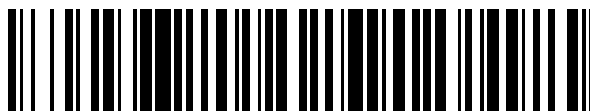


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 001**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

C07D 498/04 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/5383 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 5/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010 E 10707770 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2406252**

54 Título: **Antagonista de receptor de mineralocorticoides y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

12.03.2009 US 159578 P

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

29.07.2015

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)

**Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**COATES, DAVID, ANDREW;
GAVARDINAS, KONSTANTINOS y
JADHAV, PRABHAKAR, KONDAJI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 542 001 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

Antagonista de receptor de mineralocorticoides y procedimientos de uso

La presente invención se refiere a compuestos tricíclicos que son útiles como agentes terapéuticos, a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, a usos de los compuestos para tratar trastornos fisiológicos en

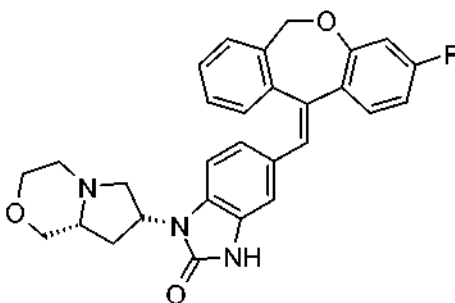
Aldosterona, el mineralocorticoide endógeno primario, promueve reabsorción de sodio o agua y excreción de potasio tras interacción con el receptor de mineralocorticoides (MR). Debido al papel de la aldosterona en mantener equilibrio de electrolitos y de agua, se han usado antagonistas de MR para el tratamiento de numerosos trastornos psicológicos incluyendo hipertensión, hipocalcemia, arritmias miocárdicas, síndrome de Bartter, así como trastornos de hiperaldosteronismo primario y secundario tales como síndrome de Conn. Más recientemente, los antagonistas de MR se han usado en el tratamiento de fallo cardíaco congestivo e infarto de miocardio agudo. Además, los antagonistas de MR han demostrado también efectividad en modelos preclínicos de enfermedad renal y en combinación con terapia estándar para reducir proteinuria en pacientes que sufren de trastornos renales tales como enfermedad renal crónica incluyendo nefropatía diabética.

Sin embargo, antagonistas de MR esteroideos existentes producen efectos concomitantes que limitan su seguridad y/o efectividad. Por ejemplo, la espironolactona no es selectiva y reacciona de forma cruzada con otros receptores de hormonas nucleares (por ejemplo el receptor de andrógenos (AR), el receptor de progesterona (PR), o el receptor de glucocorticoides (GR)) que median ambos procesos fisiológicos. La terapia de espironolactona se ha asociado también con hipercalcemia así como con disfunción eréctil asociada con ginecomastia, libido reducida, menstruaciones irregulares, así como con alteración gástrica. Eplerenona, aunque selectiva para M en relación con los otros receptores de hormonas nucleares, se ha asociado también con hipercalcemia. Así, permanece la necesidad en la técnica de alternativas a la terapia con antagonistas de MR actual.

El objeto de la presente invención es proporcionar una ligando de MR no esteroideo que posea actividad antagonista de MR. Más particularmente, es un objeto proporcionar un antagonista de MR no esteroideo que se una a MR con mayor afinidad en relación a AR, PR y GR. Como una realización más particular, es un objeto de la presente invención proporcionar antagonista de MR no esteroideo que se una a MR con mayor afinidad con respecto a AR, PR y GR y que posea actividad renoprotectora o cardioprotectora potente. Como una realización incluso más particular, es un objeto proporcionar un antagonista no esteroideo que una a MR con mayor afinidad relativa a AR, PR y GR y que posea actividad reno-cardio-protectora potente, pero con una incidencia reducida o probabilidad reducida para producir hipercalcemia.

Ligandos de MR tricíclicos son conocidos en la técnica. Por ejemplo los documentos WO 04/052847 y WO 05/066161 divulgan moduladores de receptores de hormonas esteroideas tricíclicos que son útiles para tratar trastornos susceptibles de modulación de receptor de mineralocorticoides o modulación de receptor de glucocorticoides. La presente invención se refiere a una dibenzooxepina particular, como se da por Compuesto (I) más adelante, que tiene un perfil de actividad *in vitro* e *in vivo* que indica que ello tiene utilidad en el tratamiento de prevención de trastornos responsables de terapia antagonista de receptor de mineralocorticoides.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Compuesto (I)

(5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona)

Como una realización particular, la presente invención proporciona Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en forma cristalina.

En otra realización, la presente invención también proporciona Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable

de la misma, para usar en terapia. Adicionalmente, la presente invención proporciona Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento o la prevención de fallo cardíaco congestivo, nefropatía diabética, enfermedad renal crónica, hipertensión, hipocalcemia, arritmia miocárdica, síndrome de Bartter, hiperaldosteronismo primario o secundario, o síndrome de Conn. Más particularmente, la invención proporciona

5 Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento o prevención de fallo cardíaco congestivo, hipertensión, nefropatía diabética, o enfermedad renal crónica.

En otra realización, la presente invención proporciona el uso de Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento o la prevención de fallo cardíaco congestivo, nefropatía diabética, enfermedad renal crónica, hipertensión, hipocalcemia, arritmia miocárdica, síndrome de Bartter, hiperaldosteronismo primario o secundario, o síndrome de Conn. Más particularmente, la presente invención proporciona el uso de

10 Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de fallo cardíaco congestivo, hipertensión, nefropatía diabética, o enfermedad renal crónica.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Más particularmente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de fallo cardíaco congestivo, hipertensión, nefropatía diabética, o enfermedad renal crónica que comprende Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La presente invención también comprende intermedios novedosos y procedimientos útiles para la síntesis del Compuesto (I):

15 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Más particularmente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de fallo cardíaco congestivo, hipertensión, nefropatía diabética, o enfermedad renal crónica que comprende Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La presente invención también comprende intermedios novedosos y procedimientos útiles para la síntesis del Compuesto (I):

La presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de Compuesto (I) así como a solvatos de Compuesto (I), o a sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Como tal, cuando se usa en el presente documento, el término "Compuesto (I)" incluye dentro de su significado cualquier solvato del compuesto. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y de procedimientos para su preparación están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. Véanse por ejemplo, P. Stahl et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use," VCHA/Wiley-VCH, (2002); Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); y Bastin et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000). Se hace mención particular de la sal tosilato de Compuesto (I), sin embargo, se entiende que la base libre de Compuesto (I) se prefiere.

20 La presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de Compuesto (I) así como a solvatos de Compuesto (I), o a sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Como tal, cuando se usa en el presente documento, el término "Compuesto (I)" incluye dentro de su significado cualquier solvato del compuesto. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y de procedimientos para su preparación están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. Véanse por ejemplo, P. Stahl et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use," VCHA/Wiley-VCH, (2002); Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); y Bastin et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000). Se hace mención particular de la sal tosilato de Compuesto (I), sin embargo, se entiende que la base libre de Compuesto (I) se prefiere.

Los términos "R" y "S" se usan en el presente documento como se usan comúnmente en química orgánica para designar las configuraciones específicas de un centro quiral. Los términos "(±)", "R/S" o "RS" se refirieron a una configuración racémica de un centro quiral. Una lista parcial de prioridades y una discusión de estereoquímica está contenida en "Nomenclature of Organic Compounds: Principles and Practice", (J.H. Fletcher, et al., eds., 1974). Como se usa en el presente documento, la designación "  " se refiere a un enlace que se proyecta fuera del plano de la página, mientras que la designación "  " se refiere a un enlace que sobresale hacia atrás fuera del plano de la página.

30 Los términos "R" y "S" se usan en el presente documento como se usan comúnmente en química orgánica para designar las configuraciones específicas de un centro quiral. Los términos "(±)", "R/S" o "RS" se refirieron a una configuración racémica de un centro quiral. Una lista parcial de prioridades y una discusión de estereoquímica está contenida en "Nomenclature of Organic Compounds: Principles and Practice", (J.H. Fletcher, et al., eds., 1974). Como se usa en el presente documento, la designación "  " se refiere a un enlace que se proyecta fuera del plano de la página, mientras que la designación "  " se refiere a un enlace que sobresale hacia atrás fuera del plano de la página.

Como se apreciará por un experto en la técnica, las moléculas que contienen un doble enlace carbono-carbono o carbono-nitrógeno pueden existir como isómeros geométricos. Se usan comúnmente dos procedimientos para designar los isómeros específicos, el procedimiento "cis-trans" y el procedimiento "E y Z" dependiendo de si los grupos unidos a cada uno de los átomos enlazados por doble enlace son el mismo o diferentes. Una discusión de isomería geométrica y la nomenclatura de isómeros específicos se encuentra en el documento March, "Advanced Organic Chemistry", John Wiley & Sons, 1992, Capítulo 4.

40 Como se apreciará por un experto en la técnica, las moléculas que contienen un doble enlace carbono-carbono o carbono-nitrógeno pueden existir como isómeros geométricos. Se usan comúnmente dos procedimientos para designar los isómeros específicos, el procedimiento "cis-trans" y el procedimiento "E y Z" dependiendo de si los grupos unidos a cada uno de los átomos enlazados por doble enlace son el mismo o diferentes. Una discusión de isomería geométrica y la nomenclatura de isómeros específicos se encuentra en el documento March, "Advanced Organic Chemistry", John Wiley & Sons, 1992, Capítulo 4.

El Compuesto (I) se puede formular como parte de una composición farmacéutica. Como tal, una composición farmacéutica que comprende Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable es una realización importante de la invención. Ejemplos de composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación se conocen bien en la técnica. Véase, p. ej., REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro et al., eds., 19ª ed., Mack Publishing, (1995)). Las composiciones ilustrativas que comprenden Compuesto (I) incluyen, por ejemplo: Compuesto (I) en suspensión con carboximetilcelulosa al 0,5 %, Polisorbato 80 al 0,25 % y NaCl al 2,7 %; o Compuesto (I) en suspensión con carboximetilcelulosa al 1 % y Polisorbato 80 al 0,25 %; Compuesto (I) en suspensión con carboximetilcelulosa al 1 %, Polisorbato 80 al 0,25 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; Compuesto (I) (molido con molinos de chorro) en suspensión con carboximetilcelulosa de chorro al 1 %, Polisorbato 80 al 0,25 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; Compuesto (I) (molido con molinos de chorro) en suspensión con hidroxietilcelulosa al 1 %, vitamina E TPGS (d-alfa-tocoferilpolietilenglicol 1000 succinato) al 10 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; Compuesto (I) (molido con molinos de chorro) en suspensión con Vitamina E TPGS al 10 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; y Compuesto (I) en solución (15 mg/ml) con Captisol® al 20 %, tampón fosfato 25 mM (pH ~2) y 1 eq. de HCl. Se entenderá, sin embargo, que una composición preferida de la presente invención comprende Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente del mismo, formulado en una cápsula o comprimido.

45 Ejemplos de composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación se conocen bien en la técnica. Véase, p. ej., REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro et al., eds., 19ª ed., Mack Publishing, (1995)). Las composiciones ilustrativas que comprenden Compuesto (I) incluyen, por ejemplo: Compuesto (I) en suspensión con carboximetilcelulosa al 0,5 %, Polisorbato 80 al 0,25 % y NaCl al 2,7 %; o Compuesto (I) en suspensión con carboximetilcelulosa al 1 % y Polisorbato 80 al 0,25 %; Compuesto (I) en suspensión con carboximetilcelulosa al 1 %, Polisorbato 80 al 0,25 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; Compuesto (I) (molido con molinos de chorro) en suspensión con carboximetilcelulosa de chorro al 1 %, Polisorbato 80 al 0,25 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; Compuesto (I) (molido con molinos de chorro) en suspensión con hidroxietilcelulosa al 1 %, vitamina E TPGS (d-alfa-tocoferilpolietilenglicol 1000 succinato) al 10 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; Compuesto (I) (molido con molinos de chorro) en suspensión con Vitamina E TPGS al 10 % y Antiespumante 1510™ al 0,05 % en agua purificada; y Compuesto (I) en solución (15 mg/ml) con Captisol® al 20 %, tampón fosfato 25 mM (pH ~2) y 1 eq. de HCl. Se entenderá, sin embargo, que una composición preferida de la presente invención comprende Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente del mismo, formulado en una cápsula o comprimido.

El Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición que comprende Compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se pueden administrar por cualquier vía que hace al compuesto

60 El Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición que comprende Compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se pueden administrar por cualquier vía que hace al compuesto

biodisponible, incluyendo vías oral y parenteral. Se entenderá, sin embargo, que se prefiere la administración oral.

Un experto en la técnica apreciará que el tamaño de partícula puede afectar la disolución *in vivo* de un agente farmacéutico que, en cambio, puede afectar la absorción del agente. "Tamaño de partícula" como se usa en el presente documento, se refiere al diámetro de una partícula de un agente farmacéutico según se determina por técnicas convencionales tales como dispersión de luz láser, difracción de láser, dispersión de Mie, fraccionamiento de flujo de campo de sedimentación, espectroscopia de correlación fotónica y similares. Donde los agentes farmacéuticos tienen solubilidad pobre, tamaños de partículas pequeños o reducidos pueden ayudar a disolución y así, incrementar absorción del agente. Amidon et al., Pharm.Research, 12; 413-420 (1995). Procedimientos para reducir o controlar el tamaño de las partículas (micronización) son convencionales e incluyen molienda con bolas, molienda de martillos, molienda con molinos de chorro, amolado húmedo y similares. Otro procedimiento para controlar tamaño de partículas implica preparar el agente farmacéutico en una nanosuspensión. Una realización particular de la presente invención comprende Compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto (I), o una composición farmacéutica que comprende Compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que dicho compuesto o sal tiene un tamaño de partícula de d_{90} (es decir el tamaño respecto del que el 90 % de las partículas son más pequeñas o son iguales) de menos de aproximadamente 10 μm .

Se apreciará por un experto en la técnica que es deseable para un agente terapéutico poseer ciertas características físicas. En particular se desean sólidos cristalinos, agentes que son estables, ya que son particularmente adecuados para paradigmas convencionales de síntesis química, purificación, almacenamiento y formulación o desarrollo de forma de dosificación. "Forma cristalina" o "forma de cristal" como se usa en el presente documento se refiere a una preparación cristalina de una especie química.

Una forma de cristal particular se puede caracterizar y así distinguir de otras formas sólidas de la misma especie química usando técnicas convencionales, incluyendo difracción en polvo de rayos X (XRPD), procedimientos espectroscópicos (por ejemplo espectroscopia de infrarrojos (IR) o de resonancia magnética nuclear (RMN) y técnicas térmicas (por ejemplo calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis gravimétrico térmico (TGA), o análisis térmico diferencial (DTA)). Mientras XRPD es un medio particularmente útil para caracterizar formas cristalinas de una especie química, se apreciará que las intensidades de pico reales en el patrón de rayos X varían de análisis a análisis del mismo cristal dependiendo de la muestra analizada y del instrumento, disolvente, o procedimientos empleados. Además, se entenderá que mientras las localizaciones de pico exactas obtenidas a partir de análisis de una forma cristalina dada, según se mide en $^{\circ}2\theta$, pueden variar de análisis a análisis (por ejemplo $\pm 0,1^{\circ}$), el patrón relativo de localizaciones de pico permanecerá esencialmente el mismo entre espectros.

La presente invención proporciona Compuesto (I) en forma cristalina. Más particularmente, la presente invención proporciona la base libre de Compuesto (I) en forma cristalina que tiene picos característicos a $^{\circ}2\theta$ de aproximadamente 10,5, 13,0, 15,5 y 19,7 (Forma I de base libre en los Ejemplos en el presente documento). Además, la presente invención proporciona la base libre de Compuesto (I) en forma cristalina que tiene picos característicos a $^{\circ}2\theta$ de aproximadamente 11,3, 12,1, 18,8 y 21,0 (Forma II de base libre en los Ejemplos en el presente documento).

Como se usa en el presente documento el término "paciente" se refiere a un mamífero humano o no humano tal como un perro, gato, vaca, mono, caballo, o oveja. Más particularmente, el término "paciente" se refiere a un ser humano. El término "tratando" (o "tratar" o "tratamiento") como se usa en el presente documento incluye prohibir, evitar, restringir, ralentizar, detener, o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente. El término "evitando" (o "evitar" o "prevención") significa prohibir, restringir, o inhibir la incidencia o aparición de un síntoma o trastorno. Como se aprecia por un experto en la técnica, se pueden presentar trastornos psicológicos como una afección "crónica", o como un episodio "agudo". Así, el tratamiento de trastornos contempla tanto eventos agudos como afecciones crónicas. En un evento agudo, el compuesto se administra a la aparición de los síntomas y es discontinuo cuando los síntomas desaparecen, mientras que una afección crónica se trata a lo largo del curso de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento el término "cantidad efectiva" se refiere la cantidad o dosis de Compuesto (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, tras administración de dosis individual o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente sometido a diagnóstico o tratamiento. Una cantidad efectiva se puede determinar fácilmente por el diagnosticador encargado del caso, como un experto en la técnica, considerando un número de factores tales como la especie de mamífero, su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica implicada, el grado de gravedad de la enfermedad, la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada, el régimen de dosificación seleccionado; y el uso de cualesquiera medicaciones concomitantes.

Cuando se usan en conjunto con los usos de la presente invención, el compuesto y las composiciones de la presente invención se pueden administrar bien solas, o bien en combinación con agentes terapéuticos convencionales usados para tratar el trastorno o afección en particular. Por ejemplo, el Compuesto (I), o una composición que comprende Compuesto (I) se puede administrar en combinación con agentes convencionales para el tratamiento de hipertensión, nefropatía diabética o enfermedad renal crónica tales como inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE) o bloqueantes de receptor de angiotensina (fármacos ARB). Donde el compuesto o composición de la presente invención se usa como parte de una combinación, el Compuesto (I), o una composición que comprende Compuesto (I) se puede administrar bien separadamente o bien como parte de una formulación que comprende el agente

terapéutico con el que se combina.

Determinación de Actividad Biológica

Como se usa en el presente documento, " K_d " se refiere a la constante de disociación en el equilibrio para un complejo receptor-ligando; " K_i " se refiere a la constante de disociación en el equilibrio para el complejo receptor de fármacos y es una indicación de la concentración de fármaco que se unirá a la mitad de los sitios de unión en el equilibrio; " K_b " se refiere a la constante de disociación en el equilibrio para un complejo de antagonista-receptor; "CI50" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente o, alternativamente, a la concentración de un agente que produce desplazamiento del 50 % de unión de ligando al receptor; "CE50" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50 % de la respuesta máxima posible para ese agente y "DE50" se refiere a la dosis de un agente terapéutico administrado que produce el 50 % de la respuesta máxima de ese agente.

A. Ensayo de Unión a Receptor de Hormonas Nucleares Esteroideas:

Los lisados celulares de células HEK293 de riñón embrionario humano que sobreexpresan MR humano (receptor de mineralocorticoides), GR (receptor de glucocorticoides), AR (receptor de andrógenos), o PR (receptor de progesterona) se usan para ensayos de unión de competición receptor-ligando para determinar valores de K_i .

Brevemente, los ensayos de unión de competición de receptor de esteroides se hacen funcionar en un tampón que contiene tampón de HEPES 20 mM (pH = 7,6), EDTA 0,2 mM, NaCl 75 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, glicerol al 20 %, molibdato de sodio 20 mM, DTT (ditiotreitól) 0,2 mM, 20 μ g/ml de aprotinina y 20 μ g/ml de leupeptina (tampón de ensayo). Típicamente, los ensayos de unión de receptor de esteroides incluyen ligandos radiomarcados, tales como [3 H]-aldosterona 0,25 nM para unión a MR, [3 H]-dexametasona 0,7 nM para unión a GR, [3 H]-metiltienolona 0,36 nM para unión a AR y [3 H]-metiltienolona 0,29 nM para unión a PR y bien 20 μ g de lisado 293-MR, bien 20 μ g de lisado 293-GR, bien 22 μ g de lisado 293-AR, o bien 40 μ g de lisado 293-PR por pocillo. Los ensayos funcionan típicamente en formato de 96 pocillos. Los compuestos de prueba de competición se añaden a diversas concentraciones que varían desde aproximadamente 0,01 mM hasta 10 μ M. La unión no específica se determina en presencia de aldosterona 500 nM para unión a MR, dexametasona 500 nM para unión a GR, o metiltienolona 500 nM para unión a AR y PR. Las reacciones de unión (140 μ l) se incuban durante toda una noche a 4 °C, después 70 μ l de tampón de carbón activo-dextrano (conteniendo por 50 ml de tampón de ensayo, 0,75 g de carbón activado y 0,25 g de dextrano) se añaden a cada reacción. Las placas se mezclaron durante 8 minutos en un agitador orbital a 4 °C. Las placas se centrifugaron después a 3.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Una alícuota de 120 μ l de la mezcla de reacción de unión se transfiere después a otra placa de 96 pocillos y se añaden a cada pocillo 175 μ l de Wallac Optiphase Hisafe 3™. Las placas se sellaron y se agitaron vigorosamente en un agitador orbital. Después de una incubación de 2 horas, las placas se leen en un contador Microbeta de Wallac.

Los datos se usaron para calcular una CI50 estimada y la inhibición en porcentaje a 10 μ M. La K_d para [3 H]-aldosterona para unión a MR, [3 H]-dexametasona para unión a GR, [3 H]-metiltienolona para unión a AR, o [3 H]-metiltienolona para unión a PR, se determina por unión de saturación. Los valores de CI50 para compuestos se convierten a K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, el Compuesto (I) presenta una K_i en el ensayo de unión de aproximadamente 0,40 nM, demostrando así que el Compuesto (I) es un potente ligando de MR humano. Además, el Compuesto (I) presentaba una K_i a los ensayos de unión a AR, GR y PR de aproximadamente 1170 nM, 669 nM y 478 nM respectivamente, demostrando así que el Compuesto (I) es un ligando selectivo para MR.

B. Ensayos Funcionales de Modulación de Receptores de Hormonas Nucleares Esteroideas:

La aldosterona ejerce sus efectos fisiológicos por interacción con el receptor de mineralocorticoides. Tras la unión citoplásmica de aldosterona a PR, el complejo receptor de ligando se transloca al núcleo celular donde ello se une a elementos de respuesta a hormonas en ADN para iniciar la expresión de genes diana. Para demostrar la capacidad de compuestos de la presente invención para modular la actividad de receptores de hormonas esteroideas (es decir bien agonizan, bien agonizan parcialmente, o bien antagonizan), se llevan a cabo bioensayos que detectan modulación funcional de expresión de genes objetivo en células transfectadas transitoriamente con una proteína de receptor nuclear y una construcción génica comunicadora de elemento de respuesta a hormonas. Los disolventes, reactivos y ligandos empleados en el ensayo funcional están fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales, o se pueden preparar por un experto en la técnica.

1. Pantalla de Panel de Receptor de Hormonas Nucleares

Las células HEK293 de riñón embrionario humano se transfectan con plásmidos de genes de receptor de hormonas esteroideas y plásmidos de genes comunicadores usando un reactivo de transfección adecuado tal como Fugene™. Brevemente, el plásmido comunicador que contiene dos copias de promotor de probasina ARE y de TK (timidina cinasa) aguas arriba del ADNc del comunicador luciferasa, se transfecta dentro de las células o HEK293 con un plásmido que expresa constitutivamente receptor androgénico humano (AR) usando promotor de CMV (citomegalovirus) vírico. El plásmido comunicador que contiene dos copias de GRE y promotor de TK del ADNc

comunicador de luciferasa se transfecta con un plásmido que expresa constitutivamente bien receptor de glucocorticoides humano (GR), bien receptor de mineralocorticoides humano (MR), o bien receptor de progesterona humano (PR) usando promotor de CMV vírico. Las células se transfectaron en matraces T150 cm en medios DMEM con suero fetal bovino (FBS) purificado con carbón activo al 5 %. Después de una incubación durante toda una noche, las células transfectadas se tripsinizaron, se plaquearon en placas de 96 pocillos en medios DMEM conteniendo FBS purificado con carbón activo al 5 %, se incubaron durante 4 horas y después se expusieron a diversas concentraciones de compuestos de prueba que varían desde aproximadamente 0,01 nM hasta 10 mM. En el modo antagonista para los ensayos, se añaden concentraciones bajas de agonista para cada receptor respectivo a los medios (aldosterona 0,08 nM para MR, dexametazona para GR, 0,66 nM de metiltrenolona para AR y 0,08 nM de promefestona para PR). Después de incubación de 24 horas con compuestos de prueba, las células se lisaron y la actividad de luciferasa se determinó usando técnicas estándar.

Los datos se ajustan a una curva logística de cuatro parámetros para determinar valores de CE50. La eficacia en porcentaje (compuestos con respuestas máximas saturadas) o la estimulación máxima en porcentaje (compuestos con respuestas máximas que no saturan) se determinan en relación estimulación máxima obtenida con los siguientes agonistas de referencia: Aldosterona 30 nM para ensayo de MR, metiltrenolona 100 nM para ensayo de AR, promegestona 30 nM para ensayo de PR y con dexametazona 100 nM para ensayo de GR. Los valores de CI50 se determinan de forma similar usando datos de ensayo de modo antagonista. En el modo antagonista, las inhibiciones en porcentaje se determinaron comparando actividad de compuesto de prueba en presencia de concentración baja de agonista (aldosterona 0,08 nM para MR, 0,25 nM de dexametazona para GR, 0,66 nM de metiltrenolona para AR y 0,08 nM de promegestona para PR) para la respuesta producida por la misma concentración baja de agonista en ausencia del compuesto de prueba.

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, el Compuesto (I) presentó valores de CI50 de aproximadamente 21 nM, 924 nM, > 10000 nM y > 10000 nM en los ensayos de MR, PR, GR y AR (modo antagonista), respectivamente y una CE50 de > 10000 nM para cada uno de MR, PR, GR y AR en el modo agonista. Así, el Compuesto (I) es un antagonista funcional selectivo de hMR.

2. Ensayo de Antagonista Competitivo de hMR:

Células HEK293 de riñón embrionario humano se transfectaron con MR humano usando los mismos reactivos de transfección, plásmidos, promotores, construcciones comunicadoras, tampones y procedimientos como se describen anteriormente para la Pantalla de Panel de Receptor de Hormonas Nucleares. Las células transfectadas se tripsinizaron, se plaquearon en placas de 96 pocillos en medios DMEM conteniendo FBS purificado con carbón activo al 5 %, se incubaron durante 4 horas y después se expusieron a diversas concentraciones (10 diluciones) de aldosterona (que varían desde aproximadamente 0,001 nM hasta 0,03 μ M). La capacidad de aldosterona para agonizar la hMR se determina en la ausencia y presencia de concentraciones fijas de compuesto de prueba y se monitorizan midiendo actividad luciferasa usando técnicas estándar. El compuesto de ensayo K_b se puede determinar usando un trazado logarítmico de análisis de Schild (proporción de dosis - 1) frente a logaritmo de concentración de antagonistas usando la ecuación: $\text{Log (DR-1)} = \text{Log [Antagonista]} - \text{Log } K_b$ donde la proporción de dosis (DR) representa la proporción de CE50 de aldosterona en presencia de compuesto de ensayo frente a la CE50 de aldosterona en ausencia de compuesto de ensayo).

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, el Compuesto (I) presenta una K_i en el ensayo antagonista competitivo de MR de aproximadamente 5,1 nM, demostrando así que el Compuesto (I) es un potente ligando de MR humano.

C. Modelo In vivo de Enfermedad Renal Mediada por Aldosterona

Ratas Sprague Dawley macho (240-280 g) uni-nefrectomizadas se albergaron individualmente con agua *a demanda* y dieta rodent 5001 durante una semana. Después de aclimatación, se recogieron muestras de orina a las 24 horas de línea base y se analizaron para proteína de orina total y creatinina. Los animales se distribuyeron al azar por medio de peso corporal y proteína urinaria de línea base en grupos de estudio. Los sueros de línea base se toman por corte de la cola y se analizaron con respecto a nitrógeno de urea en la sangre (BUN), creatinina y electrolitos. Después de que se tomen muestras de línea base, todas las ratas con la excepción del grupo control se mantienen en una dieta conteniendo sal al 6 % y bebiendo agua conteniendo KCl al 0,3 % a lo largo de la duración del estudio. Los animales control se mantuvieron en dieta 5001 y agua potable a lo largo de la duración del estudio y no recibieron aldosterona. Mini-bombas Alza para administrar 2,5 μ l/hora X 28 días de d-aldosterona en DMSO al 0,01 % a 0,75 μ g/h, se implantaron subcutáneamente en animales no de control (por ejemplo grupo de Compuesto de Prueba y grupo de solo Vehículo) en anestesia de isoflurano. El compuesto de ensayo, en un vehículo que comprende carboximetilcelulosa al 1 % (CMC)/polisorbato 80 al 0,25 %, o solo vehículo, se administra después por sonda oral diariamente una vez (10 ml/kg) comenzando el día después de implantación de aldosterona. Se recogen muestras de orina repetidas después de 2 y 4 semanas de administración de compuesto o vehículo solo y se analizaron con respecto a proteínas en la orina totales y creatinina. A la terminación del estudio, las muestras farmacocinéticas se obtienen en 8 puntos temporales (0,5, 1, 2, 3, 6, 8, 12 y 24 horas). Además, se retiraron corazones y riñones y se fijaron en formalina tamponada al 10 % corazones y riñones para hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson para detectar daño estructural en tejidos cardíacos y en tejidos renales. El suero se puede tomar también por

punción cardíaca en la finalización del estudio para análisis adicional de suero BUN, creatinina y electrolitos.

Tras un protocolo estándar como se describe anteriormente, el Compuesto (I), cuando se administra a 10 mg/kg/día X 28 días, la excreción de proteína urinaria se redujo en comparación con los animales tratados con vehículo en aproximadamente el 60 %, demostrando así que el Compuesto (I) tiene actividad reno-protectora *in vivo*.

- 5 Con el fin de demostrar que un compuesto tiene efectos antihipertensión, se pueden emplear el siguiente modelo.

D. Modelo *In vivo* de Hipertensión Mediada por Aldosterona

10 Ratas Sprague Dawley macho (240-280 g) uni-nefrectomizadas se albergaron individualmente con agua *a demanda* y dieta rodent 5001 durante una semana. Después de aclimatación, los animales se implantaron con bombas de Alzet para administrar subcutáneamente 0,25 µg/h de aldosterona a 2,5 µl/h durante hasta 28 días y se mantuvieron a una dieta conteniendo NaCl al 6 % y bebiendo agua que contenía KCl al 0,3 % a lo largo de la duración del estudio. Los dispositivos de radiotelemedría se implantaron para monitorizar presión sanguínea arterial. Por ejemplo, las señales de cada animal se muestrearon cada 10 minutos a lo largo del estudio. El promedio ($\pm$ 6) de todos los valores recogidos a lo largo de un periodo de 24 horas representa la presión arterial media diaria para cada animal. En el día después de la implantación de la bomba, el compuesto de prueba en un vehículo que comprende carboximetilcelulosa de sodio de viscosidad del medio al 1 %/polisorbato 80 al 0,25 %/antiespumante 1510™ al 0,05 %, o vehículo solo, se administró después por sonda oral diariamente (10 ml/kg).

15 Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, el Compuesto (I), cuando se administra oralmente una vez al día (1-30 mg/kg/día) X 14 días, redujo de forma dependiente de dosis los efectos hipertensivos de aldosterona en presencia de sal comparado con el vehículo, demostrando así que el Compuesto (I) tiene efectos antihipertensión.

20 Con el fin de demostrar que un compuesto tiene una incidencia reducida o una probabilidad reducida de producir hipercalemia, se puede emplear el siguiente modelo.

E. Ensayo *In vivo* de Modulación Electrolítica

25 Las ratas Sprague Dawley macho (240-280 g) se adrenalectomizan a continuación se mantienen a pienso de roedores 5001 y solución de bebida de NaCl al 1 % durante 6 días después de la cirugía. Los animales se someten a ayuno durante toda una noche y el agua de bebida salina al 1 % se sustituye con agua potable *a demanda*. La mañana del estudio, los animales sometidos a ayuno se distribuyen al azar en base al peso corporal tras el ayuno. A los animales control (por ejemplo aquellos que no reciben nada de aldosterona o de compuesto de prueba) se da 10 ml/kg de vehículo del compuesto de prueba comprendiendo CMC al 0,5 %/polisorbato 80 al 0,25 %/NaCl al 2,7 % por sonda oral y 1 ml/kg de vehículo de aldosterona (DMSO al 0,01 %/agua) por inyección subcutánea. A los animales de vehículo se les da el mismo vehículo del compuesto de prueba por sonda oral y aldosterona 3 µg/kg, s.c. Las sustancias de prueba están suspendidas en el vehículo de carboximetilcelulosa/NaCl. Los grupos de tratamiento del compuesto de prueba reciben sustancia de prueba suspendida en el vehículo de carboximetilcelulosa/NaCl y en aldosterona 3 µg/kg s.c. Inmediatamente después de dosificación, los animales se sitúan en estantes metabólicos con acceso a agua potable *a demanda*. Se recogen muestras de orina 5 horas después de administración de dosis y se somete a ensayos la excreción electrolítica. Los datos se presentan como proporción de excreción de log Na/K o como % de proporción de Na/K con respecto a animales tratados con vehículo adrenalectomizado. El compuesto I se puede poner a prueba a diversas dosis para determinar en qué grado los compuestos inducen un incremento en la proporción Na/K urinaria (un índice de concentración de potasio en suero incrementado).

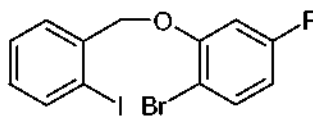
35 Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, el Compuesto (I), cuando se administra a 30 mg/kg por vía oral, se incrementó la proporción de excreción de Na/K urinario en solo aproximadamente el 39 % comparado con los animales tratados con vehículo demostrando que el Compuesto (I) puede tener una incidencia reducida o una probabilidad reducida de producir hipercalemia.

40 Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica podrá, usando la descripción precedente poner en práctica la presente invención en su extensión más plena. Los siguientes Preparaciones y Ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención en detalle adicional y representan la síntesis típica del Compuesto de Fórmula (I). Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para, o pueden sintetizarse fácilmente por, un experto en la técnica. Los expertos en la técnica reconocerán apropiadamente variaciones de los procedimientos descritos en los ejemplos. Los nombres de los compuestos de la presente invención se proporcionan generalmente por ChemDraw Ultra® versión 10.0.

45 Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DMAC" se refiere a N,N-dimetilacetamida; "tBOC" o "boc" se refiere a *tert*-butoxicarbonilo; y "TLC" se refiere a cromatografía en capa fina.

Preparación 1

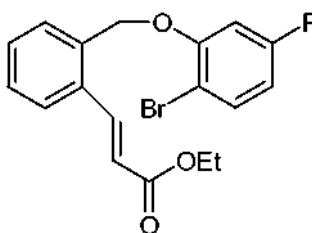
55 1-bromo-4-fluoro-2-(2-iodo-benciloxi)-benzeno



Agitar una mezcla de bromuro de 2-yodobencilo (90 g, 0,29 mol), 2-bromo-5-fluorofenol (57,9 g, 0,29 mol) y carbonato de potasio (63 g, 0,46 mol) en N,N-dimetilformamida (750 ml) a temperatura ambiente durante 16 horas. Añadir agua (1 l), agitar la mezcla resultante durante una hora, eliminar por filtrado los sólidos, aclarar con agua y secar en un horno al vacío (2666,44 pascales (20 mm de Hg)/60 °C) para obtener el compuesto del título (121 g, > 100 %).RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,11 (s, 2H), 6,81 (t, 1H), 7,13 (t, 1H), 7,19 (dd, 1H), 7,46 (t, 1H), 7,59 (d, 1H), 7,62 (t, 1H), 7,93 (d, 1H).

Preparación 2

Éster etílico del ácido 3-[2-(2-bromo-5-fluoro-fenoximetil)-fenil]-acrílico



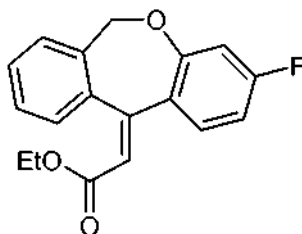
A una mezcla de 1-bromo-4-fluoro-2-(2-yodo-benciloxi)-benceno (117,4 g, 0,29 mol), acetato de sodio (36,1 g, 0,44 mol), bromuro de tetra-*n*-butilamonio (90,3 g, 0,29 mol), acetato de paladio (II) (1,8 g, 8 mmol, 3 % mol) y N-metilpirrolidinona (900 ml) a 55-60 °C, añadir gota a gota una solución de acrilato de etilo (34,3 ml, 0,32 mol) en N-metilpirrolidinona (200 ml). Enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y tratar con agua (2 l) y éter metil $tert$ -butílico (2 l). Hacer pasar la reacción a través de tierra de diatomeas, añadir acetato de etilo (1 l), separar las capas y lavar con agua (2 l). Secar los productos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar. Suspender el sólido resultante en hexanos (1 l), refrigerar durante 2 h, filtrar y lavar con hexanos fríos (500 ml). Secar en un horno de vacío (50 °C/2666,44 pascales (20 mm de Hg)) para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (104,4 g, al 95%). CL-EM m/z 381,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Procedimiento alternativo:

A un reactor de 378,54 litros (100 galones) limpio, seco con agitación en nitrógeno añadir N-metilpirrolidinona (72 l), acetato de sodio (2721 g, 33,17 mol), 1-bromo-4-fluoro-2-(2-iodo-benciloxi)-benceno (9000 g, 22,11 mol) y bromuro de tetrabutilamonio (7128 g, 22,11 mol) recién preparados. Iniciar agitación y desgasificar la mezcla de reacción en el vacío total durante 30 minutos, purgar con nitrógeno. Permitir al reactor retornar a a presión ambiente en nitrógeno y repetir el procedimiento de desgasificación. Añadir acetato de paladio (II) (180 g, peso al 2 %) a la mezcla de reacción y calentar a 60 °C. A 60 °C, añadir lentamente acrilato de etilo (2258 g, 22,55 mol) como una solución en N-metilpirrolidinona (18 l) a la mezcla de reacción por medio del embudo de adición. Tras finalización de la adición, calentar la mezcla de reacción a 70 °C. Continuar agitando durante un mínimo de 2 horas a 70 °C. Ajustar la temperatura interna de la mezcla de reacción a 5-10 °C. En un reactor aparte, limpio, dotado de un tamaño apropiado, cargar agua (225 l), iniciar agitación vigorosa y enfriar a una temperatura interna de ≤ 5 °C. Transferir la mezcla de reacción al agua con agitación vigorosa durante un mínimo de una hora. Agitar la suspensión resultante durante 30 minutos a una hora a temperatura ambiente. Filtrar a través de un lecho corto de filtro de polipropileno para recoger los sólidos violeta claro. Lavar la torta del filtro con agua (25 l) y poner a secar sobre el filtro usando un dique de goma. Recargar los sólidos a la reacción con agua (45 l) y agitar la suspensión durante 30 minutos a una hora. Re-filtrar los sólidos sobre un lecho corto de filtro de polipropileno, lavar la torta del filtro con agua (25 l). Poner a secar sobre el filtro usando un dique de goma. Transferir el material violeta claro a bandejas de secado y secar la aire en una vitrina extractora durante un mínimo de 24 horas. Secar los sólidos en horno al vacío a < 50 °C para obtener el compuesto del título (8,4 kg, al 100 %).

Preparación 3

Éster etílico del ácido (E)-(3-fluoro-6H-dibenzo[b,e]oxepin-11-ilideno)-acético



Calentar una mezcla de éster etílico del ácido 3-[2-(2-bromo-5-fluoro-fenoximetil)-fenil]-acrílico (94 g, 0,25 mol), acetato de sodio (30 g, 0,37 mol), bromuro de tetra-*n*-butilamonio (81 g, 0,25 mol) y acetato de paladio (II) (1,7 g, 7 mmol, 3 % mol) en N-metilpirrolidinona (850 ml) a 100-110 °C durante 6 h. Enfriar a temperatura ambiente, diluir con agua (1 l), filtrar a través de tierra de diatomeas y lavar con acetato de etilo (2 l). Transferir el filtrado a un embudo separador, añadir agua (500 ml) y separar las capas. Lavar la fase orgánica con agua (2 X 1,5 l), secar sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar a través de un lecho corto de sílice, lavar con acetato de etilo (1,5 l) y concentrar hasta sequedad. Al sólido residual añadir hexanos (1 l), refrigerar durante 2 horas, filtrar, aclarar con hexanos (500 ml) y secar a 50 °C/2666,44 pascales (20 mm de Hg) para obtener el compuesto del título (64,3 g, al 87 %). CL-EM m/z 299,0 [M+H]⁺

Procedimiento alternativo:

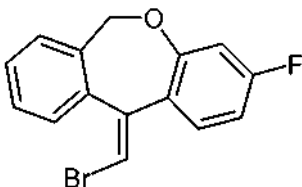
A un reactor de 378,54 litros (100 galones) limpio, seco con agitación en nitrógeno añadir N-metilpirrolidinona (83,4 l), acetato de sodio (2,706 kg, 32,98 mol), éster etílico del ácido 3-[2-(2-bromo-5-fluoro-fenoximetil)-fenil]-acrílico (9,256 kg, 21,99 mol) y bromuro de tetrabutilamonio (7,088 kg, 21,99). Iniciar agitación y desgasificar la mezcla de reacción en el vacío total durante 30 minutos, purgar con nitrógeno. Permitir al reactor retornar a a presión ambiente en nitrógeno y repetir el procedimiento de desgasificación. Añadir acetato de paladio (II) (167 g, al 2 % en peso) a la mezcla de reacción. Calentar la reacción a entre 100 °C y 125 °C, agitar durante un mínimo de 3 a 5 horas. Añadir acetato de etilo (100 l) y agitar 30 min. Añadir agua (100 l) y agitar 30 minutos. Realizar agitación discontinua y permitir a las capas separarse durante un mínimo de una hora. Recoger la fase orgánica y extraer la fase acuosa con acetato de etilo (50 l, después 25 l). Combinar las partes orgánicas y lavar con agua (40 l), una solución de cloruro de sodio acuoso al 20 % (2 X 20 l), agitar durante un mínimo de 30 minutos cada uno y permitir al menos 30 minutos para separación de capas. Secar la solución orgánica con sulfato de magnesio (8,0 kg) y añadir carbón activo (2,0 kg) y gel de sílice 60 (2,0 kg), durante un mínimo de una hora. Filtrar para retirar los sólidos. Concentrar el filtrado a sequedad al vacío a < 35 °C. Añadir metanol (20 l) al residuo sólido y calentar la mezcla hasta una solución transparente a 50-60 °C. Añadir heptano (40 l) y enfriar a entre 20 °C y 25 °C. Continuar hasta enfriar adicionalmente la mezcla de reacción a -10 °C durante un mínimo de 3 h. Agitar a -10 °C durante un mínimo de 12 horas. Filtrar para recoger el producto sólido resultante, lavar con una mezcla de heptano:metanol, (75:25) (2 X 20 l). Secar los sólidos al vacío a < 40 °C a un peso constante para obtener el compuesto del título (3,7 kg, al 64 %).

Procedimiento alternativo 2:

Calentar 1-bromo-4-fluoro-2-(2-yodo-benciloxi)-benceno (50 g, 0,123 mol), acetato de sodio (30,2 g, 0,369 mol), bromuro de tetrabutilamonio (39,6 g, 0,123 mol) y acetato de paladio (1 g) en N-metilpirrolidina (250 ml) a 60 °C. Añadir acetato de etilo (12,91 g, 0,129 mol) en N-metilpirrolidina (50 ml) gota a gota durante 20 minutos. Después de que la adición se completa, calentar la mezcla de reacción a 145 °C durante 3 horas. Enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, filtrar a través de tierra de diatomeas y lavar los sólidos con éter metil-t-butílico (2 X 150 ml). Diluir el filtrado con éter metil-t-butílico (0,5 l) y lavar con agua (0,5 l). Separar la fase orgánica y extraer la fase acuosa con éter metil-t-butílico (2 X 300 ml). Lavar las fases orgánicas combinadas con agua (2 X 200 ml). Secar la parte orgánica sobre sulfato de magnesio, tratar con carbón activo, filtrar, lavar los sólidos con éter metil-t-butílico (100 ml) y concentrar. Suspender el residuo en isopropanol (20 ml) en un matraz de Buchi a 55 °C con agitación. Añadir heptanos (100 ml) con agitación. Situar la suspensión oscura en una cámara fría durante toda una noche. Filtrar los sólidos, aclarar con heptano/isopropanol (9:1, 2 X 100 ml) fría, después con heptano (50 ml) y secar a un peso constante en un horno al vacío a 35 °C para obtener el compuesto del título como un polvo canela (22,25 g, al 61 %).

Preparación 4

(E)-11-bromometileno-3-fluoro-6,11-dihidro-dibenzo[b,e]oxepina



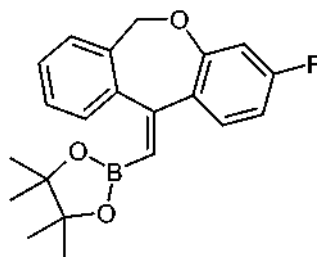
A una suspensión de éster etílico del ácido (3-fluoro-6H-dibenzo[b,e]oxepin-11-ilideno)-acético (69,5 g, 0,23 mol) en isopropanol (725 ml) añadir una solución de hidróxido de litio (12,0 g, 0,53 mol) en agua (125 ml) y calentar a 70 °C durante 4 h. Permitir a la mezcla enfriarse a 40 °C y después tratar con ácido acético glacial (0,44 mol, 25 ml). Después de agitar durante 15 minutos, añadir N-bromosuccinimida (0,25 mol, 44 g). Tiene lugar burbujeo, la temperatura se eleva a 45 °C y se forman sólidos después de unos pocos minutos. Agitar la mezcla a 40-45 °C durante una hora y enfriar a temperatura ambiente. Añadir bisulfito de sodio (4,5 g) en agua (150 ml), bicarbonato de sodio acuoso saturada (150 ml) y agua (450 ml). Filtrar la suspensión resultante y aclarar con isopropanol/agua 1:1 fría (300 ml). Secar el sólido a 60 °C/2666,44 pascales (20 mm de Hg) durante toda una noche para obtener el compuesto del título (65,8 g, al 93 %). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4,9-5,4 (d a, 2H), 6,63 (dd, 1H), 6,77 (dt, 1H), 7,13 (s, 1H), 7,32-7,46 (m, 4H), 7,52 (dd, 1H).

Procedimiento alternativo:

A un reactor de 378,54 l (100 galones) limpio, seco con agitación en nitrógeno, se cargaron isopropanol (125 l), éster etílico del ácido (E)-(3-fluoro-6H-dibenzo[b,e]oxepin-11-ilideno)-acético (13,857 kg, 46,42 mol) y una solución de hidróxido de litio (3,896 kg, 92,84 mol) en agua (54 l). Calentar la mezcla de reacción a 80 °C y agitar durante 2 horas. Enfriar la mezcla de reacción 40 °C y añadir ácido acético (5,575 kg, 92,84 mol) durante 20 minutos entre 40 °C y 45 °C. Añadir N-bromosuccinimida (48,74 mol, 8,676 kg) parte a parte durante 30 minutos a < 45 °C. Enfriar la reacción a temperatura ambiente y agitar durante un mínimo de 12 h. Añadir una solución acuosa de bicarbonato de sodio (~37,7 l) y agitar 15 minutos. Añadir una solución acuosa de bicarbonato de sodio (~37,7 l) y agitar 15 min. Añadir agua (129 l) y agitar 30 minutos. Filtrar para recoger los sólidos resultante, lavar con isopropanol:agua (1:1, 2 X 20 l). Secar los sólidos al vacío a < 32 °C a un peso constante para obtener el compuesto del título (13,8 kg, al 97%).

Preparación 5

(E)-2-((3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano



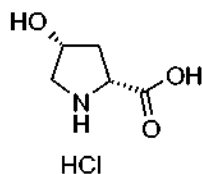
A una mezcla agitada de (E)-11-(bromometileno)-3-fluoro-6,11-dihidrodibenzo[b,e]oxepina (15 g, 49 mmol) y bis(pinacolato)diboro (16 g, 64 mmol) en 1,4-dioxano (250 ml) añadir acetato de potasio (15 g, 150 mmol). Lavar la mezcla con nitrógeno, añadir aducto de diclorometano dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)-ferroceno]paladio (II) (1,80 g, 2,46 mmol) y calentar a 65 °C durante toda una noche. Enfriar a temperatura ambiente, filtrar a través de tierra de diatomeas, lavar con acetato de etilo y concentrar el filtrado al vacío. Añadir metanol (200 ml) y rotar la muestra durante una hora en un evaporador rotatorio sin vacío, causando que se forme un sólido marrón. Recoger los cristales marrones por filtración y secar al vacío durante toda una noche para obtener el compuesto del título (7,28 g, al 42 %). Concentrar el filtrado y purificar por cromatografía en columna eluyendo con acetato de etilo al 0 % hasta el 16 % en hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo (3,46 g, al 20 %). El rendimiento total de la reacción es 10,7 g (al 62 %). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,36 (dd, J = 8,8, 6,8 Hz, 1H), 7,32-7,27 (m, 4H), 6,64-6,57 (m, 1H), 6,48 (dd, J = 10,3, 2,6 Hz, 1H), 5,98 (s, 1H), 5,20 (s a, 1H), 1,15 (s, 12H).

Procedimiento alternativo:

Equipar un matraz de fondo redondo de tres cuellos con un agitador mecánico, par termoeléctrico, entrada de nitrógeno y condensador de reflujo. Situar en una manta calefactora. Cargar el matraz con dioxano (13,5 l), (E)-11-bromometileno-3-fluoro-6,11-dihidro-dibenzo[b,e]oxepina (1,600 kg, 5,24 mol), bis(pinacolato)diboro (1,731 kg, 6,82 mol), acetato de potasio (823 g, 8,38 mol), agua (20 ml), triciclohexilfosfina (29,5 g, 0,105 mol) y tris(dibencilideno acetona)di-paladio (48 g, 0,052 mol). Calentar la mezcla de reacción a 80-85 °C. Mantener la reacción a 85-90 °C durante un mínimo de 6 horas. Enfriar a temperatura ambiente. Filtrar la mezcla de reacción a través de un lecho corto de tierra de diatomeas (2,54 centímetros (2-3 pulgadas)). Lavar el filtrado con acetato de etilo (2 X 3,5 l). Concentrar el filtrado en un evaporador rotatorio a 50-55 °C. Co-evaporar con heptanos (2 X 3,5 l) para formar una suspensión. Añadir metanol (2,5 l) a la suspensión a 50 °C. Agitar a 10-15 minutos. Enfriar la suspensión a -10 - 0 °C durante 20-30 min. Filtrar el sólido. Lavar los sólidos recogidos con metanol (2 X 1,5 l) frío (-10 °C) (seguido por heptanos (2 X 1,5 l)). Secar los sólidos al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (1,408 kg, al 76 %).

Preparación 6

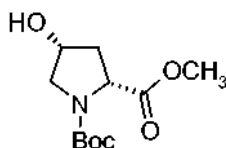
Clorhidrato de ácido (2R, 4R)-4-hidroxi-pirrolidina-2-carboxílico



Tras un procedimiento esencialmente como se describe en Tetrahedron: Asymmetry, 14, (2003) 3141-3152, a una mezcla de anhídrido acético (1,437 kg, 5,65 equivalentes) y ácido acético (4,225 l) a 50 °C añadir *trans*-4-hidroxi-L-prolina (331 g, 2,49 mol) en porciones durante 30 minutos. Calentar la mezcla de reacción durante 5,5 horas a 90 °C después dejar enfriar a temperatura ambiente. Agitar la reacción a temperatura ambiente durante toda una noche y después concentrar. Disolver el residuo en ácido clorhídrico 2 N (4,57 l) y someter a reflujo durante 3 horas. Enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, filtrar a través de tierra de diatomeas y concentrar al vacío a 70 °C a aproximadamente 700 ml. Permitir al material enfriarse a temperatura ambiente y dejar reposar durante toda una noche. Diluir la suspensión resultante con éter (1 l), filtrar los cristales, lavar con éter y secar al vacío para obtener el compuesto del título (340 g). Disolver el sólido en etanol caliente (2,5 l), enfriar, agitar lentamente a 35 °C y añadir éter etílico (2,5 l) lentamente por partes durante una hora. Agitar durante 2 horas, filtrar el sólido blanco resultante y secar durante toda una noche en un horno al vacío para obtener el compuesto del título (270,6 g, al 65 %). $[\alpha]_D^{20} + 12,0$ (c = 1,0 en metanol). RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) δ 2,34-2,39 (m, 1H), 2,45-2,53 (m, 1H), 3,38 (dd, 1H), 3,45 (d, 1H), 4,50 (dd, 1H), 4,58 (s a, 1H).

Preparación 7

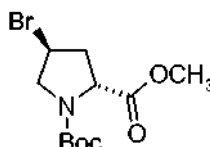
Éster 1-*tert*-butílico éster 2-metilico del ácido (2R, 4R)-4-hidroxi-pirrolidina-1,2-dicarboxílico



Añadir cloruro de tionilo (233 ml, 3,10 mol) gota a gota a una solución de clorhidrato de (2R, 4R)-4-hidroxi-pirrolidina-2-carboxílico (355 g, 2,12 mol) en metanol seco (3,5 l) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Tras la adición completa, calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y agitar durante 6 horas. Concentrar la mezcla de reacción a presión reducida para obtener el clorhidrato de éster metílico correspondiente como un sólido céreo. Suspender el sólido en diclorometano seco (3,5 l) a 0 °C y añadir trietilamina (640 ml, 4,66 mol) con precaución durante 30 minutos y agitar durante 30 minutos adicionales. Añadir N,N-dimetilaminopiridina (39 g, 0,32 mol) y bicarbonato de di-*tert*-butilo (500 g, 2,25 mol) de forma consecutiva. Calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y agitar durante 18 horas. Extraer la solución con agua (4 l), bicarbonato de sodio saturado (4 l) y salmuera (4 l). Tratar la fase orgánica con etilendiamina (8 ml), agitar durante 15 minutos y retroextraer con ácido cítrico acuoso al 10 % (4 l). Secar la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar al vacío para obtener un aceite amarillo (484 g), que solidifica durante toda una noche. Disolver en éter metil-*t*-butílico (1 l) y concentrar a volumen bajo. Añadir hexanos (2 l) y permitir a la mezcla reposar durante una hora. Filtrar los sólidos blancos y lavar con hexanos. Secar el sólido blanco (2666,44 pascales (20 mm de Hg)/60 °C) durante toda una noche para obtener el compuesto del título (354 g, al 68 %). $[\alpha]_D^{20} + 56,3$ (c = 1,0 en metanol). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,43 (s, 9H), 1,46 (s, 9 H), 2,05-2,10 (m, 2H), 2,26-2,35 (m, 2H), 3,48-3,56 (m, 2H), 3,58-3,61 (m, 1H), 3,64-3,70 (m, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 4,27-4,29 (m, 1H), 4,34-4,38 (m, 2H).

Preparación 8

Éster 1-*tert*-butílico éster 2-metilico del ácido (2R, 4R)-4-bromo-pirrolidina-1,2-dicarboxílico

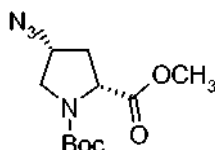


A una solución de éster 1-*tert*-butílico éster 2-metilico del ácido (2R, 4R)-4-hidroxi-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (320 g, 1,30 mol) y tetrabromuro de carbono (540 g, 1,94 mol) en diclorometano (3,2 l) a 0-5 °C (baño de hielo seco/diclorometano) añadir trifenilfosfina (1,95 mol, 514 g) en partes durante 30 minutos y agitar a temperatura ambiente durante 4 h. Añadir etanol (3,2 l) y agotar durante 2 horas adicionales. Transferir la reacción a una garrafa de

boca ancha de 18 l y añadir éter (8 l) hasta que tiene lugar la precipitación. Agitar la mezcla durante la noche. Eliminar por filtración los sólidos y concentrar la fase de éter. Disolver el residuo aceitoso en diclorometano y filtrar a través de un tapón de sílice eluyendo con diclorometano hasta que no se pueda detectar más producto. Concentrar la capa de diclorometano y tratar con acetato de etilo al 5 % en hexanos (4 l) causando que se forme un sólido blanco. Hacer pasar la mezcla a través de un tapón de sílice eluyendo con acetato de etilo al 5 % en hexanos y recoger solo las fracciones que contienen el producto deseado. Concentrar la solución, disolver en acetato de etilo al 5 % en hexanos (2 l) y purificar a través de un lecho corto de gel de sílice de 1 kg eluyendo con acetato de etilo al 5 % en hexanos para obtener el compuesto del título como un aceite amarillento (372,4 g, al 93 %). $[\alpha]_D^{20} + 53,6$ ($c = 1,0$ en metanol). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1,33 y 1,39 (dos s, 9H), 2,40 (m, 1H), 2,53 (m, 1H), 3,35 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,80 (m, 1H), 4,35 (c, 1H), 4,73 (m, 1H).

Preparación 9

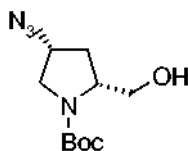
Éster 1-*tert*-butílico éster 2-metílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-azido-pirrolidina-1,2-dicarboxílico



Añadir azida de sodio (157 g, 2,39 mol) a éster 1-*tert*-butílico éster 2-metílico del ácido (2*R*, 4*S*)-4-bromo-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (370 g, 1,20 mol) en *N,N*-dimetilformamida (2,5 l) y calentar a 70-75 °C durante 16 horas en nitrógeno. Enfriar a temperatura ambiente, diluir con agua (5 l) y extraer con acetato de etilo (3 l). Lavar con salmuera (2 l). Extraer la capa de salmuera con acetato de etilo (3 l), combinar las fases orgánicas, secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar para obtener un aceite (324,5 g). Disolver el material en éter (2 l), lavar con agua (2 X 2 l), secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar para obtener 261,2 g de un aceite amarillo oscuro. Retroextraer la fase acuosa con éter (2 X 2 l), secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar para obtener 7,3 g adicionales de producto. Rendimiento general 268,5 g (al 83 %). $[\alpha]_D^{20} + 39,5$ ($c = 1,0$ en metanol). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,40-1,41 (s, 9H), 2,09-2,13 (m, 1H), 2,40-2,44 (m, 1H), 3,37-3,45 (m, 1H), 3,61-3,65 (m, 1H), 3,67-3,69 (s, 3H), 4,09-4,15 (m, 1H), 4,25-4,38 (m, 1H).

Preparación 10

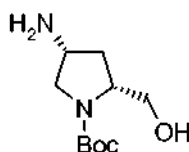
Éster *tert*-butílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-azido-2-hidroximetil-pirrolidina-1-carboxílico



Añadir borohidruro de litio (8,50 g, 351 mmol) a una solución de éster 1-*tert*-butílico éster 2-metílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-azido-pirrolidina-1,2-dicarboxílico (95 g, 351 mmol) en éter (1 l) a -30 °C en nitrógeno. Permitir a la temperatura elevarse a 0 °C durante 1,5 horas y agitar durante 2 horas adicionales. Enfriar a -70 °C y añadir bicarbonato de sodio acuoso saturado (1 l) gota a gota. Permitir calentar a temperatura ambiente, separar las capas y extraer la fase acuosa con éter (1 l). Combinar las capas de éter, secar sobre sulfato de sodio y concentrar. Secar el material resultante para obtener un aceite amarillo (82 g, al 96 %). $[\alpha]_D^{20} + 20,3$ ($c = 1,0$ en metanol). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1,38 (s, 9H), 1,99 (s a, 1H, OH), 2,20 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,50-3,78 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,78 (m, 1H).

Preparación 11

Éster *tert*-butílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-amino-2-hidroximetil-pirrolidina-1-carboxílico

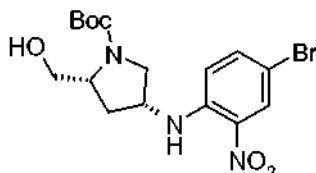


Hidrogenar una mezcla de éster *tert*-butílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-azido-2-hidroximetil-pirrolidina-1-carboxílico (225 g, 0,93 mol) y paladio al 10 % sobre carbono (22,5 g, pre-humedecido con tolueno) en metanol (2,3 l) a 103421,39

pascales (15 psi) de hidrógeno a temperatura ambiente durante 16 h. Eliminar por filtración el catalizador y concentrar el filtrado para obtener el compuesto del título como un aceite (198 g, al 92 %). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1,38 (s, 9H), 1,58 (m, 1H), 2,16 (m, 1H), 2,95 (m, 1H), 3,20-3,58 (m, 6H), 3,61 (m, 1H), 3,65 (s a, 1H).

Preparación 12

5 Éster *terc*-butílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-(4-bromo-2-nitro-fenilamino)-2-hidroxietil-pirrolidina-1-carboxílico

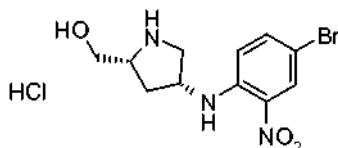


10 Someter a reflujo una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-amino-2-hidroximetil-pirrolidina-1-carboxílico (198 g, 0,92 mol), 5-bromo-fluoronitrobenceno (224 g, 0,98 mol), trietilamina (273 ml, 1,96 mol) en acetato de etilo (2 l) durante 16 horas en nitrógeno con agitación vigorosa. Enfriar a temperatura ambiente y lavar con salmuera. Retroextraer la fase de salmuera con acetato de etilo (1 l), combinar las fases orgánicas, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar. Disolver el sólido resultante en acetato de etilo caliente (2 l), concentrar a aproximadamente 500 ml y permitir a los cristales comenzar a formarse. Tratar la solución lentamente con hexanos (2 l) y permitir a la mezcla permanecer a temperatura ambiente durante 2 horas. Recoger el sólido amarillo por filtración, lavar con hexanos y secar a 40 °C/2666,44 pascales (20 mm de Hg) para obtener 227 g de producto deseado. El

15 filtrado se concentra a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna de gel desílce (acetato de etilo/diclorometano/heptano 2:3:5 que se incrementa gradualmente a acetato de etilo/heptano 2:3) para obtener 54 g adicionales de producto deseado. Rendimiento General: 281 g (70%). $[\alpha]_D^{20} + 81$ ($c = 1,0$ en metanol). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1,40 (s, 9H), 1,90 (m, 1H), 2,48 (s a, 1H), 3,14 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,81 (m, 2H), 4,29 (m, 1H), 5,12 (m, 1H), 7,08 (d, 1H), 7,65 (dd, 1H), 8,15 (d, 1H), 8,57 (d a, 1H, NH).

20 Preparación 13

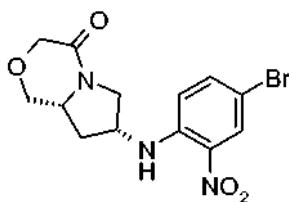
(2*R*, 4*R*)-[4-(4-bromo-2-nitro-fenilamino)-pirrolidin-2-il]-metanol, clorhidrato



25 A una solución de éster *terc*-butílico del ácido (2*R*, 4*R*)-4-(4-bromo-2-nitro-fenilamino)-2-hidroximetil-pirrolidina-1-carboxílico (125,5 g, 0,301 mol) en diclorometano (400 ml) añadir ácido clorhídrico 4 N en dioxano (800 ml) y agitar durante 4 horas a temperatura ambiente. Recoger el precipitado por filtración, lavar con éter y secar a 2666,44 pascales (20 mm de Hg)/60 °C para obtener el compuesto del título (105,2 g, al 99 %). $[\alpha]_D^{20} + 89,6$ ($c = 1,0$ en metanol). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1,80-1,85 (m, 1H), 2,54-2,59 (m, 1H), 3,43-3,51 (m, 3H), 3,56-3,63 (m, 1H), 3,69-3,72 (m, 2 H), 4,50 - 4,51(m, 1H), 5,60 (s a, 1H), 7,10 (d, 1H), 7,65 (dd, 1H), 8,14 (d, 1H), 8,95 (s a, 1H), 9,91 (s a, 1H).

30 Preparación 14

(7*R*, 8*aR*)-7-(4-bromo-2-nitro-fenilamino)-tetrahidro-pirrol[2,1-*c*][1,4]oxazin-4-ona



A una solución en agitación de (2*R*, 4*R*)-[4-(4-bromo-2-nitro-fenilamino)-pirrolidin-2-il]-metanol, clorhidrato (54.5 g, 155 mmol) en tetrahidrofurano (375 ml) y agua (376 ml) añadir hidróxido de sodio 5 N gota a gota hasta que el pH es

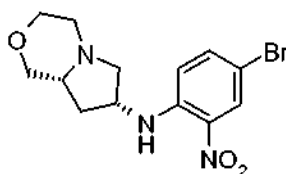
10-12. Añadir cloruro de cloroacetilo (27,3 ml, 337 mmol) a través de un embudo de goteo gota a gota durante 30 min. Usando otro embudo de goteo, añadir hidróxido de sodio 5 N durante la adición de cloruro ácido a una velocidad tal como para mantener el pH interno a 8-12. Agitar durante 6 horas, recoger el sólido que se ha formado por filtración y lavar con agua. Retirar el componente orgánico del filtrado a presión reducida y recoger los sólidos por filtración.

5 Combinar los lotes sólidos y secar a 60 °C/2666,44 pascales (20 mm de Hg) para obtener 51,4 g. Suspender el sólido en metanol al 2 % en diclorometano (1,5 l) y rotar en un evaporador rotatorio a 40 °C durante una hora. Recoger el precipitado por filtración (11 g) y descartar. Hacer pasar el filtrado a través de un tapón de gel de sílice eluyendo con diclorometano y concentrar el eluyente para obtener el compuesto del título como un sólido naranja amarillento (32,8 g, al 60 %). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,68 (d, 1H); 2,42 (d, 1H); 3,37 (m, 1H); 3,49 (d, 1H); 3,75-3,91 (m, 3H); 4,10 (m, 1H); 4,48 (d, 1H); 7,18 (d, 1H); 7,64 (d, 1H); 7,93 (m, 1H); 8,19 (s, 2H).

10

Preparación 15

(7R, 8aR)-(4-bromo-2-nitro-fenil)-(hexahidro-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-amina



15 Añadir (7R, 8aR)-7-(4-bromo-2-nitro-fenilamino)-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-4-ona (32,1 g, 90,1 mmol) a tetrahydrofurano anhidro (450 ml) y enfriar a 0 a 5 °C. Añadir complejo borano-dimetilsulfuro (26 ml, 0,279 mol) durante 10 min. Calentar la mezcla de reacción a reflujo durante 3 horas. Enfriar la mezcla de reacción en un baño de hielo y añadir con precaución metanol (450 ml) gota a gota. Añadir ácido clorhídrico 4 N (450 ml) y someter a reflujo durante 2 horas. Enfriar a aproximadamente 40 °C y ajustar el pH a 10-12 con adición gota a gota con precaución de hidróxido de sodio 5 N. Retirar el disolvente orgánico a presión reducida. Diluir la fase acuosa con agua (1,2 l) y extraer con diclorometano (1,2 l). Secar la fase orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar para obtener un aceite. En este punto combinar el aceite con la materia prima a partir de una preparación idéntica anterior (empezando con 30,2 g de material de partida de amida). Hacer pasar el aceite a través de un tapón de gel de sílice con cloruro de metileno para retirar un componente de R_f superior. Eluir con metanol al 1 % en diclorometano y concentrar para obtener un sólido (57,8 g). Suspender el sólido en éter (1 l) y permitir reposar durante toda una noche. Recoger el sólido por filtración y lavar con una cantidad pequeña de éter para obtener 47,5 g. Concentrar el filtrado, suspender en éter (100 ml) y permitir reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Recoger 3,1 g adicionales de producto desecado por filtración. Concentrar el filtrado y purificar el residuo por filtración de tapón de sílice para obtener 2,9 g adicionales de un sólido naranja. Combinar todos los sólidos para obtener el compuesto del título (53,5 g, al 89 %). [α]_D²⁰ -36 (c = 1,0 en DMSO). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,21 (m, 1H), 2,06 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,42 (m, 2H), 2,87 (d, 1H), 2,95 (d, 1H), 3,18 (t, 1H), 3,42 (t, 1H), 3,73 (d, 1H), 3,85 (d, 1H), 4,19 (m, 1H), 7,03 (d, 1H), 7,66 (dd, 1H), 8,01 (d, 1H), 8,18 (s, 1H). CL-EM m/z 342,0, 344,0 (proporción isotópica 1:1) [M+H]⁺.

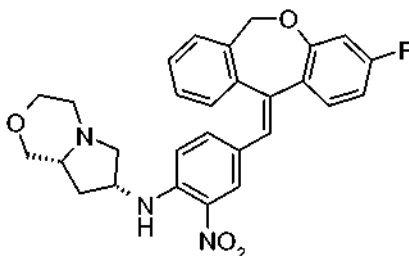
20

25

30

Preparación 16

(E)-[4-(3-fluoro-6H-dibenzo[b,e]oxepin-11-ilidenometil)-2-nitro-fenil]-((7R, 8aR)-hexahidro-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-amina



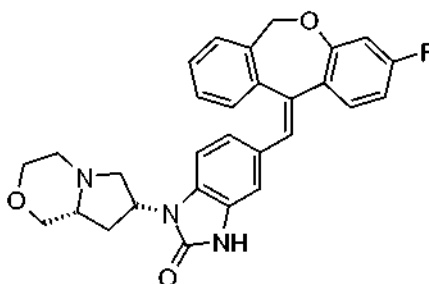
35 Cargar un matraz con (7R, 8aR)-(4-bromo-2-nitro-fenil)-(hexahidro-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-amina (50,9 g, 0,149 mol), (E)-2-((3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilidena)metil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (57,5 g, 0,163 mol), trifetilfosfina (10,1 g, 39 mmol) y metóxido de sodio (19,7 g, 0,346 mol) en tetrahydrofurano (1 l) y metanol (500 ml). Hacer burbujear nitrógeno a través de la mezcla durante 30 minutos. Añadir acetato de paladio (II) (3,00 g, 13 mmol) y hacer burbujear nitrógeno a través de la mezcla durante 30 minutos adicionales. Calentar a reflujo (60 °C) en nitrógeno durante 16 horas. Enfriar a temperatura ambiente, filtrar a través de tierra de diatomeas y concentrar al vacío para obtener un sólido. Disolver en acetato de etilo/salmuera 1:1 (2 l) y hacer pasar a través de un lecho de tierra de diatomeas. Lavar el lecho con acetato de etilo/salmuera 1:1 (2 X 1 l) y después con metanol al 10 % en diclorometano

40

(4 X 1 l). Separar las capas y combinar las fases orgánicas. Secar la fase orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar para obtener un aceite. Disolver el aceite en diclorometano y hacerlo pasar a través de un lecho corto de gel de sílice. Aclarar el lecho corto con diclorometano hasta que se retiró el componente TLC de R_f superior. Eluir con metanol al 1 % en diclorometano y concentrar al vacío para obtener una espuma. Disolver en acetato de etilo (2 l) y concentrar a aproximadamente 200 ml. Añadir hexanos (1,5 l) y permitir a la suspensión permanecer a temperatura ambiente durante una hora. Recoger el sólido naranja por filtración y secar a 50 °C/2666,44 pascales (20 mm de Hg) para obtener el compuesto del título (53 g, al 73 %). $[\alpha]_D^{20}$ -26 (c = 1,0 en DMSO). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,08 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 2,17 (m, 1H), 2,41 (m, 2H), 2,88 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 3,73 (d, 1H), 3,82 (d, 1H), 4,12 (m, 1H), 5,02 (s amplio, 1H), 5,59 (s amplio, 1H), 6,60 (d, 1H), 6,81 (m, 2H), 6,96 (s, 1H), 7,05 (m, 2H), 7,28 (t, 1H), 7,38 (t, 1H), 7,60 (m, 2H), 7,84 (s, 1H), 8,05 (d, 1H). CL-EM m/z = 458,3 [M+H]⁺.

Ejemplo 1

5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (Forma I)



Hidrogenar una mezcla de (E)-[4-(3-fluoro-6H-dibenzo[b,e]oxepin-11-ilidenometil)-2-nitro-fenil]-((7R,8aR)-hexahidro-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-amina (52 g, 0,107 mol), trietilamina (33 ml, 0,237 mol) y platino al 5 % sobre carbono (18 g) en tetrahidrofurano (450 ml) a temperatura ambiente a 344737,95 pascales (50 psi) durante 2 h. Eliminar el catalizador por filtración, aclarar con tetrahidrofurano y concentrar para obtener una espuma marrón. Disolver la espuma en tetrahidrofurano anhidro (500 ml) y enfriar en un baño de hielo. Añadir trifosgeno (31,5 g, 0,106 mol) en tetrahidrofurano (450 ml) gota a gota durante 30 minutos y agitar a temperatura ambiente durante 16 h. Concentrar la solución, disolver el metanol al 5 % en diclorometano y purificar a través de un tapón de gel de sílice corto. Concentrar para obtener un sólido marrón. Suspender el sólido en bicarbonato de sodio saturado (1,5 l) y agitar sobre el evaporador rotatorio durante una hora. Filtrar y secar *al vacío*. Disolver en metanol/diclorometano 1:1 caliente (aproximadamente 6 l) y tratar con resina reticulada de poli(4-vinilpiridina) al 2 % (170 g). Agitar la suspensión durante 30 minutos y filtrar a través de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado a aproximadamente 1,5 l de volumen y recoger los sólidos resultantes por filtración. Secar a 80 °C/2666,44 pascales (20 mm de Hg) durante toda una noche para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (38,1 g, al 74 %). $[\alpha]_D^{20}$ -20,5 (c = 1,0 en DMSO). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,48 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 2,19 (m, 2H), 2,52 (m, 1H), 2,91 (d, 1H), 3,03 (d, 1H), 3,25 (t, 1H), 3,50 (t, 1H), 3,79 (d, 1H), 3,88 (d, 1H), 4,95 (m, 1H), 5,03 (s amplio, 1H), 5,60 (s amplio, 1H), 6,59 (m, 2H), 6,78 (m, 2H), 6,97 (s, 1H), 7,02 (d, 1H), 7,25 (t, 1H), 7,38 (t, 1H), 7,48-7,61 (m, 3H), 10,72 (s, 1H, NH). CL-EM m/z 484,0 [M+H]⁺.

Usando material preparado como se describe en Ejemplo 1, se obtienen patrones de difracción en polvo de rayos X y revelan una forma de cristal (Forma I) que tiene posiciones de pico características (valores de °2θ) de aproximadamente 10,5, 13,0, 15,5 y 19,7. Las características del punto de fusión del material se determinan por DSC. Aparece fusión = 298,9 °C

Ejemplo 1(a)

5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (Forma II)

Añadir 117,7 mg de 5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (preparada como se describe anteriormente en el Ejemplo 1) dentro de un vial y mezclar con 2,5 ml de DMAC en una placa de agitación a 1000 rpm y a 70 °C hasta que se disuelven. Añadir agua a la mezcla lentamente hasta turbidez después retirar calor. Continuar agitando durante 30 minutos hasta que precipite un sólido blanco de la solución. Recoger los sólidos por filtración y secar durante toda una noche a 40 °C.

Usando material preparado como se describe en Ejemplo 1, (a) se obtienen patrones de difracción en polvo de rayos X y revelan una forma de cristal (Forma I) que tiene posiciones de pico características (valores de °2θ) de aproximadamente 11,3, 12,1, 18,8 y 21,0.

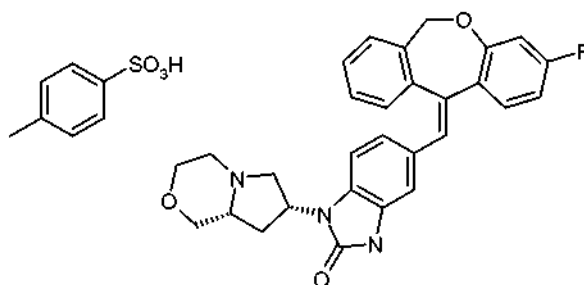
Procedimientos alternativos:

- 5 (i) Extraer una suspensión de 4-metilbencenosulfonato de 5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (10,2 g, 15,55 mmoles) (preparado esencialmente como se describe en el Ejemplo 2 más adelante) en NaOH 1 N (200 ml) con solución de MeOH al 5 %/CHCl₃ (5 X 100 ml) en un embudo separador. Lavar la fase orgánica con salmuera, secar sobre sulfato de sodio, filtrar a través de un filtro plegado y concentrar en el vacío. Secar el residuo en horno al vacío a 50 °C durante toda una noche para obtener sólido blanco (6,71 g, recuperación al 90 %). CL-EM (4 minutos): TR = 1,87 minutos, al 100 % M+H = 484,2.
- 10 (ii) Tratar una muestra de 0,1 g de material de procedimiento alternativo (i), anterior, con 1 ml de DMAc y calentar la suspensión en un baño de aceite a 80 °C durante 30 min. Añadir 15 ml de AcCN a la solución, calentar en un baño de aceite a 80 °C durante 30 minutos, después enfriar a temperatura ambiente con agitación. Los sólidos se recogen por filtración y después se secan en horno al vacío a 50 °C durante toda una noche para recuperar 74,5 mg de producto.
- 15 (iii) Tratar una muestra de 0,1 g de material de procedimiento alternativo (i), anterior, con 20 ml de AcCN y calentar la suspensión resultante en un baño de aceite a 80 °C durante 30 minutos, después enfriar a temperatura ambiente con agitación. Los sólidos se recogen por filtración y después se secan en horno al vacío a 50 °C durante toda una noche para recuperar 81,8 mg de producto.
- 20 (iv) Tratar una muestra de 0,1 g de material de procedimiento alternativo (i), anterior, con 20 ml de IPA y calentar la suspensión resultante en un baño de aceite a 80 °C durante 30 minutos, después enfriar a temperatura ambiente con agitación. Los sólidos se recogen por filtración y después se secan en horno al vacío a 50 °C durante toda una noche para recuperar 92,8 mg de producto.

Usando material preparado como se describe en Procedimiento alternativo (i), anterior, la difracción en polvo de rayos X revela una forma cristalina que tiene posiciones de pico características (valores de 2θ) de aproximadamente 11,3, 12,1, 18,8 y 21,0 (Forma II).

Ejemplo 2

5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona, sal tosilato



- 30 Calentar una solución de monohidrato del ácido p-toluenosulfónico (51,70 mmol, 9,98 g) en dimetilacetamida (50 ml) en un baño de aceite a 40 °C durante 30 minutos. Añadir a la solución homogénea 5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (51,70 mmol, 25,00 g) en porciones de 5 g con agitación vigorosa. Lavar el embudo de polvo y la botella recipiente con dimetilacetamida (25 ml) y agitar la suspensión a 40 °C durante 30 minutos hasta que el sólido se disuelve completamente. Situar la solución homogénea marrón clara en una corriente de gas nitrógeno durante toda una noche a 30 °C. Diluir el residuo con acetonitrilo (200 ml) y sonicar en un baño de agua durante 20 minutos. Calentar la suspensión de sólido blanco en un baño de aceite a 60 °C durante 3 horas. Enfriar a temperatura ambiente y recoger el sólido por filtración. Secar en un horno al vacío a 40 °C durante 2 días para obtener el compuesto del título (32,88 g, al 97 %). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2,00 (m, 0,5H), 2,29 (m, 0,5H), 2,44 (s, 3H), 2,48 (m, 0,5H), 3,1-4,2 (m, 7H), 5,10 (m amplio, 2H), 5,55 (s amplio, 1H), 6,60 (dd, 1H), 6,67 (d, 1H), 6,78 (m, 2H), 6,95 (m, 3H), 7,08 (d, 2H), 7,21 (t, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,43 (d, 2H), 7,57 (m, 2H), 9,65 (s, 0,5H), 10,25 (s, 0,5H), 10,98 (s, 0,5H), 11,14 (s, 0,5H). CL-EM m/z 484,2 [M+H]⁺
- 40

Procedimientos alternativos:

- 45 (a) Disolver 85,8 mg (0,177 mmol) de 5-((E)-(3-fluorodibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilideno)metil)-1-((7R,8aR)-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]oxazin-7-il)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ona (preparada esencialmente como se describe en el Ejemplo 1) en dimetilacetamida (2 ml). Añadir monohidrato del ácido p-toluenosulfónico (43 mg, 0,226 mmol) y agitar la mezcla en una solución transparente. Añadir acetonitrilo (7 ml) y evaporar para obtener

un aceite transparente. Añadir agua (2 ml) y sonicar la muestra. Después de que un sólido blanco precipita, suspender la mezcla durante 10 minutos. Filtrar y obtener un sólido.

- (b) Disolver 98,0 mg de 5-((*E*)-(3-fluorodibenzo[*b,e*]oxepin-11(6*H*)-ilideno)metil)-1-((7*R*,8*aR*)-hexahidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazin-7-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-ona (preparada esencialmente como se describe en el Ejemplo 1) en 2,5 ml de DMAC. Añadir 1,2 equivalentes de monohidrato del ácido *p*-toluenosulfónico y agitar hasta que la solución es transparente e incolora. Añadir 2 ml de acetona al 88 % después 16 ml de agua se evaporan para retirar disolventes. Al aceite transparente resultante, añadir 1 ml de acetona y sonicar. Secar el gel resultante para obtener un sólido blanquecino. Disolver el sólido de nuevo en THF:H₂O 1:10 y evaporar para obtener un aceite transparente después sonicar con 5 ml de acetonitrilo. Después de que precipita un sólido blanco, suspender la muestra durante toda una noche. Filtrar y secar para obtener un sólido.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es 5-((*E*)-(3-fluorodibenzo[*b,e*]oxepin-11(6*H*)-ilideno)metil)-1-((7*R*,8*aR*)-hexahidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazin-7-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 5-((*E*)-(3-fluorodibenzo[*b,e*]oxepin-11 (6*H*)-ilideno)metil)-1-((7*R*,8*aR*)-hexahidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazin-7-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-ona.
3. Un compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en terapia.
4. Un compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en el tratamiento de fallo cardíaco congestivo, hipertensión, nefropatía diabética, o enfermedad renal crónica.
- 10 5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende un agente terapéutico adicional.