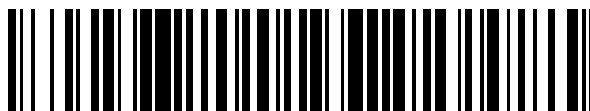


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 515**

51 Int. Cl.:

C07D 211/58 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 31/4468 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 11748693 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2619180**

54 Título: **Antagonistas del receptor 5-HT2B**

30 Prioridad:

01.09.2010 EP 10174880

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

23.12.2014

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V. (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**THURING, JOHANNES, WILHELMUS, JOHN F. y
VER DONCK, LUC, AUGUST, LAURENTIUS**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 525 515 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

Antagonistas del receptor 5-HT_{2B}

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de piperidina fluorados novedosos que tienen actividad antagonista en el receptor 5-HT_{2B}, a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y a sus usos como medicamento.

10

Antecedentes de la invención

La cisaprida es un agonista del receptor 5-HT₄ de serotonina útil como fármaco gastroprocinético (documento EP-0.076.530). Interacciona significativamente con otros receptores diversos tales como 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}; D_{2L}; 5-HT_{3A/B}; Alfa_{1A}, Alfa_{2A}, Alfa_{2B} y Alfa_{2C}. Se retiró de algunos mercados en el año 2000 debido a informes de arritmias cardiacas súbitas. En el origen de este efecto secundario está la prolongación del intervalo QT inducida por el fármaco mediante el bloqueo del canal de potasio hERG (gen relacionado con éter a-go-go humano). Uno de los farmacóforos conocidos de un bloqueante del canal hERG comprende un resto hidrófilo y uno hidrófobo unidos mediante una parte media que tiene un átomo de nitrógeno básico. A pH fisiológico, el nitrógeno básico está protonado y está implicado en la interacción del catión π con residuos de Tyr 652 dentro del poro del canal hERG. Con el fin de disminuir el valor de pKa del átomo de nitrógeno de piperidina, y reducir de ese modo la posibilidad de bloqueo del canal hERG, se prepararon derivados de cisaprida en los que se reemplazó 3-metoxi-piperidina por 3-fluoropiperidina y 3,3-difluoropiperidina. El documento WO 2008/139152 muestra que el derivado de N-óxido de cisaprida tiene una afinidad inferior por el canal h-ERG que la cisaprida.

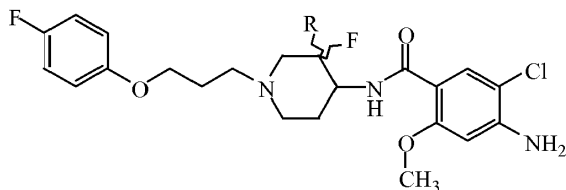
15

20

25

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



30

o una forma estereoquímicamente isomérica del mismo, en la que

R es hidrógeno o fluoro, o

35

una sal de adición o un solvato del mismo.

Es ilustrativa de la invención una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y cualquiera de los compuestos descritos anteriormente. Una ilustración de la invención es una composición farmacéutica obtenida mezclando cualquiera de los compuestos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Ilustra la invención un procedimiento para obtener una composición farmacéutica que comprende mezclar cualquiera de los compuestos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

40

45

Ejemplifican la invención métodos de tratamiento de un trastorno mediado por el receptor 5-HT_{2B}, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos anteriormente.

50

Ejemplifican adicionalmente la invención métodos de inhibición del receptor 5-HT_{2B}, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos anteriormente.

55

Un ejemplo de la invención es un método de tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en hipertensión arterial pulmonar, fibrosis pulmonar, síndrome del intestino irritable, trastornos cardiovasculares tales como enfermedad cardiaca crónica, insuficiencia cardiaca congestiva e hipertensión, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos anteriormente.

60

Otro ejemplo de la invención es cualquiera de los compuestos descritos anteriormente para su uso en el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar, fibrosis pulmonar, síndrome del intestino irritable, trastornos cardiovasculares tales

como enfermedad cardiaca crónica, insuficiencia cardiaca congestiva e hipertensión, en un sujeto que lo necesita.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) tal como se definió anteriormente en el presente documento, y a sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos de fórmula (I) son antagonistas selectivos en el receptor 5-HT_{2B}.

10 En una realización de la presente invención, R es fluoro y el compuesto es una mezcla racémica o una sal de adición o un solvato del mismo.

En otra realización de la presente invención, R es fluoro y el compuesto tiene una rotación óptica $[\alpha] = +14,1^\circ$ (c = 0,3, MeOH, $\lambda = 598$ nm; 20°C), o una sal de adición o un solvato del mismo.

15 En otra realización de la presente invención, R es fluoro y el compuesto tiene una rotación óptica $[\alpha] = -14,4^\circ$ (c = 0,3, MeOH, $\lambda = 598$ nm; 20°C), o una sal de adición o un solvato del mismo.

20 En otra realización de la presente invención, R es hidrógeno y los sustituyentes en posición 3 y 4 del resto de piperidina tienen una orientación cis, o una sal de adición o un solvato del mismo.

En otra realización de la presente invención, R es hidrógeno, los sustituyentes en posición 3 y 4 del resto de piperidina tienen una orientación cis y el compuesto tiene una rotación óptica $[\alpha] = +39,8^\circ$ (c = 0,2, MeOH, $\lambda = 598$ nm; 20°C), o una sal de adición o un solvato del mismo.

25 En otra realización de la presente invención, R es hidrógeno, los sustituyentes en posición 3 y 4 del resto de piperidina tienen una orientación cis y el compuesto tiene una rotación óptica $[\alpha] = -45,5^\circ$ (c = 0,2, MeOH, $\lambda = 598$ nm; 20°C), o una sal de adición o un solvato del mismo.

30 En otra realización de la presente invención, R es hidrógeno y los sustituyentes en posición 3 y 4 del resto de piperidina tienen una orientación trans, o una sal de adición o un solvato del mismo.

35 En otra realización de la presente invención, R es hidrógeno, los sustituyentes en posición 3 y 4 del resto de piperidina tienen una orientación trans y el compuesto tiene una rotación óptica $[\alpha] = +19,2^\circ$ (c = 0,4, MeOH, $\lambda = 598$ nm; 20°C), o una sal de adición o un solvato del mismo.

En otra realización de la presente invención, R es hidrógeno, los sustituyentes en posición 3 y 4 del resto de piperidina tienen una orientación trans y el compuesto tiene una rotación óptica $[\alpha] = -22,8^\circ$ (c = 0,3, MeOH, $\lambda = 598$ nm; 20°C), o una sal de adición o un solvato del mismo.

40 Tal como se preveía, los derivados fluorados de cisaprida son bloqueantes del canal hERG significativamente menos potentes que la cisaprida y por tanto es mucho menos probable que produzcan prolongación del intervalo QT inducida por fármacos. Aunque inesperadamente, las afinidades del receptor cambian de diversas maneras para producir compuestos con un perfil más selectivo. Las afinidades por los receptores 5-HT_{2A} y D_{2L} disminuyen significativamente, y por los receptores 5-HT_{3A/B}, 5-HT_{4B}, Alfa_{1A}, Alfa_{2A}, Alfa_{2B} y Alfa_{2C} muestran tendencia a una
45 reducción. La única excepción es la afinidad por el receptor 5-HT_{2B} que aumenta significativamente.

Los antagonistas del receptor 5-HT_{2B} están indicados para el tratamiento o la prevención de hipertensión arterial pulmonar, fibrosis pulmonar o síndrome del intestino irritable. La hipertensión arterial pulmonar puede ser idiopática, familiar o asociada con otras enfermedades tales como infección por VIH o uso de determinados fármacos. También
50 puede estar asociada con enfermedades cardíacas o pulmonares tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad pulmonar intersticial o exposición crónica a alta altitud. La fibrosis pulmonar se caracteriza por inflamación crónica y fibrosis progresiva de las paredes alveolares, con disnea que progresa de manera continua, que da como resultado finalmente la muerte por falta de oxígeno o insuficiencia cardiaca derecha. El síndrome del intestino irritable es una enfermedad no inflamatoria crónica caracterizada por dolor abdominal,
55 hábitos intestinales alterados que consisten en diarrea o estreñimiento o ambos, y ausencia de cambio patológico. Es un trastorno común con base psicofisiológica. Los antagonistas del receptor 5-HT_{2B} también pueden usarse para tratar trastornos cardiovasculares tales como enfermedad cardiaca crónica, insuficiencia cardiaca congestiva e hipertensión.

60 Definiciones

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano, que es o ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento.

65 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento, significa aquella cantidad

de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica en un sistema tisular, animal o ser humano que está buscando un investigador, veterinario, médico u otro facultativo, que incluye alivio de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que está tratándose.

5 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “composición” abarque un producto que comprende los componentes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los componentes especificados en las cantidades especificadas.

10 Se apreciará que algunos de los compuestos según la fórmula (I) y las sales de adición, hidratos y solvatos de los mismos pueden contener uno o más centros de quiralidad y existir como formas estereoisoméricas.

El término “formas estereoisoméricas” tal como se usó anteriormente en el presente documento o a continuación en el presente documento define todas las posibles formas estereoisoméricas que pueden presentar los compuestos según la fórmula (I) y sus sales de adición. A menos que se mencione o indique otra cosa, la designación química de los compuestos indica la mezcla de todas las posibles formas estereoquímicamente isoméricas, conteniendo dichas mezclas todos los diastereómeros y enantiómeros de la estructura molecular básica, así como de cada una de las formas isoméricas individuales según la fórmula (I) y sus sales, solvatos, sustancialmente libres, es decir asociados con menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, en particular menos del 2% y lo más preferiblemente menos del 20 1% de los otros isómeros.

Cuando los compuestos según esta invención tienen al menos un centro quiral, pueden existir por consiguiente como enantiómeros. Cuando los compuestos presentan dos o más centros quirales, pueden existir adicionalmente como diastereómeros. Ha de entenderse que todos los isómeros y mezclas de los mismos están abarcados dentro del alcance de la presente invención. Preferiblemente, cuando el compuesto está presente como enantiómero, el enantiómero está presente en un exceso enantiomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 80%, más preferiblemente, en un exceso enantiomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 90%, todavía más preferiblemente, en un exceso enantiomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 95%, todavía más preferiblemente, en un exceso enantiomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 98%, lo más preferiblemente, en un exceso enantiomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 99%. De manera similar, cuando el compuesto está presente como diastereómero, el diastereómero está presente en un exceso diastereomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 80%, más preferiblemente, en un exceso diastereomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 90%, todavía más preferiblemente, en un exceso diastereomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 95%, todavía más preferiblemente, en un exceso diastereomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 98%, lo más preferiblemente, en un exceso diastereomérico de mayor de o igual a aproximadamente el 99%.

Además, algunas de las formas cristalinas para los compuestos de la presente invención pueden existir como polimorfos y como tal se pretende que se incluyan en la presente invención. Además, algunos de los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos con agua (es decir, hidratos) o disolventes orgánicos comunes, y también se pretende que tales solvatos estén abarcados dentro del alcance de esta invención.

Para su uso en medicina, las sales de los compuestos de esta invención se refieren a “sales farmacéuticamente aceptables” no tóxicas. Sin embargo, pueden ser útiles otras sales en la preparación de compuestos según esta invención o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos incluyen sales de adición de ácido que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una disolución del compuesto con una disolución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Además, cuando los compuestos de la invención portan un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los mismos pueden incluir sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo, sales de calcio o magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados, por ejemplo, sales de amonio cuaternario.

Los ácidos representativos que pueden usarse en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, aminoácidos acilados, ácido adípico, ácido alginico, ácido ascórbico, ácido L-aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido (+)-canfórico, ácido canforsulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido L-glutámico, ácido beta-oxo-glutámico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido (+)-L-láctico, ácido (±)-DL-láctico, ácido lactobiónico, ácido maleico, ácido (-)-L-málico, ácido malónico, ácido (±)-DL-mandélico, meglumina, ácido metanosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico, ácido L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido 4-amino-salicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tánico, ácido (+)-L-tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluorometilsulfónico y ácido undecilénico.

Algunos de los compuestos según la fórmula (I) también pueden existir en su forma tautomérica. Se pretende que tales formas, aunque no se indican explícitamente en la fórmula anterior, se incluyan dentro del alcance de la presente invención.

5

Composiciones farmacéuticas

La presente invención también proporciona composiciones para prevenir o tratar enfermedades en las que es beneficiosa la inhibición de la hipertensión arterial pulmonar o la fibrosis pulmonar.

10

Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la fórmula (I) y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15

Aunque es posible que el principio activo se administre solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la presente invención, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. El portador o diluyente debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la composición y no perjudicial para los receptores de la misma.

20

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto particular, en forma de base o en forma de sal de adición, como principio activo se combina en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, que puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas están de manera deseable en una forma farmacéutica unitaria adecuada, preferiblemente, para la administración sistémica tal como administración oral, percutánea o parenteral; o administración tópica tal como inhalación o insuflación. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma farmacéutica oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y disoluciones; o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad en la administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma farmacéutica unitaria oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Para las composiciones parenterales, el portador comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros componentes, por ejemplo, para ayudar a la solubilidad. Pueden prepararse, por ejemplo, disoluciones inyectables en las que el portador comprende solución salina, disolución de glucosa o una mezcla de solución salina y disolución de glucosa. También pueden prepararse suspensiones inyectables en cuyo caso pueden emplearse portadores líquidos, agentes de suspensión y similares, apropiados. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente de potenciación de la penetración y/o un agente humectable adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones minoritarias, aditivos que no producen ningún efecto perjudicial significativo en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse de varias formas, por ejemplo, como un parche transdérmico, como una pipeta para aplicación en la piel o como una pomada.

35

40

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. La forma farmacéutica unitaria tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéuticamente requerido. Ejemplos de tales formas farmacéuticas unitarias son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, supositorios, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, polvos para inhalación, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples divisiones de los mismos.

50

55

La dosificación y frecuencia de administración exactas dependen del compuesto particular de fórmula (I) usado, del estado particular que está tratándose, de la gravedad del estado que está tratándose, de la edad, del peso, del sexo del grado del trastorno y del estado físico general del paciente particular, así como otra medicación que pueda estar tomando el individuo, tal como conocen bien los expertos en la técnica. Además, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede disminuirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que receta los compuestos de la presente invención.

60

Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica comprenderá desde el 0,05 hasta el 99% en peso, preferiblemente desde el 0,1 hasta el 70% en peso, más preferiblemente desde el 0,1 hasta el 50% en peso del principio activo, y, desde el 1 hasta el 99,95% en peso, preferiblemente desde el 30 hasta el 99,9% en peso, más preferiblemente desde el 50 hasta el 99,9% en peso de un portador farmacéuticamente aceptable, basándose todos los porcentajes en el peso total de la composición.

65

Los presentes compuestos pueden usarse para administración sistémica tal como administración oral, percutánea o parenteral; o administración tópica tal como a través de inhalación, un aerosol nasal, colirios o a través de una crema, gel, champú o similar. Los compuestos se administran preferiblemente por vía oral. La dosificación y frecuencia de administración exactas dependen del compuesto particular según la fórmula (I) usado, del estado particular que está tratándose, de la gravedad del estado que está tratándose, de la edad, del peso, del sexo, del grado del trastorno y del estado físico general del paciente particular, así como otra medicación que pueda estar tomando el individuo, tal como conocen bien los expertos en la técnica. Además, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede disminuirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que receta los compuestos de la presente invención.

La cantidad de un compuesto de fórmula (I) que puede combinarse con un material portador para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo de la enfermedad tratada, de la especie de mamífero y del modo de administración particular. Sin embargo, como guía general, las dosis unitarias adecuadas para los compuestos de la presente invención pueden contener preferiblemente, por ejemplo, entre 0,1 mg y aproximadamente 1000 mg del compuesto activo. Una dosis unitaria preferida es de entre 1 mg y aproximadamente 500 mg. Una dosis unitaria más preferida es de entre 1 mg y aproximadamente 300 mg. Una dosis unitaria incluso más preferida es de entre 1 mg y aproximadamente 100 mg. Tales dosis unitarias pueden administrarse más de una vez al día, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6 veces al día, pero preferiblemente 1 ó 2 veces al día, de modo que la dosificación total para un adulto de 70 kg está en el intervalo de 0,001 a aproximadamente 15 mg por kg de peso de sujeto por administración. Una dosificación preferida es de 0,01 a aproximadamente 1,5 mg por kg de peso de sujeto por administración, y una terapia de este tipo puede prolongarse durante varias semanas o meses, y en algunos casos, años. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del individuo que está tratándose; el momento y la vía de administración; la tasa de excreción; otros fármacos que se hayan administrado anteriormente; y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia, tal como entenderán los expertos en el área.

Una dosificación típica puede ser un comprimido de 1 mg a aproximadamente 100 mg o de 1 mg a aproximadamente 300 mg tomado una vez al día, o, múltiples veces al día, o una cápsula o comprimido de liberación prolongada tomado una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente superior de principio activo. El efecto de liberación prolongada puede obtenerse mediante materiales de cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, mediante cápsulas que se liberan lentamente por la presión osmótica, o mediante cualquier otro medio conocido de liberación controlada.

Puede ser necesario usar dosificaciones fuera de estos intervalos en algunos casos tal como resultará evidente para los expertos en la técnica. Además, se observa que el facultativo o médico que trata sabrá cómo y cuándo comenzar, interrumpir, ajustar o terminar la terapia conjuntamente con la respuesta del paciente individual.

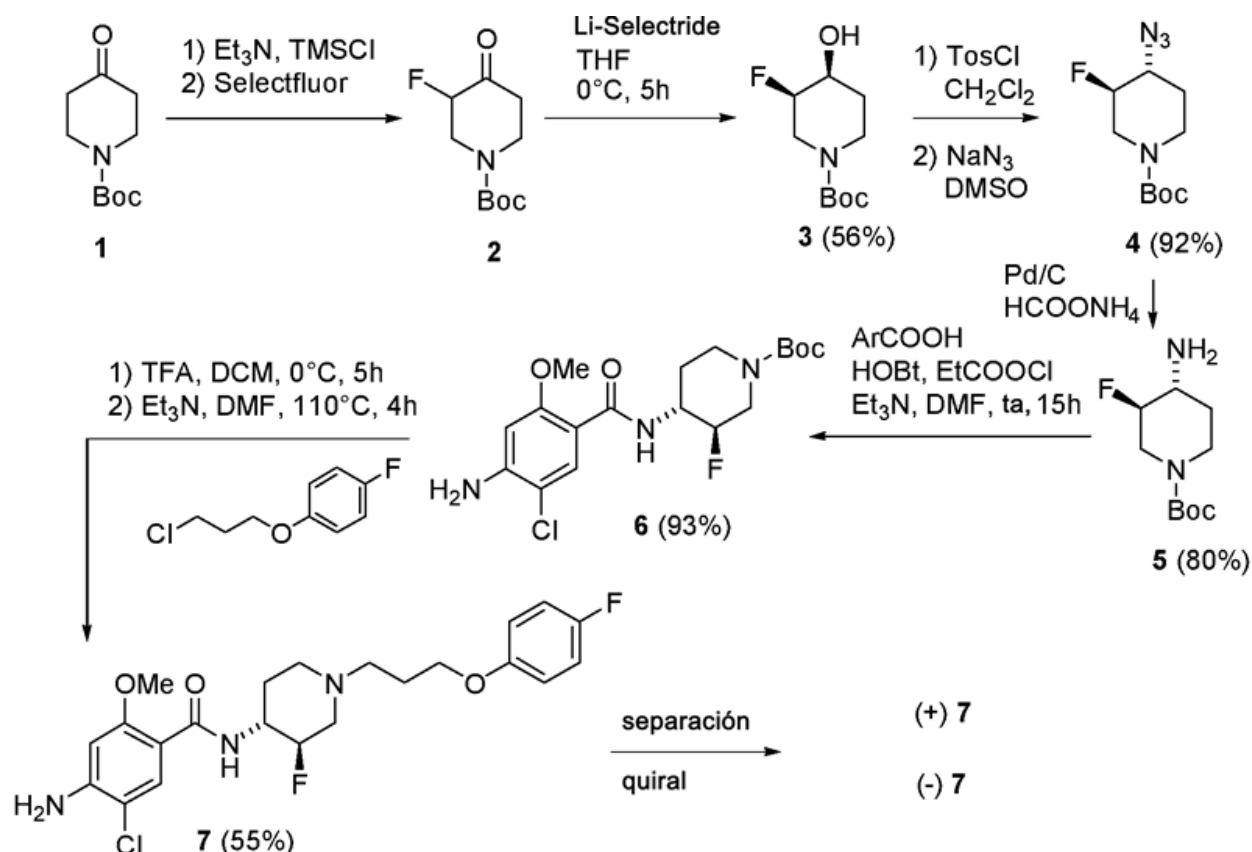
Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero no limiten el alcance de la presente invención.

Parte experimental

EJEMPLOS DE SÍNTESIS

A continuación en el presente documento, el término "p.f." significa punto de fusión, "THF" significa tetrahidrofurano, "DMF" significa dimetilformamida, "DCM" significa diclorometano, "EtOAc" significa acetato de etilo, "AcOH" significa ácido acético, "MeOH" significa metanol, "rac" significa racémico, "Et₂O" significa dietil éter, "DMAP" significa dimetilaminopiridina, "DMSO" significa dimetilsulfóxido, "hex" significa hexanos y "TFA" significa ácido trifluoroacético, DEA significa dietilamina.

Ejemplo 1: Síntesis de *trans*-4-amino-5-cloro-N-[3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)-propil]-piperidin-4-il]-2-metoxibenzamida 7.



Síntesis de *cis*-1-Boc-3-fluoro-4-hidroxipiperidina 3

- 5 A una disolución de 0,5 g (2,30 mmol) de *N*-Boc-3-fluoro-4-piperidinona 2 (J. Med. Chem. 1999, 42, 2087-2104) en 10 ml de THF seco se le añadieron gota a gota 2,8 ml (2,76 mmol) de una disolución 1 M de Li-Selectride en THF bajo atmósfera de N_2 a 0°C . Se agitó la disolución a 0°C durante 4 h, entonces se añadieron 10 ml de NaOH 2 M a 0°C y se agitó la mezcla durante la noche a ta. Se extrajo la mezcla de reacción con Et_2O , se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a presión reducida. Se sometió la mezcla en bruto a cromatografía ultrarrápida en gel de sílice
- 10 (hex/EtOAc/ Et_3N 1:1:0,1) para producir 0,27 g (el 56%) de *cis*-1-Boc-3-fluoro-4-hidroxipiperidina 3 pura como un aceite incoloro que solidificó dejándolo estar a -20°C (congelador). Pf 48°C . ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,46 (9H, s, 3x CH_3), 1,67-1,91 (2H, m, CH_2), 2,40-2,65 (1H, m, OH), 2,92-3,35 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_a\text{H}_b\text{N}$ y $\text{CH}_a\text{H}_b\text{CHF}$), 3,55-3,94 (3H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_a\text{H}_b\text{N}$ y CHOH y $\text{CH}_a\text{H}_b\text{CHF}$), 4,52 (1H, dm, $J = 48,4$ Hz, CHF). ^{19}F -RMN (282 MHz, CDCl_3): δ -201,9 y -203,1 (1F, 2 x m). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 28,4 (3x), 29,2, 40,4, 44,8, 68,0 (d, $J = 17,3$ Hz), 80,2, 88,6 (d, $J = 177,7$ Hz), 155,1. IR (KBr): ν 3413, 1674, 1429, 1167 cm^{-1} . CG-EM (IE): m/z (%): 219 (M^+ , 4), 164 (46), 146 (50), 57 (C_4H_9^+ , 100).

Síntesis de *trans*-4-azido-1-Boc-3-fluoropiperidina 4

- 20 A una disolución de 0,60 g (2,74 mmol) de *cis*-1-Boc-3-fluoro-4-hidroxipiperidina 3 en 15 ml de DCM se le añadieron 0,42 g (4,11 mmol) de trietilamina y 37 mg (0,3 mmol) de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) a ta. Entonces se añadió una disolución de 0,57 g (3,01 mmol) de cloruro de *p*-toluenosulfonilo en 2 ml de DCM bajo una atmósfera seca (tubo de CaCl_2) a ta. Tras agitar durante 15 h a ta, se vertió la disolución en salmuera (20 ml) y se extrajo con DCM (3 x 25 ml). Tras secar sobre MgSO_4 , filtración y evaporación del disolvente, se usó la mezcla en bruto como tal en la siguiente etapa sin purificación adicional. Se disolvió el tosilato obtenido en 5 ml de DMSO seco y se añadieron 0,36 g (5,48 mmol) de NaN_3 . Se agitó la mezcla bajo atmósfera de N_2 a 90°C durante 15 h. Tras enfriar, se vertió la mezcla en salmuera (10 ml) y se extrajo con EtOAc. Se lavó el extracto combinado con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a vacío. Se obtuvo *trans*-4-azido-1-Boc-3-fluoropiperidina 4 como un aceite incoloro con un rendimiento del 92% a partir de 4-hidroxipiperidina 3 y fue suficientemente puro para su uso
- 25 adicional. ^1H -RMN (CDCl_3): δ 1,43 (9H, s); 1,44-1,64 (1H, m); 1,97 (1H, ddd, $J = 4,3$ Hz, 8,4 Hz, 18,0 Hz); 2,99 (1H, ddd, $J = 3,3$ Hz, 10,5 Hz, 13,8 Hz); 3,00-3,15 (2H, m); 3,57-3,68 (1H, m); 3,79 (1H, dt, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,4$ Hz); 4,00-4,19 (1H, m); 4,33 (tdd, $J = 47,9$ Hz, $J = 8,3$ Hz, $J = 4,4$ Hz). ^{19}F -RMN (CDCl_3): δ -188,1 (1F, d(a), $J = 47,4$ Hz). ^{13}C -RMN (CDCl_3): δ 28,3 (4x), 41,2 (a), 45,5 (a), 61,4 (d, $J = 20,7$ Hz), 80,6, 88,9 (d, $J = 182,3$ Hz), 154,4. IR (ATR, cm^{-1}): $\nu = 2099, 1693, 1417, 1236, 1161, 1141$. EM (ES+) m/z (%): 227 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100).

Síntesis de *trans*-4-amino-1-Boc-3-fluoropiperidina 5

A una disolución de 0,59 g (2,42 mmol) de *trans*-4-azido-1-Boc-3-fluoropiperidina 4 en 10 ml de MeOH se le añadieron 0,61 g (9,67 mmol) de formiato de amonio y 0,25 g (0,24 mmol de Pd) de Pd al 10% sobre carbono. Se agitó la mezcla de reacción bajo atmósfera de N₂ a 50°C durante 5 h. Tras enfriar, se filtró la mezcla sobre tierra de diatomeas y se evaporó a presión reducida. Entonces se sometió la mezcla en bruto a cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (Et₃N al 5% en EtOAc, columna de recorrido corto) para dar 0,42 g (el 80%) de *trans*-4-amino-1-Boc-3-fluoropiperidina 5 como un aceite. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,39 (9H, s); 1,60 (2H, s(a)); 1,76-1,86 (1H, m); 2,65-2,76 (2H, m); 2,78-2,90 (2H, m); 3,89-3,97 (1H, m); 4,01 (1H, dm, J = 48,5 Hz); 4,15-4,30 (1H, m). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ de -191,0 a -190,3 (1F, m). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 28,4 (3x), 31,8, 41,9 (a), 46,2 (a), 53,5 (d, J = 18,5 Hz), 80,3, 93,0 (d, J = 177,7 Hz), 154,6. IR (ATR, cm⁻¹): ν = 1685, 1415, 1244, 1152, 1028. EM (ES+) *m/z* (%): 204 (M-CH₃+H⁺), 163 (M-3CH₃+2H⁺, 100).

Síntesis de (4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoilamino)-3-fluoropiperidina-1-carboxilato de *trans*-terc-butilo 6

A una disolución de 0,41 g (2,02 mmol) de ácido 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoico en 10 ml de DMF seco se le añadieron 0,29 g (2,89 mmol) de trietilamina a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. Tras agitar durante 10 min a ta, se añadió gota a gota una disolución de 0,22 g (2,02 mmol) de cloroformiato de etilo en 2 ml de DMF a ta y se continuó con la agitación durante 30 min, mientras se mantenía la temperatura a ta (enfriamiento con baño de agua a ta). Entonces se añadieron 0,27 g (2,02 mmol) de hidroxibenzotriazol como un sólido en una porción a ta y se agitó la disolución durante 30 min. Posteriormente, se añadió gota a gota una disolución de 0,42 g (1,93 mmol) de amina 5 en 3 ml de DMF a ta y se agitó la mezcla de reacción durante la noche a ta. Después, se vertió la mezcla en 20 ml de salmuera y se extrajo con EtOAc (3 x 25 ml). Se lavó la fracción orgánica combinada con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se sometió la mezcla en bruto a cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (hex/EtOAc/Et₃N 1:1:0,1) para producir 0,72 g (el 93%) de 4-(4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoilamino)-3-fluoropiperidina-1-carboxilato de *trans*-terc-butilo 6 puro como un sólido. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,47 (9H, s); 2,17-2,28 (1H, m); 2,96-3,19 (2H, m); 3,74 (1H, dm, J = 13,7 Hz); 3,90 (3H, s); 3,92-4,40 (3H, m); 4,45 (1H, ddt, J = 4,4 Hz, 8,3 Hz, J = 48,4 Hz); 6,30 (1H, s); 7,82 (1H, d, J = 7,2 Hz); 8,08 (1H, s). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ -189,0 (d, J = 44,7 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 28,4 (3x), 29,1 (a), 41,5 (a), 45,6 (a), 50,1 (a), 56,4, 80,4, 88,2 (d, J = 182,3 Hz), 97,9, 111,8, 112,1, 133,2, 147,1, 154,7, 157,6; 164,5. IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3478, 3378, 1683, 1619, 1593, 1420, 1247, 1146. EM (ES+) *m/z* (%): 346/48 (M+H⁺, 100); 402/404 (M+H⁺, 60).

Síntesis de *trans*-4-amino-5-cloro-N-{3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]-piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 7.

A una disolución de 0,14 g (0,34 mmol) de 4-(4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoilamino)-3-fluoropiperidina-1-carboxilato de *trans*-terc-butilo 6 en 5 ml de DCM se le añadieron 0,39 g (3,4 mmol) de ácido trifluoroacético a 0°C bajo atmósfera seca (tubo de CaCl₂). Tras agitar durante 5 h a 0°C, se evaporó la mezcla a presión reducida. Se recogió el residuo oleoso en 10 ml de dietil éter seco, se enfrió hasta 0°C y se aisló la sal de TFA cristalina formada (filtrar o decantar Et₂O). Tras secado y evaporación adicional, se disolvió la sal de TFA cristalina blanca de 4-amino-5-cloro-N-(3-fluoropiperidin-4-il)-2-metoxibenzamida en 5 ml de DMF seco. A la disolución se le añadieron 0,17 g (1,70 mmol) de trietilamina, 55 mg (0,34 mmol) de yoduro de sodio y luego 65 mg (0,34 mmol) de 1-cloruro de 3-(4-fluorofenoxi)propilo a ta bajo atmósfera seca. Se calentó la mezcla hasta de 110° a 120°C durante 4 h. Tras enfriar, se diluyó la mezcla con 25 ml de EtOAc, se vertió en salmuera (25 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 25 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se sometió la mezcla en bruto a cromatografía ultrarrápida en gradiente en gel de sílice (EtOAc/hex/Et₃N 3:2:0,1 al 1% de Et₃N en EtOAc) para dar 85 mg (el 55%) de *trans*-4-amino-5-cloro-N-{3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 7 como un sólido amarillo pálido. Pf 125°C. Recristalización opcional en EtOAc/EtOH. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,46-1,59 (1H, m); 1,94 (2H, quint, J = 6,6 Hz); 2,18-2,34 (3H, m); 2,58 (2H, t, J = 6,6 Hz); 2,76 (1H, dm, J = 11,6 Hz); 3,13 (1H, td(a), J = 4,4 Hz, 9,9 Hz); 3,87 (3H, s); 3,96 (2H, t, J = 6,6 Hz); 4,09-4,23 (1H, m); 4,47 (1H, ddt, J = 4,4 Hz, J = 9,4 Hz, J = 49,5 Hz); 4,48 (2H, s(a)); 6,02 (1H, s); 6,79-6,86 (2H, m); 6,92-7,00 (2H, m); 7,79 (1H, d, J = 7,7 Hz), 8,09 (1H, s). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ -187,6 (d, J = 51,3 Hz); -124,0 (tt, J = 3,9 Hz, J = 9,2 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 27,0, 29,9 (d, J = 6,9 Hz), 51,0 (d, J = 18,5 Hz), 51,5, 54,6, 56,2, 56,3 (d, J = 24,2 Hz), 66,7, 89,0, 90,2 (d, J = 178,8 Hz), 97,9, 111,7, 112,3, 2 x 115,5 (d, J = 8,0 Hz), 2 x 115,8 (d, J = 23,0 Hz), 133,2, 147,0, 155,2, 157,3 (d, J = 238,9 Hz), 157,6, 164,6. IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3453, 3370, 3317, 3194, 1631, 1584, 1537, 1508, 1250, 1200. EM (ES+) *m/z* (%): 454/456 (M+H⁺, 100).

Separación quiral de *trans*-4-amino-5-cloro-N-{3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)-propil]-piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 7.

Se resolvió el compuesto 7 en sus enantiómeros mediante cromatografía de fluidos supercríticos.

Cantidad: 80 mg (Carga: 10 mg/3,00 ml)
Condiciones:

Columna: DO 20 x 250 mm (I)
Fase móvil: el 37% de MeOH (con el 0,2% de iPrNH₂) mantenido 9,00 min

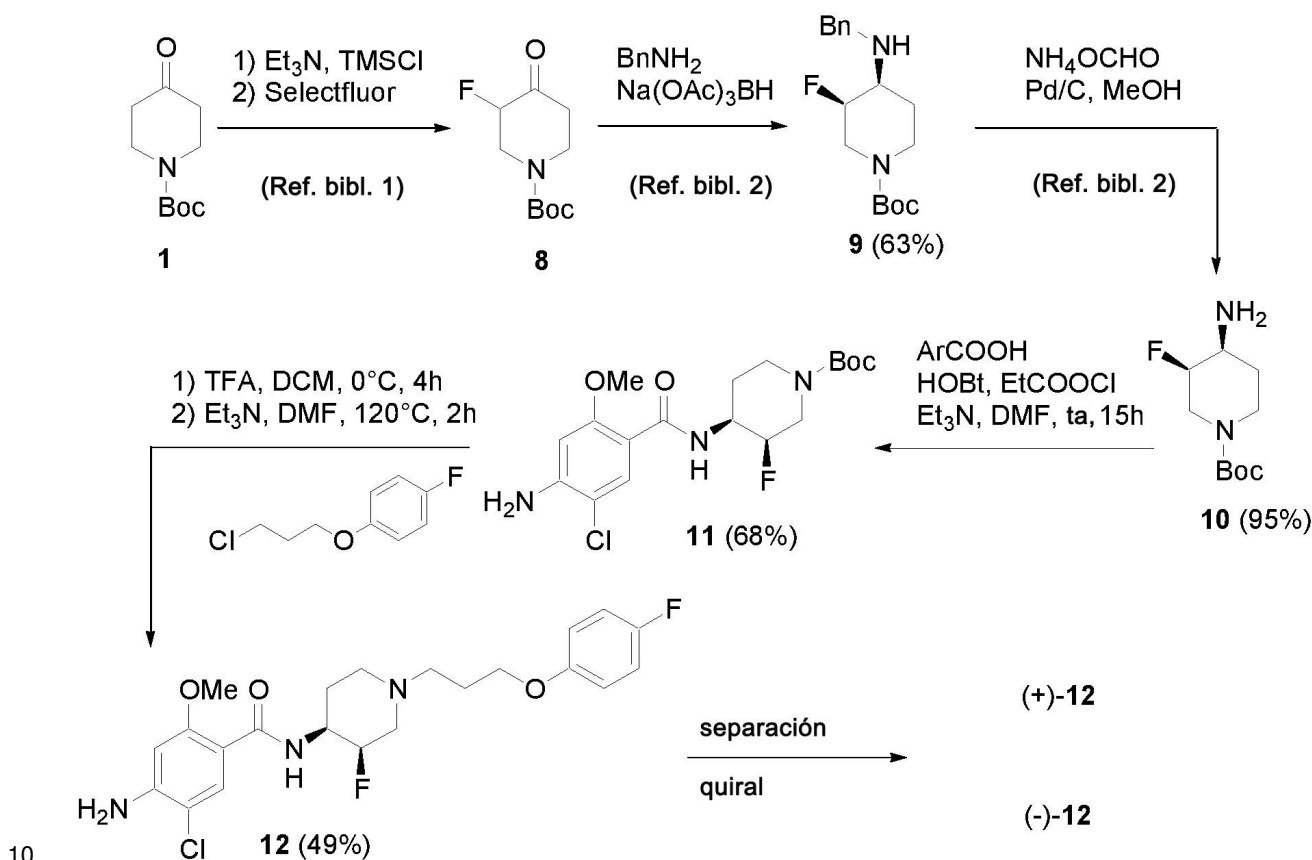
Parámetros: Flujo = 50 ml/min
 Temperatura de la columna = 40°C
 Presión de la boquilla = 10 MPa

Tipo de inyección: inyecciones superpuestas (8 x)
Método de recogida: Recogida usando detección de pico convencional.

El pico 1 eluyó a los 5 min 20' y produjo el enantiómero levógiro (-)-7 [α] = -22,8° (c = 0,3, MeOH, λ = 598 nm; 20°C).

5 El pico 2 eluyó a los 7 min 30' y produjo el enantiómero dextrógiro (+)-7 [α] = +19,2° (c = 0,4, MeOH, λ = 598 nm; 20°C).

Ejemplo 2: Síntesis de *cis*-4-amino-5-cloro-N-[3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)-propil]-piperidin-4-il]-2-metoxibenzamida 12.



Síntesis de *cis*-N-(1-Boc-3-fluoropiperidin-4-il)amina 10

Se preparó el compuesto tal como se da a conocer en las referencias bibliográficas:

- 1) J. Med. Chem. 1999, 42, 2087-2104, y
 2) Documento WO 2007071965.

Síntesis de 4-(4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoilamino)-3-fluoropiperidina-1-carboxilato de *cis*-terc-butilo 11

A una disolución de 0,97 g (4,82 mmol) de ácido 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoico en 25 ml de DMF seco se le añadieron 0,70 g (6,88 mmol) de trietilamina a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. Tras agitar durante 10 min a ta, se añadió gota a gota una disolución de 0,52 g (4,82 mmol) de cloroformiato de etilo en 1 ml de DMF a ta y se continuó con la agitación durante 30 min. Entonces se añadieron 0,65 g (4,82 mmol) de hidroxibenzotriazol como un sólido en una porción a ta y se agitó la disolución durante 30 min. Posteriormente, se añadió gota a gota una disolución de 1,0 g (4,59 mmol) de amina 10 en 3 ml de DMF a ta y se agitó la mezcla de reacción durante la noche a ta. Después, se vertió la mezcla en 100 ml de salmuera y se extrajo con EtOAc (4 x 30 ml). Se lavó la fracción orgánica combinada con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se sometió la mezcla en bruto a cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (hex/EtOAc/Et₃N 1:1:0,1; R_f = 0,01) para producir 1,25 g (el 68%) de 4-(4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoilamino)-3-fluoropiperidina-1-carboxilato de terc-butilo

11 puro como un sólido. Pf 198-199°C. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,35 (9H, s); 1,44-1,77 (2H, m); 2,77-2,98 (1H, m); 3,81 (3H, s); 4,04-4,32 (4H, m); 4,42 (2H, s(a)); 4,65 (1H, d, J = 48,9 Hz); 6,23 (1H, s); 7,95 (1H, s(a)); 8,01 (1H, s). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ de -203,5 a -204,5 (1F, m). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 26,6, 28,5 (3x), 42,3 (a), 46,5 (a), 48,6 (d, J = 17,3 Hz), 52,2, 80,1, 87,9 (d, J = 176,5 Hz), 97,9, 111,6, 112,0, 133,1, 147,1, 155,2, 157,7, 164,0. IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3470, 3393, 3310, 1697, 1637, 1612, 1534, 1420. EM (ES+) m/z (%): 402/404 (M+H⁺, 100).

Síntesis de *cis*-4-amino-5-cloro-*N*-{3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]-piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 12.

A una disolución de 1,00 g (2,49 mmol) de 4-(4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoilamino)-3-fluoropiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo 11 en 10 ml de DCM se le añadieron 2,83 g (24,9 mmol) de ácido trifluoroacético a 0°C bajo atmósfera seca (tubo de CaCl₂). Tras agitar durante 4 h a 0°C, se evaporó la mezcla a presión reducida. Se recogió el residuo oleoso en 25 ml de dietil éter seco, se enfrió hasta 0°C y se aisló la sal de TFA cristalina formada (filtrar o decantar Et₂O). Tras secado y evaporación adicional a vacío, se obtuvieron 0,78 g de la sal de TFA de 4-amino-5-cloro-*N*-{3-fluoropiperidin-4-il}-2-metoxibenzamida como un sólido blanco. A una disolución de 0,78 g de la sal obtenida en 10 ml de DMF se le añadieron 1,26 g (12,45 mmol) de trietilamina, 0,37 g (2,49 mmol) de yoduro de sodio y luego 0,47 g (2,49 mmol) de 1-cloruro de 3-(4-fluorofenoxi)propilo a ta bajo atmósfera seca. Se calentó la mezcla hasta 120°C durante 2 h. Tras enfriar, se diluyó la mezcla con 25 ml de EtOAc, se vertió en salmuera (25 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 25 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se sometió la mezcla en bruto a cromatografía ultrarrápida en gradiente en gel de sílice (EtOAc/hex/Et₃N 3:1:0,1 al 1% de Et₃N en EtOAc) para dar el 49% de 4-amino-5-cloro-*N*-{3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 12 como un sólido amarillo pálido. Pf 137°C. Recristalización opcional en EtOAc/EtOH. ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,83-1,92 (2H, m); 1,94 (2H, quint, J = 6,6 Hz); 2,10-2,35 (2H, m); 2,47-2,61 (2H, m); 2,94 (1H, d(a), J = 11,6 Hz); 3,24 (1H, t(a), J = 11,3 Hz); 3,85 (3H, s); 3,95 (2H, t, J = 6,6 Hz); 4,08-4,27 (1H, m); 4,41 (2H, s(a)); 4,73 (1H, d(a), J = 49,6 Hz); 6,26 (1H, s), 6,76-6,84 (2H, m); 6,89-6,97 (2H, m); 8,03 (1H, s(a)); 8,06 (1H, s). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ de -199,3 a -200,0 (1F, m); -124,1 (1F, tt, J = 7,9 Hz, J = 5,3 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 26,9, 27,4, 48,3 (d, J = 18,4 Hz), 52,0, 54,7, 56,1 (d, J = 18,3 Hz), 56,2, 66,8, 88,8 (d, J = 175,3 Hz), 97,9 Hz, 111,6, 112,2, 2 x 115,6 (d, J = 8,0 Hz), 2 x 115,8 (d, J = 23,1 Hz), 133,1, 147,0, 155,2, 157,2 (d, J = 237,7 Hz), 157,7, 164,0. IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3477, 3398, 3322, 1636, 1612, 1583, 1537, 1505, 1247, 1209. EM (ES+) m/z (%): 454/456 (M+H⁺, 100).

Separación quiral de *cis*-4-amino-5-cloro-*N*-{3-fluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]-piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 12.

Se resolvió el compuesto 12 en sus enantiómeros mediante cromatografía de fluidos supercríticos.

Cantidad: 152 mg (Carga: 8,5 mg/1,250 ml)

Condiciones:

Columna: DO 20 x 250 mm (I)
Fase móvil: el 19% de MeOH (con el 0,2% de iPrNH₂) mantenido 14,00 min
Parámetros: Flujo = 50 ml/min
 Temperatura de la columna = 40°C
 Presión de la boquilla = 10 MPa

Tipo de inyección: inyecciones superpuestas (18 x)
Método de recogida: Recogida usando detección de pico convencional.

El pico 1 eluyó a los 10 min 20' y produjo el enantiómero levógiro (-)-12 [α] = -45,5° (c = 0,2, MeOH, λ = 598 nm; 20°C).

El pico 2 eluyó a los 11 min 40' y produjo el enantiómero dextrógiro (+)-12 [α] = +39,8° (c = 0,2, MeOH, λ = 598 nm; 20°C).

Ejemplo 3: Síntesis de 4-amino-5-cloro-*N*-{3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)-propil]-piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 17

Síntesis de bencil-(3,3-difluoro-piperidin-4-il)amina 14

En un matraz de 100 ml, se disolvieron 2,00 g (8,0 mmol) de 3,3-difluoro-4,4-dihidroxi-1-trifluoroacetilpiperidina 13 (J. Org Chem. 2010, 75, 929-932) y 2,15 g (20,0 mmol; 2,5 equiv.) de bencilamina en 50 ml de tolueno. Se calentó la mezcla a reflujo con una trampa Dean Stark durante 15 horas. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a vacío. Se disolvió el aceite resultante en 25 ml de metanol absoluto y se añadieron lentamente 0,56 g (8,8 mmol; 1,1 equiv.) de cianoborohidruro de sodio y 0,48 g (8,0 mmol; 1 equiv.) de ácido acético a temperatura ambiente. Se agitó la disolución durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras eliminar el disolvente a vacío, se redisolvió el aceite en bruto en 50 ml de diclorometano y se vertió en 50 ml de una disolución saturada acuosa de NaHCO₃ y se extrajo posteriormente con diclorometano (3 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con

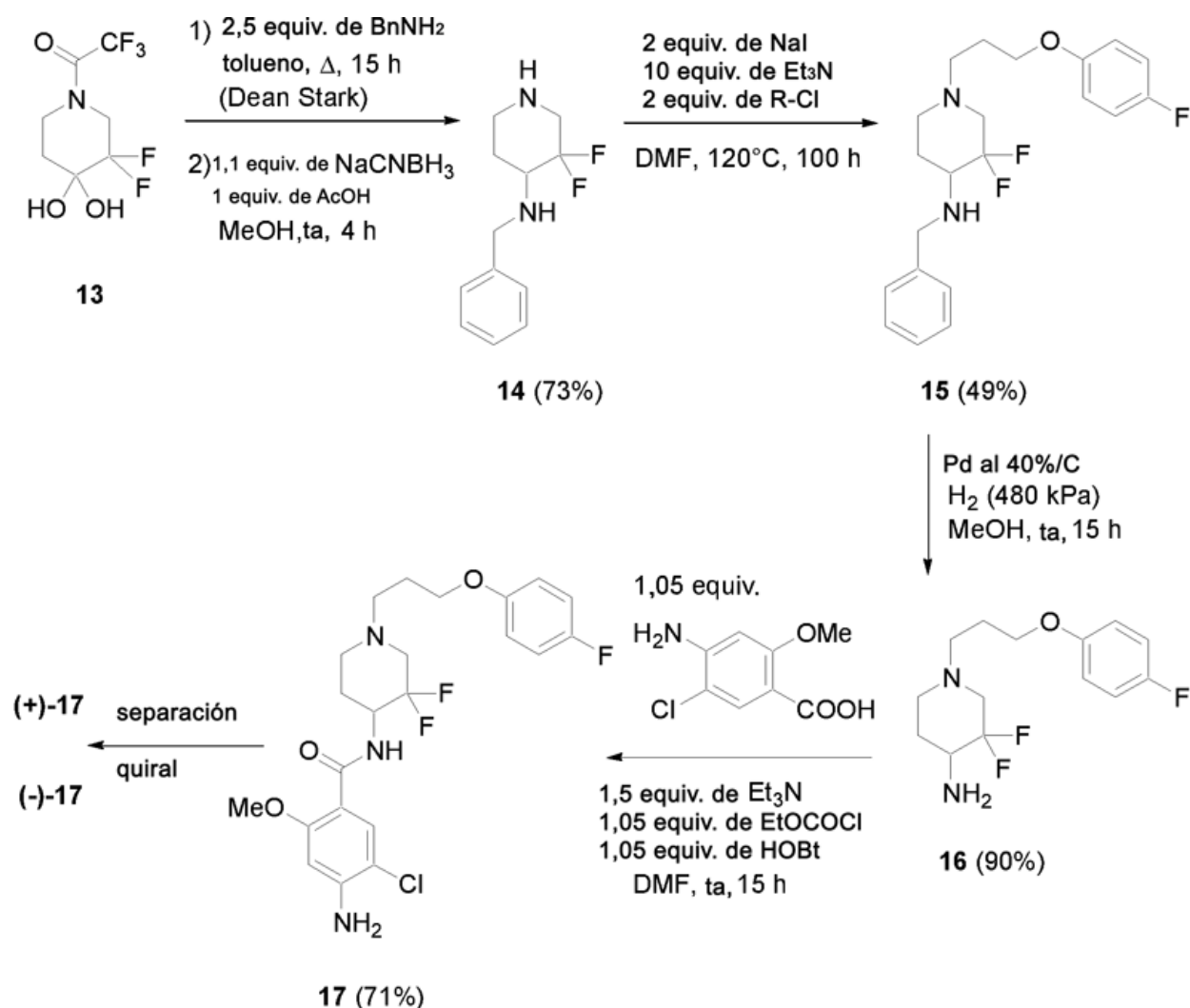
salmuera y se secaron sobre MgSO₄. La filtración de los sólidos y la evaporación del disolvente dieron como resultado un aceite en bruto que se purificó a través de cromatografía ultrarrápida (EtOAc, R_f = 0,03) produciendo 1,32 g (5,8 mmol; rendimiento del 73%) de bencil-(3,3-difluoro-piperidin-4-il)amina 14 como un aceite amarillo.

5 ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,51 (1H, q, J = 11,8 Hz, CH_aH_b); 1,69 (1H, s(ancho), NH); 1,94 (1H, d, J = 11,8 Hz, CH_aH_b); 2,58 (1H, t, J = 12,8 Hz, NCH_aH_b); 2,74 (1H, dd, J = 25,3 Hz, 14,3 Hz, NCH_aH_bCF₂); 2,86-2,97 (1H, m, NCH); 3,02 (1H, d, J = 12,8 Hz, NCH_aH_b); 3,22 (1H, dt, J = 14,3 Hz, 9,4 Hz, NCH_aH_bCF₂); 3,91 (1H, d, J = 14,9 Hz, CH_aH_bPh); 3,96 (1H, d, 14,9 Hz, CH_aH_bPh); 7,22-7,38 (5H, m, 5 × CH_{ar}). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ -109,0 (1F, d, J = 234,1 Hz); -120,4 (1F, d(ancho), J = 234,1 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 31,9 (CH₂); 43,3 (NCH₂); 50,5 (t, J = 27,1 Hz, NCH₂CF₂); 51,5 (NCH₂Ph); 57,1 (t, J = 20,8 Hz, NCH); 120,9 (t, J = 247,5 Hz, CF₂); 126,9 (CH_{ar}); 127,9 (2 × CH_{ar}); 128,3 (2 × CH_{ar}); 140,1 (C_{ar}). IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3324 (NH); 3028; 2930; 2859; 1495; 1453; 1317; 1274; 1181; 1130; 1106; 1072; 983; 912; 855; 740; 699. EM (ES+) *m/z* (%): 227 (M+H⁺, 100).

Síntesis de bencil-{3,3-difluoro-1-[3-(4-fluoro-fenoxi)propil]piperidin-4-il}amina 15

15 En un matraz de 100 ml, se agitó una mezcla de 1,22 g (5,4 mmol) de bencil-(3,3-difluoro-piperidin-4-il)amina 14, 0,81 g (5,4 mmol; 1 equiv.) de yoduro de sodio, 2,73 g (27,0 mmol; 5 equiv.) de trietilamina y 1,05 g (5,4 mmol; 1 equiv.) de 1-(3-cloropropoxi)-4-fluorobenceno en 70 ml a 120°C durante 30 horas. Se añadió otra porción de 2,73 g (27,0 mmol; 5 equiv.) de trietilamina y se agitó la mezcla a 120°C durante 16 horas. Entonces se añadieron 1,05 g (5,4 mmol; 1 equiv.) de 1-(3-cloropropoxi)-4-fluorobenceno y se agitó la mezcla a 120°C durante 54 horas hasta que se completó la reacción. Se eliminó el disolvente a vacío y se redisolvió el aceite en bruto en 100 ml de EtOAc y se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. La filtración de los sólidos y la evaporación del disolvente dieron como resultado un aceite en bruto que se purificó a través de cromatografía ultrarrápida (hexano/EtOAc 1:1, R_f = 0,19-0,38) produciendo 1,00 g (2,6 mmol; rendimiento del 49%) de bencil-{3,3-difluoro-1-[3-(4-fluoro-fenoxi)propil]piperidin-4-il}amina 15 como un aceite marrón.

30 ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,48-1,62 (1H, m, CH_aH_b); 1,58 (1H, s(ancho), NH); 1,80-1,92 (1H, m, CH_aH_b); 1,86 (2H, quintete, J = 6,9 Hz, CH₂); 2,09 (1H, t, J = 10,7 Hz, NCH_aH_b); 2,26 (1H, ddd, J = 23,8 Hz, 12,3 Hz, 3,4 Hz, NCH_aH_bCF₂); 2,41-2,57 (2H, m, NCH₂); 2,68-2,82 (2H, m, NCH y NCH_aH_b); 2,99 (1H, td, J = 11,3 Hz, 8,8 Hz, NCH_aH_bCF₂); 3,84 (1H, d, J = 14,0 Hz, CH_aH_bPh); 3,89 (2H, t, J = 6,9 Hz, OCH₂); 3,91 (1H, d, 14,0 Hz, CH_aH_bPh); 6,74 (2H, dd, J = 9,4 Hz, 4,4 Hz, 2 × CH_{ar}); 6,87 (2H, t, J = 9,4 Hz, 2 × CH_{ar}); 7,14-7,30 (5H, m, 5 × CH_{ar}). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ -104,9 (1F, d, J = 225,6 Hz, CF_aF_b); -116,9 (1F, d(ancho), J = 225,6 Hz, CF_aF_b); -124,0 (1F, tt, J = 7,9 Hz, 4,0 Hz, C_{ar}F). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 26,7 (CH_{2,alquilo}); 29,2 (d, J = 5,8 Hz, CH₂); 50,8 (NCH₂); 51,5 (NCH₂Ph); 53,9 (NCH_{2,alquilo}); 57,0 (t, J = 20,8 Hz, NCH); 57,2 (t, J = 27,7 Hz, NCH₂CF₂); 66,4 (OCH₂); 115,4 (d, J = 8,1 Hz, 2 × CH_{ar}); 115,7 (d, J = 23,1 Hz, 2 × CH_{ar}); 120,9 (t, J = 245,2 Hz, CF₂); 127,0 (CH_{ar}); 128,0 (2 × CH_{ar}); 128,5 (2 × CH_{ar}); 140,2 (C_{ar}); 155,0 (d, J = 2,3 Hz, OC_{ar}); 157,1 (d, J = 238,8 Hz, C_{ar}F). IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3334 (NH); 3062; 3028; 2953; 2823; 1682; 1602; 1505; 1470; 1454; 1388; 1346; 1292; 1247; 1205; 1152; 1118; 1097; 1064; 1028; 987; 912; 828; 736; 699. EM (ES+) *m/z* (%): 379 (M+H⁺, 100).



Síntesis de 3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-amina 16

- 5 En un recipiente a presión seco, se disolvieron 0,83 g (2,2 mmol) de bencil-{3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-il}amina 15 en 10 ml de metanol. Tras añadir 0,33 g (40% en peso) de Pd/C (el 10%) a 0°C, se agitó la mezcla durante 15 horas a temperatura ambiente bajo presión de hidrógeno de 480 kPa. Se filtró la mezcla sobre tierra de diatomeas. Se evaporó el disolvente a vacío para producir 0,57 g (2,0 mmol; rendimiento del 90%) de 3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-amina 16 como un aceite amarillo.

10 ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,54 (1H, dddd, J = 24,5 Hz, 11,3 Hz, 3,7 Hz, 1,7 Hz, CH_aH_b); 1,80-1,99 (1H, m, CH_aH_b); 1,86 (2H, quintete, J = 6,7 Hz, CH₂); 2,11 (1H, t, J = 11,6 Hz, NCH_aH_b); 2,21 (1H, ddd, J = 26,4 Hz, 12,1 Hz, 2,2 Hz, NCH_aH_bCF₂); 1,42 (2H, s(ancho), NH₂); 2,44-2,61 (2H, m, NCH₂); 2,76-2,92 (2H, m, NCH y NCH_aH_b); 3,00-3,13 (1H, m, NCH_aH_bCF₂); 3,90 (2H, t, J = 6,7 Hz, OCH₂); 6,75 (2H, dd, J = 9,4 Hz, 4,4 Hz, 2 × CH_{ar}); 6,88 (2H, t, J = 9,4 Hz, 2 × CH_{ar}). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ -109,6 (1F, d, J = 239,4 Hz, CF_aF_b); -120,5 (1F, d(ancho), J = 239,4 Hz, CF_aF_b); -124,0 (1F, tt, J = 7,9 Hz, 4,0 Hz, C_{ar}F). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 26,8 (CH_{2,alquilo}); 30,6 (d, J = 6,9 Hz, CH₂); 51,4 (NCH₂); 52,8 (t, J = 22,5 Hz, NCH); 53,9 (NCH_{2,alquilo}); 57,0 (dd, J = 29,4 Hz, 24,8 Hz, NCH₂CF₂); 66,4 (OCH₂); 115,4 (d, J = 6,9 Hz, 2 × CH_{ar}); 115,7 (d, J = 21,9 Hz, 2 × CH_{ar}); 119,6 (dd, J = 245,8 Hz, 241,1 Hz, CF₂); 155,0 (OC_{ar}); 157,2 (d, J = 237,7 Hz, C_{ar}F). IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3384; 2952; 2821; 1601; 1505; 1470; 1390; 1348; 1294; 1247; 1204; 1146; 1078; 915; 828; 757; 735. EM (ES+) m/z (%): 289 (M+H⁺, 100).

Síntesis de 4-amino-5-cloro-N-{3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 17

- 25 En un matraz seco de 50 ml, se disolvieron 0,44 g (2,2 mmol; 1,1 equiv.) de ácido 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoico y 0,30 g (3 mmol; 1,5 equiv.) de trietilamina en 25 ml de dimetilformamida y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se enfrió la mezcla hasta 0°C y se añadieron 0,24 g (2,2 mmol; 1,1 equiv.) de cloroformiato de etilo y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadieron 0,29 g (2,2 mmol; 1,1 equiv.) de 1-hidroxibenzotriazol y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadieron 0,57 g de 3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-amina 16 y se agitó la mezcla a temperatura

ambiente durante 15 horas. Tras la evaporación del disolvente a vacío, se redisolvió el aceite en bruto en EtOAc y se vertió en 50 ml de salmuera y se extrajo con EtOAc (4 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas con salmuera y se secaron sobre MgSO₄. Tras filtración de los sólidos y evaporación del disolvente a vacío, se purificó el aceite en bruto a través de cromatografía ultrarrápida (hexano/EtOAc 3:7, R_f = 0,35) produciendo 0,66 g (1,4 mmol; rendimiento del 71%) de 4-amino-5-cloro-N-{3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 17 pura como cristales blancos. P.f. = 125,8°C (hexano/EtOH 1:1).

¹H-RMN (CDCl₃): δ 1,70 (1H, ddd, J = 24,8 Hz, 12,7 Hz, 3,9 Hz, CH_aH_b); 1,93 (2H, quintete, J = 6,6 Hz, CH₂); 2,01-2,12 (1H, m, CH_aH_b); 2,21 (1H, t, J = 11,8 Hz, NCH_aH_b); 2,34 (1H, ddd, J = 28,8 Hz, 11,3 Hz, 1,7 Hz, NCH_aH_bCF₂); 2,50-2,69 (2H, m, NCH₂); 2,92 (1H, d, J = 11,8 Hz, NCH_aH_b); 3,19 (1H, td, J = 11,3 Hz, 4,4 Hz, NCH_aH_bCF_x); 3,86 (3H, s, OCH₃); 3,96 (2H, t, J = 6,6 Hz, OCH₂); 4,43 (3H, s(ancho), NCH y NH₂); 6,26 (1H, s, CH_{ar}); 6,81 (2H, dd, J = 8,8 Hz, 4,4 Hz, 2 × CH_{ar}); 6,94 (2H, t, J = 8,8 Hz, 2 × CH_{ar}); 8,03 (1H, s(ancho), NH); 8,06 (1H, s, CH_{ar}). ¹⁹F-RMN (CDCl₃): δ -107,6 (1F, d, J = 240,7 Hz, CF_aF_b); -116,9 (1F, d(ancho), J = 240,7 Hz, CF_aF_b); -124,0 (1F, tt, J = 7,9 Hz, 4,0 Hz, C_{ar}F). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 26,8 (CH_{2,alquilo}); 29,6 (d, J = 5,8 Hz, CH₂); 50,2 (t, J = 19,6 Hz, NCH); 51,5 (NCH₂); 53,9 (NCH_{2,alquilo}); 56,2 (OCH₃); 58,0 (dd, J = 29,4 Hz, 23,7 Hz, NCH₂CF₂); 66,3 (OCH₂); 97,8 (CH_{ar}); 111,6 (C_{ar}CO); 111,9 (C_{ar}Cl); 115,4 (d, J = 8,1 Hz, 2 × CH_{ar}); 115,7 (d, J = 23,1 Hz, 2 × CH_{ar}); 118,9 (t, J = 245,8 Hz, CF₂); 133,1 (CH_{ar}); 147,1 (C_{ar}NH₂); 155,0 (d, J = 2,3 Hz, OC_{ar}); 157,2 (d, J = 237,7 Hz, C_{ar}F); 157,6 (C_{ar}OMe); 164,4 (C = O). IR (ATR, cm⁻¹): ν = 3480; 3398; 3329; 3194; 2964; 2886; 2818; 1641; 1614; 1584; 1538; 1506; 1462; 1318; 1247; 1208; 1146; 1124; 1074; 1037; 982; 910; 822; 753; 681. EM (ES+) m/z (%): 472/474 (M+H⁺, 100).

Separación quiral de 4-amino-5-cloro-N-{3,3-difluoro-1-[3-(4-fluorofenoxi)propil]-piperidin-4-il}-2-metoxibenzamida 17

Se resolvieron 170 mg de 17 en sus enantiómeros mediante cromatografía de fluidos supercríticos en un dispositivo Berger Multigram[™] SFC (Mettler, Toledo Co., Ltd) con una columna IC 250 mm*50 mm, 5 mm.

Fase móvil: CO₂ supercrítico. MeOH con el 0,05% de DEA = 75:25 a 160 ml/min. Temperatura de la columna: 38°C

Presión de la boquilla: 30 MPa

Temperatura de la boquilla: 60°C

Temperatura del evaporador: 20°C

Temperatura del separador: 25°C

Longitud de onda: 220 nm.

El pico 1 eluyó a los 7,4 min y produjo el enantiómero dextrógiro (+)-17 % de e.e. = el 100%; [α] = +14,1° (c = 0,3, MeOH, λ = 598 nm; 20°C).

El pico 2 eluyó a los 8,5 min y produjo el enantiómero levógiro (-)-17 % de e.e. = el 98,6%; [α] = -14,4° (c = 0,3, MeOH, λ = 598 nm; 20°C).

EJEMPLOS FARMACOLÓGICOS

Ejemplo 4: Unión al receptor

Se usaron ensayos de unión de radioligando competitiva para determinar la afinidad de los compuestos de prueba por un receptor particular. Se añadieron diversas concentraciones del compuesto de prueba no marcado a la mezcla de incubación con la fracción de membrana, que contenía el receptor de interés, y una concentración baja fija (nM) del radioligando. Durante la incubación, el radioligando se unió al receptor, pero esto se inhibió por el compuesto de prueba no marcado en proporción a su afinidad de unión y concentración.

Se establecieron líneas celulares que expresan de manera estable la variante humana del receptor en investigación tras la transfección con el ADNc apropiado (tabla 1). Se hicieron crecer células transfectadas en condiciones de cultivo convencionales, y se obtuvieron fracciones de membrana con centrifugación y homogeneización de las células. Se determinaron las diluciones de membrana óptimas para los estudios de unión y se almacenaron alícuotas a -70°C hasta su uso. En un formato de placa de 96 pocillos, se añadió el radioligando apropiado a la preparación de membrana que contenía el receptor en investigación. Se prepararon disoluciones del compuesto en DMSO y se diluyeron 100 veces en la placa de múltiples pocillos hasta una concentración de prueba final de 10⁻⁹ a 10⁻⁵ M. Tras la incubación con el compuesto de prueba, se eliminó el radioligando no unido mediante filtración en filtros G/F con un sistema Filtermate 96. Se añadió Microscint[™] a las placas de filtro lavadas y se midió la radiactividad unida al receptor mediante recuento por centelleo líquido en un dispositivo TopCount (Packard). Para medir la unión no específica (NSB), se añadió una alta concentración del ligando no radiomarcado a los pocillos que contenían la fracción de membrana y el radioligando.

Tabla 1: Resumen de las condiciones de ensayo para la inhibición de la unión del radioligando a los receptores evaluados.

Receptor	Línea celular	Radioligando	Conc. (nM)	Kd (nM)
4HT _{1A}	HEK293	3H-8-OH-DPAT	0,5	0,557
5HT _{2A}	NIH3T3	3H-ketanserina	2	0,628
5HT _{2B}	CHO	3H-5-HT	4	2,312
5HT _{2C}	CHO	3H-mesulergina	1	1,909
5HT _{3A/B}	HEK293	3H-GR65630	0,5	0,247
5HT _{4B}	HEK293	3H-GR113808	0,1	0,059
Alfa _{1A}	CHO	3H-prazosina	0,25	0,226
Alfa _{2A}	CHO	3H-rauwolscina	1	0,485
Alfa _{2B}	CHO	3H-rauwolscina	1	0,853
Alfa _{2C}	CHO	3H-rauwolscina	1	0,100
D2L	CHO	3H-espiperona	0,2	0,239
hERG	HEK293	3H-dofetilida	5	3,66

5 Se calculó el % de inhibición de la unión del radioligando al receptor inducida por el compuesto de prueba mediante la fórmula % de efecto = 100 - [(muestra - NSB)/(HC - NSB) * 100], donde muestra = recuento radiactivo en un pocillo tratado con fármaco, HC = recuento radiactivo en pocillos control incubados sólo con radioligando. Usando un software desarrollado internamente, se ajustó una curva de ajuste óptimo mediante un método de mínima suma de cuadrados a la gráfica de % de inhibición frente a concentración del compuesto de prueba. A partir de esto, se determinó el valor de pCl₅₀ (concentración inhibitoria que produce un desplazamiento del 50% de la unión específica), así como una estimación de la pendiente de la gráfica (coeficiente de Hill).

Tabla 2: Valores de pCl₅₀

N.º de Co. objetivo	Ref.	(±)-17	(+)-17	(-)-17	(±)-7	(+)-7	(-)-7	(±)-12	(+)-12	(-)-12	tendencia
5HT _{1A}	5,71	5,1	5,25	<5	5,74	6,17	5,96	5,38	6,13	5,73	=
5HT _{2A}	7,84	5,71	5,59	5,76	6,95	7,15	6,12	6,44	6,49	6,31	↓
SHT _{ZB}	6,62	7,86	7,29	8,14	6,97	6,89	6,6	7,18	6,83	7,14	↑
5HT _{2C}	5,73	5,33	<5	5,18	5,74	5,91	5,43	5,36	5,3	5,18	=
5HT _{3A/B}	5,94	<5	<5	<5	<5	<5	<5	5,17	<5	5,56	↘
5HT _{4B}	6,65	<5	<5	<5	6,21	6,06	6,36	6,94	6,9	6,27	↘
Alfa _{1A}	6,39	<5	<5	5,11	<5	6,28	6,4	6,35	6,26	6,48	↘
Alfa _{2A}	6,05	<5	<5	<5	5,44	<5	5,11	5,32	5	5,09	↘
Alfa _{2B}	6,19	<5	<5	<5	5,6	5,58	5,22	5,6	5,47	5,28	↘
Alfa _{2C}	6	<5	<5	<5	6,02	<5	5,93	5,68	5,71	5,23	↘

D2L	6,27	4,98	<5	<5	5,34	5,56	5,10	5,33	5,32	5,32	↘
hERG	7,42	5,12	<5	<5	6,63	6,54	6,5	6,5	6,75	6,72	↓
El compuesto de referencia (Ref.) es cisaprida.											

Ejemplo 5: Antagonismo de 5-HT_{2B}

5 Se transfectaron de manera estable células CHO-K1 (ECACC) con ADNc de receptor 5-HT_{2B} humano subclonado en pCDNA3.1 usando el método del fosfato de calcio. Se seleccionaron líneas celulares transfectadas de manera estable usando G-418 y se desarrollaron líneas celulares clonales mediante dilución limitada. Se cultivaron las líneas celulares en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) dializado inactivado por calor al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina al 1% y aminoácidos no esenciales al 1%.

10 Se cargaron las monocapas confluentes sembradas en placas negras de 96 pocillos con fondos transparentes con Fluo-3-AM 4 μM durante 90 min a 37°C en solución salina equilibrada de Hanks complementada con HEPES 20 mM y probenecid 2,5 mM. Tras el lavado, se añadió el compuesto de prueba a las células y se registró la fluorescencia máxima en respuesta a serotonina 0,1 nM usando un lector de placas de obtención de imágenes fluorométricas (FLIPR) para detectar cambios en los niveles de calcio intracelular.

15 Se expresó la fluorescencia máxima registrada en presencia del compuesto de prueba como un porcentaje de la respuesta de fluorescencia máxima al agonista serotonina (0,1 nM). Se determinó el valor de CI₅₀ mediante el análisis de regresión no lineal de las curvas de concentración-respuesta generadas con valores repetidos medios usando el ajuste de curvas a la ecuación de Hill ($Y = D + [(A - D)/(1 + (C/C_{50})^nH)]$), donde Y = respuesta específica, D = respuesta específica mínima (sin fármacos ni serotonina añadidos), A = respuesta específica máxima (serotonina 0,1 nM, sin fármacos), C = concentración de compuesto, y C₅₀ = CI₅₀, y nH = factor de pendiente) (SigmaPlot® 4.0, SPSS Inc.). Se calculó la constante de disociación aparente (K_B) usando la ecuación de Cheng Prusoff modificada ($K_B = CI_{50}/(1 + (A/CE_{50A}))$), donde A = concentración de serotonina, y CE_{50A} = valor de CE₅₀ de serotonina en este ensayo. (Porter *et al.* (1999), Br. J. Pharmacol., 128: 13-20)

25

Tabla 3: Antagonismo de 5-HT_{2B}

Compuesto	CI ₅₀	K _B
(±)-7	60 nM	20 nM
(±)-12	12 nM	4,2 nM
(+)-17	33 nM	11 nM
(-)-17	1,6 nM	0,55 nM

Ejemplo 6: Células HEK293 transfectadas con hERG usando un aparato Patch Express.

30

Se realizaron experimentos usando células HEK293 que expresan de manera estable el canal de potasio hERG. Se hicieron crecer las células a 37°C y con el 5% de CO₂ en frascos de cultivo en medio MEM complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, disolución de L-glutamina-penicilina-estreptomicina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% (100x), piruvato de sodio al 1% (100 mM) y geneticina al 0,8% (50 mg/ml). Antes de su uso, se subcultivaron las células en medio MEM en ausencia de 5 ml de L-glutamina-penicilina-estreptomicina. Para su uso en el sistema de pinzamiento zonal automatizado PatchXpress 7000A (Axon Instruments) se recogieron las células para obtener una suspensión celular de células individuales. La disolución extracelular contenía (mM): NaCl 150, KCl 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1,8, HEPES 10, glucosa 5 (pH 7,4 con NaOH). La disolución de pipeta contenía (mM): KCl 120, HEPES 10, EGTA 5, ATP-Mg₂ 4, MgCl₂ 2, CaCl₂ 0,5 (pH 7,2 con KOH).

35

Se realizaron experimentos de pinzamiento zonal en el modo de fijación de voltaje y se registraron las corrientes de células completas con un ensayo de pinzamiento zonal automatizado utilizando el sistema PatchXpress 7000A (Axon Instruments). Se amplificaron las señales de corriente y se digitalizaron mediante un amplificador Multiclamp, se almacenaron y se analizaron usando el software DataXpress de PatchXpress e Igor 5.0 (Wavemetrics).

40

El potencial de mantenimiento fue de -80 mV. Se determinó la corriente de hERG (corriente exterior selectiva de K⁺) como la corriente de cola máxima a -40 mV tras una despolarización de 2 segundos hasta +60 mV. La tasa de ciclos de pulso fue de 15 s. Antes de cada pulso de prueba se administró un pulso corto (0,5 s) desde el potencial de mantenimiento hasta -60 mV para determinar la corriente de fuga (lineal).

45

50

Tras establecer la configuración de célula completa y un periodo de estabilidad, se aplicó el vehículo (control con DMSO acuoso) durante 5 minutos seguido por la sustancia de prueba mediante concentraciones crecientes de 10⁻⁷ M, 3 x 10⁻⁷ M y 3 x 10⁻⁶ M.

Se aplicó cada concentración de la sustancia de prueba dos veces. Se determinó el efecto de cada concentración tras 5 min como una corriente promedio de 3 pulsos de voltaje secuenciales. Para determinar el grado de bloqueo, se comparó la corriente residual con el pretratamiento con vehículo. Los datos se expresan como % de bloqueo a las concentraciones indicadas en la tabla 4. Los valores entre paréntesis se refieren al % de bloqueo por el vehículo.

Tabla 4: % de bloqueo del canal hERG

Concentración	100 nM	300 nM	3000 nM
Cisaprida	80 (7)	95 (15)	No sometida a prueba
(±)-7	35 (7)	62 (15)	94 (21)
(±)-12	40 (7)	73 (15)	96 (21)
(±)-17	9 (7)	17 (15)	58 (21)
(+)-17	14 (7)	21 (10)	52 (11)
(-)-17	3 (7)	11 (10)	47 (11)

10 Ejemplo 7: Hipertensión arterial pulmonar inducida por monocrotalina en la rata

Se sometió a prueba el compuesto (-)-17 en hipertensión arterial pulmonar inducida por monocrotalina en la rata (véase por ejemplo, Stenmark *et al*, 2009, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297, L1013-L1032). Las mediciones incluyeron: tensión arterial media y tensión ventricular derecha *in vivo*, razón del peso ventricular derecho con respecto al peso ventricular izquierdo más septo como índice de la hipertrofia ventricular derecha, tiempo de aceleración de la arteria pulmonar y evaluación histológica de la muscularización de las arterias pulmonares.

Se disolvió la monocrotalina en HCl 1 N y luego en agua destilada y se ajustó el pH a 7,4 usando NaOH. Se administró una dosis única de 60 mg/kg de monocrotalina por vía subcutánea en el día 0 a tres grupos de ratas Sprague Dawley macho. Se disolvió el artículo de prueba compuesto (-)-17 en hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 20% con NaOH, HCl y manitol en agua libre de pirógenos y se administró por vía oral mediante sonda nasogástrica (10 ml/kg) una vez al día desde el día 1 durante 21 días a 10 mg/kg y 50 mg/kg. Se midieron las concentraciones plasmáticas del compuesto (-)-17, 2 horas (Cmax aproximada tras dosificación oral en ratas) tras la administración final en el día 21. Se administraron volúmenes correspondientes de vehículo de hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 20% por vía oral según el mismo protocolo en un tercer grupo de animales.

Los tratamientos de tres semanas con el compuesto (-)-17 a 10 mg v.o. una vez al día (concentración plasmática media 2 horas tras la dosificación en el día 21 ~80 ng/ml) y a 50 mg v.o. una vez al día (concentración plasmática media ~1.000 ng/ml) no fueron tóxicos y no tuvieron efecto sobre la tensión arterial media (MAP), pero redujeron la tensión ventricular derecha (RVP), la hipertrofia ventricular derecha (ventrículo derecho/(ventrículo izquierdo + septo); RV/(LV + S)), y aumentaron el tiempo de aceleración de la arteria pulmonar (PAAT) (tabla 5). El grosor de pared medio de las arterias pulmonares pequeñas disminuyó significativamente mediante el tratamiento con monocrotalina y este engrosamiento se redujo mediante un tratamiento de tres semanas con el compuesto (-)-17 a 50 mg/kg v.o. (P = 0,0539) y a 10 mg v.o. (P <0,005).

Tabla 5:

Tratamiento	MAP (mmHg)	RVP (mmHg)	RV/(LV + S)	PAAT (ms)
Vehículo	92,53 ± 20,18	52,45 ± 9,16	0,66 ± 0,16	11,63 ± 2,36
Compuesto (-)-17 10 mg/kg v.o.	93,7 ± 14,11	43,18 ± 7,38*	0,46 ± 0,08*	15,91 ± 2,76*
Compuesto (-)-17 50 mg/kg v.o.	97,58 ± 9,74	42,85 ± 11,55*	0,41 ± 0,08*	15,42 ± 2,62*

Los valores son la media ± DE medidos en el día 21. * p < 0,05 en comparación con el vehículo

40 Ejemplo 8: Efectos cardiovasculares en cobayas anestesiadas

Se anestesiaron cobayas hembra con pentobarbital sódico (66 mg/kg i.p.) seguido por una infusión i.v. continua de 6 mg/h de pentobarbital sódico y se prepararon para mediciones del electrocardiograma (ECG) de superficie, la frecuencia cardiaca y la tensión arterial media (véase De Clerck *et al*, Fundam. Clin. Pharm.; 2002; 16: 125-140). Se disolvió el compuesto (-)-17 en hidroxipropil-ciclodextrina al 20% con NaOH, HCl y manitol en agua libre de pirógenos y se administró por vía intravenosa (0,5 ml/kg) en dosis crecientes (0,16, 0,32, 0,64, 1,25, 2,5 y 5 mg/kg) a lo largo de un periodo de 5 min a intervalos de 15 min. Se midieron las concentraciones plasmáticas del compuesto (-)-17 al final de cada infusión. Se administraron volúmenes correspondientes de vehículo según el mismo protocolo en un segundo grupo de animales.

50 En relación con el vehículo, el compuesto (-)-17 a de 0,16 hasta 5 mg/kg (dosis total: 9,87 mg/kg; Cmax: 11.950 ng/ml) no tuvo efecto relevante sobre la frecuencia cardiaca, la duración de los intervalos PQ, QRS, QT y QTcB, o sobre la morfología de ECG en las cobayas anestesiadas (tabla 6). Desde 2,5 mg/kg en adelante (Cmax:

6.325 ng/ml; tabla 7), la tensión arterial media comenzó a aumentar (tabla 6).

El compuesto de referencia dofetilida (0,02 mg/kg i.v. a lo largo de 1 min), administrado 15 min tras el comienzo de la última infusión de vehículo, disminuyó la frecuencia cardíaca y prolongó los intervalos QT y QTcB.

Tabla 6: Efectos del compuesto (-)-17 antes y a los 2, 5 y 15 minutos tras el comienzo de cada infusión, expresados como cambios en porcentaje en relación con los valores de referencia en la frecuencia cardíaca (HR), la tensión arterial media (MBP) y en los parámetros de ECG en cobayas anestesiadas. Los valores de referencia se presentan como unidades reales.

Parámetro	HR p/min	MBP mmHg	PQ ms	QRS ms	QT ms	QTc B ms
Referencia	230	33	63	31	185	361
0,16 mg/kg a los 2'	-1%	4%	0%	-2%	0%	-1%
0,16 mg/kg a los 5'	0%	13%	1%	-2%	-1%	-1%
0,16 mg/kg a los 15'	-2%	-3%	4%	0%	1%	1%
0,32 mg/kg a los 2'	-1%	6%	2%	-2%	0%	1%
0,32 mg/kg a los 5'	-4%	2%	4%	0%	3%	1%
0,32 mg/kg a los 15'	-4%	-3%	4%	0%	4%	3%
0,64 mg/kg a los 2'	-5%	6%	5%	0%	7%	4%
0,64 mg/kg a los 5'	-2%	13%	5%	-5%	5%	2%
0,64 mg/kg a los 15'	-5%	-5%	4%	-3%	8%	4%
1,25 mg/kg a los 2'	-7%	4%	5%	-2%	8%	4%
1,25 mg/kg a los 5'	-7%	15%	6%	0%	6%	2%
1,25 mg/kg a los 15'	0%	9%	6%	-3%	2%	3%
2,5 mg/kg a los 2'	-5%	17%	7%	-3%	6%	4%
2,5 mg/kg a los 5'	-6%	21%	7%	-3%	6%	3%
2,5 mg/kg a los 15'	-4%	8%	8%	0%	6%	5%
5 mg/kg a los 2'	-3%	36%	6%	-2%	7%	5%
5 mg/kg a los 5'	-3%	34%	6%	0%	3%	2%

Los valores son la mediana de n = 6. Las diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) se indican en negrita y cursiva y se calcularon según los cambios desde la referencia en unidades reales.

Tabla 7: Mediana de niveles plasmáticos del compuesto (-)-17 (ng/ml) tras la administración de dosis intravenosas crecientes de 0,16, 0,32, 0,64, 1,25, 2,5 y 5 mg/kg a lo largo de periodos de 5 minutos a intervalos de 15 minutos (n = 6)

Dosis	0,16	0,32	0,64	1,25	2,5	5
Mediana	398	873	1815	3330	6325	11950

Ejemplo 9: Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en el ratón (profético)

Se tratan ratones C57BL/6 macho por vía intratraqueal con sulfato de bleomicina (disolución acuosa 2,5 U/ml; 2 ml/kg de peso corporal) bajo anestesia con inhalación de isoflurano (véase por ejemplo, Ishii Y *et al*, 2006. Am J Respir Crit Care Med. 174 (5): 550-6). Después se administra el compuesto (-)-17 una vez al día durante 2 semanas a 10 mg/kg y 50 mg/kg v.o. El examen post mórtem incluye patología macroscópica, pesos de los pulmones e histopatología de los pulmones en el día 15. El examen histopatológico de los pulmones indica que la bleomicina produce inflamación seguido por fibrosis en los pulmones en ratones no tratados.

Ejemplo 10: Evaluación farmacocinética en el ratón

Para la administración intravenosa (i.v.), se disolvió el compuesto (-)-17 en solución salina que contenía hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPbCD) al 20% (p/v) a una concentración de 0,25 mg/ml y se administró (10 ml/kg) a ratones CD1 macho (n = 3) como un bolo a través de una vena de la cola a un nivel de dosis de 2,5 mg/kg. Para la administración oral (v.o.), se disolvió el compuesto (-)-17 en agua que contenía HPbCD al 20% (p/v) a una concentración de 0,5 mg/ml y se administró (20 ml/kg) a ratones CD1 macho (n = 3) a través de sonda nasogástrica a un nivel de dosis de 10 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre a través de la vena safena en puntos de tiempo en serie hasta 24 h tras la dosificación. Se obtuvo el plasma mediante centrifugación y se almacenó a -20°C antes del análisis. Se realizó el análisis usando cromatografía de líquidos (CL) con detección espectrométrica de masas en tándem (EM/EM) en modo de ión positivo. Se eluyó el compuesto (-)-17 de una columna en fase inversa con un gradiente de acetonitrilo y agua que contenía ácido fórmico al 0,1% (v/v). En el momento del análisis, se descongelaron las muestras de plasma (20 ul) y se desprotonaron con 200 ul de acetonitrilo y se centrifugaron. Se inyectaron alícuotas del sobrenadante en una columna de UPLC en fase inversa y se analizaron a través de espectrometría de masas por electropulverización. Se prepararon patrones de calibración y controles de calidad, analizados antes y después de las muestras del estudio, en plasma de ratón al mismo tiempo que. La exactitud (exactitud dentro de una rama de muestras de QC independientes) estaba entre el 85% y el 115% del valor nominal

a lo largo de todo el intervalo de concentración. Se realizó el análisis farmacocinético no compartimental de las curvas de concentración plasmática-tiempo usando el software WinNonLin para proporcionar estimaciones del aclaramiento plasmático (CL_p), el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}), la semivida de eliminación de fase terminal (t_{1/2}) y la biodisponibilidad oral (F). Los resultados se resumen en la tabla 8.

5

Ejemplo 11: Evaluación farmacocinética en la rata

Para la administración intravenosa (i.v.), se disolvió el compuesto (-)-17 en solución salina que contenía hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPbCD) al 20% (p/v) a una concentración de 1 mg/ml y se administró (2,5 ml/kg) a ratas Sprague Dawley macho (n = 1) como un bolo a través de una vena safena a un nivel de dosis de 2,5 mg/kg. Para la administración oral (v.o.), se disolvió el compuesto (-)-17 en agua que contenía HPbCD al 20% (p/v) a una concentración de 1 mg/ml y se administró (10 ml/kg) a ratas Sprague Dawley macho (n = 3) a través de sonda nasogástrica a un nivel de dosis de 10 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre a través de una vena de la cola en los mismos puntos de tiempo en serie hasta 24 h tras la dosificación. Se obtuvo el plasma mediante centrifugación y se almacenó a -20°C antes del análisis. Se realizó el análisis usando cromatografía de líquidos (CL) con detección espectrométrica de masas en tándem (EM/EM) en modo de ión positivo. Se eluyó el compuesto (-)-17 de una columna en fase inversa con un gradiente de acetonitrilo y agua que contenía ácido fórmico al 0,1% (v/v). En el momento del análisis, se descongelaron las muestras de plasma (50 µl) y se desprotonaron con al menos tres volúmenes de acetonitrilo y se centrifugaron. Se inyectaron alícuotas del sobrenadante en una columna de UPLC en fase inversa y se analizaron a través de espectrometría de masas por electropulverización. Se prepararon patrones de calibración y controles de calidad, analizados antes y después de las muestras, en plasma de rata al mismo tiempo que las muestras de estudio. La exactitud (exactitud dentro de una rama de muestras de QC independientes) estaba entre el 85% y el 115% del valor nominal a lo largo de todo el intervalo de concentración. Se realizó el análisis farmacocinético no compartimental de las curvas de concentración plasmática-tiempo usando el software WinNonLin para proporcionar estimaciones del aclaramiento plasmático (CL_p), el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}), la semivida de eliminación de fase terminal (t_{1/2}) y la biodisponibilidad oral (F), los resultados se resumen en la tabla 8.

30

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos no compartimentales para el compuesto (-)-17 obtenidos en ratón y rata tras la administración i.v. y v.o. del compuesto (-)-17-AAA (la base libre).

Parámetro	Ratón	Rata
CL (ml/min/kg)	20 ± 6	46
V _{ss} (l/kg)	1,9 ± 0,6	3,1
t _{1/2} (h)	1,4 ± 0,2	1,1
C _{max} (ng/ml) v.o.	1580 ± 165	119 ± 37
T _{max} (h) v.o.	0,5 [0,5-1,0]	0,5
AUC (0-t) (ng.h/ml) v.o.	4443 ± 1093	686 ± 254
F (%)	52	19

Ejemplo 12: Efectos cardiohemodinámicos, cardioelectrofisiológicos, electroencefalográficos y pulmonares/respiratorios en perros anestesiados, ventilados artificialmente (Beagles)

35

Se anestesió a los animales con una mezcla de 0,015 mg/kg i.v. de escopolamina y 0,075 mg/kg i.v. de lofentanilo, y se relajaron con succinilcolina (5 mg/kg i.v.) seguido por una infusión i.v. continua de 1,5 mg/kg/h de etomidato y se administraron pequeñas dosis adicionales de fentanilo (0,025 mg/kg i.v.) a intervalos de 60 min. Se ventiló a los animales y se prepararon para mediciones de ECG de superficie, tensión arterial aórtica, pulmonar y ventricular izquierda, flujo de sangre carotídea, potencial de acción monofásico, temperatura corporal, gases sanguíneos y EEG (véase Van Deuren *et al*, J Pharmacol Toxicol Methods; 2009; 60: 11-23). Se disolvió el compuesto (-)-17 en hidroxipropil-ciclodextrina al 20% con NaOH, HCl y manitol en agua libre de pirógenos y se administró por vía intravenosa (1 ml/kg) en dosis crecientes (0,16, 0,32, 0,63, 1,25, 2,5 y 5 mg/kg) a lo largo de un periodo de 5 min a intervalos de 30 min. Se midieron las concentraciones plasmáticas del compuesto (-)-17 antes y al final de cada infusión. Se administraron volúmenes correspondientes de vehículo según el mismo protocolo en un segundo grupo de animales.

En relación con el vehículo, el compuesto (-)-17 a de 0,16 hasta 5 mg/kg (dosis total: 9,86 mg/kg; mediana de C_{max}: 20.375 ng/ml) no tuvo efecto relevante sobre la frecuencia cardíaca (HR), la tensión arterial pulmonar, la tensión diastólica final ventricular izquierda, el gasto cardíaco, el volumen sistólico, el producto de tensión-frecuencia, la duración de los intervalos PQ y QRS, la función pulmonar (distensibilidad dinámica, C_{dyn} y resistencia de las vías respiratorias, R_{aw}), la temperatura corporal ni sobre el EEG (medido mediante el dispositivo Narcotrend®) en el perro anestesiado. Desde 1,25 mg/kg en adelante (C_{max}: 5.205 ng/ml), la tensión arterial, la resistencia vascular (sistémica y carotídea común) y la Tau (constante de tiempo de relajación) comenzaron a aumentar. Además, a 2,5 mg/kg (C_{max}: 9.550 ng/ml) LV dp/dt_{max}/pd comenzó a disminuir y a 5 mg/kg (C_{max}: 20.375 ng/ml) se observó una disminución minoritaria en la duración de QTc VDW (intervalo QT corregido para HR) y QTc VcT (intervalo QT corregido para HR y temperatura).

55

Tabla 9: Efectos del compuesto (-)-17 antes y a los 5 y 30 minutos tras el comienzo de cada infusión, expresados como los cambios en porcentaje en relación con el vehículo, en la frecuencia cardiaca (HR), la tensión arterial media (MBP), la tensión pulmonar sistólica (SPP) y diastólica (DPP), la contractilidad ventricular izquierda (LVdp/dt_{max}) y los parámetros de ECG (PQ, QRS y QTcV) en perros Beagle anestesiados. Los valores de referencia se presentan como unidades reales.

5

Parámetros Unidades	HR l/min	MBP mmHg	SPP mmHg	DPP mmHg	LVdp/dt _{max} mmHg/s	PQ ms	QRS ms	QTcV ms
Referencia	64	103	29	12	3123	97	46	294
0,16 mg/kg a los 5'	-4%	+2%	+2%	+3%	-1%	-1%	+1%	+2%
0,16 mg/kg a los 30'	-5%	+3%	+5%	-3%	+0%	-0%	+2%	+4%
0,32 mg/kg a los 5'	-5%	+5%	+11%	+0%	+0%	-2%	+3%	+2%
0,32 mg/kg a los 30'	+3%	+2%	-3%	-8%	-4%	-2%	+4%	+1%
Referencia	64	103	29	12	3123	97	46	294
0,63 mg/kg a los 5'	-0%	+6%	-2%	+0%	-3%	+3%	+4%	+1%
0,63 mg/kg a los 30'	+4%	+2%	-1%	-9%	-2%	-0%	+1%	+4%
1,25 mg/kg a los 5'	-0%	+10%	-1%	-7%	-1%	+2%	+4%	+2%
1,25 mg/kg a los 30'	-3%	+0%	-9%	-12%	-5%	+2%	+2%	+1%
2,5 mg/kg a los 5'	-5%	+13%	-1%	+1%	-8%	+6%	+2%	-3%
2,5 mg/kg a los 30'	-4%	+0%	-15%	-24%	+2%	+2%	+3%	-1%
5 mg/kg a los 5'	-15%	+17%	-10%	+17%	-11%	+2%	+6%	-3%
5 mg/kg a los 30'	-14%	+0%	-7%	-5%	+2%	+2%	+3%	-2%

Los valores son la mediana de n = 4. Las diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) se indican en negrita y cursiva y se calcularon según los cambios desde la referencia en unidades reales.

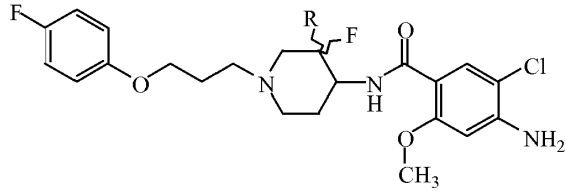
Tabla 10: Mediana de niveles plasmáticos del compuesto (-)-17 (ng/ml) tras la administración de dosis intravenosas crecientes de 0,16, 0,32, 0,64, 1,25, 2,5 y 5 mg/kg a lo largo de periodos de 5 minutos a intervalos de 30 minutos (n = 4).

10

Dosis (mg/kg)	0,16	0,32	0,64	1,25	2,5	5
Mediana (ng/ml)	725	1420	2540	5205	9550	20375

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



5

o una forma estereoquímicamente isomérica del mismo, en la que

R es hidrógeno o fluoro, o

10

una sal de adición o un solvato del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R es fluoro y el compuesto es una mezcla racémica, o una sal de adición o un solvato del mismo.

15

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R es fluoro y el compuesto tiene una rotación óptica $[\alpha] = -14,4^{\circ}$ ($c = 0,3$, MeOH, $\lambda = 598$ nm; 20°C), o una sal de adición o un solvato del mismo.

20

4. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

25

5. Procedimiento para preparar una composición farmacéutica según la reivindicación 4, caracterizado porque se mezcla de manera íntima un portador farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento o la prevención de hipertensión arterial pulmonar, fibrosis pulmonar o síndrome del intestino irritable.