratamiento del SIDA). Por lo tanto, se pueden usar también para pacientes infectados por VIH para quienes ya no son efectivos otros agentes para la prevención y/o el tratamiento de la infección por VIH. En ese caso, aunque el compuesto de la presente invención puede ser usado solo, puede ser también usado junto con agentes para la prevención y/o el tratamiento de una infección por VIH donde la cepa infectiva del VIH ha adquirido resistencia o con otros fármacos.

40 La presente invención cubre la combinación de los compuestos de la presente invención con fármacos que no inhiben la infección por el VIH, mediante lo cual aumenta el efecto preventivo y/o terapéutico de la infección por el VIH en comparación con una sola preparación.

45 Son ejemplos de otros agentes para prevenir y/o tratar la infección por el VIH utilizados en combinación con los compuestos de la presente invención un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de proteasas, un antagonista de quimioquinas (tal como un antagonista de CCR2, un antagonista de CCR3, un antagonista de CCR4, un antagonista de CCR5, un antagonista de CXCR3 y un antagonista de CXCR4), un inhibidor de la integrasa, un inhibidor de la fusión, un anticuerpo para el antígeno de superficie del VIH y una vacuna para el VIH.

50 Los inhibidores de la transcriptasa inversa son concretamente (1) inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos/nucleótidos: zidovudina (marca comercial: Retrovir), didanosina (marca comercial: Videx), zalcitabina (marca comercial: HIVID), estavudina (marca comercial: Zerit), lamivudina (marca comercial: Epivir), abacavir (marca comercial: Ziagen), adefovir, adefovir dipivoxilo, emtricitabina (marca comercial: Coviracil) o PMPA (marca comercial: Tenofovir), *etc.*, y (2) inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos: nevirapina (marca comercial: Viramune), delavirdina (marca comercial: Rescriptor), efavirenz (marca comercial: Sustiva, Stocklin) o capravirina (AG1549), *etc.*

55 Los inhibidores de proteasas son concretamente indinavir (marca comercial: Crixivan), ritonavir (marca comercial: Norvir), nelfinavir (marca comercial: Viracept), saquinavir (marca comercial: Invirase, Fortovase), amprenavir (marca comercial: Agenerase), lopinavir (marca comercial: Kaletra) o tipranavir, *etc.*

60 Como antagonistas de quimioquinas, se incluyen un ligando interno del receptor de quimioquina, sus derivados, sus compuestos no peptídicos de bajo peso molecular o un anticuerpo para el receptor de quimioquina.

Son ejemplos de ligando interno del receptor de quimioquina concretamente MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, SDF-1 α ,

SDF-1 β , MCP-1, MCP-2, MCP-4, Eotaxina y MDC, *etc.*

Los derivados de ligando interno son concretamente AOP-RANTES, Met-SDF-1 α , Met-SDF-1 β , *etc.*

5 Los anticuerpos para el receptor de quimioquina son concretamente Pro-140, *etc.*

Se citan antagonistas de CCR2 concretamente en la memoria descriptiva de WO99/07351, WO99/40913, WO00/46195, WO00/46196, WO00/46197, WO00/46198, WO00/46199, WO00/69432 o WO00/69815, o en Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 1803 (2000), *etc.*

10 Se citan antagonistas de CCR3 en, por ejemplo, la memoria descriptiva de DE19837386, WO99/55324, WO99/55330, WO00/04003, WO00/27800, WO00/27835, WO00/27843, WO00/29377, WO00/31032, WO00/31033, WO00/34278, WO00/35449, WO00/35451, WO00/35452, WO00/35453, WO00/35454, WO00/35876, WO00/35877, WO00/41685, WO00/51607, WO00/51608, WO00/51609, WO00/51610, WO00/53172, WO00/53600, WO00/58305, WO00/59497, WO00/59498, WO00/59502, WO00/59503, WO00/62814, WO00/73327 o WO01/09088, *etc.*

15 Son antagonistas de CCR5, por ejemplo, TAK-779, SCH-351125 (SCH-C), SCH-417690(SCH-D), UK-427857, GW873140 (ONO-4128), TAK-220, *etc.* Más aún, se incluyen compuestos citados en, por ejemplo, la memoria descriptiva de WO99/17773; WO99/32100; WO00/06085; WO00/06146; WO00/10965; WO00/06153; WO00/21916; WO00/37455; EP1013276; WO00/38680; WO00/39125; WO00/40239; WO00/42045; WO00/53175; WO00/42852; WO00/66551; WO00/66558; WO00/66559; WO00/66141; WO00/68203; JP2000309598; WO00/51607; WO00/51608; WO00/51609; WO00/51610; WO00/56729; WO00/59497; WO00/59498; WO00/59502; WO00/59503; WO00/76933; WO98/25605; WO99/04794; WO99/38514; Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 2663 (2003); Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents, 4, 133 (2005); Current Opinion in Pharmacology, 4, 447 (2004); o Current Opinion in Investigational Drugs, 5, 851 (2004), *etc.*

20 Se citan antagonistas de CXCR3 en, por ejemplo, la memoria descriptiva de WO01/16114, WO02/083143, WO02/085862, US6469002 o WO03/101970, *etc.*

30 Son antagonistas de CXCR4, por ejemplo, AMD-3100, AMD-070, T-22, KRH-1120, KRH-1636, KRH-2731 o los compuestos citados en la memoria descriptiva de WO00/66112, *etc.*

Son inhibidores de la integrasa Equisetina, Temacrazina, PL-2500, V-165, NSC-618929, L-870810, análogo de L-708906, S-1360 ó 1838, *etc.*

35 Son inhibidores de la fusión concretamente T-20 (Pentafusida) y T-1249, *etc.*

Los ejemplos de agentes de combinación citados anteriormente pretenden ilustrar la presente invención, pero no la limitan.

40 Los ejemplos típicos del nivel de dosificación habitual en pruebas clínicas de inhibidores de la transcriptasa inversa o de inhibidores de proteasas que se citan a continuación están destinados a ilustrar la presente invención, pero no la limitan.

45	Zidovudina:	cápsula de 100 mg, 200 mg por dosis, 3 veces al día, tableta de 300 mg, 300 mg por dosis, dos veces al día;
	didanosina:	tableta de 25-200 mg, 125-200 mg por dosis, dos veces al día;
	zalcitabina:	tableta de 0,375-0,75 mg, 0,75 mg por dosis, 3 veces al día;
	estavudina:	cápsula de 15-40 mg, 30-40 mg por dosis, dos veces al día;
50	lamivudina:	tableta de 150 mg, 150 mg por dosis, dos veces al día;
	abacavir:	tableta de 300 mg, 300 mg por dosis, dos veces al día;
	nevirapina:	tableta de 200 mg, 200 mg por dosis, una vez al día durante 14 días y luego dos veces al día;
	delavirdina:	tableta de 100 mg, 400 mg por dosis, 3 veces al día;
	efavirenz:	cápsula de 50-200 mg, 600 mg por dosis, una vez al día;
55	indinavir:	cápsula de 200-400 mg, 800 mg por dosis, 3 veces al día;
	ritonavir:	cápsula de 100 mg, 600 mg por dosis, dos veces al día;
	nelfinavir:	tableta de 250 mg, 750 mg por dosis, 3 veces al día;
	saquinavir:	cápsula de 200 mg, 1.200 mg por dosis, 3 veces al día;
60	amprenavir:	tableta de 50-150 mg, 1.200 mg por dosis, dos veces al día.

Son ejemplos de otros agentes para la prevención y/o el tratamiento del rechazo en el trasplante de órganos usados en combinación con los compuestos de la presente invención los inmunosupresores.

Como ejemplos del inmunosupresor, se incluyen tacrolimus (FK506), ciclosporina, sirolimus (rapamicina), corticosteroides, azatioprina, micofenolato de mofetilo, FTY-720, ciclofosfamida o anticuerpos para ligandos de la superficie celular, *etc.*

- 5 Como ejemplos del anticuerpo para ligandos de la superficie celular, se incluyen Atgam, timoglobulina, Simulect, Zanafax u Orthoclone, *etc.*

10 Son ejemplos de otros agentes para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunes usados en combinación con los compuestos de la presente invención los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME, fármacos antirreumáticos de acción lenta), los esteroides, los agentes inmunosupresores, las preparaciones de enzimas antiinflamatorias, los agentes condroprotectores, los inhibidores de las células T, los inhibidores del TNF α (incluyendo una preparación proteica, tal como un anticuerpo anti-TNF α), los inhibidores de la prostaglandina sintasa, los inhibidores de IL-1, los inhibidores de IL-6 (incluyendo una preparación proteica, tal como un anticuerpo anti-receptor de IL-6), los agonistas del interferón gamma, las prostaglandinas, los inhibidores de las fosfodiesterasas, los inhibidores de las metaloproteinasas, *etc.*

20 Como ejemplos del fármaco antiinflamatorio no esteroideo, se incluyen sasapirina, salicilato de sodio, aspirina, formulación de dialuminato de aspirina, diflunisal, indometacina, suprofen, ufenamato, dimetilisopropilazuleno, bufexamac, felbinaco, diclofenaco, tolmetina sodio, Clinoril, fenbufeno, napmetona, proglumetacina, indometacina farnesilo, acemetacina, maleato de proglumetacina, amfenaco sodio, mofezolaco, etodolaco, ibuprofeno, ibuprofeno piconol, naproxeno, flurbiprofeno, flurbiprofeno axetilo, ketoprofeno, fenoprofeno calcio, tiaprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, loxoprofeno sodio, aluminoprofeno, zaltoprofeno, ácido mefenámico, mefenamato de aluminio, ácido tolfenámico, floctafenina, cetofenilbutazona, oxifenbutazona, piroxicam, tenoxicam, anpiroxicam, napagelIn crema, epirizol, clorhidrato de tiaramida, clorhidrato de tinoridina, emorfazona, sulpirina, Migrenin, Saridon, Sedes G, Amipyo N, Sorbon, antipiréticos del sistema de pirina, acetaminofeno, fenacetina, mesilato de dimetotiazina, formulación de simetrida o antipiréticos del sistema de antipirina, *etc.*

30 Como ejemplos de los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME, fármacos antirreumáticos de acción lenta), se incluyen, por ejemplo, tioglucosa oro, aurotiomalato de sodio, auranofina, actarit, preparaciones de D-penicilamina, lobenzarit disódico, bucilamina, hidroxiclороquina, salazosulfapiridina, metotrexato o leflunomida, *etc.*

35 Como ejemplos de los esteroides para aplicación externa, se incluyen propionato de clobetasol, acetato de diflorasona, fluocinonida, furancarboxilato de monometasona, dipropionato de betamesona, butiropropionato de betamesona, valerato de betamesona, difluprednato, budesonida, valerato de diflucortolona, amcinonida, halcinonida, dexametasona, propionato de dexametasona, valerato de dexametasona, acetato de dexametasona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, acetopropionato de hidrocortisona, propionato de deprodona, valeroacetato de prednisolona, acetónido de fluocinolona, dipropionato de beclometasona, acetónido de triamcinolona, pivalato de flumetasona, prednisolona, propionato de beclometasona y fludrocortida, *etc.*

45 Como ejemplos de los esteroides para uso interno o para inyección, se incluyen acetato de cortisona, hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona sodio, succinato de hidrocortisona sodio, acetato de fludrocortisona, prednisolona, acetato de prednisolona, succinato de prednisolona sodio, butilacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, acetato de halopredona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato de metilprednisolona sodio, triamicinolona, acetato de triamicinolona, acetónido de triamicinolona, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato de dexametasona sodio, palmitato de dexametasona, acetato de parametasona y betametasona, *etc.*

50 Como ejemplos de los esteroides como inhalatorios, se incluyen propionato de beclometasona, propionato de fluticasona, budesonida, flunisolida, triamcinolona, ST-126P, ciclesonida, palmitato de dexametasona, furancarboxilato de monometasona, sulfonato de prasterona, deflazacort, suleptanato de metilprednisolona y succinato de metilprednisolona sodio, *etc.*

55 Como ejemplos de las preparaciones enzimáticas antiinflamatorias, se incluyen, por ejemplo, cloruro de lisozima, bromelaína, pronasa, serrapeptasa o estreptoquinasa-estreptodornasa, *etc.*

Como ejemplos de los agentes condroprotectores, se incluyen, por ejemplo, hialuronato de sodio, glucosamina, sulfato de condroitina y polisulfato de glucosaminoglicano, *etc.*

60 Como ejemplos del inhibidor del TNF α (incluyendo una preparación proteica, tal como un anticuerpo anti-TNF α), se incluyen, por ejemplo, infliximab, adalimumab o etanercept, *etc.*

Como ejemplos del inhibidor de la prostaglandina sintasa, se incluyen, por ejemplo, salazosulfapiridina, mesalazina,

olsalazina, ácido 4-aminosalicílico, JTE-522, auranofina, carprofeno, difenpiramida, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, lornoxicam, loxoprofeno, meloxicam, oxaprozina, parsalmida, piroxeno, piroxicam, piroxicam betadex, cinamato de piroxicam, indometacinato de tropina, zaltoprofeno y pranoprofeno, *etc.*

5 Como ejemplos del inhibidor de la IL-1 (incluyendo una preparación proteica, tal como un antagonista del receptor de IL-1 humano), se incluye, por ejemplo, anakinra, *etc.*

Como ejemplos del inhibidor de la IL-6 (incluyendo una preparación proteica, tal como un anticuerpo anti-receptor de IL-6), se incluye, por ejemplo, MRA, *etc.*

10 Como ejemplos de las prostaglandinas (de aquí en adelante abreviadas como "PG"), se incluyen un agonista de los receptores de PG y un antagonista de los receptores de PG, *etc.* Como ejemplos del receptor de PG, se incluyen el receptor de PGE (EP1, EP2, EP3 y EP4), el receptor de PGD (DP, CRTH2), el receptor de PGF (FP), el receptor de PGI (IP) o el receptor de TX (TP), *etc.*

15 Como ejemplos del inhibidor de la fosfodiesterasa, se incluyen, por ejemplo, rolipram, cilomilast (marca comercial: Ariflo), Bay 19-8004, NIK-616, roflumilast (BY-217), cipamfilina (BGL-61063), atizolam (CP-80633), SCH-351591, YM-976, V-11294A, PD-168787, D-4396, IC-485 u ONO-6126 como inhibidor de PDE-4, *etc.*

20 Son ejemplos de otros agentes para la prevención y/o el tratamiento de otras enfermedades alérgicas, por ejemplo el asma, usados en combinación con los compuestos de la presente invención los esteroides; los estimuladores de los β_2 -adrenorreceptores, los antagonistas de los receptores de leucotrienos, los inhibidores de la tromboxano sintetasa, los antagonistas de los receptores de tromboxano A_2 , los inhibidores de la liberación de mediadores, los antihistamínicos, los derivados de xantina, los agentes anticolinérgicos, los inhibidores de citoquinas, las prostaglandinas, la forskolina, los inhibidores de fosfodiesterasas, los inhibidores de elastasa, los inhibidores de metaloproteinasas, los expectorantes y los antibióticos.

30 Como ejemplos de los estimuladores de los β_2 -adrenorreceptores, se incluyen bromhidrato de fenoterol, sulfato de salbutamol, sulfato de terbutalina, fumarato de fenoterol, xinafoato de salmeterol, sulfato de isoprotenol, sulfato de orciprenalina, sulfato de cloroprenalina, epinefrina, clorhidrato de trimetoquinol, sulfato de hexoprenalínmesilo, clorhidrato de procaterol, clorhidrato de tulobuterol, tulobuterol, clorhidrato de pirbuterol, clorhidrato de clenbuterol, clorhidrato de mabuterol, clorhidrato de ritodrina, bambuterol, clorhidrato de dopexamina, tartrato de meradrina, AR-C68397, levosalbutamol, R,R-formoterol, KUR-1246, KUL-7211, ARC89855 y S-1319, *etc.*

35 Como ejemplos del antagonista de los receptores de leucotrienos, se incluyen hidrato de pranlukast, montelukast, zafirlukast, seratrodist, MCC-847, KCA-757, CS-615, YM-158, L-740515, CP-195494, LM-1484, RS-635, A-93178, S-36496, BIL-284 y ONO-4057, *etc.*

Como ejemplos del inhibidor de la tromboxano sintetasa, se incluyen clorhidrato de ozagrel e imitrodast sodio, *etc.*

40 Como ejemplos del antagonista de los receptores de tromboxano A_2 , se incluyen seratrodist, ramatrobán, domitrobán calcio dihidrato y KT-2-962, *etc.*

45 Como ejemplos del inhibidor de la liberación de mediadores, se incluyen tranilast, cromoglicato de sodio, anlexanox, repirinast, ibudilast, tazanolast y pemilolast potasio, *etc.*

50 Como ejemplos de los antihistamínicos, se incluyen fumarato de ketotifeno, mequitazina, clorhidrato de azelastina, oxatomida, terfenadina, fumarato de emedastina, clorhidrato de epinastina, astemizol, ebastina, clorhidrato de cetirizina, bepotastina, fexofenadina, lolatadina, deslolatadina, clorhidrato de olopatadina, TAK-427, ZCR-2060, NIP-530, furoato de mometasona, mizolastina, BP-294, andolast, auranofina y acribastina, *etc.*

Como ejemplos de los derivados de xantina, se incluyen aminofilina, teofilina, doxofilina, cipamfilina y diprofilina, *etc.*

55 Como ejemplos del agente anticolinérgico, se incluyen bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, bromuro de flutropio, terniverina, bromuro de tiotropio y revatropato (UK-112166), *etc.*

Como ejemplos del inhibidor de citoquinas, se incluye el tosillato de suplatast (marca comercial: IPD), *etc.*

60 Como ejemplos de los inhibidores de la elastasa, se incluyen ONO-5046, ONO-6818, MR-889, PBI-1101, EPI-HNE-4, R-665, ZD-0892, ZD-8321, GW-311616 y AE-3763, *etc.*

Como ejemplos del expectorante, se incluyen licor de amoníaco anisado, hidrógeno carbonato de sodio, clorhidrato de bromhexina, carbocisteína, clorhidrato de ambroxol, clorhidrato de ambroxol de liberación mantenida, clorhidrato

de metilcisteína, acetilcisteína, clorhidrato de L-etilcisteína y tiloxapol, etc.

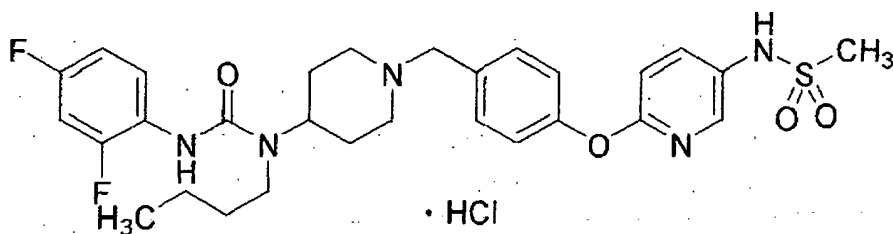
5 Como ejemplos de antibióticos, se incluyen cefuroxima de sodio, meropenem trihidrato, sulfato de netilmicina, sulfato de sisomicina, ceftibuteno, PA-1806, IB-367, tobramicina, PA-1420, doxorubicina, sulfato de astromicina o clorhidrato de cefetamet pivoxilo, etc.

Como ejemplos de antibióticos para uso inhalatorio, se incluyen PA-1806, IB-367, tobramicina, PA-1420, doxorubicina, sulfato de astromicina o clorhidrato de cefetamet pivoxilo, etc.

10 Los otros agentes farmacéuticos que suplementan y/o potencian el efecto preventivo y/o terapéutico del compuesto de la presente invención no se limitan a los ejemplos antes descritos. Con respecto a los otros agentes farmacéuticos que suplementan y/o potencian el efecto preventivo y/o terapéutico del compuesto de la presente invención, se incluyen no sólo los descubiertos hasta ahora, sino también los que se descubran en un futuro en base al mecanismo antes mencionado.

15 A continuación se describe la nomenclatura de los compuestos de la presente invención.

20 Todos los compuestos descritos en la presente memoria fueron denominados usando ACD/Name (marca registrada, Advanced Chemistry Development Inc.) o ACD/Name Batch (marca registrada, Advanced Chemistry Development Inc.), o fueron denominados según el sistema de nomenclatura de la IUPAC. Por ejemplo, un compuesto representado por



25 fue denominado clorhidrato de N-[6-(4-[[4-(butil[(2,4-difluorofenil)amino]carbonil)amino]-1-piperidinil]metil]fenoxi)-3-piridinil]metanosulfonamida.

30 En la presente memoria descriptiva, "clorhidrato (o diclorhidrato)" significa o bien clorhidrato o bien diclorhidrato, por lo que no representa una mezcla de clorhidrato y diclorhidrato. En la presente memoria descriptiva, "diclorhidrato (o triclорhidrato)" significa o bien diclorhidrato o bien triclорhidrato, por lo que no representa una mezcla de diclorhidrato y triclорhidrato. "HCl o 2HCl" en la estructura descrita en la presente memoria descriptiva significa o bien HCl o bien 2HCl, por lo que no representa una mezcla de HCl y 2HCl. "2HCl o 3HCl" en la estructura descrita en la presente memoria descriptiva significa o bien 2HCl o bien 3HCl, por lo que no representa una mezcla de 2HCl y 3HCl.

35 Efecto de la invención

Los compuestos de la presente invención tienen actividad antagonista frente a receptores de quimioquinas, especialmente CCR5, por lo que son útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR5.

40 El hecho de que el compuesto de la presente invención tenga antagonismo de CCR5 queda demostrado, por ejemplo, por el siguiente experimento. La operación total se basa en la ingeniería genética básica para preparar células que tienen una alta expresión génica, y se usan los métodos ordinarios. Además, en el método de ensayo de la presente invención, con objeto de evaluar el compuesto de la presente invención, se mejoran la precisión de la medición y/o la sensibilidad de la medición como se describe a continuación. A continuación se muestran los métodos experimentales detallados.

(I) Prueba de inhibición de la unión de RANTES a CCR5

50 (1) Aislamiento del gen CCR5 humano

Se prepara ADNc placentario humano usando el kit de amplificación de ADNc Marathon (Clontech). Se diseñan los cebadores de PCR

hCCR5Xbal-F1:

5'-AGCTAGTCTAGATCCGTTCCCCTACAAGAACTCTCC-3' (Nº ID. SEC. 1)

5 y hCCR5Xbal-R1:

5'-AGCTAGTCTAGAGTGCACTCTGACTGGGTCACCA-3' (Nº ID. SEC. 2)

en base a la secuencia de GenBank U54994.

10 Usando el ADNc placentario humano como plantilla y usando Ex Taq (Takara), se lleva a cabo la reacción PCR (2 minutos a 95°C → (30 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C) x 35 veces). El producto de la PCR así amplificado es sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1%, purificado usando el QIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN) y digerido luego con una enzima de restricción *Xba*I. Se ligan los fragmentos digeridos a un vector de expresión pEF-BOS-bsr usando el DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara) y se transforman en *Escherichia coli* DH5α. Preparando el plásmido resultante pEF-BOS-bsr/hCCR5, se verifica su secuencia de ADN.

(2) Cultivo de células CHO

20 Se cultivan CHO-dhfr(-) usando F-12 de Ham (que contiene suero bovino fetal (10%), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 mg/ml)). Además, se cultivan las células transducidas añadiendo blasticidina (5 mg/ml) al anterior medio.

(3) Transducción en células CHO

25 Se transduce el plásmido pEF-BOS-bsr/hCCR5 en células CHO-dhfr(-) usando reactivo DMRIE-C (Gibco BRL). Después de 48 horas, se reemplaza el medio con un medio que contiene 5 mg/ml de blasticidina para realizar la selección, estableciéndose así células que sobreexpresan de manera estable.

30 (4) Prueba de inhibición de la unión de quimioquinas (RANTES, MIP-1α y MIP-1β) a CCR5 (actividad de las quimioquinas para inducir un aumento transitorio de iones Ca)

35 Se suspenden las células CHO estables así establecidas que sobreexpresan CCR5 humano (células CCR5/CHO) en medio F-12 de Ham que contiene FBS (10%) y se siembran a una densidad de $3,0 \times 10^6$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Un día después de cultivar a 37°C, se desecha el sobrenadante del cultivo y se dispensa medio F-12 de Ham (que contiene Fura-2AM (5 μM), Probenecid (2,5 μM) y HEPES (20 mM; pH 7,4)) en porciones de 80 μl/pocillo para llevar a cabo una incubación durante 1 hora a 37°C en condiciones de oscuridad. Después de lavar dos veces con solución de Hanks/HEPES (20 mM; pH 7,4) 1x, se dispensa la misma solución en porciones de 100 μl/pocillo. Se añade cada uno de los compuestos de ensayo a las células CCR5/CHO que han incorporado así Fura-2AM y a los 3 minutos se añade un ligando CCR5 humano recombinante (RANTES, MIP-1α o MIP-1β) (PeproTach) diluido con solución de Hanks/HEPES (20 mM; pH 7,4) 1x hasta una concentración final (Rantes: 10 nM; MIP-1α: 30 nM; MIP-1β: 30 nM). Se mide el aumento transitorio en la concentración de Ca²⁺ intracelular inducido por el ligando CCR5 humano usando un detector de Ca²⁺ para uso en 96 pocillos (Hamamatsu Photonics), y se calcula el índice de inhibición (%) del compuesto de ensayo mediante la siguiente fórmula de cálculo.

45
$$\text{Índice de inhibición} = (E_c - E_a) / E_c \times 100$$

Ec: valor medido del aumento transitorio de Ca²⁺ por el ligando CCR5

Ea: valor medido del aumento transitorio de Ca²⁺ por el ligando CCR5 cuando se añade un compuesto de ensayo

50 (II) Prueba de migración de células que expresan CCR5 humano (células hCCR5-Ba/F3)

(1) Establecimiento de células que expresan CCR5 humano

55 (1-A) Aislamiento del gen CCR5 humano

Se lleva a cabo el aislamiento según el método de aislamiento del gen CCR5 humano descrito en el anterior método (I)-(1).

60 (1-B) Cultivo de células Ba/F3

Se cultivan estáticamente células Ba/F3 utilizando medio RMMI-1640 (Gibco BRL) que contiene antibióticos

(Antibiótico-Antimicótico) (concentración final: penicilina G sodio (100 U/ml), sulfato de estreptomicina (100 µg/ml), anfotericina B (0,25 µg/ml) (Gibco BRL)), suero bovino fetal (FBS) (10%), 2-mercaptoetanol (55 µM) e interleuquina-3 (IL-3) de ratón (5 ng/ml) (Pepro Tech, Inc.) en una incubadora con dióxido de carbono (temperatura 7°C, concentración de CO₂ 5%, humedad 95%). Se cultivan células que hiperexpresan de manera estable genes exógenos en el medio anterior, al que se añade blasticidina (Kaken Pharmaceutical) para obtener una concentración final de 10 µg/ml.

(1-C) Transformación en células Ba/F3

Se digiere un plásmido para la expresión de CCR5 humano (pEF-BOS-bsr/hCCR5) con *AatII* para su linealización. Se purifica el plásmido linealizado con el QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) y se introduce en células Ba/F3 por electroporación (Gene Pulser (BIO RAD), 960 µF/250V). Se siembran las células en una placa de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 1.000, 100 y 10 células/100 µl/pocillo y se cultivan durante 48 horas. A continuación, se añade blasticidina, para obtener una concentración final de 10 µg/ml, seguido de clonación de una línea de células resistentes a blasticidina, para establecer así un clon estable que sobreexpresa el gen exógeno transfectado (células hCCR5-Ba/F3).

(1-D) Análisis de la expresión de CCR5

Se detecta el nivel de expresión del CCR5 humano en el clon obtenido mediante el método descrito en el punto (1-C) anterior con FAC Sort (denominación comercial, Becton Dickinson), detectando las células con un anticuerpo anti-CCR5 humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen), y se analiza. A este respecto, se usa IgG2ax de ratón marcada con FITC (BD Pharmingen) como anticuerpo de control de isotipo.

(2) Prueba de migración celular

Se examina la influencia de un compuesto de ensayo sobre la capacidad migratoria de las células Ba/F3 que expresan CCR5 humano frente a RANTES, MIP-1 α o MIP-1 β . Primeramente, se añaden 0,3 ml de medio que contiene quimioquina 0 ó 3 nM (RANTES, MIP-1 α o MIP-1 β), respectivamente, al espacio inferior de una placa Chemo T x 96 pocillos (Neuro Probe). A continuación, se fija un filtro (tamaño de poro 5 µm) y se añade una solución de mezcla (1x10⁵ células/pocillo) del compuesto de ensayo y las células CCR5-Ba/F3 preparada con anterioridad a razón de 65 µl. Se prepara el compuesto de ensayo que se ha de añadir diluyéndolo con medio que contiene un 0,1% de DMSO, para obtener una concentración final sobre el filtro de 0, 0,01, 0,03, 0,1 ó 0,3 µM. Se cultivan estas células en una incubadora con CO₂ (37°C, 5% de CO₂, humedad relativa del 95%) durante 3 horas y se eliminan después el medio y las células no migradas sobre el filtro. Más aún, se retira el filtro, se centrifuga la microplaca (1.500 rpm, 10 min., TA) y se elimina el sobrenadante por decantación. Se suspenden las células de la microplaca en 100 µl de un tampón fosfato (PBS) y se vuelve a diluir una porción 1/10 con 90 µl de PBS, se transfiere a una placa blanca para el ensayo de fluorescencia y se utiliza como muestra de ensayo para los números de células migradas (final: 100 µl/pocillo).

A continuación, se añade Cell Titer-Glo Reagent (denominación comercial, Promega), previamente preparado a temperatura ambiente, a la anterior muestra de ensayo para los números de células migradas (100 µl/pocillo), seguido de mezcla suave (300 rpm, 2 min. con KASCHUTTLER MTS4) para lisar las células, se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos y se mide la fluorescencia con un Wallac ARVO SX 1420 MULTILABEL COUNTER (denominación comercial, Perkin Elmer) (detección por cuentas/segundo).

Se usan los números de células migradas (números de células que caen de manera natural) a una concentración de quimioquina de 0 nmol/l como fondo y se calcula el índice de inhibición del compuesto de ensayo frente al grupo control del 0,1% de DMSO.

Se calcula el índice de inhibición de la migración (%) del compuesto de ensayo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de inhibición} = \frac{(E_c - E_a)}{E_c} \times 100$$

E_c: (valor medido por fluorescencia al añadir un 0,1% de DMSO) - (valor medido por fluorescencia de las células que caen de manera natural)

E_a: (valor medido por fluorescencia al añadir el compuesto de ensayo) - (valor medido por fluorescencia de las células que caen de manera natural)

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Los siguientes Ejemplos de preparación, Ejemplos biológicos y Ejemplos de formulación pretenden ilustrar la presente invención, pero no la limitan.

En las separaciones cromatográficas y en la TLC, los solventes entre paréntesis muestran los solventes de elución y revelado, y las proporciones de los solventes utilizados están en volumen.

La RMN es el valor medido de la ¹H RMN. Los solventes entre paréntesis en la RMN muestran los solventes usados para la medición.

Ejemplo de preparación**Ejemplo de preparación 1**

N-[6-(4-Formilfenoxi)piridin-3-il]metanosulfonamida

Se sometió {4-[(5-nitropiridin-2-il)oxi]fenil}metanol a reducción del grupo nitro usando zinc y ácido acético, se hizo reaccionar el compuesto obtenido con cloruro de metanosulfonylo en piridina y se sometió el compuesto obtenido a oxidación usando dióxido de manganeso, para obtener el compuesto del título, que tenía los siguientes datos físicos. TLC: Rf 0,67 (diclorometano:metanol = 9:1).

RMN (CDCl₃): δ 3,04, 6,56, 7,05, 7,29, 7,80, 7,94, 8,08, 9,99.

Ejemplo de preparación 2

Clorhidrato de N-butil-N'-(2,4-difluorofenil)-N-piperidin-4-ilurea

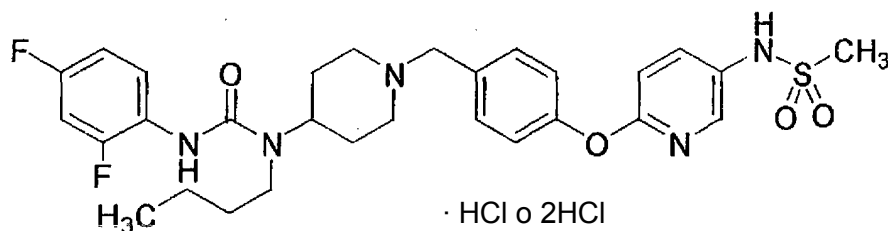
A una solución de 4-(butilamino)piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (1 g) en dimetilacetamida (13 ml) se le añadieron trietilamina (1,6 ml) e isocianato de 2,4-difluorofenilo (907 mg). Se agitó la mezcla de reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó el extracto con agua y solución salina acuosa saturada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. Se añadió a una solución del compuesto obtenido (1,28 g) en acetato de etilo (2 ml) una solución 4N de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (10 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente y se concentró. Se lavó el residuo obtenido con *terc*-butil metil éter y se secó, para obtener el compuesto del título, que tenía los siguientes datos físicos.

TLC: Rf 0,52 (diclorometano:metanol:ácido acético = 5:1:0,1).

RMN (CD₃OD): δ 0,99, 1,34-1,47, 1,60-1,71, 1,95-2,01, 2,08-2,22, 3,03-3,13, 3,27-3,34, 3,44-3,50, 4,13, 7,00, 7,37, 8,01.

Ejemplo de preparación 3

Clorhidrato (o diclorhidrato) de N-[6-(4-{[4-(butil{[(2,4-difluorofenil)amino]carbonil}amino)-1-piperidinil]metil}fenoxi)-3-piridinil]metanosulfonamida



A una solución del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 1 (95 mg) y el compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 2 (80 mg) en dimetilformamida (1,5 ml) se le añadieron ácido acético (0,15 ml) y triacetoxiborohidruro de sodio (116 mg). Se agitó la mezcla de reacción durante 18 horas a temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. Se purificó el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:metanol = 10:1). A una solución del compuesto obtenido, se le añadió una solución 4N de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo. Se concentró la mezcla de reacción, para obtener el compuesto del título (115 mg), que tenía los siguientes datos físicos.

TLC: Rf 0,44 (diclorometano:metanol = 9:1).

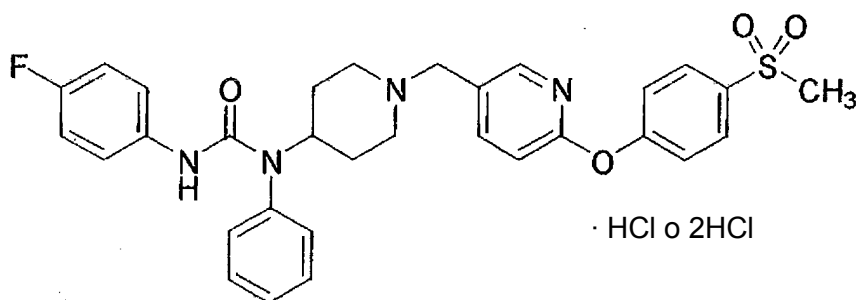
RMN (CD₃OD) δ 0,98, 1,35-1,48, 1,58-1,70, 1,95-2,08, 2,18-2,34, 3,00, 3,08-3,20, 3,25-3,34, 3,57-3,65, 4,19, 4,34, 6,89-7,03, 7,09, 7,25, 7,38, 7,60, 7,85, 8,06.

5 Ejemplos de preparación 6(1)-6(17)

Mediante el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo de preparación 3, usando el correspondiente compuesto aldehído en lugar del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 1 y el correspondiente compuesto amina en lugar del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 2, se obtuvo el siguiente compuesto.

Ejemplo de preparación 6(17)

15 Clorhidrato (o diclorhidrato) de N-(4-fluorofenil)-N-[1-({6-[4-(metilsulfonyl)fenoxi]piridin-3-il}metil)piperidin-4-il]-N-fenilurea



TLC: Rf 0,54 (diclorometano:metanol = 9:1).

20 RMN (CD₃OD): δ 1,62-1,80, 2,14-2,03, 3,14, 3,12-3,25, 3,48-3,58, 4,30, 4,67, 6,95, 7,16-7,25, 7,30-7,40, 7,46-7,58, 7,96, 8,00, 8,22.

Ejemplo y Ejemplo de preparación 7(14), 7(29), 7(54) y 7(83)

25 Mediante el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo de preparación 3, usando el correspondiente compuesto aldehído en lugar del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 1 y el correspondiente compuesto amina en lugar del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 2, y convirtiéndolos en la forma libre, de ser necesario, se obtuvieron los siguientes compuestos.

30 Ejemplo 7(16)

Clorhidrato (o diclorhidrato) de 5-[[[butil{1-[(2-metil-6-{4-[(metilsulfonyl)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil}amino)carbonil]amino]-2,4-difluorobenzamida

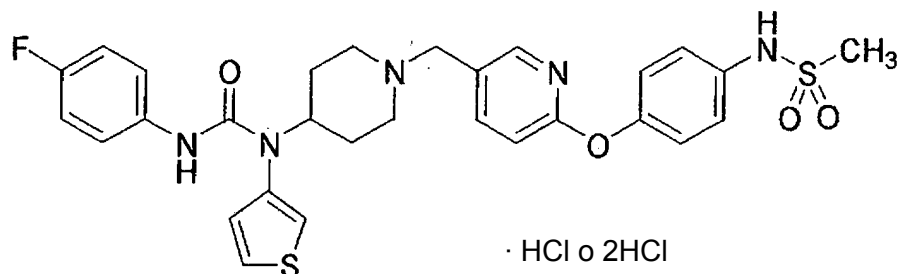
35 TLC: Rf 0,56 (diclorometano:metanol = 9:1).

RMN (CD₃OD): δ 0,98, 1,32-1,45, 1,58-1,70, 1,95-2,05, 2,24-2,40, 2,67, 2,99, 3,20-3,35, 3,60-3,69, 4,28, 4,43, 6,95, 7,14, 7,22, 7,37, 7,87, 8,20.

Ejemplo de preparación 7(29)

Clorhidrato (o diclorhidrato) de N-(4-[[5-({4-[[[(4-fluorofenil)amino]carbonil](3-tienil)amino]-1-piperidinil]metil)-2-piridinil]oxi]fenil)metanosulfonamida

5



TLC: Rf 0,30 (cloroformo:metanol = 10:1).

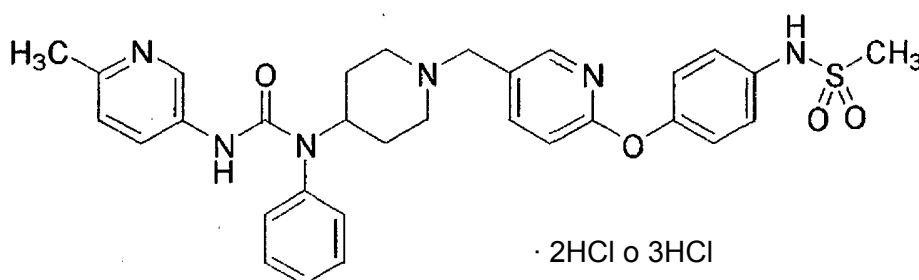
RMN (CD₃OD): δ 1,60-1,80, 2,10-2,20, 2,97, 3,10-3,25, 3,50-3,60, 4,29, 4,65, 6,93-7,13, 7,22-7,33, 7,53, 7,61, 7,94, 8,21.

10

Ejemplo de preparación 7(54)

Diclorhidrato (o triclorhidrato) de N-(4-[[5-({4-[[[(6-metil-3-piridinil)amino]carbonil](fenil)amino]-1-piperidinil]metil)-2-piridinil]oxil]fenil)metanosulfonamida

15



Polvo amorfo.

TLC: Rf 0,48 (diclorometano:metanol = 9:1).

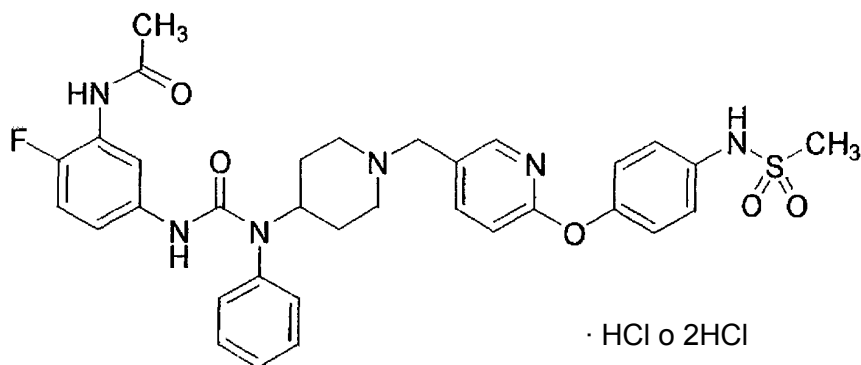
RMN (CD₃OD): δ 1,68-1,85, 2,12-2,25, 2,68, 2,97, 3,15-3,28, 3,50-3,60, 4,31, 4,71, 7,07, 7,13, 7,29-7,38, 7,50-7,62, 7,73, 8,01, 8,25, 8,31, 8,97.

20

Ejemplo de preparación 7(83)

Clorhidrato (o diclorhidrato) de N-[2-fluoro-5-({[1-[(6-{4-[(metilsulfonil)amino]fenoxi}-3-piridinil]metil]-4-piperidinil](fenil)amino]carbonil}amino)fenil]acetamida

25



30

Polvo amorfo blanco.

TLC: Rf 0,36 (cloroformo:metanol = 10:1).

RMN (CD_3OD): δ 1,60-1,80, 2,10-2,30, 2,12, 2,97, 3,10-3,25, 3,45-3,55, 4,27, 4,65, 7,00-7,12, 7,30-7,33, 7,49-7,55, 7,78, 7,90, 8,18.

5

Ejemplos biológicos

Se demuestra mediante los siguientes experimentos que el compuesto de la presente invención representado por la fórmula (I) tiene actividad antagonista de los receptores de quimioquinas, especialmente de CCR5, y actividad inhibitoria de la migración celular, y que tiene también las condiciones apropiadas para ser un medicamento de gran utilidad.

10

Ejemplo biológico 1

15 Prueba de la actividad antagonista frente a CCR5

Se puede demostrar mediante, por ejemplo, el procedimiento descrito en JP-A-2004-256531 que el compuesto de la presente invención tiene actividad antagonista frente a CCR5.

20 Ejemplo biológico 2

Prueba de la migración celular

Se demostró mediante, por ejemplo, el siguiente experimento que el compuesto de la presente invención tiene actividad inhibitoria frente a la migración celular.

25

Preparación de PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

Se guardó sangre venosa humana (50 ml) recogida utilizando una jeringa con heparina sódica (concentración final: 10 U/ml, inyección de heparina sódica 1.000 U/ml, Shimizu Pharmaceutical Co., Ltd.) en un tubo cónico de 50 ml hecho de polipropileno. Se añadieron a un tubo Lymphoprep (HYCOMED PHARMA, N° de Cat. 1019818) 16,5 ml de DPBS(-) (GIBCO, N° Cat. 14190-136) y una muestra de sangre, se sacudió varias veces y se centrifugó después a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron aproximadamente 7 ml de fase PBMC (fase central) en un tubo cónico de 50 ml hecho de polipropileno usando una pipeta Pasteur y se añadió DPBS(-) hasta una concentración final (50 ml), y se centrifugó luego a 1.200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar el sobrenadante, se redisolvió el residuo en 50 ml de DPBS(-). Se centrifugó la suspensión celular a 1.500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, se añadieron entonces 3 ml de tampón de hemólisis (0,8% de NH_4Cl , 0,1% de $KHCO_3$, 1 mmol/l de EDTA) para suspender suficientemente y se dejó luego durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la suspensión 30 ml de DPBS(-) y se centrifugó a 1.500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, para obtener PBMC.

30

35

40

Cultivo de PBMC humanas

Después de revestir con anticuerpo anti-CD3 humano OKT3 (Janssen Pharmaceutical K.K., 1 $\mu g/ml$) una placa de 24 pocillos durante la noche a 4°C, se bloqueó ésta con medio de cultivo (RPMI 1640 (GIBCO, N° de Cat. 11875-085), 10% de FBS (GIBCO, N° de Cat. 112318-028), 1% de PSF (GIBCO, N° de Cat. 15240-096)) en 30 minutos a 37°C. Se sembraron las PBMC humanas preparadas en la placa revestida con OKT3 (2×10^6 células/pocillo) y se cultivaron durante varios días a 37°C. Se recogieron las PBMC y se sembraron en una placa no revestida con OKT3 (2×10^6 células/pocillo) en presencia de IL-2 humana (5 ng/ml), se cultivaron después y se subcultivaron las PBMC cada dos o tres días.

45

50

Análisis de la expresión del CCR5 humano usando FACS

Después de añadir 10 μl de anticuerpo anti-CCR5 humano marcado con FITC (2D7) (BD Pharmingen, N° de Cat. 555992) y anticuerpo anti-CD45RO humano marcado con PE (BD Pharmingen, N° de Cat. 347967) a las PBMC humanas cultivadas a razón de 1×10^6 células, se mantuvo la mezcla en oscuridad durante 15 minutos o se dejó durante 30 minutos sobre hielo, se le añadió luego DPBS (GIBCO) y se lavó. Se suspendieron las células en 500 μl de DPBS y se midió luego la intensidad de fluorescencia usando FACS.

55

60 Experimento *in vitro* de migración celular

Se añadieron 50 μl de la suspensión de PBMC humanas de 5×10^5 células (medio de cultivo) y 50 μl de la solución del compuesto de ensayo (0-2 $\mu mol/l$: doble concentración de la concentración final) al pocillo superior de una placa

de transpocillos (Coster) y se añadieron 300 µl de la MIP-1β humana a 60 nmol/l (Pepro tech, N° de Cat. 300-09) y 300 µl de una doble concentración de la solución del compuesto de ensayo al pocillo inferior. Se preparó de tal forma que la concentración de DMSO en el pocillo superior fuera del 0,01%. Se incubó la solución durante 1,5 horas en una atmósfera de dióxido de carbono gaseoso (37°C, 5% de CO₂, grado de humedad: 95%). Después de aspirar el solvente del pocillo superior, se añadieron al mismo 100 µl de EDTA/DPBS(-) a 20 µmol/l y se incubó durante 30 minutos a 4°C, y se centrifugó luego a 1.500 rpm durante 5 minutos. Se transfirieron 100 µl de la solución del pocillo inferior a una placa de 96 pocillos blanca para fluorescencia por pipeteado y se midió la cantidad de células usando Celltiter Glo (Promega) (una medición del ATP). Se calculó el índice de inhibición de la migración celular mediante la siguiente fórmula de cálculo. Se calculó el valor de la CI₅₀ a partir del índice de inhibición de la migración celular de cada concentración. El valor era un valor medio (n=3).

Como resultado, los compuestos de la presente invención mostraron actividad inhibitoria frente a la migración celular inducida por MIP-1β humana de las PBMC humanas cultivadas, con un valor de CI₅₀ de 0,01 µM o menos. Por ejemplo, el compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 7(29) mostró un valor de CI₅₀ de 0,0012 µM.

$$\text{Índice de inhibición de la migración celular} = (Ea - Ec)/(Eb - Ec) \times 100$$

Ea: valor medido cuando se añade un compuesto de ensayo (0,01% en DMSO)
 Eb: valor medido cuando no se añade ningún compuesto de ensayo, sino sólo DMSO
 Ec: valor medido cuando no se añade ningún compuesto de ensayo, sino sólo DMSO, sin adición de ligando al pocillo inferior

Ejemplo biológico 3: Prueba de estabilidad en microsomas hepáticos de mono

Se demostró que los compuestos de la presente invención tienen estabilidad metabólica mediante los siguientes experimentos, por ejemplo.

A una solución de 100 mmol/l de tampón fosfato (pH 7,4, preparada a partir de 100 mmol/l de una solución acuosa de hidrógeno fosfato dipotásico y 100 mmol/l de una solución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio), se le añadieron microsomas hepáticos de mono (concentración final: 1 mg/ml) y un compuesto de ensayo (concentración final: 5 µmol/l) y se preincubó la solución de la mezcla durante 5 minutos. Se añadieron a la solución de la mezcla sistema generador de NADPH (13 mmol/l de β-NADP⁺ (concentración final: 1,3 mmol/l), 33 mmol/l de G-6-P (concentración final: 3,3 mmol/l), 10 U/ml de G-6-P DH (de levaduras) (concentración final: 0,4 U/ml) y 33 mmol/l de una solución de cloruro de magnesio (concentración final: 3,3 mmol/l)). Mientras se incubaba la mezcla a 37°C, se recogieron 100 µl de la solución de reacción a los 0 y 30 minutos del inicio y se añadieron a acetonitrilo (2 ml) para finalizar la reacción (n=2). Después de añadirle una solución de patrón interno, se agitó la solución de la mezcla y se centrifugó luego a 3.000 rpm durante 5 minutos. Se mezclaron 100 µl del sobrenadante resultante con 100 µl de fase móvil A y se analizó luego por LC/MS/MS.

A continuación se indican las condiciones de LC/MS/MS para el análisis.

Condiciones de LC:

Columna: XTerra RP8 3,5 µm (2,1 mm DI × 50 mm) (Waters Corporation)
 Temperatura de la columna: 40°C
 Fase móvil A: solución acuosa de acetato de amonio a 5 mmol/l / acetonitrilo (80/20, v/v)
 Fase móvil B: solución acuosa de acetato de amonio a 5 mmol/l / acetonitrilo (20/80, v/v)
 Temperatura de la muestra: 4°C
 Volumen de inyección de la muestra: 5 µl
 Tiempo para el análisis: 10 min.

Composición de las fases móviles y velocidad de flujo:

Tabla 1

Tiempo (min.)	Velocidad de flujo (µl/min)	A (%)	B(%)
0,00	300	95,0	5,0
1,00	300	95,0	5,0
1,10	300	5,0	95,0
5,00	300	5,0	95,0
5,10	300	95,0	5,0
10,00	300	95,0	5,0

Condiciones de MS/MS:

Equipo de medición: API3000 (AB/MDS SCIEX)
Método de ionización: Ionización por electroaspersión (ESI, Positiva)

5 Se seleccionó el ion de monitorización apropiado para cada muestra. Por ejemplo, se seleccionaron 647,5 (m/z) como ion parental y 277,0 (m/z) como ion hijo para el compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 7(83).

10 Se calculó el índice residual del compuesto de ensayo no metabolizado (%) en los microsomas hepáticos de mono mediante la siguiente fórmula de cálculo.

$$\text{Índice residual del compuesto no metabolizado (\%)} = (\text{concentración del compuesto de ensayo a los 30 minutos}) / (\text{concentración del compuesto de ensayo a los 0 minutos}) \times 100$$

15 Como resultado, se vio que los compuestos de la presente invención son metabólicamente estables en los microsomas hepáticos. Por ejemplo, el índice residual del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 7(83) no metabolizado era del 88%.

20 Ejemplo biológico 4

Prueba farmacocinética en sangre de mono

Se demostró que los compuestos de la presente invención tienen buenas propiedades farmacocinéticas en sangre mediante los siguientes experimentos, por ejemplo.

25 Se pesaron cada uno de cinco compuestos de ensayo y se disolvieron en Soltol (marca registrada, BASF Takeda Vitamins Ltd.)/propilenglicol = 7/3 calentado hasta 50°C para preparar una solución de 5 mg/ml de los mismos. Se pesaron cantidades iguales de cada una de las cinco muestras, se mezclaron y se diluyeron después con agua destilada para inyección cinco veces, para preparar una solución para administración oral. Se administró la solución oral (1 mg/kg) por administración forzada intragástrica con sonda a monos cinomolgos (machos, Hamri Co., Ltd.) (n=3). Se realizó la administración en ayunas, pero con libre acceso al agua de bebida. Se recogieron muestras de 1 ml de sangre de la vena cefálica superficial usando una jeringa heparinizada a los 5, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas de la administración. Se guardaron las muestras recogidas en hielo y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma. Se guardó el plasma a -20°C. Se disolvieron las muestras de plasma guardadas a -20°C, se añadieron entonces a 100 µl de la solución resultante solución de patrón interno y acetonitrilo (2 ml), se agitó y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se secó el sobrenadante resultante con un concentrador centrifugo. Se volvió a disolver el residuo en 100 µl de fase móvil A y se analizaron luego 40 µl de la solución resultante por LC/MS/MS

40 A continuación se indican las condiciones para el análisis LC/MS/MS.

Condiciones de LC:

45 Equipo de medición: Waters 2790 (Waters)
Columna: YMC-Pack MB-ODS 5 µm (2,1 mm DI × 50 mm) (YMC)
Temperatura de la columna: temperatura ambiente
Velocidad de flujo: 200 µl/minuto
Fase móvil: solución acuosa de acetato de amonio a 20 mmol/l / acetonitrilo (1/1, v/v)

50 Condiciones de MS/MS:

Equipo de medición: QUATTRO Ultima (Micromass)
Método de ionización: ES+
Voltaje capilar: 3,20 kV
55 Temperatura de fuente: 150°C
Temperatura de desolvatación: 250°C
Multiplicador: 650V

60 Se seleccionó el ion de monitorización apropiado para cada muestra. Por ejemplo, se seleccionaron 575,64 (m/z) como ion parental y 262,07 (m/z) como ion hijo para el compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 6(17), y 587,20 (m/z) como ion parental y 227,12 (m/z) como ion hijo para el compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 7(54), respectivamente.

Se analizó la transición de la concentración plasmática del compuesto de ensayo en monos con un método analítico no compartimentado usando WinNonlin 4.0.1 (Pharsight) y se calculó el AUC.

- 5 Como resultado, se vio que los compuestos de la presente invención tienen buenas propiedades farmacocinéticas en sangre. Por ejemplo, las AUC de los compuestos preparados en el Ejemplo de preparación 6(17) y el Ejemplo de preparación 7(54) eran de 226 ng-h/ml y 1.150 ng-h/ml, respectivamente.

Ejemplo biológico 5

- 10 Medición de la biodisponibilidad (BD)

Se demostró que los compuestos de la presente invención tienen una buena absorción como preparaciones orales mediante los siguientes experimentos, por ejemplo.

- 15 Se pesó el compuesto de ensayo y se disolvió en HP- β -CD (marca registrada, Mitsubishi Corporation) al 30%, para preparar una solución de 1 mg/ml para administración intravenosa. Se pesó el compuesto de ensayo y se disolvió en Soltol (marca registrada, BASF Takeda Vitamins Ltd.)/propilenglicol = 7/3 calentado hasta 50°C para preparar una solución de 5 mg/ml del mismo. Se pesaron cantidades iguales de cada una de cinco muestras, se mezclaron y se diluyeron luego con agua destilada para inyección cinco veces, para preparar una solución para administración oral.
- 20 Se administró la solución intravenosa (1 mg/kg) a monos cinomolgos (machos, Hamri Co., Ltd.) a través de la vena cefálica superficial mediante una única dosis intravenosa (n=3). Se administró la solución oral (3 mg/kg) por administración forzada intragástrica con sonda a monos cinomolgos (machos, Hamri Co., Ltd.) (n=3). Se realizó la administración en ayunas, pero con libre acceso al agua de bebida. Se recogieron muestras de 1 ml de sangre de la vena cefálica superficial usando una jeringa heparinizada a los 5, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas de la administración. Se guardaron las muestras recogidas en hielo y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma. Se guardó el plasma a -20°C. Se disolvieron las muestras de plasma guardadas a -20°C, se añadieron luego a 100 μ l de la solución resultante solución de patrón interno y acetonitrilo (2 ml), se agitó y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se volvió a disolver el residuo en 100 μ l de fase móvil A y se analizaron entonces 40 μ l de la solución resultante por LC/MS/MS

- 30 A continuación se indican las condiciones para el análisis LC/MS/MS.

Condiciones de LC:

- | | | |
|----|----------------------------|---|
| 35 | Equipo de medición: | Waters 2790 (Waters) |
| | Columna: | YMC-Pack MB-ODS 5 μ m (2,1 mm DI \times 50 mm) (YMC) |
| | Temperatura de la columna: | temperatura ambiente |
| | Velocidad de flujo: | 200 μ l/minuto |
| 40 | Fase móvil: | solución acuosa de acetato de amonio a 20 mmol/l / acetonitrilo (1/1) |

Condiciones de MS/MS:

- | | | |
|----|-------------------------------|----------------------------|
| | Equipo de medición: | QUATTRO Ultima (Micromass) |
| 45 | Método de ionización: | ES+ |
| | Voltaje capilar: | 3,20 kV |
| | Temperatura de fuente: | 150°C |
| | Temperatura de desolvatación: | 250°C |
| | Multiplicador: | 650V |

- 50 Se seleccionó el ion de monitorización apropiado para cada muestra, Por ejemplo, se seleccionaron 575,64 (m/z) como ion parental y 262,07 (m/z) como ion hijo (corriente de cono: 35 V, corriente de colisión: 34 eV) para el compuesto preparado en el Ejemplo 6(17).

- 55 Se analizó la transición de la concentración plasmática del compuesto de ensayo en monos con un método analítico no compartimentado usando WinNonlin 4.0.1 (Pharsight) y se calculó el AUC.

Se calculó la BD mediante la siguiente fórmula de cálculo.

- 60
$$BD (\%) = (AUC_{p.o.}/Dosis_{p.o.})/(AUC_{i.v.}/Dosis_{i.v.}) \times 100$$

AUC_{p.o.}: AUC cuando se administra oralmente un compuesto de ensayo

Dosis_{p.o.}: cantidad del compuesto administrado oralmente

AUC_{i.v.}: AUC cuando se administra intravenosamente un compuesto de ensayo

Dosis_{i.v.}: cantidad del compuesto administrado intravenosamente

Como resultado, se vio que los compuestos de la presente invención tienen una buena absorción como preparaciones orales. Por ejemplo, la BD del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación 6(17) era del 42%.

Ejemplo biológico 6

Modelo de alotrasplante renal en monos cinomolgos para evaluar el efecto inmunosupresor del compuesto de la presente invención:

Se sometieron monos cinomolgos (peso corporal: 3-4,5 kg) que eran ABO-compatibles y diferentes en cuanto al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), más específicamente, combinaciones de donantes (machos)-receptores (cualquier sexo) con discordancia en la RLM, a nefrectomía bilateral con posterior implante de un riñón alogénico de un animal donante seleccionado. Se administró una sustancia de ensayo (un compuesto de la presente invención y/o un agente inmunosupresor) diariamente comenzando el Día-1 (el día antes del trasplante) hasta el día antes de definirse el rechazo. Se valoró la eficacia comparando la duración de la supervivencia del riñón trasplantado.

Se administró el compuesto de la presente invención en combinación con un agente inmunosupresor subterapéutico comercial (ciclosporina, sirolimus y/o tacrolimus). Se demostró la eficacia por comparación con la administración del agente inmunosupresor solo.

Se administró el compuesto de la presente invención, por ejemplo, *per os* (PO) dos veces al día a un nivel de dosis de 3, 10 ó 30 mg/kg.

Por ejemplo, había sospecha de la presencia de rechazo si se elevaban los niveles séricos de creatinina. En particular, se definió el rechazo del riñón trasplantado como un aumento en los niveles séricos de creatinina de hasta 8 mg/dl.

Como resultado, el compuesto de la presente invención mostró un efecto inmunosupresor en el modelo de alotrasplante renal en monos cinomolgos.

Ejemplos de formulación

Ejemplo de formulación 1

Se mezclan clorhidrato de N'-(4-fluorofenil)-N-[1-({6-[4-(metilsulfonil)fenoxi]piridin-3-il}metil)piperidin-4-il]-N-fenilurea (10 g), carboximetilcelulosa calcio (desintegrante, 2,0 g), estearato de magnesio (lubricante, 1,0 g) y celulosa microcristalina (87 g) de un modo convencional y se troquelan, para obtener 1.000 tabletas con un contenido en principio activo de 10 mg cada una.

Ejemplo de formulación 2

Se mezclan clorhidrato de N'-(4-fluorofenil)-N-[1-({6-[4-(metilsulfonil)fenoxi]piridin-3-il}metil)piperidin-4-il]-N-fenilurea (10 g), manitol (200 g) y agua destilada (5 l) de un modo convencional. Se filtra entonces la solución a través de un filtro a prueba de polvo y se cargan luego alícuotas de 5 ml en ampollas, que se autoclavan, para obtener 1.000 ampollas con un contenido en principio activo de 10 mg cada una.

Aplicabilidad industrial

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) tienen actividad antagonista de los receptores de quimioquinas, especialmente de CCR5, por lo que son útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR5, por ejemplo, diversas enfermedades inflamatorias (asma, nefritis, nefropatía, hepatitis, artritis, artritis reumatoide, rinitis, conjuntivitis, enfermedad inflamatoria del intestino, tal como colitis ulcerativa, etc.), enfermedades inmunológicas (enfermedades autoinmunes, rechazo en el trasplante de órganos (rechazo de injertos de órganos sólidos, rechazo de injertos de células de los islotes pancreáticos en la terapia de la diabetes, enfermedad del injerto contra el huésped, etc.), inmunosupresión, psoriasis, esclerosis múltiple, etc.), enfermedades infecciosas (infección con el virus de la inmunodeficiencia humana, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, infección con VSR, etc.), enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, urticaria, aspergilosis alérgica broncopulmonar, gastroenteritis alérgica eosinofílica, etc.), enfermedades cardiovasculares (arteriosclerosis, lesión por isquemia y reperfusión, etc.), síndrome del distrés respiratorio agudo, shock acompañante de la infección bacteriana, diabetes, metástasis cancerosa, etc. Por lo tanto, el antagonista de los receptores de quimioquinas, especialmente el antagonista de CCR5, es útil como medicamento.

Lista de secuencias

- <110> ONO Pharmaceutical Co., Ltd.
- 5 <120> Un derivado heterocíclico que contiene nitrógeno y un fármaco que lo contiene como principio activo
- <130> ONF-5691PCT
- 10 <150> JP 2004-264855
<151> 13-09-2004
- <150> JP 2005-127359
<151> 26-04-2005
- 15 <160> 2
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 20 <210> 1
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador hacia delante hCCR5Xbal
- <400> 1
agctagtcta gatccgttcc cctacaagaa actctcc 37
- 30 <210> 2
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador inverso hCCR5Xba1
- <400> 2
40 agctagtcta gagtgcacaa ctctgactgg gtcacca 37

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es

5 (150) 5-[[butil{1-[(2-metil-6-{4-[(metilsulfonyl)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil}amino)carbonil]amino}-2,4-difluorobenzamida, una sal de la misma, un N-óxido de la misma o un solvato de la misma.

2. El compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto es clorhidrato de 5-[[butil{1-[(2-metil-6-{4-
10 [(metilsulfonyl)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil}amino)carbonil]amino}-2,4-difluorobenzamida o diclorhidrato de 5-[[butil{1-[(2-metil-6-{4-[(metilsulfonyl)amino]fenoxi}-3-piridinil)metil]-4-piperidinil}amino)carbonil]amino}-2,4-difluorobenzamida.

3. Una composición farmacéutica que contiene el compuesto según la reivindicación 1 ó 2, una sal del mismo, un N-óxido del mismo o un solvato del mismo.