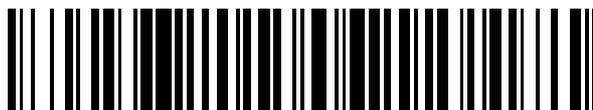


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 856**

51 Int. Cl.:

C07D 207/16 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2007** **E 12159851 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015** **EP 2468724**

54 Título: **Síntesis de compuestos de pirrolidina**

30 Prioridad:

21.12.2006 US 876290 P

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

09.02.2016

73 Titular/es:

**ZEALAND PHARMA A/S (100.0%)
Smedeland 36
2600 Glostrup, DK**

72 Inventor/es:

**ALIMARDANOV, ASAF RAGIM;
SUTHERLAND, KAREN WIGGINS;
MIRMEHRABI, MAHMOUD;
DESHMUKH, SUBODH S.;
KRISHNAN, LALITHA;
ZHOU, MAOTANG;
WANG, TING-ZHONG;
REN, JIANXIN;
CONSIDINE, JOHN LEO;
WU, CHARLES C.;
BRAZZILLO, JASON y
RAVEENDRANATH, PANOLIL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 558 856 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

Síntesis de compuestos de pirrolidina

- 5 En el presente documento se describen ciertos compuestos de pirrolidina, composiciones de los mismos y métodos para su preparación y uso.

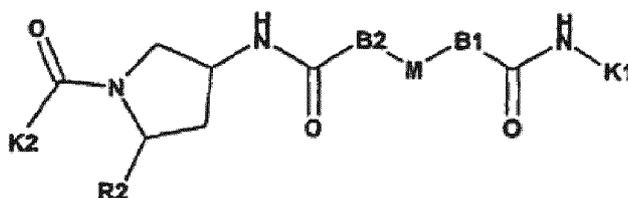
10 Generalmente, las uniones comunicantes son regiones especializadas de la membrana celular que contienen grupos de cientos a miles de canales densamente empaquetados que conectan directamente el citoplasma de dos células adyacentes. Los canales de las uniones comunicantes se componen de dos hemicanales o conexones, proporcionados por cada una de las dos células vecinas. Cada conexón, a su vez, se compone de seis proteínas llamadas conexinas.

15 Existe un creciente reconocimiento de que la comunicación intercelular facilitada por las uniones comunicantes es esencial para la homeostasis, la proliferación y la diferenciación celulares. Se piensa que estas estructuras son una vía para acoplar células y permitir la "interacción". La interacción entre las uniones comunicantes se conoce como "comunicación intercelular por unión comunicante" (GJIC, del inglés "gap junctional intercellular communication").

20 En el corazón, la conducción de los impulsos eléctricos se realiza a través de uniones comunicantes. La GJIC anormal se ha relacionado con diversas patologías, incluyendo las cardiopatías. Por ejemplo, se ha demostrado que los ratones heterocigóticos para el gen Cx43, que codifica una conexina ventricular específica, desarrollan arritmias ventriculares espontáneas y padecen muerte súbita cardíaca. La expresión reducida del Cx43 en ratones heterocigóticos está directamente relacionada con una mayor incidencia de arritmias ventriculares durante la isquemia. Varios otros estudios han demostrado la expresión reducida o la distribución alterada del Cx43 en corazones crónicamente isquémicos, hibernantes o hipertrofiados.

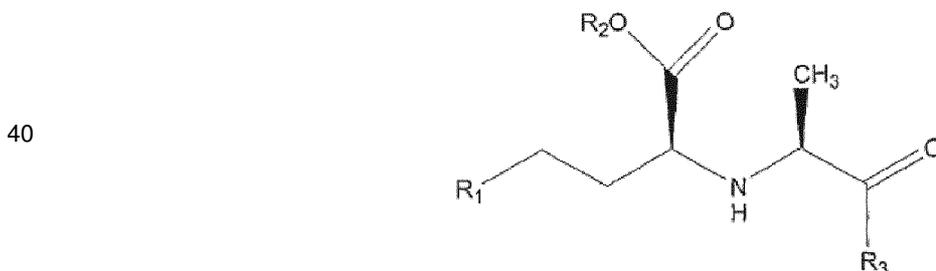
30 Se han identificado varios péptidos que influyen en la GJIC, incluyendo los péptidos antiarrítmicos AAP, AAP10 y HP5. Sin embargo, estos péptidos presentan características indeseables, incluyendo la baja estabilidad, la vida media corta y la falta de biodisponibilidad oral.

El documento WO2004/012731 A1 describe inhibidores de la triptasa de fórmula:



35 y describe su utilidad potencial en el tratamiento de trastornos incluyendo los trastornos de las vías respiratorias, las dermatosis y los trastornos intestinales inflamatorios.

El documento WO2004/101515 A1 describe un proceso para la preparación de compuestos de fórmula:



40 que tienen una acción inhibitoria de la ECA, en los que el grupo carboxi del aminoácido estereoespecífico se activa con una sal de uronio en presencia de un disolvente aprótico y un aminoácido activado se transforma adicionalmente con una amina apropiada en un inhibidor de la ECA o su precursor.

45 Li *et al.* (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, págs. 1287-1293, 2006) describe la síntesis de una serie de derivados de galoilpirrolidina y su utilidad como agentes antitumorales potenciales.

50 El documento WO2007/078990 A2 describe compuestos miméticos de lisina modificada que tienen una actividad farmacológica útil tal como la actividad antiarrítmica y propiedades de biodisponibilidad deseables.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que es monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

5 En algunas realizaciones, el compuesto tiene una temperatura de comienzo de la desolvatación de aproximadamente 104 °C.

10 En algunas realizaciones, el compuesto tiene dos transiciones endotérmicas con temperaturas de comienzo de aproximadamente 104 °C y 168 °C.

15 En algunas realizaciones, el compuesto tiene picos de difracción de rayos X de polvo a 12,5° 2θ y 19,0° 2θ, teniendo además opcionalmente picos de difracción de rayos X de polvo a 17,1° 2θ, 19,7° 2θ, 20,5° 2θ, 21,8° 2θ, 23,3° 2θ y 23,4° 2θ, teniendo además opcionalmente picos de difracción de rayos X de polvo a 5,4° 2θ, 20,7° 2θ, 21,2° 2θ, 23,1° 2θ, 26,4° 2θ y 27,4° 2θ.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con el primer aspecto para su uso en terapéutica.

25 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con el primer aspecto para su uso en un método de tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis, la inflamación del epitelio de las vías respiratorias, los trastornos del tejido alveolar, la incontinencia vesical, la deficiencia auditiva, las lesiones endoteliales, la diabetes de tipo I o de tipo II, la retinopatía diabética, la neuropatía diabética, la aterosclerosis, las afecciones relacionadas con el SNC, las convulsiones, la isquemia, los trastornos del tejido dental, las nefropatías, la anemia, la leucopenia, la trombocitopenia, la pancitopenia, las heridas superficiales, las heridas profundas resultado de traumatismos, las fracturas óseas, la disfunción eréctil, la incontinencia de la vejiga urinaria, el dolor neuropático, la inflamación subcrónica y crónica, el cáncer, la insuficiencia medular, el trasplante de células madre, las afecciones que surgen durante el trasplante de células y tejidos, las afecciones que surgen durante los procedimientos médicos, las afecciones causadas por un exceso de especies reactivas de oxígeno, de radicales libres o de óxido nítrico, las enfermedades o los trastornos del embarazo, la infertilidad femenina o el ictus, preferentemente para su uso en un método de tratamiento de las enfermedades cardiovasculares o en un método de tratamiento de la isquemia.

35 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con el primer aspecto para su uso en un método de prevención o de tratamiento de la lesión isquémica en uno o más órganos de un mamífero, en el que el órgano se selecciona opcionalmente entre el corazón, el sistema nervioso central, el riñón, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones y las extremidades.

40 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis, la inflamación del epitelio de las vías respiratorias, los trastornos del tejido alveolar, la incontinencia vesical, la deficiencia auditiva, las lesiones endoteliales, la diabetes de tipo I o de tipo II, la retinopatía diabética, la neuropatía diabética, la aterosclerosis, las afecciones relacionadas con el SNC, las convulsiones, la isquemia, los trastornos del tejido dental, las nefropatías, la anemia, la leucopenia, la trombocitopenia, la pancitopenia, las heridas superficiales, las heridas profundas resultado de traumatismos, las fracturas óseas, la disfunción eréctil, la incontinencia de la vejiga urinaria, el dolor neuropático, la inflamación subcrónica y crónica, el cáncer, la insuficiencia medular, el trasplante de células madre, las afecciones que surgen durante el trasplante de células y tejidos, las afecciones que surgen durante los procedimientos médicos, las afecciones causadas por un exceso de especies reactivas de oxígeno, de radicales libres o de óxido nítrico, las enfermedades o los trastornos del embarazo, la infertilidad femenina o el ictus, preferentemente para su uso en un método de tratamiento de las enfermedades cardiovasculares o en un método de tratamiento de la isquemia.

55 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la lesión isquémica en uno o más órganos de un mamífero, en el que el órgano se selecciona opcionalmente entre el corazón, el sistema nervioso central, el riñón, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones y las extremidades.

60 En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto de acuerdo con el primer aspecto, comprendiendo el método proporcionar una solución de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico en un medio de cristalización, en el que el medio de cristalización comprende al menos un disolvente orgánico miscible en agua y agua y mantener la solución durante un tiempo y en condiciones adecuadas para formar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

65 En algunas realizaciones, el al menos un disolvente orgánico miscible en agua comprende al menos un disolvente

seleccionado entre alcoholes miscibles en agua, cetonas miscibles en agua y éteres miscibles en agua, preferentemente seleccionados entre alcoholes C₁-C₄ miscible en agua, cetonas C₁-C₆ miscible en agua y éteres C₁-C₆ miscibles en agua.

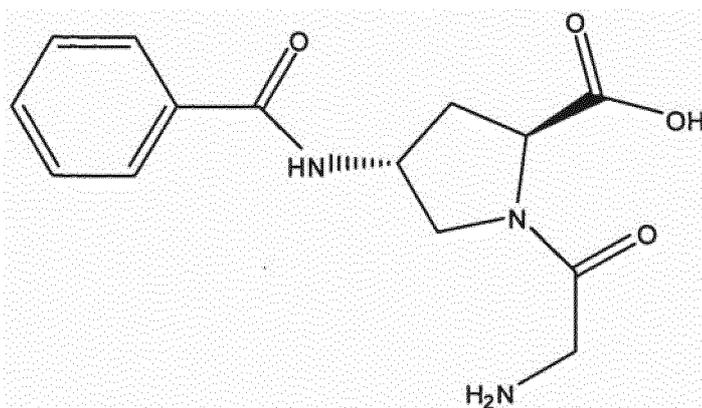
- 5 En algunas realizaciones, el al menos un disolvente orgánico miscible en agua comprende una mezcla de isopropanol, acetona y éter metil *t*-butílico.

En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas para formar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico comprenden mantener la solución a temperatura ambiente.

10

En algunas formas de realización, el medio de cristalización comprende hasta el 5 % en volumen de agua.

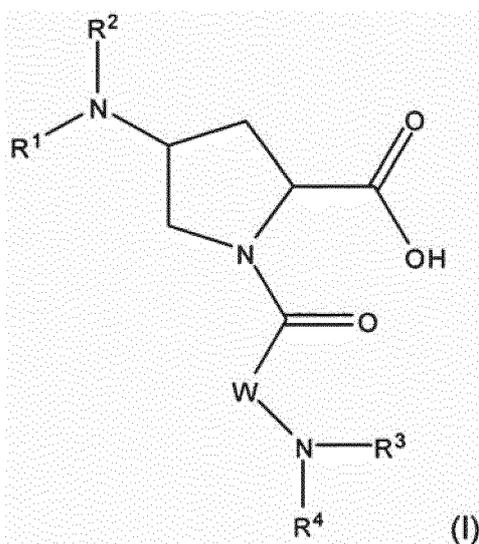
El compuesto ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico:



15

restablece y mantiene la integridad de las uniones comunicantes entre las membranas celulares y es útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a las comunicaciones intercelulares por uniones comunicantes anormales.

- 20 En el presente documento se describe un método para preparar un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo:



en la que:

25

uno de R¹ y R² es hidrógeno o alquilo C₁-C₆ y el otro es -C(O)R⁵;
en el que R⁵ se elige entre:

30

- arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;
- heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
- alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
- haloalquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
- aralquilo C₇-C₁₂ opcionalmente sustituido;
- heteroaralquilo opcionalmente sustituido que incluye 6-12 átomos;

cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y
 cicloalquenilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido;

W es alquileo C₁₋₆; y

5 R₃ y R₄ pueden ser iguales o diferentes y cada uno se elige independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, -C(O)OR⁶ y -C(O)R⁹;

en el que R⁶ es alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido; y

en el que R⁹ se elige entre

hidrógeno;

10 arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;

alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;

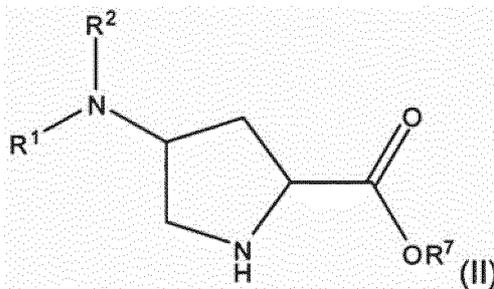
cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y

heterocicloalquilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;

15

comprendiendo el método:

convertir un compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo:

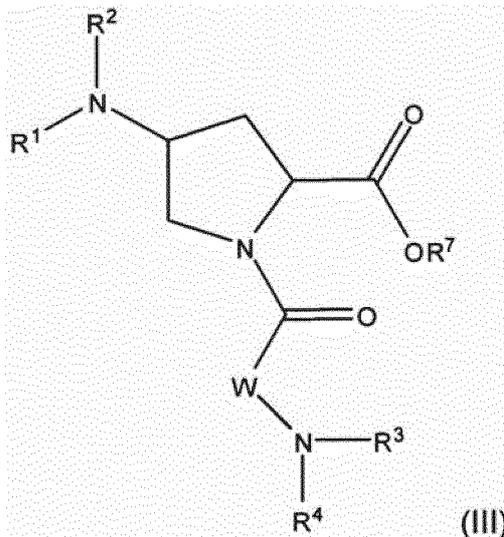


20

en la que:

25 R⁷ se elige entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; en un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo:

25

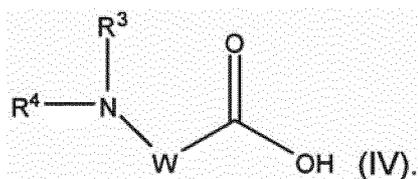


30

y donde R⁷ en la fórmula (III) es alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido,

hacer reaccionar el compuesto de fórmula (III) con un hidróxido de metal u otra base adecuada para proporcionar un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo. La conversión del compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo en un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo puede realizarse por acilación de una manera conocida. En particular, la conversión puede realizarse haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (II) con un compuesto que tiene la fórmula (IV)

35

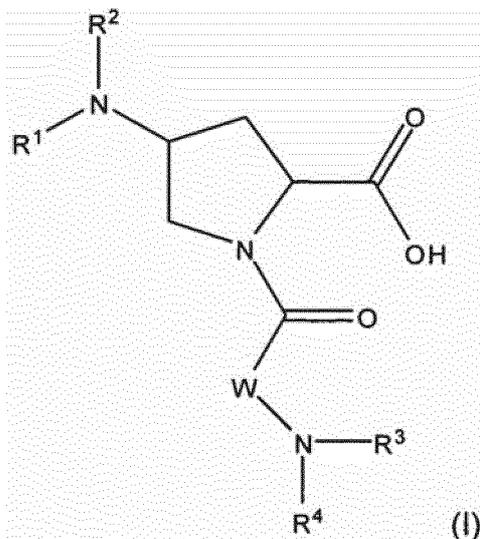


en la que W, R³ y R⁴ son como se definen en el presente documento o un derivado reactivo de los mismos, por ejemplo, un anhídrido mixto de los mismos.

5

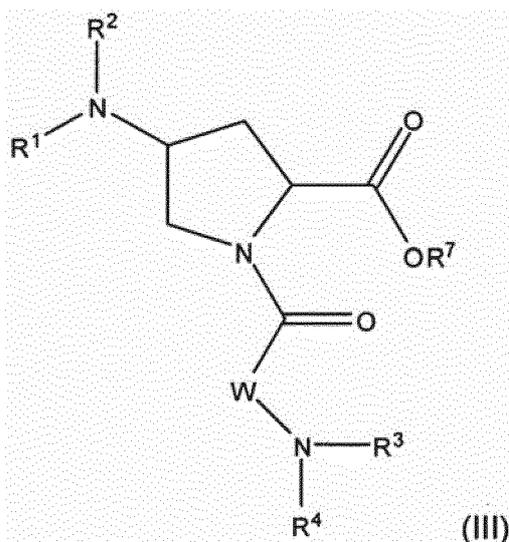
En el presente documento también se describe una composición que comprende

(1) un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo



10

y/o
un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo



15

en la que
uno de R¹ y R² es hidrógeno o alquilo C₁-C₆ y el otro es -C(O)R⁵;
en el que R⁵ se elige entre:

20

- arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;
- heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
- alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;

haloalquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
 aralquilo C₇-C₁₂ opcionalmente sustituido;
 heteroaralquilo opcionalmente sustituido que incluye 6-12 átomos;
 cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y
 cicloalqueno C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido;

W es alquileo C₁₋₆; y

R³ y R⁴ pueden ser iguales o diferentes y cada uno se elige independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, -C(O)OR⁶ y -C(O)R⁹;

en el que R⁶ es alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido; y

en el que R⁹ se elige entre hidrógeno;

arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;

alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;

cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y

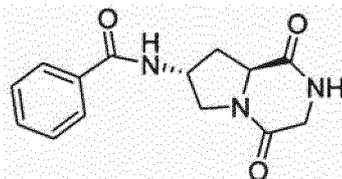
heterocicloalquilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos; y

R⁷ se elige entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido;

y

(2) una cantidad detectable de uno o más compuestos seleccionados entre:

N-((7*R*,8*aS*)-1,4-dioxooctahidropirrol[1,2-*a*]pirazin-7-il)benzamida o una sal de la misma, es decir, un compuesto de fórmula



o una sal del mismo;

trifenilfosfina;

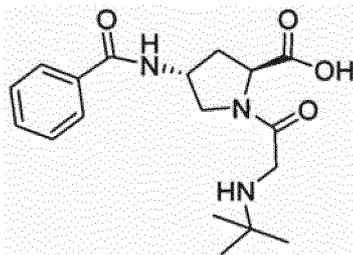
óxido de trifenilfosfina;

un dicarboxilato de hidrazina;

triethylamina;

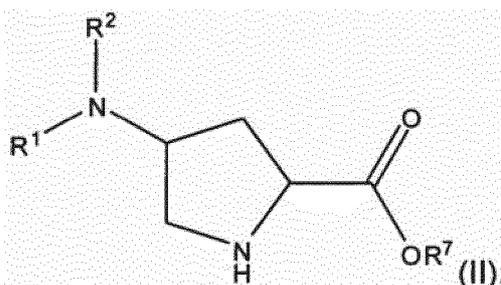
benzotriazol;

ácido (2*S*,4*R*)-4-benzamido-1-(2-(*terc*-butilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico o una sal del mismo, es decir, un compuesto de fórmula:



o una sal del mismo;

y un compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo:



En el presente documento también se describe un compuesto que es el clorhidrato del ácido (2*S*,4*R*)-1-(2-

aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

En el presente documento también se describe un compuesto que es el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

En el presente documento también se describe un método para preparar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico, que comprende proporcionar una solución del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico en un medio de cristalización, en el que el medio de cristalización comprende al menos un disolvente orgánico miscible en agua y agua y mantener la solución durante un tiempo y en condiciones adecuadas para formar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

En el presente documento también se describe una formulación farmacéutica que comprende uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y un compuesto descrito en el presente documento.

En el presente documento también se describe un método para tratar una afección seleccionada entre las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis, la inflamación del epitelio de las vías respiratorias, los trastornos del tejido alveolar, la incontinencia vesical, la deficiencia auditiva, las lesiones endoteliales, la diabetes de tipo I o de tipo II, la retinopatía diabética, la neuropatía diabética, la aterosclerosis, las afecciones relacionadas con el SNC, las convulsiones, la isquemia, los trastornos del tejido dental, las nefropatías, la anemia, la leucopenia, la trombocitopenia, la pancitopenia, las heridas superficiales, las heridas profundas resultado de traumatismos, las fracturas óseas, la disfunción eréctil, la incontinencia de la vejiga urinaria, el dolor neuropático, la inflamación subcrónica y crónica, el cáncer, la insuficiencia medular, el trasplante de células madre, las afecciones que surgen durante el trasplante de células y tejidos, las afecciones que surgen durante los procedimientos médicos, las afecciones causadas por un exceso de especies reactivas de oxígeno, de radicales libres o de óxido nítrico, las enfermedades o los trastornos del embarazo, la infertilidad femenina o el ictus, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto descrito en el presente documento o una formulación farmacéutica descrita en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La FIG.1 muestra los patrones de difracción de rayos X de polvo de preparaciones del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico en forma de un sólido amorfo y en forma de un monohidrato cristalino.

La FIG. 2 es el patrón de difracción de rayos X de polvo del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

La FIG. 3 es un análisis de calorimetría diferencial de barrido ("DSC") del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

La FIG. 4 es un análisis de DSC del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico amorfo.

La FIG. 5 es un análisis termogravimétrico ("TGA") del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

La FIG. 6 es un análisis de sorción de vapor dinámica del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.

La Fig. 7 es el análisis de sorción de vapor dinámica del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico amorfo.

Como se utiliza en el presente documento, cuando cualquier variable aparece más de una vez en una fórmula química, su definición en cada aparición es independiente de su definición en cualquier otra aparición.

Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados a lo largo de:

Boc	= <i>t</i> -butiloxi carbonilo
eq	= equivalente
Et	= etilo
EtOAc	=acetato de etilo
g	=gramo
HPLC	= cromatografía líquida de alto rendimiento
h	= horas o horas
cm	= centímetro o centímetros
kg	= kilogramo
l	= litro
CL	= cromatografía líquida
M	= molar
Me	= metilo
min	= minutos

ml	= mililitro
mmol	= milimol o mmoles
mol	= mol o moles
Ph	= fenilo
ppm	= partes por millón
Pr	= propilo
TEA	= trietilamina

Como se utilizan en la presente memoria descriptiva, generalmente se pretende que las siguientes palabras y frases tengan los significados como se establecen a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, la expresión "alquilo C₁-C₂₀" indica que el grupo puede estar ramificado o sin ramificar y puede contener de 1 a 20 (inclusive) átomos de carbono. De forma similar, la expresión "alquilo C₁-C₆" indica que el grupo puede estar
10 ramificado o sin ramificar y puede contener de 1 a 6 (inclusive) átomos de carbono. Cualquier átomo puede estar sustituido opcionalmente. Los ejemplos no limitantes de grupos alquilo incluyen, por ejemplo, metilo, etilo y *terc*-butilo.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "alquileno" se refiere a un radical alquilo bivalente, es decir, un radical alquilo que tiene dos puntos de unión. Por ejemplo, un grupo metileno es un grupo -CH₂- y un grupo etileno es un grupo -CH₂CH₂-.

20 Como se utiliza en el presente documento, el término "aralquilo" se refiere a un resto alquilo en el que un átomo de hidrógeno del alquilo está reemplazado por un grupo arilo. Uno de los carbonos del resto alquilo sirve como el punto de unión del grupo aralquilo a otro resto. El término "aralquilo" incluye también grupos en los que más de un átomo de hidrógeno en un resto alquilo se ha reemplazado por un grupo arilo. Cualquier átomo de anillo o de cadena puede estar sustituido opcionalmente por uno o más sustituyentes. Los ejemplos no limitantes de grupos "aralquilo" incluyen bencilo, 2-feniletilo (a veces denominado "fenetilo"), 3-fenilpropilo, benzhidrido (difenilmetilo) y grupos tritilo (trifenilmetilo).

25 Como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillo hidrocarbonado C₆-C₁₄ (por ejemplo, C₆-C₁₀, C₆) aromático monocíclico (C₆), bicíclico (C₁₀) o tricíclico (C₁₄). Cualquier átomo de anillo puede estar sustituido opcionalmente por uno o más sustituyentes. Los grupos arilo también pueden contener anillos fusionados. Los anillos fusionados son anillos que comparten un átomo de carbono común. Los ejemplos no
30 limitantes de restos arilo incluyen fenilo, naftilo y antraceno.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "convertir" se refiere a una o más transformaciones químicas, que pueden realizarse in situ o con el aislamiento de compuestos intermedios. Las transformaciones pueden incluir hacer reaccionar los compuestos de partida o los intermedios con reactivos adicionales utilizando técnicas y protocolos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los intermedios pueden utilizarse con o sin purificación (por ejemplo, filtración, destilación, sublimación, cristalización, trituración, extracción en fase sólida, cromatografía).

40 Como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a grupos hidrocarbonados saturados monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos o a otros grupos hidrocarbonados saturados policíclicos. Cualquier átomo puede estar sustituido opcionalmente por uno o más sustituyentes. Un carbono de anillo sirve como el punto de unión de un grupo cicloalquilo a otro resto. Los grupos cicloalquilo pueden contener anillos fusionados. Los anillos fusionados son anillos que comparten un átomo de carbono común. Los ejemplos no limitantes de restos cicloalquilo incluyen
45 ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo y norbornilo (biciclo[2.2.1]heptilo).

50 Como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquenilo" se refiere a grupos hidrocarbonados parcialmente insaturados monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, o a otros grupos hidrocarbonados parcialmente insaturados policíclicos. Un carbono de anillo (por ejemplo, saturado o insaturado) es el punto de unión del sustituyente cicloalquenilo. Cualquier átomo puede estar sustituido opcionalmente por uno o más sustituyentes. Los
55 grupos cicloalquenilo pueden contener anillos fusionados. Los anillos fusionados son anillos que comparten un átomo de carbono común. Los ejemplos no limitantes de restos cicloalquenilo incluyen ciclohexenilo, ciclohexadienilo o norbornenilo.

60 Como se utiliza en el presente documento, se pretende que una "cantidad detectable" de un compuesto signifique una cantidad suficiente para proporcionar la identificación positiva pero no necesariamente la cuantificación del compuesto mediante cualquier técnica analítica adecuada, por ejemplo HPLC.

Como se utiliza en el presente documento, el término "halo" o "halógeno" se refiere a cualquier radical de flúor, cloro,

productos de solvatación y las formas amorfas. Las formas amorfas consisten en disposiciones desordenadas de moléculas y no poseen una red cristalina distinguible. Los productos de solvatación son aductos sólidos cristalinos que contienen cantidades ya sea estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente incorporado dentro de la estructura cristalina. Si el disolvente incorporado es el agua, los solvatos también se conocen habitualmente como hidratos.

Como se utilizan en el presente documento, las expresiones "hacer reaccionar" o "poner en contacto" se refieren a la reunión de los reactivos químicos señalados de manera que ocurre una transformación química que genera un compuesto diferente de cualquiera introducido inicialmente en el sistema. La reacción o el contacto pueden ocurrir en presencia o ausencia de disolvente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sales" se deriva de la combinación de un compuesto y un ácido o una base orgánicos o inorgánicos. Los compuestos descritos en el presente documento son útiles tanto en forma libre como de sal. La frase "sal farmacéuticamente aceptable" significa aquellas sales que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con tejidos de seres humanos y de animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares y se adecúan a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge *et al.* describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, vol. 66, págs. 1-19. Las sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos descritos en el presente documento o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido orgánico adecuado.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de los presentes contenidos que tienen un resto ácido pueden formarse utilizando bases orgánicas e inorgánicas. Las sales adecuadas formadas con bases incluyen las sales de metales, tales como las sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, por ejemplo las sales de sodio, potasio o magnesio; las sales de amonio y las sales de amins orgánicas, tales como aquellas formadas con morfolina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, una mono-, di- o tri-alkuilamina inferior (por ejemplo, una etil-*terc*-butil-, dietil-, diisopropil-, trietil-, tributil- o dimetilpropilamina) o una mono-, di- o trihidroxialquilamina inferior (por ejemplo, la mono-, di- o trietanolamina). También pueden formarse sales internas. De forma similar, cuando un compuesto de los presentes contenidos contiene un resto básico, las sales pueden formarse utilizando ácidos orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo, las sales pueden formarse a partir de los siguientes ácidos: acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, y canforsulfónico así como otros ácidos farmacéuticamente aceptables conocidos. También pueden formarse sales de adición de aminoácidos con aminoácidos tales como la lisina, la glicina o la fenilalanina. Las sales de adición de ácido representativas incluyen las sales de clorhidrato. Otras sales aceptables pueden encontrarse a través de los compendios que enumeran compuestos previamente aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "solución" significa una mezcla de uno o más solutos en uno o más disolventes. Se pretende que la solución abarque mezclas homogéneas, así como mezclas heterogéneas, tales como las suspensiones u otras mezclas que tengan una suspensión de material insoluble (no disuelto).

Como se utilizan en el presente documento, las expresiones "disolvente", "disolvente orgánico" o "disolvente inerte" significan cada una un disolvente inerte en las condiciones de la reacción que se describe junto con ellas (incluyendo, por ejemplo, benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahidrofurano ("THF"), dimetilformamida ("DMF"), cloroformo, cloruro de metileno (o diclorometano), éter dietílico, metanol, piridina y similares). A menos que se especifique lo contrario, los disolventes utilizados en las reacciones descritas en el presente documento son disolventes orgánicos inertes. Como se utiliza en el presente documento, el término "antidisolvente" significa una sustancia que reduce la solubilidad de un soluto en un disolvente. En algunas realizaciones, un antidisolvente es uno o más líquidos químicos o mezclas de los mismos en los que el compuesto que se purifica muestra una solubilidad menor que el disolvente en el que se disuelve parcial o totalmente.

En varios sitios de la presente memoria descriptiva, los sustituyentes de los compuestos descritos en el presente documento se desvelan en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que los presentes contenidos incluyan todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos e intervalos. Por ejemplo, se pretende específicamente que la expresión "alquilo C₁₋₆" desvele individualmente el alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₁-C₆, C₁-C₅, C₁-C₄, C₁-C₃, C₁-C₂, C₂-C₆, C₂-C₅, C₂-C₄, C₂-C₃, C₃-C₆, C₃-C₅, C₃-C₄, C₄-C₆, C₄-C₅ y C₅-C₆. Por ejemplo, también se pretende específicamente que la expresión "alquilo C₁₋₆" desvele individualmente el metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, isobutilo, etc.

Los materiales de partida, los intermedios y los productos de los métodos descritos en el presente documento pueden contener uno, dos o más centros asimétricos y por tanto aparecer en forma de racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales y mezclas enantioméricas o diastereoméricas. Todas dichas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente divulgación. Los compuestos descritos en el presente documento también pueden contener uniones (por ejemplo, enlaces carbono-carbono, enlaces carbono-nitrógeno tales como los enlaces amida) en las que la rotación del enlace está restringida

alrededor de esa unión en particular, por ejemplo, la restricción resultante de la presencia de un anillo o un doble enlace. En consecuencia, todos los isómeros *cis/trans* y *E/Z* y los isómeros rotacionales se incluyen expresamente en la presente divulgación. Los compuestos descritos en el presente documento también pueden representarse en múltiples formas tautoméricas, en dichos casos, la presente divulgación incluye expresamente todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en el presente documento, a pesar de que solo pueda representarse una única forma tautomérica. Todas dichas formas isoméricas de dichos compuestos se incluyen expresamente en la presente divulgación.

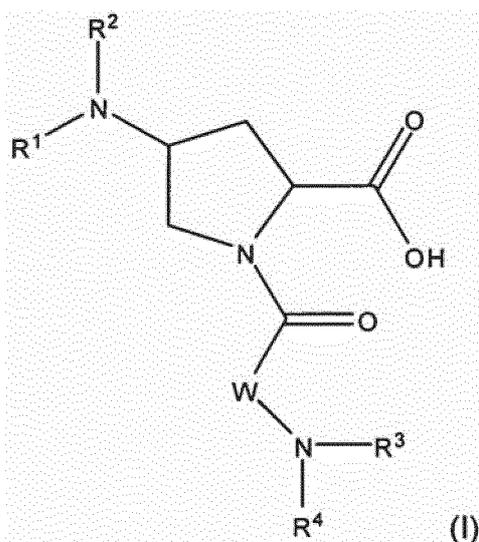
Los materiales de partida, los intermedios y los productos de los métodos descritos en el presente documento incluyen cada uno un anillo de pirrolidina que está sustituido en las posiciones 2 y 4 del anillo. Con fines de aclaración, cada una de las siguientes estereoquímicas de anillo absolutas se considera para los materiales de partida, los intermedios y los productos de los métodos descritos en el presente documento: 2S, 4R; 2R, 4S; 2S, 4S y 2R, 4R.

Cualquier material de partida, intermedio o producto de los métodos descritos en el presente documento puede aparecer en forma de una mezcla de estereoisómeros que tiene al menos aproximadamente el 60 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 %, más de aproximadamente el 99 %) de uno de los cuatro estereoisómeros posibles (por ejemplo, 2S, 4R; 2R, 4S; 2S, 4S o 2R, 4R). El material de partida, el intermedio o el producto puede estar sustancialmente libre de su enantiómero y de los otros dos estereoisómeros posibles. El material de partida, el intermedio o el producto puede ser uno de los cuatro estereoisómeros posibles (por ejemplo, 2S, 4R o 2S, 4S) en forma sustancialmente pura y puede estar sustancialmente libre de sus estereoisómeros, así como de otros materiales no relacionados con el estereoisómero, por ejemplo, disolventes, reactivos, subproductos de reacción y similares.

Cualquier material de partida, intermedio o producto de los métodos descritos en el presente documento puede aparecer en forma de una mezcla de estereoisómeros que tiene al menos aproximadamente el 60 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 %, más de aproximadamente el 99 %) de dos de los cuatro estereoisómeros posibles (por ejemplo, R, R y S, S; R, S y S, R; R, R y S, R; R, R y R, S; S, S y S, R o S, S y R, S).

Como se utiliza en el presente documento, a menos que se especifique expresamente, todos los números tales como aquellos que expresan valores, intervalos, cantidades o porcentajes pueden leerse como si estuvieran precedidos por la palabra "aproximadamente", incluso si el término no aparece expresamente.

En el presente documento también se describe un método para preparar un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo:



en la que:

uno de R^1 y R^2 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 y el otro es $-C(O)R^5$; en el que R^5 se elige entre:

arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;
 heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
 alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
 haloalquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
 5 aralquilo C₇-C₁₂ opcionalmente sustituido;
 heteroaralquilo opcionalmente sustituido que incluye 6-12 átomos;
 cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y
 cicloalqueno C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido;

W es alquileo C₁₋₆; y

R₃ y R₄ pueden ser iguales o diferentes y cada uno se elige independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, -C(O)OR⁶ y -C(O)R⁹;

en el que R⁶ es alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido; y

en el que R⁹ se elige entre

hidrógeno;

arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;

heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;

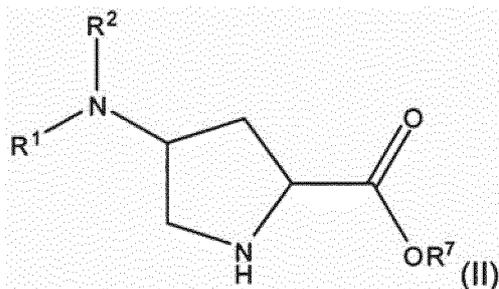
alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;

cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y

heterocicloalquilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;

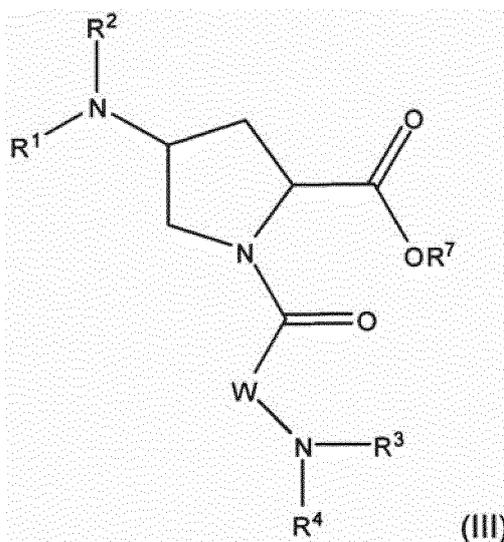
comprendiendo el método:

convertir un compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo:



en la que:

R⁷ se elige entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; en un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo:



y, donde R⁷ en la fórmula (III) es alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, hacer reaccionar el compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada para proporcionar un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo.

Por ejemplo, W en la fórmula (I) puede ser $-\text{CH}_2-$.

Por ejemplo, cada uno de R^3 y R^4 en la fórmula (I) puede ser hidrógeno. Como alternativa, uno de R^3 y R^4 es hidrógeno y el otro es $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^6$ o uno de R^3 y R^4 en la fórmula (I) es hidrógeno y el otro es $-\text{C}(\text{O})\text{R}^9$.

5 Por ejemplo, W en la fórmula (I) puede ser $-\text{CH}_2-$, mientras que cada uno de R^3 y R^4 en la fórmula (I) es hidrógeno.

10 Por ejemplo, W en la fórmula (I) puede ser $-\text{CH}_2-$ mientras que uno de R^3 y R^4 en la fórmula (I) es hidrógeno y el otro es $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^6$. R^6 en la fórmula (I) puede ser alquilo C_1 - C_6 , por ejemplo, R^6 puede *terc*-butilo. Como alternativa, R^6 puede ser bencilo.

15 Por ejemplo, W en la fórmula (I) puede ser $-\text{CH}_2-$. Mientras que uno de R^3 y R^4 en la fórmula (I) es hidrógeno y el otro es $-\text{C}(\text{O})\text{R}^9$. R^9 en la fórmula (I) puede ser hidrógeno. Como alternativa, R^9 en la fórmula (I) puede ser alquilo C_1 - C_6 , por ejemplo, R^9 en la fórmula (I) puede ser metilo. Como alternativa, R^9 en la fórmula (I) puede ser fenilo opcionalmente sustituido.

R^5 en la fórmula (I) puede ser arilo C_6 - C_{10} opcionalmente sustituido, por ejemplo, R^5 puede ser fenilo.

20 R^7 puede ser alquilo C_1 - C_6 , por ejemplo, CH_3 .

El grupo $-\text{NR}^1\text{R}^2$ y el grupo $-\text{COOH}$ en la fórmula (I) pueden ser *trans* uno con respecto al otro. Por ejemplo, el carbono de anillo unido al grupo $-\text{NR}^1\text{R}^2$ puede tener la configuración *R* y el carbono de anillo unido al grupo $-\text{COOH}$ puede tener la configuración *S*.

25 El grupo $-\text{NR}^1\text{R}^2$ y el grupo $-\text{COOR}^7$ en la fórmula (II) pueden ser *trans* uno con respecto al otro. Por ejemplo, el carbono de anillo unido al grupo $-\text{NR}^1\text{R}^2$ puede tener la configuración *R* y el carbono de anillo unido al grupo $-\text{COOR}^7$ puede tener la configuración *S*.

30 El compuesto de fórmula (II) puede estar en forma de una base libre o de una sal (por ejemplo, una sal de HCl). El compuesto de fórmula (II) puede convertirse en la base libre *in situ* mediante el tratamiento con la base orgánica o inorgánica apropiada, en un disolvente orgánico o en una mezcla de disolvente orgánico y agua libre; por ejemplo, mediante el tratamiento con NaOH en una mezcla de THF y agua. El disolvente puede ser cloruro de metileno (CH_2Cl_2), que puede intercambiarse con acetona para su posterior aislamiento. Puede utilizarse trietilamina para neutralizar la sal de HCl del compuesto de fórmula (II), que en algunos casos puede minimizar la probabilidad de hidrólisis parcial del grupo funcional éster (por ejemplo, éster de metilo) y de generación de impurezas posteriores.

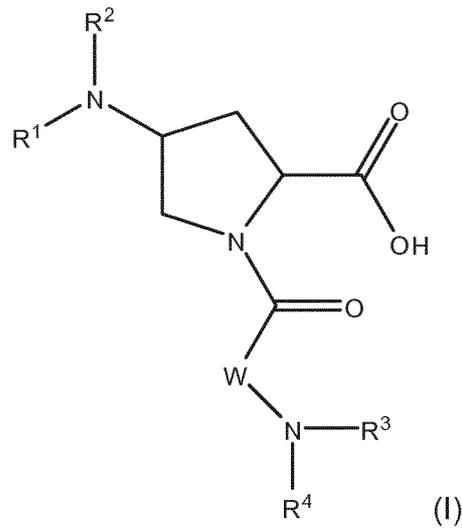
35 El hidróxido de metal puede ser un hidróxido de metal del Grupo IA, por ejemplo, el hidróxido de metal del Grupo IA puede elegirse entre NaOH, KOH y LiOH. El hidróxido de metal del Grupo IA puede ser NaOH.

40 La reacción del compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede realizarse en presencia de al menos un disolvente. El al menos un disolvente puede ser una mezcla de dos o más disolventes. El al menos un disolvente puede ser una mezcla de agua y un alcohol C_1 - C_3 . El alcohol C_1 - C_3 puede ser metanol (CH_3OH).

45 La reacción del compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede realizarse a una temperatura de como máximo aproximadamente $5\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción del compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede realizarse a una temperatura de desde aproximadamente $-10\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $5\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción del compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede realizarse a una temperatura de desde aproximadamente $-5\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $5\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción del compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede realizarse a una temperatura de desde aproximadamente $-5\text{ }^\circ\text{C}$ a aproximadamente $1\text{ }^\circ\text{C}$.

50 La reacción del compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede comprender, además, la acidificación de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción puede, por ejemplo, acidificarse con ácido clorhídrico diluido. El producto puede extraerse con acetato de etilo y cristalizarse en acetona y heptano. La cristalización puede retirar las impurezas estereoisoméricas (por ejemplo, una pequeña cantidad de isómero *cis* cuando se desea el isómero *trans*). El rendimiento químico para el proceso puede ser de aproximadamente el 80-90 %.

60 En el presente documento también se describe un método para preparar un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo



en la que:

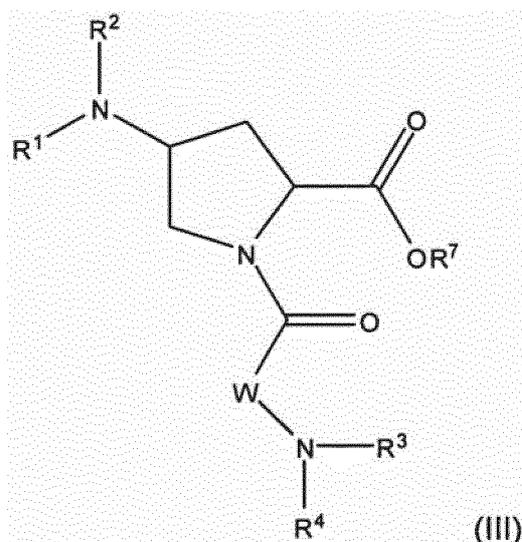
5 uno de R¹ y R² es hidrógeno o alquilo C₁-C₆ y el otro es -C(O)R⁵;
en el que R⁵ se elige entre:

- 10 arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;
heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
haloalquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
aralquilo C₇-C₁₂ opcionalmente sustituido;
heteroaralquilo opcionalmente sustituido que incluye 6-12 átomos;
15 cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y
cicloalqueno C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido;

W es alquileno C₁₋₆; y

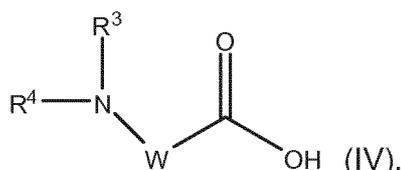
- R₃ y R₄ pueden ser iguales o diferentes y cada uno se elige independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆
opcionalmente sustituido, -C(O)OR⁶ y -C(O)R⁹;
20 en el que R⁶ es alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido; y
en el que R⁹ se elige entre
hidrógeno;
arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;
heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
25 alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y
heterocicloalquilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
comprendiendo el método:

30 hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo



en la que R^7 se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido; con un hidróxido de metal u otra base adecuada para proporcionar un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo.

5 El método puede comprender, además, convertir el compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo en un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo poniendo en contacto el compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo con un compuesto de fórmula (IV):



10 El compuesto de fórmula (IV) puede ser glicina (por ejemplo, R^3 y R^4 son H y W es $-CH_2-$). El compuesto de fórmula (IV) puede ser Boc-Gly-OH (por ejemplo, uno de R^3 y R^4 es H y el otro es *tert*-butiloxicarbonilo y W es $-CH_2-$). El compuesto de fórmula (IV) puede ser CHO-Gly-OH (por ejemplo, uno de R^3 y R^4 es H y el otro es CHO (formilo) y W es $-CH_2-$).

15 W en la fórmula (IV) puede ser $-CH_2-$, mientras que uno de R^3 y R^4 en la fórmula (IV) es hidrógeno y el otro es $-C(O)OR^6$. R^6 en la fórmula (IV) puede ser alquilo C_1-C_6 (por ejemplo, *tert*-butilo).

20 El compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo pueden ponerse en contacto con el ácido carboxílico de fórmula (IV) en presencia de un agente de acoplamiento. La expresión "agente de acoplamiento" se refiere a un compuesto que se utiliza cuando se acoplan juntos una amina y un ácido carboxílico. El agente de acoplamiento puede ser una carbodiimida, por ejemplo, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) o dicitclohexilcarbodiimida (DCC).

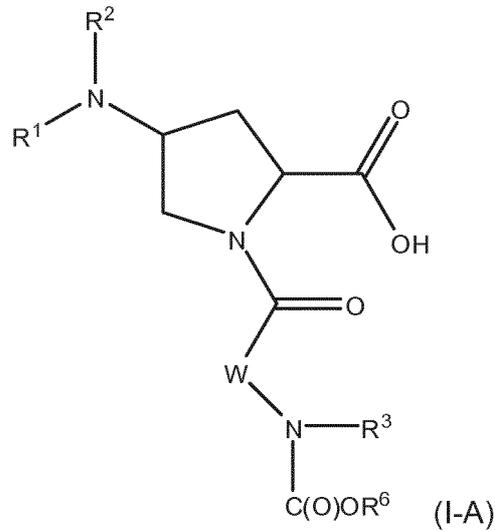
25 El compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo puede ponerse en contacto con el ácido carboxílico de fórmula (IV) en presencia de un agente de acoplamiento y un resto hidroxilado. Por ejemplo, el resto hidroxilado puede ser N-hidroxibenzotriazol (HOBt), 1-hidroxí-7-azabenzotriazol (HOAt) o pentafluorofenol.

30 El ácido carboxílico de fórmula (IV) puede convertirse en un anhídrido mixto. El compuesto de fórmula (IV) puede ser Boc-Gly-OH y el anhídrido mixto puede formarse mediante el tratamiento del compuesto de fórmula (IV) con cloroformiato de etilo, opcionalmente en presencia de trietilamina, seguido de la reacción con un compuesto de fórmula (II).

35 El compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo pueden aislarse en acetona en forma de un solvato de acetona, lo que puede eliminar la necesidad de concentrar la mezcla de reacción a sequedad.

El rendimiento puede ser mayor del 70 %, tal como mayor del 80 %, por ejemplo, mayor del 85 %, tal como aproximadamente del 86 %.

40 R^3 puede elegirse entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido cuando R^4 es $-C(O)OR^6$. Por tanto, la reacción del compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede proporcionar un compuesto de fórmula (I-A) o una sal del mismo

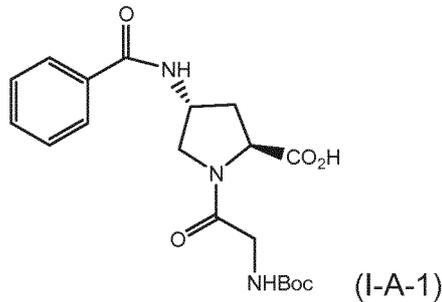


5 en la que R³ se elige entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido.

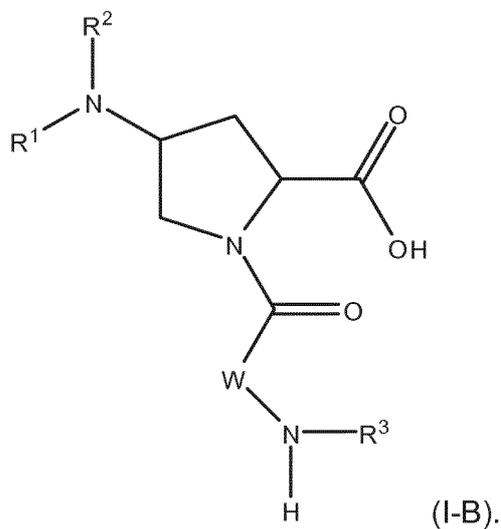
R³ en la fórmula (I-A) puede ser hidrógeno, mientras que R⁶ en la fórmula (I-A) es *terc*-butilo. Como alternativa, R³ en la fórmula (I-A) puede ser hidrógeno, mientras que R⁶ en la fórmula (I-A) es bencilo.

10 W en la fórmula (I-A) puede ser -CH₂-. R⁵ en la fórmula (I-A) puede fenilo.

La reacción del compuesto de fórmula (III) con un hidróxido de metal u otra base adecuada puede proporcionar un compuesto de fórmula (I-A-1) o una sal del mismo:



15 Los métodos pueden incluir, además, la retirada del grupo -C(OR⁶) del compuesto de fórmula (I-A) (es decir, desproteger el átomo de nitrógeno al que se unen R³ y R⁴) para proporcionar un compuesto de fórmula (I-B) o una sal del mismo:



El método puede comprender, además, convertir el compuesto de fórmula (I-A) o una sal del mismo en un compuesto de fórmula (I-B) o una sal del mismo. Por ejemplo, convertir el compuesto de fórmula (I-A) o una sal del mismo en un compuesto de fórmula (I-B) o una sal del mismo puede comprender poner en contacto el compuesto de fórmula (I-A) con al menos un ácido.

5

El al menos un ácido puede ser HCl, por ejemplo, HCl anhidro o ácido clorhídrico acuoso concentrado.

Puede utilizarse un disolvente para la conversión. El disolvente puede ser un disolvente orgánico, tal como dioxano o acetona. El disolvente puede ser agua.

10

R^3 en la fórmula (I-A) puede ser hidrógeno, mientras que R^6 en la fórmula (I-A) es *terc*-butilo.

Convertir el compuesto de fórmula (I-B) o una sal del mismo en un compuesto de fórmula (I-B) o una sal del mismo puede comprender someter el compuesto de fórmula (I-A) a hidrogenación catalítica. R^3 en la fórmula (I-A) puede ser hidrógeno, mientras que R^6 en la fórmula (I-A) es bencilo.

15

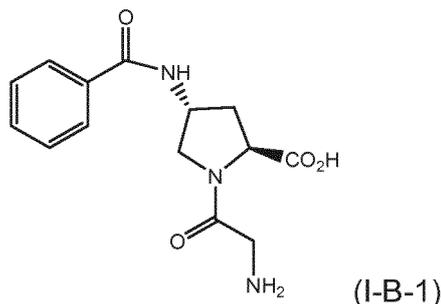
Someter el compuesto de fórmula (I-A) a hidrogenación catalítica puede comprender poner en contacto el compuesto de fórmula (I-A) con gas H_2 y un catalizador de metal de transición. El catalizador de metal de transición puede ser paladio. Someter el compuesto de fórmula (I-A) a hidrogenación por transferencia puede comprender poner en contacto el compuesto de fórmula (I-A) con ciclohexeno y un catalizador de metal de transición. El catalizador de metal de transición puede ser paladio.

20

El compuesto de fórmula (I-B) puede obtenerse en forma del ácido libre. El compuesto de fórmula (I-B) puede obtenerse en forma de una sal (por ejemplo, en forma de una sal de HCl).

25

El método puede comprender, además, convertir el compuesto de fórmula (I-A-1) o una sal del mismo en un compuesto de fórmula (I-B-1) o una sal del mismo:



30

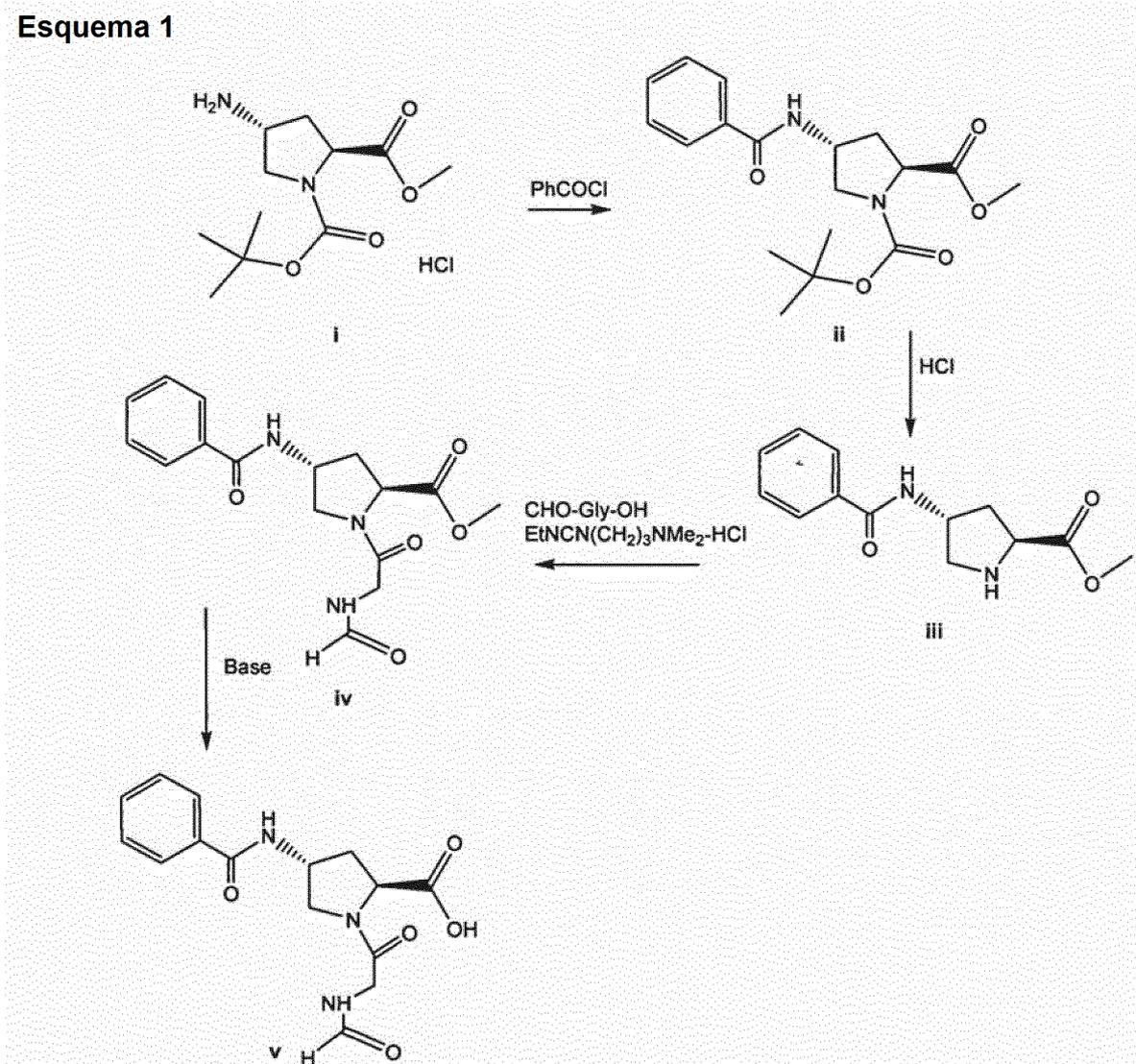
La posterior desprotección del ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico al ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico, clorhidrato, puede ser conseguirse mediante el tratamiento del compuesto anterior con ácido clorhídrico concentrado en acetona. El producto precipitado se disuelve mediante la adición de agua para formar una solución transparente, que se filtra para retirar las partículas. El producto deseado se cristaliza mediante la adición de acetona. El clorhidrato cristalino puede aislarse en forma de un monohidrato. El rendimiento químico para el proceso puede ser de aproximadamente el 80-95 %.

35

Un ejemplo se esboza en el Esquema 1 a continuación. Como se muestra, el compuesto v (es decir, un compuesto de fórmula (I)) se obtiene haciendo reaccionar el compuesto iii (es decir, un compuesto de fórmula (II)) con un compuesto de glicina formilada para proporcionar un compuesto iv, que se hace reaccionar posteriormente con una base.

40

Esquema 1

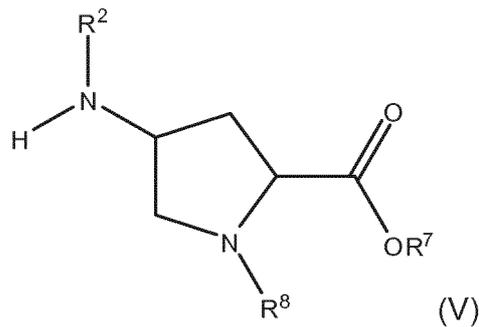


La base utilizada para convertir el compuesto iv en el compuesto v puede ser un hidróxido de metal (por ejemplo, LiOH, NaOH, KOH). Como alternativa, la base puede ser un carbonato de metal (por ejemplo, Li₂CO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃) o un hidrogenocarbonato de metal (por ejemplo, NaHCO₃, KHCO₃) en combinación con agua.

El compuesto de fórmula (II) puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula (V). El compuesto de fórmula (V) puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula (VIII) o un compuesto de fórmula (X). El método para preparar un compuesto de fórmula (I) a partir de un compuesto de fórmula (II) puede incluir, además, uno o los dos métodos.

El compuesto de fórmula (II) se prepara mediante un método que comprende:

poner en contacto un compuesto de fórmula (V):



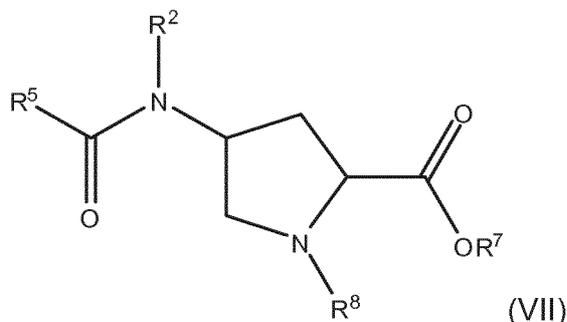
en la que:

R^2 se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido;

R^7 se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido; y

5 R^8 es un grupo protector del nitrógeno;

con un ácido carboxílico activado para proporcionar un compuesto de fórmula (VII) o una sal del mismo:



10 y
retirar el grupo protector del nitrógeno R^8 del compuesto de fórmula (VII).

El método anterior para preparar un compuesto de fórmula (II) a partir de un compuesto de fórmula (V) puede practicarse por separado de, o en conjunción con, los métodos descritos en el presente documento para preparar un compuesto de fórmula (I) a partir de un compuesto de fórmula (II) o un compuesto de fórmula (III).

R^2 en las fórmulas (V) y (VII) puede ser hidrógeno.

R^8 en las fórmulas (V) y (VII) puede ser $-C(O)OR^a$, en el que R^a se selecciona entre:

20 arilo C_6-C_{10} opcionalmente sustituido;
heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
alquilo C_1-C_{20} opcionalmente sustituido;
haloalquilo C_1-C_{20} opcionalmente sustituido;
25 aralquilo C_7-C_{12} opcionalmente sustituido;
heteroaralquilo opcionalmente sustituido que incluye 6-12 átomos;
cicloalquilo C_3-C_{10} opcionalmente sustituido; y
cicloalqueno C_3-C_{10} opcionalmente sustituido;

30 Por ejemplo, R^8 en las fórmulas (V) y (VII) puede ser $-C(O)O(terc-butilo)$ o $-C(O)O(bencilo)$.

R^5 en la fórmula (VII) puede ser arilo C_6-C_{10} opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos. R^5 puede ser arilo C_6-C_{10} opcionalmente sustituido, por ejemplo, R^5 es fenilo.

35 R^8 en las fórmulas (V) y (VII) puede ser un grupo protector del nitrógeno lábil al ácido y retirar el grupo protector del compuesto de fórmula (VII) puede comprender poner en contacto el compuesto de fórmula (VII) con al menos un ácido. El al menos un ácido puede ser HCl o ácido trifluoroacético. El grupo protector del nitrógeno puede ser $-C(O)O(terc-butilo)$.

40 R^8 en las fórmulas (V) y (VII) puede ser un grupo protector del nitrógeno que sea susceptible a la escisión por hidrogenólisis y retirar el grupo protector del compuesto de fórmula (VII) puede comprender someter el compuesto de fórmula (VII) a hidrogenación catalítica. El grupo protector del nitrógeno puede ser $C(O)O(bencilo)$.

45 Someter el compuesto de fórmula (VII) a hidrogenación catalítica puede comprender poner en contacto el compuesto de fórmula (VII) con gas H_2 y un catalizador de metal de transición. El catalizador de metal de transición puede ser paladio.

50 R^8 en las fórmulas (V) y (VII) puede ser un grupo protector del nitrógeno que sea susceptible a la escisión por hidrogenólisis y la retirada del grupo protector del compuesto de fórmula (VII) comprende someter el compuesto de fórmula (VII) a hidrogenación por transferencia. Someter el compuesto de fórmula (VII) a hidrogenación por transferencia puede comprender poner en contacto el compuesto de fórmula (VII) con ciclohexeno y un catalizador de metal de transición, que puede ser, por ejemplo, paladio.

El ácido carboxílico activado puede ser un compuesto de fórmula (VI):

55



Retirar el grupo protector del compuesto de fórmula (VII) puede proporcionar el compuesto de fórmula (II) en forma de una sal de HCl.

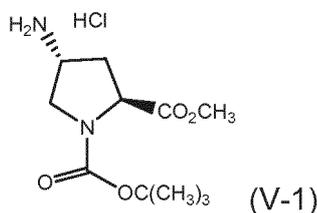
5 La benzoilación del éster metílico de *N*-Boc-*trans*-4-amino-L-prolina (sal de HCl o base libre) disponible en el mercado puede conseguirse utilizando métodos de formación de enlaces amida convencionales, que incluyen hacerlo reaccionar con ácido benzoico en presencia de un agente de acoplamiento, hacerlo reaccionar con el correspondiente anhídrido de ácido benzoico (o anhídrido mixto) o con haluro de benzoílo. Por ejemplo, el éster metílico de *N*-Boc-*trans*-4-amino-L-prolina (ya sea en forma de una sal de HCl o de base libre) puede tratarse con cloruro de benzoílo en condiciones de Schotten-Bauman, es decir, en una mezcla bifásica de disolvente orgánico (por ejemplo, acetato de etilo (EtOAc), tolueno, éter metil *tert*-butílico (MTBE), etc.) y agua en presencia de una base (por ejemplo, NaHCO₃). Las condiciones de Schotten-Bauman pueden incluir EtOAc, agua y NaHCO₃. Puede utilizarse la destilación azeotrópica para secar la mezcla de reacción cuando se emplea tolueno como disolvente orgánico (el uso de tolueno también puede facilitar el aislamiento del compuesto de fórmula (II) en forma de un sólido cristalino después de la desprotección).

La benzoilación puede realizarse mediante el tratamiento con haluro de benzoílo (por ejemplo, cloruro de benzoílo) en un disolvente orgánico (por ejemplo, CH₂Cl₂) en presencia de una base orgánica (por ejemplo, piridina) o inorgánica.

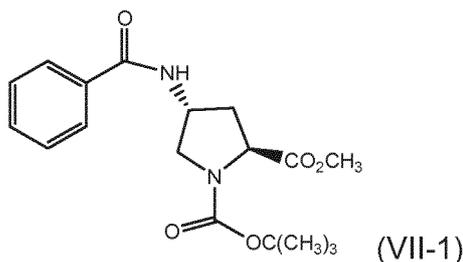
La desprotección del compuesto de fórmula (VII) puede realizarse utilizando un ácido (por ejemplo, HCl, CF₃COOH, etc.) en un disolvente etéreo (Et₂O, dioxano, etc.). Por ejemplo, la desprotección del compuesto de fórmula (VII) se realiza utilizando HCl anhidro en MeOH. El uso de HCl anhidro en MeOH puede minimizar la probabilidad de reacciones secundarias de hidrólisis no deseadas. El compuesto de fórmula (VII) no se aísla necesariamente antes de la desprotección.

El compuesto de fórmula (II) puede prepararse mediante un método que comprende:

30 poner en contacto un compuesto de fórmula (V-1):

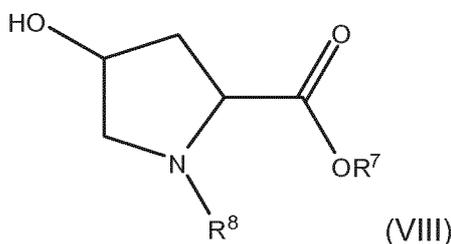


35 con cloruro de benzoílo para proporcionar un compuesto de fórmula (VII-1):

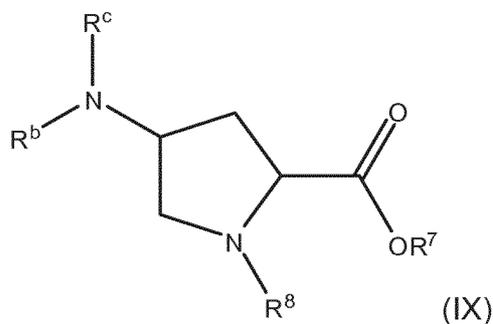


y la retirada del -C(O)O(*tert*-butilo) del compuesto de fórmula (VII-1).

40 Por ejemplo, un compuesto de fórmula (V), en la que R² es hidrógeno, puede prepararse mediante un método que comprende poner en contacto un compuesto de fórmula (VIII):



en la que R^7 se elige entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, con un compuesto de fórmula $(R^b)(R^c)NH$, en la que R^b y/o R^c son distintos del hidrógeno para proporcionar un compuesto de fórmula (IX):



5

y

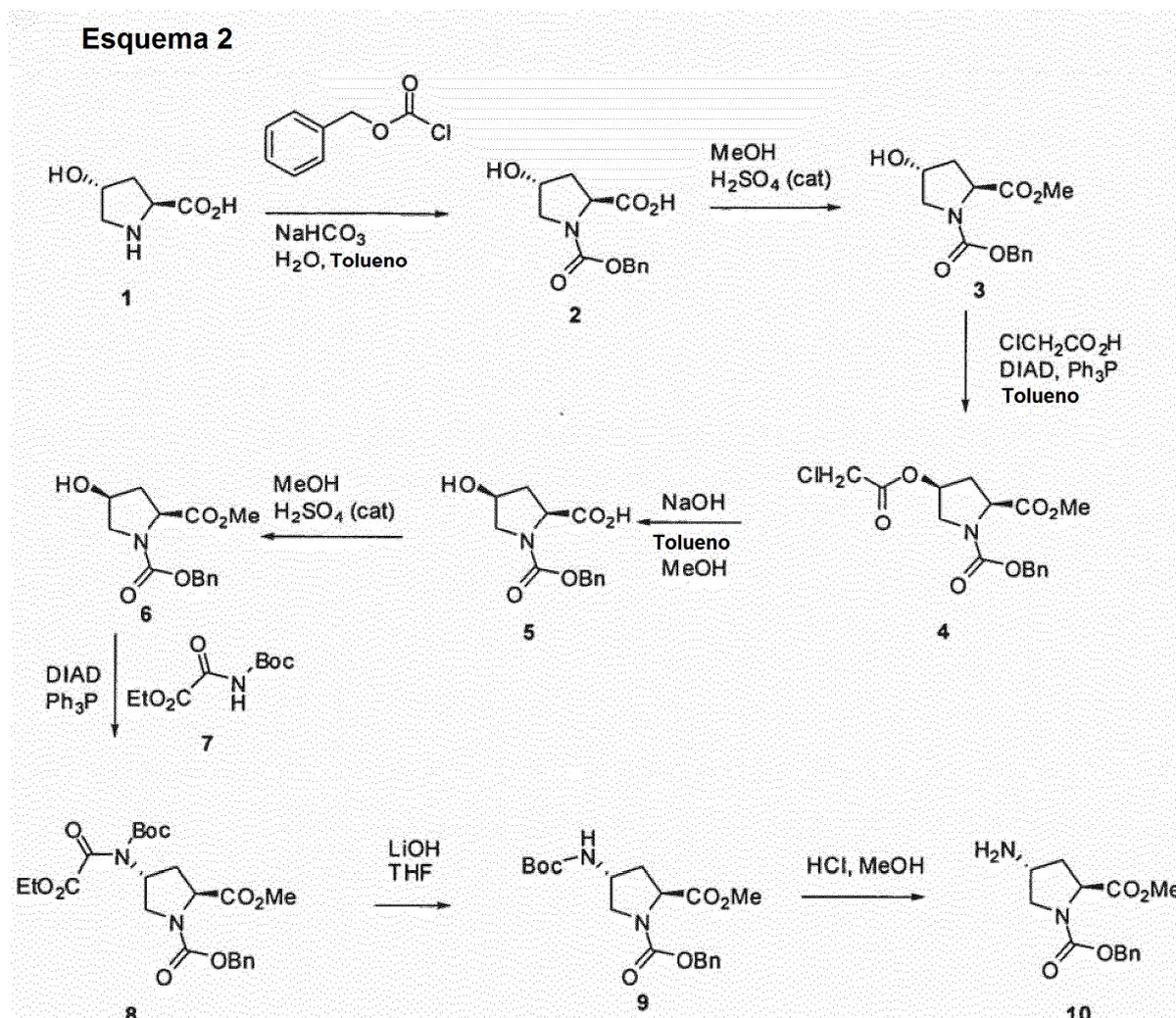
(ii) convertir el compuesto de fórmula (IX) en un compuesto de fórmula (V), en la que R^2 es hidrógeno.

10

El compuesto de fórmula $(R^b)(R^c)NH$ puede elegirse de manera que cuando se incorpore en un sustrato pueda transformarse en una o más etapas químicas en un grupo amino (es decir, $-NH_2$), por ejemplo, el compuesto de fórmula $(R^b)(R^c)NH$ puede elegirse entre ftalimida, carbamato de *O-terc*-butilo, etil oxamato de *N*-Boc, benzhidrilamina, tritilamina, hexametildisilazano de litio, trifeniilsililamina, $LiNH_2$, alilamina y bis(alil)amina.

15

Los métodos de preparación de los compuestos de Fórmula (V) pueden implicar la conversión de una *trans*-4-hidroxi-L-prolina (o un derivado de la misma) en una *trans*-4-amino-L-prolina (o un derivado de la misma). Un ejemplo se analiza a continuación y se esboza en el Esquema 2.



La *trans*-4-hidroxi-L-prolina **1** disponible en el mercado puede convertirse en (2S,4R)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo **3** basándose en las referencias de la bibliografía (Bridges *et al. J. Med. Chem.* 1991, 34, 717; Gregson *et al. J. Med. Chem.* 2004, 47, 1161).

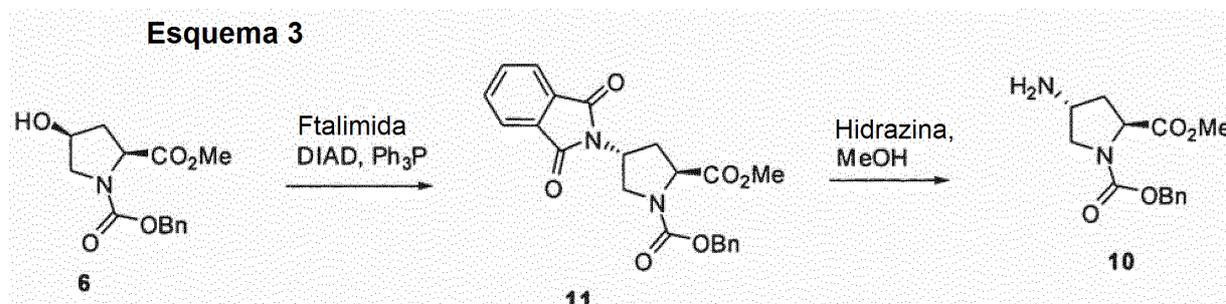
El compuesto **3** puede tratarse con un ácido orgánico hidrosoluble tal como el ácido cloroacético (Hughes y Reamer, *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 2967) en presencia de trifenilfosfina y con un azodicarboxilato tal como el azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) en un disolvente tal como el tolueno para proporcionar el compuesto **4**. Una ventaja asociada al ácido cloroacético y similares es que el ácido puede retirarse del producto de reacción tras el lavado. El éster **4** puede saponificarse *en situ* mediante la adición de un alcohol tal como el metanol como cosolvente y una solución básica acuosa tal como el hidróxido de sodio acuoso. Después de la saponificación, los subproductos de la reacción de Mitsunobu, es decir, el óxido de trifenilfosfina y el subproducto de hidrazida, pueden retirarse mediante la extracción de la solución básica con un disolvente tal como el tolueno, reduciendo por tanto la probabilidad de que sea necesaria la separación cromatográfica para retirar los subproductos y, por tanto, convirtiendo el nuevo proceso en susceptible de aumentar a escala. La neutralización y la retro-extracción con un disolvente orgánico tal como el diclorometano proporcionan el ácido **5**.

El ácido resultante **5** puede esterificarse en condiciones de esterificación catalizada por ácido convencionales con un ácido tal como el ácido sulfúrico en un alcohol alquílico tal como el MeOH para proporcionar éster metílico de *cis*-4-hidroxi-L-prolina **6**.

El derivado de *cis*-4-hidroxi-prolina **6** puede acoplarse con oxamato de *N*-Boc-etilo (**7**) (véase Berree *et al. Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 8275) en condiciones de reacción de Mitsunobu convencionales utilizando trifenilfosfina y DIAD para proporcionar el derivado de *trans*-4-aminoprolina protegido **8**. El oxamato **8** puede hidrolizarse selectivamente con hidróxido de litio acuoso y el grupo protector Boc puede escindirse posteriormente con ácido clorhídrico en metanol. En este punto, el producto deseado **10** permanece en la fase acuosa ácida. Los subproductos de la reacción de Mitsunobu pueden retirarse mediante la extracción con un disolvente orgánico tal como el tolueno. La fase acuosa ácida después se neutraliza y se extrae con otro disolvente orgánico tal como el

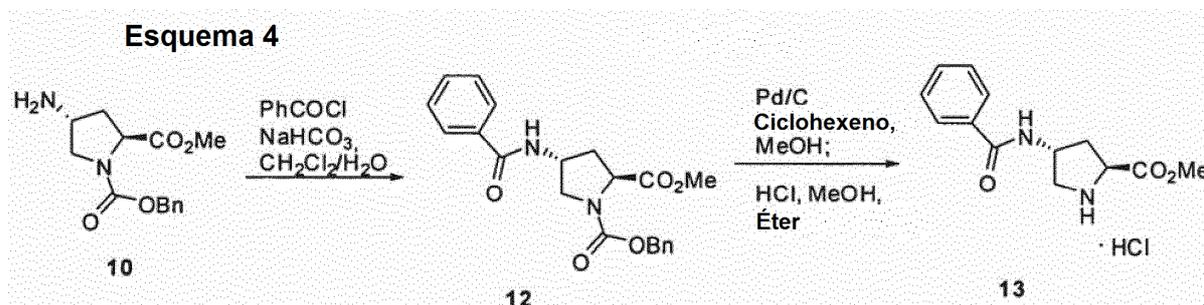
acetato de etilo para proporcionar éster metílico de *trans*-4-amino-L-prolina protegido con *N*-Cbz **10**, por tanto, la separación cromatográfica puede evitarse de nuevo en esta parte del proceso.

En algunas realizaciones, los métodos implican la conversión de una *cis*-4-hidroxi-L-prolina (o un derivado de la misma) en una *trans*-4-amino-L-prolina (o un derivado de la misma). Un ejemplo se analiza a continuación y se esboza en el Esquema 3.



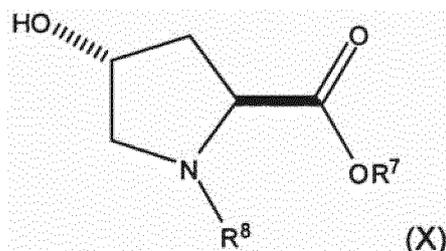
El alcohol **6** puede hacerse reaccionar con ftalimida en presencia de trifenilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo en disolventes tales como el tetrahidrofurano y el tolueno para proporcionar el compuesto **11**, que puede aislarse en forma de una solución en tolueno en bruto. La ftalimida en bruto **11** puede convertirse después en la amina **10** mediante el tratamiento con hidrato de hidrazina en metanol. La amina puede aislarse con alta pureza a través de un tratamiento extractivo en condiciones ácidas. El tratamiento extractivo en condiciones ácidas del presente documento permite retirar los subproductos de la reacción de Mitsunobu tales como el óxido de trifenilfosfina sin el uso de cromatografía. El rendimiento global de este proceso puede ser de aproximadamente el 66 %.

En algunas realizaciones, la amina **10** puede utilizarse para preparar compuestos de fórmula (II), tales como el compuesto **13** a través de un compuesto de fórmula (VII), tal como el compuesto **12**. Véase el Esquema 4.



En algunas realizaciones, se utiliza un estereoisómero o una mezcla estereoisomérica enriquecida de un compuesto de fórmula (V), en las que dicho estereoisómero o mezcla de estereoisómeros enriquecida de un compuesto de fórmula (V) se prepara mediante un método que comprende:

poner en contacto un compuesto de fórmula (X)

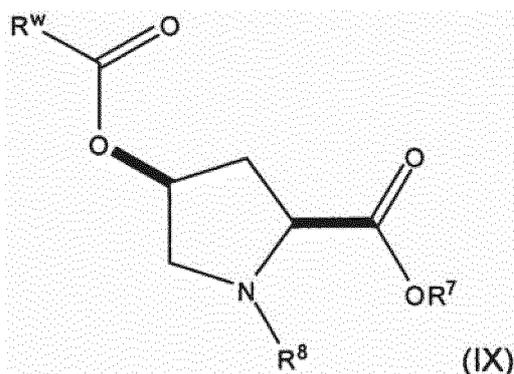


en la que

R^7 se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido; y

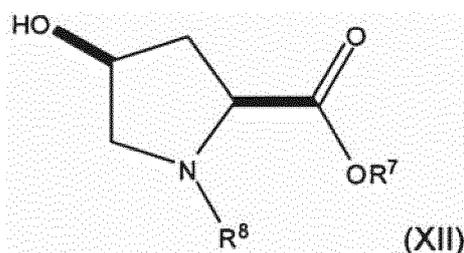
R^8 es hidrógeno o un grupo protector del nitrógeno

con un compuesto de fórmula R^wCO_2H (en la que R^w es alquilo inferior o haloalquilo inferior), un compuesto de fórmula $P(R^d)_3$ (en la que R^d en cada aparición es, independientemente, arilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos) y un di(alquilo C_1 - C_6)azodicarboxilato para proporcionar un compuesto de fórmula (XI):



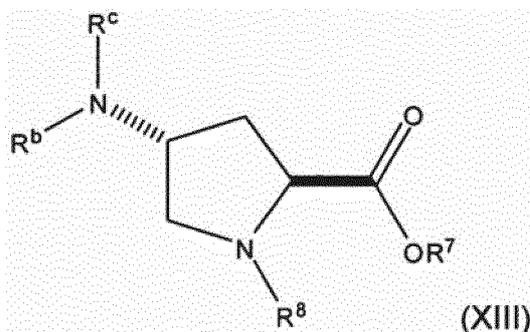
poner en contacto el compuesto de fórmula (XI) con un hidróxido de metal para proporcionar un compuesto de fórmula (XII) o una sal del mismo:

5



poner en contacto el compuesto de fórmula (XII) con un compuesto de fórmula $(R^b)(R^c)NH$ (en la que R^b y/o R^c son distintos del hidrógeno) para proporcionar un compuesto de fórmula (XIII):

10



y convertir el compuesto de fórmula (XIII) en un compuesto de fórmula (V), en la que R^2 en la fórmula (V) es hidrógeno.

15

Con fines de aclaración, se pretende que la estereoquímica representada en la fórmula (X) y en cada una de las fórmulas muestre la estereoquímica relativa. Sin embargo, se entiende que los métodos estereoselectivos o estereoespecíficos anteriormente mencionados descritos en el presente documento pueden utilizarse para preparar cualquiera de los cuatro productos estereoisoméricos posibles (es decir, 2S, 4R; 2R, 4S; 2S, 4S y 2R, 4R).

20

R^8 puede ser $C(O)OR^a$ en el que R^a se selecciona entre arilo C_6-C_{10} opcionalmente sustituido; heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos; alquilo C_1-C_{20} opcionalmente sustituido; haloalquilo C_1-C_{20} opcionalmente sustituido; aralquilo C_7-C_{12} opcionalmente sustituido; heteroaralquilo opcionalmente sustituido que incluye 6-12 átomos; cicloalquilo C_3-C_{10} opcionalmente sustituido; y cicloalqueno C_3-C_{10} opcionalmente sustituido.

25

Por ejemplo, R^8 puede ser $-C(O)O(terc-butilo)$ o $-C(O)O(bencilo)$.

El compuesto de fórmula $P(R^d)_3$ puede ser trifenilfosfina.

30

El di(alquilo C_1-C_6)azodicarboxilato puede ser azodicarboxilato de diisopropilo.

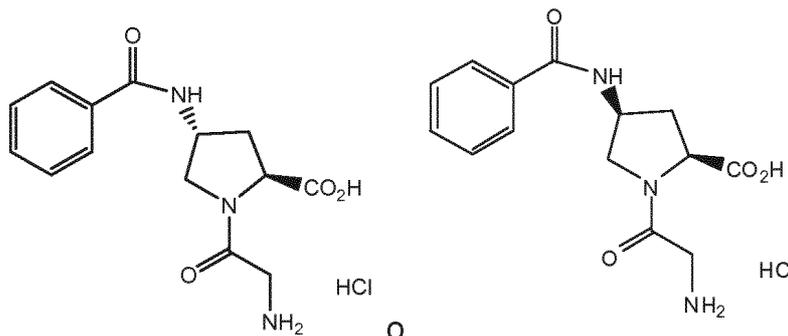
Pueden emplearse otras fosfinas y di(alquilo C_1-C_6)azodicarboxilatos que sean adecuados para su uso en una reacción de Mitsunobu.

El método puede realizarse y aumentarse a escala sin el uso de purificación mediante cromatografía. Los productos posteriores a la reacción de Mitsunobu pueden purificarse mediante métodos no cromatográficos, por ejemplo, la extracción, y estar sustancialmente libres de subproductos de la reacción de Mitsunobu.

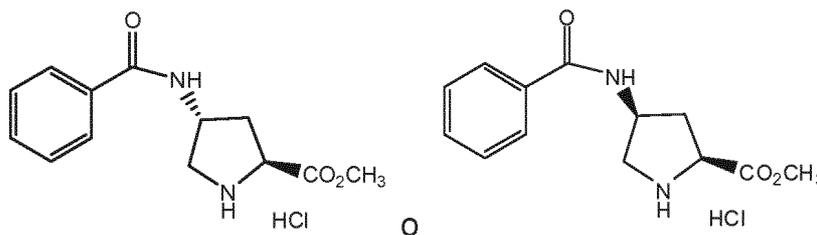
5 Los anteriores métodos para preparar un compuesto de fórmula (V) a partir de un compuesto de fórmula (VIII) o (X) (así como las variantes de los mismos) pueden practicarse por separado de, o junto con, los métodos descritos en el presente documento para preparar un compuesto de fórmula (II) a partir de un compuesto de fórmula (V), que a su vez pueden practicarse por separado de, o junto con, los métodos descritos en el presente documento para preparar un compuesto de fórmula (I) a partir de un compuesto de fórmula (II).

10

El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo pueden ser:

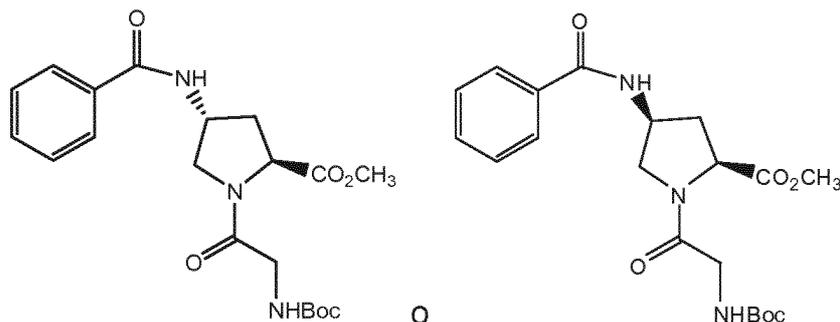


15 El compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo pueden ser:



20

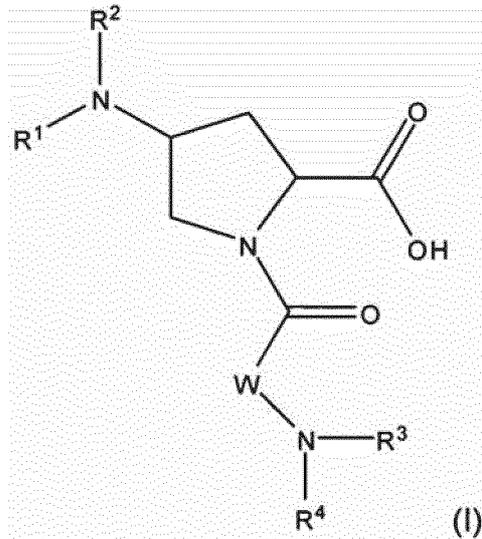
El compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo pueden ser:



El compuesto de fórmula (IV) o una sal del mismo pueden ser Boc-Gly-OH.

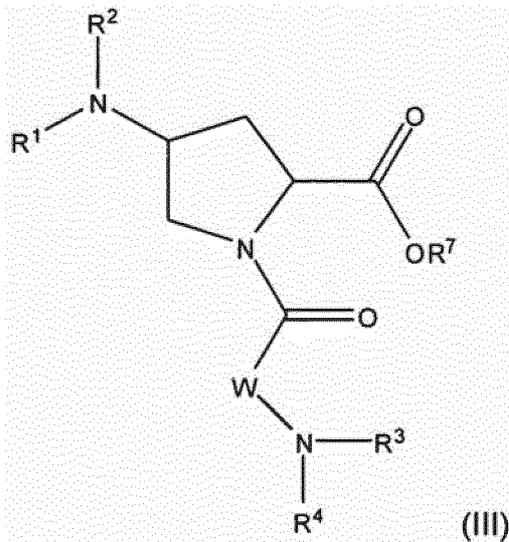
25 En el presente documento también se describe una composición que comprende

(1) un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo



y/o
un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo

5



en la que
uno de R¹ y R² es hidrógeno o alquilo C₁-C₆ y el otro es -C(O)R⁵;
en el que R⁵ se elige entre:

10

arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;
heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
15 haloalquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
aralquilo C₇-C₁₂ opcionalmente sustituido;
heteroaralquilo opcionalmente sustituido que incluye 6-12 átomos;
cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y
cicloalqueno C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido;

20

W es alquileo C₁₋₆;
R³ y R⁴ pueden ser iguales o diferentes y cada uno se elige independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-
C₆ opcionalmente sustituido, -C(O)OR⁶ y -C(O)R⁹;

25

en el que R⁶ es alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido; y
en el que R⁹ se elige entre

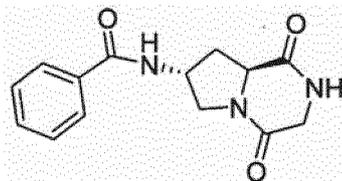
hidrógeno;
arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido;
heteroarilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos;
alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
cicloalquilo C₃-C₁₀ opcionalmente sustituido; y

heterocicloalquilo opcionalmente sustituido que incluye 5-10 átomos; y R^7 se elige entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido; y

(2) una cantidad detectable de uno o más compuestos seleccionados entre:

5

N-((7*R*,8*aS*)-1,4-dioxooctahidropirroló[1,2-*a*]pirazin-7-il)benzamida o una sal de la misma, es decir, un compuesto de fórmula



10

o una sal del mismo;

trifenilfosfina;

óxido de trifenilfosfina;

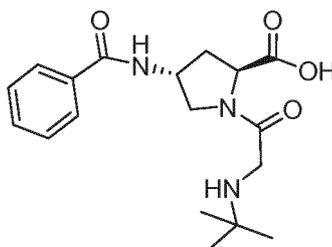
un dicarboxilato de hidrazina;

15

triethylamina;

benzotriazol;

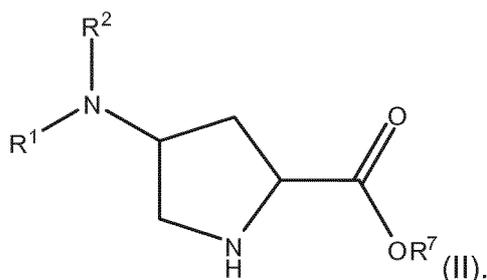
ácido (2*S*,4*R*)-4-benzamido-1-(2-(*terc*-butilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico o una sal del mismo, es decir, un compuesto de fórmula:



20

o una sal del mismo;

y un compuesto de fórmula (II) o una sal del mismo:



25

La composición puede comprender más de aproximadamente el 95 %, tal como más de aproximadamente el 98 %, por ejemplo, más de aproximadamente el 99 % de un compuesto de fórmula (I). Por ejemplo, la composición puede comprender más de aproximadamente el 99,9 % de un compuesto de fórmula (I).

30

El compuesto de fórmula (I) puede ser ácido (2*S*,4*R*)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico o una sal del mismo. El compuesto de fórmula (I) puede ser clorhidrato del ácido (2*S*,4*R*)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico. El compuesto de fórmula (I) puede ser monohidrato del clorhidrato del ácido (2*S*,4*R*)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico. El compuesto de fórmula (I) puede ser ácido (2*S*,4*R*)-4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico. El compuesto de fórmula (III) puede ser ácido 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2*S*,4*R*)-metilo. El compuesto de fórmula (III) puede ser ácido 4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxilato de (2*S*,4*R*)-metilo.

35

40

También se proporciona monohidrato del clorhidrato del ácido (2*S*,4*R*)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico. El compuesto ácido (2*S*,4*R*)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico puede prepararse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº 11/643.192) y como se describe en el presente documento.

- También se proporciona un método para preparar monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico cristalino. Dicho método de preparación incluye la etapa de proporcionar una solución de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico en un medio de cristalización en la que el medio de cristalización comprende agua y uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua. Dicho método de preparación incluye, además, mantener la solución durante un tiempo y en condiciones adecuadas para la formación de monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.
- En algunas realizaciones, el clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se añade, por ejemplo, en porciones, en forma de un sólido al medio de cristalización. En algunas realizaciones, el medio de cristalización se calienta a una temperatura elevada, por ejemplo, a reflujo.
- En algunas realizaciones, el clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se añade, por ejemplo, en porciones, en forma de un sólido a uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua. En algunas realizaciones, el uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua se calientan a una temperatura elevada, por ejemplo, a reflujo. La solución del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico en el uno o más disolventes orgánicos miscibles en agua después se combina con agua y cualesquier otros disolventes orgánicos miscibles en agua que se encuentren en el medio de cristalización.
- En algunas realizaciones, la solución proporcionada es una solución completamente disuelta de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico. En algunas realizaciones, la solución proporcionada es una suspensión o una pasta parcialmente disueltas de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.
- La solubilidad del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico variará dependiendo de la composición del medio, como se aprecia bien en la técnica, pero, en algunas realizaciones, es de al menos aproximadamente 1 mg/ml, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg/ml.
- En algunas realizaciones, el disolvente orgánico miscible en agua se selecciona entre alcoholes, cetonas, éteres o una combinación de dichos disolventes. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico miscible en agua se selecciona entre alcoholes C₁₋₄, cetonas C₁₋₆ y éteres C₁₋₆. Cuando se utiliza más de un solvente orgánico miscible en agua, puede combinarse un disolvente del mismo tipo o de diferente tipo. Por ejemplo, si se selecciona un alcohol, también puede seleccionarse otro alcohol para su uso en la mezcla de disolventes.
- Los alcoholes adecuados incluyen metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *t*-butanol y similares. Las cetonas adecuadas incluyen acetona, dietilcetona y similares. Los éteres adecuados incluyen éter metil *t*-butílico, éter dietílico, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, éter dimetílico de etilenglicol y similares. En algunas realizaciones, el alcohol es isopropanol, la cetona es acetona y el éter es éter metil *t*-butílico.
- La elección del disolvente orgánico miscible en agua o de la combinación de disolventes orgánicos miscibles en agua está bien dentro de la capacidad de un experto en la materia y dependerá de factores tales como la escala deseada, el rendimiento, la temperatura de funcionamiento, el tiempo de funcionamiento y similares. Para las combinaciones de disolventes orgánicos miscibles en agua, la relación de los componentes puede variarse. Por ejemplo, la relación de alcohol a cetona puede variar de una relación de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1. También se consideran las relaciones fuera de este intervalo. También se proporcionan combinaciones ternarias de un alcohol, una cetona y un éter. La relación de tres componentes puede variar sin límite. En una realización, se utiliza una combinación que comprende hasta aproximadamente el 10 % de un alcohol, hasta aproximadamente el 5 % de un éter y al menos aproximadamente el 85 % de una cetona.
- El agua está incluida en el medio de cristalización. El agua puede estar presente adventiciamente, pero en algunas realizaciones el agua se combina con el disolvente orgánico miscible en agua. La cantidad de agua en la mezcla de disolventes es generalmente de no más del 25 % en volumen. La solución puede comprender menos del 10 % de agua en volumen y en algunas realizaciones el agua es menos del 5 % en volumen. En algunas realizaciones, la parte de disolvente orgánico miscible en agua es aproximadamente el 97,5 % en volumen y el agua es aproximadamente el 2,5 % en volumen.
- Con respecto a las condiciones adecuadas para formar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico, puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica, tal como el enfriamiento de la solución, la adición de cristales de siembra, la reducción del volumen del disolvente a presión ambiente o reducida, la adición de un anti-disolvente, la utilización de técnicas de difusión y/o mediante la combinación de estas técnicas. La solución puede dejarse inalterada o agitarse durante el proceso de cristalización. En algunas realizaciones, la solución se mantiene a temperatura ambiente y se agita hasta que la cristalización está suficientemente completa. En algunas realizaciones, la solución se mantiene a temperatura ambiente y se deja evaporar al menos algo del medio de cristalización, tras lo cual se forman cristales. El proceso de evaporación puede realizarse a presión ambiente o a presión reducida y puede ser con o sin control de la temperatura del medio.

En algunas realizaciones, el método incluye además la etapa de recuperar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico, que puede realizarse por medios conocidos por aquellos expertos en la materia, tales como la filtración, la centrifugación, la decantación y similares. En algunas realizaciones, el método comprende además lavar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico con un disolvente adecuado tras la recuperación del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico. En algunas realizaciones, el método comprende además secar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico. El secado puede realizarse a presión ambiente o reducida y a temperatura ambiente o elevada. Por ejemplo, puede utilizarse un horno de secado al vacío. En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se seca a aproximadamente 45 °C al vacío.

En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico cristalino se caracteriza mediante difracción de rayos X de polvo.

Existen varios métodos analíticos que un experto habitual en la técnica de la química del estado sólido puede utilizar para analizar formas sólidas. El término "analizar" como se utiliza en el presente documento significa obtener información acerca de la estructura de estado sólido de las formas sólidas. Por ejemplo, la difracción de rayos X de polvo es una técnica adecuada para diferenciar formas sólidas amorfas de formas sólidas cristalinas y para caracterizar e identificar las formas sólidas cristalinas de un compuesto. La difracción de rayos X de polvo también es adecuada para cuantificar la cantidad de una forma (o formas) sólida cristalina en una mezcla.

El término "caracterizar" como se utiliza en el presente documento significa seleccionar un conjunto de datos apropiado capaz de distinguir una forma sólida de otra. Ese conjunto de datos de difracción de rayos X de polvo es la posición de uno o más picos. Se dice que seleccionar qué picos de difracción de rayos X de polvo definen una forma particular, caracteriza esa forma.

Cuando se caracterizan y/o se identifican formas sólidas cristalinas del mismo compuesto químico con difracción de rayos X de polvo, a menudo no es necesario utilizar todo el polvo patrón. A menudo puede utilizarse un subconjunto más pequeño de todo el polvo patrón para realizar la caracterización y/o la identificación. Al seleccionar una colección de picos que diferencian la forma sólida cristalina de otras formas sólidas cristalinas del compuesto, uno puede fiarse de esos picos tanto para caracterizar la forma como para identificar la forma en, por ejemplo, una mezcla desconocida. Pueden añadirse datos adicionales, tales como los de otra técnica analítica o picos adicionales del polvo patrón, para caracterizar y/o identificar la forma los polimorfos deben, por ejemplo, ser identificados más tarde.

Debido a las diferencias en los instrumentos, las muestras y la preparación de las muestras, los valores de los picos se presentan con el modificador "aproximadamente" delante de los valores de los picos. Esta es una práctica común en la técnica de la química del estado sólido debido a la variación inherente en los valores de los picos. Una precisión típica del valor de 2θ del eje X de un pico de un polvo patrón es del orden de más o menos $0,3^\circ 2\theta$. Por tanto, un pico de difracción de polvo que aparece a "aproximadamente $19,0^\circ 2\theta$ " significa que el pico podría estar entre $18,7^\circ 2\theta$ y $19,3^\circ 2\theta$ cuando se mide en la mayoría de difractómetros de rayos X en la mayoría de las condiciones. La variabilidad en la intensidad del pico es el resultado de cómo se orientan los cristales individuales en el recipiente de la muestra con respecto a la fuente externa de rayos X, del tamaño de los cristallitos, de los factores instrumentales y de la temperatura durante la medición.

Los datos de difracción de rayos X presentados en el presente documento se recogieron utilizando un instrumento Bruker-AXS Model D8 Advance. La muestra en polvo se preparó y se montó de acuerdo con la recomendación del fabricante. Se operó un difractómetro de rayos X de polvo Bruker-AXS Model D8 Advance a 40 kV y 40,0 mA y se utilizó un detector VANTEC con una hendidura antidispersión de 1 mm. Las muestras se exploraron desde un ángulo de dispersión de $3,7^\circ 2\theta$ a $30^\circ 2\theta$, en un tamaño de etapa de $0,01^\circ 2\theta$ durante un tiempo de exploración total de 33 minutos.

La FIG. 1 muestra los patrones de difracción de rayos X de polvo para tres preparaciones de formas cristalinas de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico (líneas 1-3) y una preparación amorfa del compuesto (línea 4). El difractograma del material amorfo no revela ningún pico de difracción, lo que indica que el material es, de hecho, amorfo y carece de cristalinidad. La conversión del material amorfo en una forma cristalina proporcionó el material utilizado para obtener los datos que se muestran en las líneas 1-3. Los difractogramas superpuestos revelan un patrón uniforme de picos e intensidades relativas para el monohidrato del clorhidrato cristalino para una serie de lotes cristalizados en acetona/agua.

La FIG. 2 ilustra el difractograma del monohidrato del clorhidrato cristalino de $5^\circ 2\theta$ a $30^\circ 2\theta$. En algunas realizaciones, todo el difractograma y los picos que se encuentran en él se utilizan para caracterizar las formas sólidas cristalinas descritas en el presente documento. Por tanto, las formas sólidas cristalinas se caracterizan mediante un patrón de difracción de rayos X de polvo sustancialmente como se representa en la FIG. 2.

En algunas realizaciones, se utiliza un subconjunto de los picos del patrón para caracterizar la forma cristalina. Cuando se sospecha que está presente otra sustancia, los picos comunes a las sustancias habitualmente no son útiles para confirmar la presencia de ninguna de las dos. En algunas realizaciones, es de interés el subconjunto de los picos que tienen la mayor intensidad relativa. Cualquier subconjunto basado en la intensidad relativa de los picos puede modificarse, por supuesto, para excluir ciertos picos que se superponen con los de otros componentes cristalinos que se sospecha que están presentes.

El compuesto monohidrato del clorhidrato cristalino se caracteriza por un patrón que tiene picos a aproximadamente los ángulos de dispersión y con aproximadamente las intensidades relativas descritas en la Tabla 1.

10

TABLA 1

Ángulo de dispersión ($^{\circ} 2\theta$)	Intensidad relativa (%)
5,4	28
9,8	12
10,9	12
12,5	60
14,4	6
16,3	8
16,6	8
17,1	36
18,2	9
19,0	100
19,2	14
19,6	12
19,7	35
20,5	44
20,7	22
21,2	26
21,8	37
23,1	17
23,3	44
23,4	51
23,8	5
25,0	10
25,1	7
25,6	3
26,4	17
26,9	6
27,4	29
28,6	12
29,1	5

Las intensidades relativas de los picos pueden variar dependiendo de, por ejemplo, el método de preparación de las muestras, el tamaño de los cristallitos, la distribución de tamaños, los filtros, el tipo de instrumento, la fuente de rayos X, la temperatura y similares. Como se ha mencionado anteriormente, estos y otros factores también pueden influir en el valor del ángulo de dispersión. Además, pueden observarse otros picos, o pueden no observarse ciertos picos enumerados en la Tabla 1, dependiendo de la instrumentación y de los parámetros utilizados para registrar un difractograma.

En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico tiene picos de difracción de rayos X de polvo a aproximadamente $12,5^{\circ} 2\theta$ y $19,0^{\circ} 2\theta$. En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico tiene picos de difracción de rayos X de polvo a aproximadamente $17,1^{\circ} 2\theta$, $19,7^{\circ} 2\theta$, $20,5^{\circ} 2\theta$, $21,8^{\circ} 2\theta$, $23,3^{\circ} 2\theta$ y $23,4^{\circ} 2\theta$. En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico tiene picos de difracción de rayos X de polvo a aproximadamente $5,4^{\circ} 2\theta$, $20,7^{\circ} 2\theta$, $21,2^{\circ} 2\theta$, $23,1^{\circ} 2\theta$, $26,4^{\circ} 2\theta$ y $27,4^{\circ} 2\theta$.

La difracción de rayos X de polvo es solo una de varias técnicas analíticas para caracterizar y/o identificar formas sólidas cristalinas. Pueden utilizarse técnicas espectroscópicas tales como las espectroscopías Raman (incluyendo la Raman microscópica), infrarroja y de RMN en estado sólido para caracterizar y/o identificar formas sólidas cristalinas. Estas técnicas también pueden utilizarse para cuantificar la cantidad de una o más formas sólidas cristalinas en una mezcla. Otros métodos para caracterizar y/o identificar diferentes formas sólidas cristalinas de un compuesto incluyen las técnicas térmicas tales como el punto de fusión o la calorimetría diferencial de barrido, el análisis termogravimétrico y la sorción de vapor dinámica.

35

En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-

carboxílico se caracteriza mediante calorimetría diferencial de barrido ("DSC"). En la FIG. 3 se muestra una línea de DSC. Los datos de DSC se obtuvieron mediante un modelo Q1000 DSC de TA Instruments. Las muestras se analizaron mediante la exploración de temperatura de 40 ° a 200 °C a una velocidad de exploración de 10 °C/min en una purga de gas dinitrógeno de 50 ml/min. Los acontecimientos calorimétricos observados en la línea de DSC

5 pueden variar en temperatura o en magnitud dependiendo de, por ejemplo, el método de preparación de muestras, el tamaño de los cristallitos, las impurezas, el tipo de instrumento, la calibración, la velocidad de calentamiento y similares, con posibles variaciones en la temperatura de aproximadamente 5 °C.

Como se muestra en la FIG. 3, el termograma de DSC del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por dos picos. El primer pico se observa a aproximadamente 135 °C, con una temperatura de comienzo de aproximadamente 104 °C, y se cree que corresponde a la pérdida del agua de hidratación. El segundo pico se observa a aproximadamente 180 °C, con una temperatura de comienzo de aproximadamente 168 °C, y se cree que representa un acontecimiento de fusión. En consecuencia, en algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por una línea de DSC sustancialmente como se representa en la FIG. 3. En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por que tiene dos transiciones endotérmicas con temperaturas de comienzo de aproximadamente 104 °C y aproximadamente 168 °C.

10

15

Como se muestra en la FIG. 4, el termograma de DSC del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico amorfo se caracteriza por una transición endotérmica amplia de entre aproximadamente 185 °C y 230 °C. La respuesta del material al análisis de DSC es representativa de la conducta que se observa normalmente para los materiales amorfos.

20

En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza mediante el análisis termogravimétrico ("TGA"). En la FIG. 4 se muestra una línea de TGA. Los datos de TGA se obtuvieron mediante un modelo TGA/SDTA 851e de Mettler Toledo. Las muestras se analizaron mediante la exploración de temperatura de 30 ° a 250 °C a una velocidad de exploración de 10 °C/min en una purga de gas dinitrógeno de 40 ml/min. Los acontecimientos termogravimétricos observados en la línea de TGA pueden variar en temperatura o en magnitud dependiendo de, por ejemplo, el método de preparación de muestras, el tamaño de los cristallitos, las impurezas, el tipo de instrumento, la calibración, la velocidad de calentamiento y similares, con posibles variaciones en la temperatura de aproximadamente 5 °C, o en la magnitud de un pequeño porcentaje.

25

30

Como se muestra en la FIG. 5, el termograma de TGA del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza principalmente por una pérdida de peso de aproximadamente el 4,7 % en una sola etapa. La etapa está aproximadamente completa cuando el desnivel de temperatura alcanza aproximadamente 90 °C. Se cree que la pérdida de peso corresponde a una pérdida del agua de la forma cristalina monohidratada. El contenido de agua teórico de una forma monohidratada es del 5,2 %. Aquellos expertos en la materia reconocen que la cantidad de agua en un hidrato puede variar dependiendo de los métodos y las condiciones de cristalización y del manejo de los cristales después de la misma. Por tanto, en algunas realizaciones, la relación molar del hidrato presente en la forma cristalina es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,2, desde aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,0, o aproximadamente 1,0. En consecuencia, en algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por una línea de TGA sustancialmente como se representa en la FIG. 5. En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por que tiene una pérdida de peso de aproximadamente el 5,0 % tras un aumento de temperatura a aproximadamente 100 °C. En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por que tiene una pérdida de peso de aproximadamente el 4,7 % tras un aumento de temperatura a aproximadamente 90 °C.

35

40

45

50

En algunas realizaciones, el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por sorción de vapor dinámica ("DVS"). En la FIG. 6 se muestra una línea de DVS. Los datos de DVS se obtuvieron utilizando un aparato Dynamix Vapor Sorption (DVS-1) hecho por Surface Measurement System Ltd. Las muestras se analizaron someténdolas a una serie de condiciones de humedad relativa (HR) a 25 °C. La humedad relativa se exploró desde aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 90 %.

55

Como se muestra en la FIG. 6, la línea de DVS del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por un cambio de masa reversible de aproximadamente el 1,5 % entre una HR del 0 % y una HR del 10 %, seguido de una masa relativamente estable entre una HR del 10 % y una HR de aproximadamente el 70 %, seguido de un cambio reversible de masa de aproximadamente el 2,5 % entre una HR de aproximadamente el 70 % y una HR del 90 %. La línea de DVS indica que aunque las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden ser propensas a ganar agua a alta humedad, el agua sorbida se pierde de forma reversible y no parece influir negativamente en la integridad de la forma cristalina.

60

65

Como se muestra en la FIG. 7, la línea de DVS de la forma amorfa del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-

aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico se caracteriza por un gran aumento de peso cuando se expone por primera vez a la humedad alta y porque estos cambios no son reversibles tras el ciclado de la humedad relativa. La forma amorfa aumentó de masa en un 21,7 % cuando la humedad relativa aumentó de una HR del 0 % a una HR del 90 % en el primer ciclo, de 0 a aproximadamente 1200 min. Al volver al 0 % de humedad relativa, de aproximadamente 1200 min a aproximadamente 1800 min, la muestra no volvió a su masa original y al repetir el aumento del 90 % de humedad relativa, de aproximadamente 1800 min a aproximadamente 2400 min, la ganancia de masa no fue casi tan grande como en el primer ciclo. La inspección de la muestra tras el experimento, reveló que el polvo fluido original se transformó en una masa sólida por el cambio en la humedad. Estos resultados indican que la forma amorfa no es estable a los cambios ambientales en la humedad.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden servir como medicamentos en su forma pura o como formulaciones farmacéuticas, que pueden administrarse a través de cualquier método aceptable conocido en la técnica, ya sea solos o en combinación. Las formulaciones farmacéuticas generalmente comprenden un compuesto descrito en el presente documento en mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden formularse para la administración oral (incluyendo la cavidad bucal o la vía sublingual) o para la administración parenteral (incluyendo la administración intravenosa (iv), subcutánea (sc), intramuscular (im), intraperitoneal (ip)). Otras vías de administración incluyen la administración epidural, rectal, intranasal o dérmica o por inhalación pulmonar. En algunas realizaciones, se utiliza la liberación sostenida de los compuestos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones están en forma de formulaciones sólidas o líquidas y los métodos para su preparación se describen en general en "Remington Pharmaceutical Sciences", 17^a Ed., Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, Pa., EE.UU., 1985.

En algunas realizaciones, el vehículo está en forma de una o más sustancias elegidas entre vehículos, diluyentes, agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, conservantes y estabilizantes. Los excipientes que constituyen el vehículo deben ser compatibles con el o los ingredientes farmacéuticos activos y ser capaces de estabilizar los compuestos sin ser perjudiciales para el sujeto que se trata.

Pueden utilizarse una forma de repositorio o una formulación de liberación sostenida de manera que se liberen cantidades terapéuticamente eficaces de la preparación en el torrente sanguíneo durante varias horas o días después de la administración del compuesto o la composición, por ejemplo, mediante inyección o deposición transdérmica. Las formulaciones adecuadas para la liberación sostenida incluyen polímeros biodegradables, tales como el ácido L-láctico, el ácido D-láctico, el ácido DL-láctico, el glicólido, el ácido glicólico y los isómeros de los mismos. De forma similar, el vehículo puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como el monoestearato de glicerilo o el diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

Otras formulaciones de liberación sostenida pueden incluir, pero no se limitan a, las formulaciones que incluyen al menos uno de los compuestos desvelados en el presente documento combinado con liposomas, microesferas, emulsiones o micelas y estabilizadores líquidos.

Las dosis de los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento requeridas para los efectos terapéuticos deseados dependerán de la potencia del compuesto, de la composición particular utilizada y de la vía de administración seleccionada. "Una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que reduce los síntomas de una afección o una patología dadas y, en algunas realizaciones, que normaliza las respuestas fisiológicas en un sujeto que padece la afección o la patología. La reducción de los síntomas o la normalización de las respuestas fisiológicas pueden determinarse utilizando métodos rutinarios en la técnica y pueden variar con una afección o una patología dadas.

En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos o formulaciones farmacéuticas es una cantidad que restaura un parámetro fisiológico medible a sustancialmente el mismo valor (preferentemente a dentro del ± 30 %, más preferentemente a dentro del ± 20 % y todavía más preferentemente, a dentro del ± 10 % del valor) del parámetro en un sujeto sin la afección o la patología.

La cantidad terapéuticamente eficaz se determinará por la persona experta teniendo en cuenta factores tales como la potencia del fármaco, la edad y la constitución del paciente, el peso corporal, el perfil farmacocinético del fármaco y en general el fármaco se prescribirá para cada paciente o grupo de pacientes. Sin embargo, en algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto es de al menos aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día, tal como al menos aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día, al menos aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día y al menos aproximadamente 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto es de como máximo aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, tal como, como máximo aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal/día y como máximo aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto será de aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día, aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día o aproximadamente 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. En algunas realizaciones, los compuestos se administran en el intervalo de aproximadamente 0,001 g a 10 g por paciente por día. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos se administran en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por paciente por día, desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg por paciente por día o

aproximadamente 50 mg por paciente por día.

La pauta de dosificación más adecuada puede determinarse mejor por un facultativo médico para cada paciente individualmente. La pauta de dosificación óptima con los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento depende de factores tales como la enfermedad o el trastorno particulares que se tratan, el efecto deseado y la edad, el peso o el índice de masa corporal y las condiciones físicas generales del paciente. La administración puede realizarse en una forma de dosificación unitaria única para aliviar los síntomas agudos o como una terapia continua en forma de dosis múltiples en el tiempo. Como alternativa, pueden emplearse los sistemas de infusión continua o las formulaciones de depósito de liberación lenta. Pueden coadministrarse dos o más compuestos o formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Además, los compuestos y las composiciones pueden administrarse de una manera similar con fines profilácticos. En última instancia, la mejor pauta de dosificación se decidirá por el médico especialista para cada paciente individualmente.

En el presente documento también se describen métodos para prevenir o tratar una afección que comprende administrar a un sujeto que necesite los mismos (por ejemplo, un ser humano) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una formulación farmacéutica como se describen en el presente documento. Los ejemplos de afecciones que pueden tratarse o prevenirse mediante los compuestos o las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, la fibrilación auricular, el aleteo auricular, la taquicardia ventricular o la fibrilación ventricular); la osteoporosis; la inflamación del epitelio de las vías respiratorias; los trastornos del tejido alveolar; la incontinencia vesical; la deficiencia auditiva, por ejemplo, debido a las enfermedades de la cóclea; las lesiones endoteliales; la diabetes incluyendo la retinopatía diabética y la neuropatía diabética; las afecciones relacionadas con el SNC; la isquemia (por ejemplo, la isquemia del sistema nervioso central, de la médula espinal, del cerebro o del tallo cerebral); los trastornos del tejido dental incluyendo la enfermedad periodontal; las enfermedades renales; las manifestaciones hemáticas (por ejemplo, la anemia, la leucopenia, la trombocitopenia y la pancitopenia), especialmente después del tratamiento con compuestos citostáticos o con radioterapia; las heridas tales como las heridas superficiales y las heridas profundas resultado de traumatismos; la disfunción eréctil; la incontinencia de la vejiga urinaria; el dolor neuropático; la inflamación subcrónica y crónica; el cáncer; la deficiencia medular y el trasplante de células madre; las afecciones que surgen durante el trasplante de células y de tejidos o durante los procedimientos médicos tales como la cirugía; las afecciones causadas por un exceso de especies reactivas de oxígeno, de radicales libres o de óxido nítrico; las enfermedades o los trastornos del embarazo (por ejemplo, la preeclampsia y el parto prematuro); y el iclus.

Los compuestos o las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden utilizarse para mantener el ritmo sinusal normal (RSN) tras la cardioversión de la fibrilación auricular (FA), para prevenir la FA posoperatoria tras la cirugía cardíaca y para causar farmacológicamente la cardioversión de la FA.

Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden facilitar y/o mantener la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes. En un aspecto, los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento se dirigen a las mismas células diana del AAP, el AAP10, la HP5 y/o los análogos funcionales de los mismos, es decir, los compuestos son capaces de modular la función de estas células por agonismo o antagonismo de la función del AAP, el AAP10, la HP5 y/o los análogos funcionales de los mismos. Los compuestos, sin embargo, no se limitan a los compuestos que tienen propiedades específicas agonistas o antagonistas del AAP. También se describen en el presente documento la preparación y el uso de formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de patologías que pueden estar asociadas a una comunicación intercelular por uniones comunicantes alterada, y métodos para utilizar estas composiciones, por ejemplo, como se desvelan en el documento WHO 02/077017 "New Medical Uses of Intercellular Communication Facilitating Compounds".

En el presente documento también se describen métodos de tratamiento de un sujeto que tiene, o de prevención en un sujeto en riesgo de desarrollar, una afección asociada a la GJIC alterada (por ejemplo, la arritmia cardíaca o la osteoporosis) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos o las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento. Los individuos que pueden tratarse utilizando los compuestos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, animales, preferentemente mamíferos, por ejemplo, roedores (incluyendo los ratones, las ratas, los hámsters y los lagomorfos, tales como los conejos), perros, cerdos, cabras (generalmente cualquier animal doméstico) y primates.

Los ejemplos de afecciones que pueden tratarse o prevenirse utilizando los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades cardiovasculares; la osteoporosis; la inflamación del epitelio de las vías respiratorias; los trastornos del tejido alveolar; la incontinencia vesical; la deficiencia auditiva (por ejemplo, debido a las enfermedades de la cóclea); las lesiones endoteliales; la diabetes (Tipo I o Tipo II) y las complicaciones diabéticas (incluyendo la retinopatía diabética y la neuropatía diabética); la aterosclerosis; las afecciones relacionadas con el SNC; las convulsiones; la isquemia (por ejemplo, la isquemia del sistema nervioso central, de la médula espinal, del cerebro o del tallo cerebral); los trastornos del tejido dental (incluyendo la enfermedad periodontal); las enfermedades renales; las

manifestaciones hemáticas (por ejemplo, la anemia, la leucopenia, la trombocitopenia y la pancitopenia, especialmente después del tratamiento con compuestos citostáticos o con radioterapia); las heridas (por ejemplo, las heridas superficiales y las heridas profundas resultado de traumatismos); la fractura ósea; la disfunción eréctil; la incontinencia de la vejiga urinaria; el dolor neuropático; la inflamación subcrónica y crónica; el cáncer; la deficiencia medular y el trasplante de células madre; las afecciones que surgen durante el trasplante de células y de tejidos o durante los procedimientos médicos tales como la cirugía; las afecciones causadas por un exceso de especies reactivas de oxígeno y/o de radicales libres y/o de óxido nítrico; las enfermedades o los trastornos del embarazo (por ejemplo, la preeclampsia y el parto prematuro); la infertilidad femenina; y el ictus. Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para inducir el parto (por ejemplo, facilitando el efecto de la oxitocina sobre la contracción del útero).

En el presente documento también se describen compuestos antiarrítmicos farmacológicamente activos para el tratamiento o la prevención de las arritmias y las complicaciones trombóticas que surgen durante los trastornos cardiovasculares, tales como la cardiopatía isquémica aguda (por ejemplo, la angina de pecho estable, la angina de pecho inestable, el infarto agudo de miocardio), la insuficiencia cardíaca congestiva (por ejemplo, la insuficiencia cardíaca sistólica, diastólica, de alto gasto, de bajo gasto, derecha o izquierda), las cardiopatías congénitas, la cardiopatía pulmonar, las cardiomiopatías, la miocarditis, la cardiopatía hipertensiva, durante la revascularización coronaria y similares.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar y/o prevenir las bradiarritmias (por ejemplo, debido a la enfermedad en el nodo sinusal, el nodo AV, la rama derecha o izquierda del haz de His) y las taquiarritmias asociadas a la reentrada (por ejemplo, las extrasístoles auriculares, las extrasístoles de la unión AV, las extrasístoles ventriculares, la fibrilación auricular, el aleteo auricular, la taquicardia supraventricular paroxística, la taquicardia por reentrada en el nódulo sinusal, la taquicardia por reentrada en el nodo AV y la taquicardia ventricular no sostenida). Además, los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden ser útiles para aliviar las afecciones en las que la ralentización de la velocidad de conducción es un factor importante, por ejemplo, la taquicardia ventricular, la fibrilación ventricular y la fibrilación auricular. Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden administrarse ya sea solos o en combinación con otros compuestos antiarrítmicos, tales como los agentes de clase I (por ejemplo, la lidocaína), los agentes de clase II (por ejemplo, el metoprolol o el propranolol), los agentes de clase III (por ejemplo, la amiodarona o el sotalol) o los agentes de clase IV (por ejemplo, el verapamilo).

Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento también pueden utilizarse para tratar o prevenir una o más de las arritmias de reentrada, la reentrada ventricular (por ejemplo, que surge durante el infarto de miocardio agudo, el infarto de miocardio crónico, la angina de pecho estable y la angina de pecho inestable), la miocardiopatía infecciosa o autonómica, la fibrilación auricular, la alternancia de la repolarización, la taquicardia ventricular monomórfica, la alternancia de la onda T, las bradiarritmias, la contractilidad reducida del tejido cardíaco, la trombosis y similares.

Las funciones adicionales en las que se ha implicado la comunicación intercelular por uniones comunicantes endoteliales son el comportamiento migratorio de las células endoteliales después de la lesión, la angiogénesis, el crecimiento endotelial y la senescencia y la coordinación de las respuestas vasomotoras (Cristo *et al. Braz. J Med Biol. Res.*, 33, 423-429 (2000)). Por tanto, los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden utilizarse para mejorar las respuestas vasculares realizadas y para mejorar el suministro de sangre durante las afecciones con un aumento de la demanda metabólica (por ejemplo, el ejercicio físico, la taquicardia) y durante la isquemia.

Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden utilizarse para citoproteger un tejido o un órgano de un mamífero que necesita dicho tratamiento. Citoproteger se refiere a reducir, prevenir o aliviar los síntomas asociados a la inflamación celular no deseada. Los tejidos y los órganos en particular que se beneficiarán con el método incluyen aquellos confinados o impactados por una cápsula fibrosa tales como el corazón o los riñones. También se incluyen los tejidos asociados al hueso, tales como el cerebro, la médula espinal y la médula ósea.

Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden utilizarse para prevenir o tratar la lesión isquémica en los órganos de un mamífero que necesita dicho tratamiento, incluyendo, por ejemplo, el corazón, el sistema nervioso central, el riñón, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones y las extremidades.

En el presente documento también se describe el uso de los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento para tratar o prevenir las manifestaciones hemáticas después del tratamiento con compuestos citostáticos o con radioterapia. La recuperación de la hematopoyesis alterada se observó en los pacientes después del tratamiento citostático 5-fluorouracilo (5-FU). Esto incluye la falta de la recuperación de los recuentos sanguíneos periféricos, incluyendo la neutropenia grave, la anemia grave con reticulocitopenia y la presencia de eritrocitos periféricos anormales y la trombocitopenia grave. Además, se observan disminuciones de 5-8 veces de la celularidad de la médula ósea y del contenido de progenitores hematopoyéticos (unidades formadoras

de colonias granulomacofágicas (UFC-GM), unidades formadoras de brotes eritroides (UFB-E), unidades formadoras de colonias mixtas (UFC-mix) y unidades formadoras de colonias en general (UFC-C) en la médula ósea. También se proporcionan el tratamiento o la prevención de situaciones clínicas generales habitualmente asociados a la pancitopenia iatrogénica.

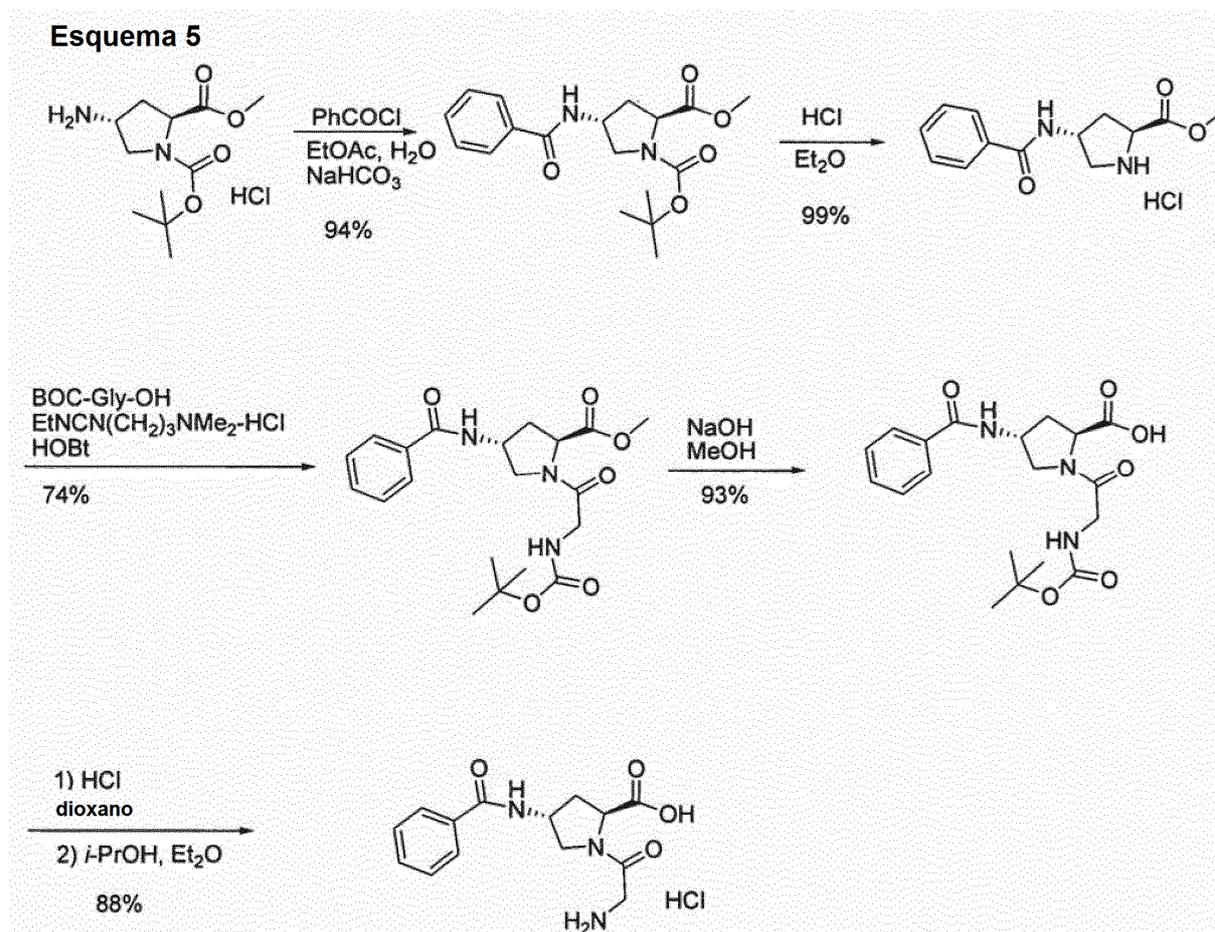
5 Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas descritos en el presente documento pueden ser útiles para tratar o prevenir la osteoporosis. Se sabe que la GJIC es importante en la formación ósea. La eficacia de los compuestos puede evaluarse, por ejemplo, mediante un aumento en la actividad de los osteoblastos en un ensayo de actividad de los osteoblastos convencional que mide ya sea la formación de la onda de calcio y/o la actividad de la fosfatasa alcalina de las células osteoblásticas en presencia de los compuestos. La actividad de la fosfatasa alcalina también puede utilizarse para proporcionar una medida de la actividad osteoblástica utilizando ensayos colorimétricos convencionales.

Ejemplos

15

Las síntesis representativas de los compuestos representativos se muestran en los Ejemplos 1 a 5.

Ejemplo 1: Síntesis del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico



Etapas 1: Síntesis de (2S,4R)-1-terc-Butil-2-metil-4-benzamidopirrolidin-1,2-dicarboxilato

25 A una solución de NaHCO_3 (58,64 g, 0,698 mol) en agua (625 ml) se añadió clorhidrato del éster metílico de N-Boc-*trans*-4-amino-L-prolina (50 g, 0,1745 mol, CNH Technologies, 98 %) en porciones, seguido de EtOAc (500 ml). La mezcla se enfrió a 0 °C. Una solución de cloruro de benzoilo (20,26 ml, 0,1745 mol) en EtOAc (100 ml) se añadió durante 25 min a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo 2 veces con 200 ml de EtOAc. La fracción orgánica combinada se lavó con 200 ml de HCl 1N, 100 ml de solución saturada de NaHCO_3 , 100 ml de salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró para proporcionar 60,67 g del producto del título en forma de un aceite pesado (rendimiento del 99,8 %; rendimiento del 94 % ajustado al EtOAc residual) RMN ^1H (CDCl_3 , δ , ppm; para dos conformeros): 7,78-7,7 (m, 2H), 7,56-7,4 (m, 3H), 6,25-6,1 (m, 1H), 4,8-4,67 (m, 1H), 4,51-4,41 (m, 0,4H), 4,34 (dd, $J = 7, 7$ Hz, 0,6H), 3,97-3,84 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,52 (dd, $J = 11, 4$ Hz, 0,6H), 3,39 (dd, $J = 11, 4$ Hz, 0,4H), 2,47-2,21 (m, 2H), 1,46 (s, 3,6H), 1,43 (s, 5,4H). EM (m/z , IEN positivo,

30

para M+Na): 371.

Etapa 2: Síntesis de clorhidrato de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo

5 Se añadió (2S,4R)-1-*tert*-Butil-2-metil-4-benzamidopirrolidin-1,2-dicarboxilato (60,19 g, contiene EtOAc al 5,6 %, 0,1631 mol) en Et₂O (100 ml) y el disolvente se evaporó al vacío para eliminar el EtOAc residual. El aceite residual se disolvió en Et₂O (100 ml). Se añadió solución de HCl 2N en Et₂O (700 ml) (exotermia suave; la precipitación comenzó después de aproximadamente 5 min). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 21 h. En ese punto, se añadieron 200 ml de solución de HCl 2N en Et₂O y la mezcla se agitó durante 24 h adicionales. El precipitado se filtró, se lavó con 500 ml de éter dietílico y se secó al vacío a temperatura ambiente durante 24 h para proporcionar 46,03 g del producto del título (rendimiento del 99 %). RMN ¹H (CD₃OD, δ, ppm): 7,91-7,84 (m, 2H), 7,6-7,44 (m, 3H), 4,78 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,69-4,59 (m, 1H), 3,77 (dd, *J* = 12, 6,6 Hz, 1H), 3,52 (dd, *J* = 12, 5 Hz, 1H), 2,67-2,5 (m, 2H). EM (*m/z*, IEN positivo, para M+H): 249.

15 Etapa 3: Síntesis de 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo

A una solución de Boc-Gly-OH (28,13 g, 0,1606 mol) y 1-hidroxibenzotriazol (0,1686 mol, 25,64 g; contiene H₂O al 11,12 % en peso) en THF (1,3 l) se le añadió clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (0,1686 mol, 32,328 g) (frasco A). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, después se detuvo la agitación y el residuo oleoso se dejó sedimentar.

En un matraz separado (matraz B), se añadió NaOH, (0,1606 mol; 32 ml de solución 5N) a una suspensión de clorhidrato de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (0,1606 mol, 45,73 g) en THF (0,52 l) durante 15 min. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min (los sólidos se disolvieron en su mayoría). La solución de éster de HOBt preparado anteriormente (matraz A) se añadió a la mezcla de reacción (matraz B) a temperatura ambiente durante 15 min, dejando el residuo oleoso atrás. El residuo del Matraz A se lavó con 250 ml de THF. La solución de THF se separó del aceite pesado y se añadió a la mezcla del matraz B. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. Se añadió agua (500 ml) y la mezcla se concentró al vacío para retirar el THF (~550 ml de volumen residual). Se añadió EtOAc (500 ml), seguido de salmuera (300 ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo 2 veces con 300 ml de EtOAc. La fracción orgánica combinada se lavó 2 veces con 250 ml de HCl 1N, 2 veces con 250 ml de solución sat. de NaHCO₃, 150 ml de salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró para proporcionar 48,31 g del producto del título en forma de un sólido espumoso (rendimiento del 74 %). RMN ¹H (CDCl₃, δ, ppm; para dos confórmeros): 7,81-7,72 (m, 2H), 7,57-7,39 (m, 3H), 6,41 (d, *J* = 6 Hz, 0,8H), 6,25 (d, *J* = 6 Hz, 0,2H), 5,32 (s a, 1H), 4,88-4,74 (m, 1H), 4,65 (t, *J* = 7 Hz, 1H), 4,11-3,86 (m, 2H), 3,83-3,78 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,69-3,56 (m, 1H), 2,65-2,3 (m, 2H), 1,43 (s, 9H). EM (*m/z*, IEN positivo, para M+Na): 428.

40 Etapa 4: Síntesis de ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico

A una solución de 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (23,33 g, 0,0575 mol) en metanol (450 ml) se le añadió NaOH, (0,2875 mol, 144 ml de solución acuosa 2N) a -1 a 1 °C durante 15 min. La mezcla se agitó a -5 a 1 °C durante 2,5 h. Se añadió HCl (0,2875 mol, 144 ml de solución acuosa 2N) a -3 a -1 °C durante 25 min. El MeOH se separó por destilación al vacío. Se añadieron 500 ml de EtOAc. La fase acuosa se saturó con NaCl. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo 2 veces con 250 ml de EtOAc. La solución de EtOAc combinada se secó sobre MgSO₄ y se concentró para proporcionar 22,54 g del producto del título en forma de un sólido espumoso de color blanco (contiene EtOAc al 6,6 % en peso; rendimiento del 94 % ajustado al EtOAc residual). RMN ¹H (CD₃OD, δ, ppm): 7,87-7,79 (m, 2H), 7,58-7,42 (m, 3H), 4,81-4,7 (m, 1H), 4,69-4,56 (m, 1H), 4,05-3,72 (m, 3H), 3,67-3,49 (m, 1H), 2,64-2,28 (m, 2H), 1,43 (s, 9H). EM (*m/z*, IEN positivo) para M+H: 392; para M+Na: 414.

Etapa 5: Síntesis de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico

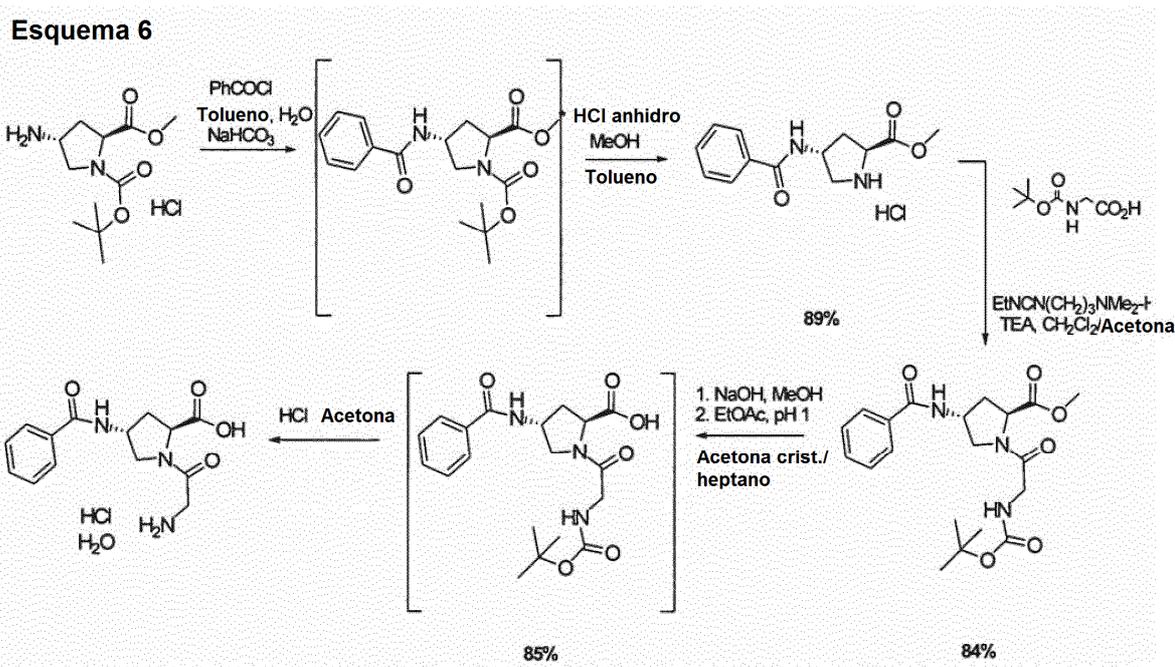
Se disolvió el ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico (21,97 g; contiene EtOAc al 6,6 % en peso; 0,0524 mol, ajustado al EtOAc residual) en dioxano (100 ml). El disolvente se evaporó al vacío para eliminar el EtOAc residual. El residuo se disolvió en dioxano anhidro (200 ml). Se añadió HCl (100 ml de solución ~3,6N en dioxano recién preparada) a 10-12 °C. La solución se dejó calentar hasta temperatura ambiente (la precipitación comenzó después de aproximadamente 2 min). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 h, momento en el cual se añadieron 30 ml de solución de HCl ~3,6N y la mezcla se agitó durante 5,5 h adicionales. Los sólidos precipitados se filtraron utilizando N₂ a presión, se lavaron 4 veces con 25 ml de dioxano y se secaron al vacío a temperatura ambiente durante 24 h para proporcionar 18,7 g de producto en bruto en forma de un sólido de color blanco.

El producto se disolvió en *i*-PrOH (104 ml). Se añadieron 210 ml de éter dietílico durante 1 h (el precipitado se formó inmediatamente después de la adición del éter). La mezcla se agitó durante 1 h, se filtró utilizando N₂ a presión, se lavó 2 veces con 50 ml de solución de Et₂O:*i*-PrOH 3:1 y se secó al vacío a temperatura ambiente durante 24 h y a

40 °C durante 48 h para proporcionar 15,7 g del compuesto del título.

El producto se combinó con 12,77 g del producto de un lote anterior, se disolvieron en 2 l de agua y la solución se liofilizó para obtener 26,85 g del compuesto del título. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ, ppm, para dos conformeros): 8,77 (d, J = 7 Hz, 0,8H), 8,71 (d, J = 7 Hz, 0,2H), 8,68-7,95 (a, 2H), 7,92-7,83 (m, 2H), 7,59-7,43 (m, 3H), 4,87-4,79 (m, 0,2H), 4,68-4,54 (m, 0,8H), 4,54-4,44 (m, 1H), 4,0-3,47 (m, 4H), 2,47-2,12 (m, 2H). EMAR calc. para C₁₄H₁₈N₃O₄ (M+H): 292,1297, encontrada: 292,1294.

Ejemplo 2: Síntesis de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-[2-aminoacetil]-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico



Etapas 1: Síntesis de clorhidrato de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo

15 A un reactor de 30 l con camisa calefactora, con agitación mecánica, se le cargaron 800 g (9,4 moles) de bicarbonato de sodio seguidos de 4,8 kg de agua. A esta solución agitada se le cargó clorhidrato del éster metílico de *N*-Boc-*trans*-4-amino-*L*-prolina (0,67 kg) en 3,4 kg de agua durante 10 minutos. Después de eso, se cargó tolueno (6,0 kg) (se observaron dos capas turbias) en el reactor de 30 l. La mezcla de reacción se enfrió a 0-10 °C con un circulador de calefacción/refrigeración. Se cargó cloruro de benzoilo (0,328 kg 2,41 moles) en 0,67 kg de tolueno durante 6 min mientras se mantenía la temperatura entre 0 a 10 °C. La línea de transferencia se enjuagó con 0,34 kg de tolueno. La mezcla se agitó a 0-10 °C durante 3 horas y se controló mediante CL (forma dos fases transparentes). Después de 3 h, la CL mostró menos del 3 % en área de cloruro de benzoilo. La temperatura se ajustó a 20-25 °C. Se detuvo la agitación y se separaron las fases. La fase orgánica se extrajo sucesivamente con HCl ~1N (1,3 kg), solución saturada acuosa de NaHCO₃ (3,25 kg) y agua (1,3 l). La solución de tolueno se concentró a 1,5-2,5 l y después seguido de 2 veces con 3,0 kg de tolueno. La solución se concentró a un volumen de 2 l a 40-50 °C y 88,04 kPa. El concentrado se transfirió a un reactor de 30 l con camisa calefactora con agitación mecánica, en atmósfera de N₂ y se diluyó con 1,8 kg de tolueno adicional.

30 A un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2 l con un tubo de entrada de gas, se le cargaron 0,64 kg de MeOH y el matraz se pesó (2,15 kg). El MeOH se enfrió a -5 a -15 °C en un baño de hielo. Se burbujó gas HCl anhidro durante 25 min a través de la solución. El matraz y su contenido se pesaron (2,357 kg). (Cálculo: Peso final del contenido - Peso inicial del contenido/volumen = g/ml de HCl) (2,357 kg - 2,15 kg = 0,207 kg g/ml de HCl).

35 La solución que contiene MeOH/HCl (0,207 kg, 5,2 mol, 2,2 eq) se añadió gota a gota durante 5 min con agitación, a la solución de tolueno del producto de la etapa (1) mientras se mantenía la temperatura entre 15-25 °C. Después de 15 min de agitación, se observó una suspensión espesa de color blanco. La suspensión se agitó durante 2,5 h a 15-25 °C. La HPLC indicó el 2,0 % de material de partida. La suspensión se filtró y se lavó 2 veces con 1,8 l de tolueno. Los sólidos se secaron a 35-40 °C al vacío para proporcionar, 619 g de producto (rendimiento del 91 % a partir de clorhidrato del éster metílico de *N*-Boc-*trans*-4-amino-*L*-prolina). Porcentaje de área por HPLC: 96,3 %. La RMN se ajusta a la estructura. RMN ¹H (CD₃OD, δ, ppm): 7,91-7,84 (m, 2H), 7,6-7,44 (m, 3H), 4,78 (t, J = 8,5 Hz, 1H), 4,69-4,59 (m, 1H), 3,77 (dd, J = 12, 6,6 Hz, 1H), 3,52 (dd, J = 12, 5 Hz, 1H), 2,67-2,5 (m, 2H). EM (*m/z*, IEN positivo, para M+H): 285.

Etapa 2: Síntesis de 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo

5 A un reactor de 50 l con camisa calefactora equipado con agitador y sonda de temperatura, se le cargaron clorhidrato de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (670 g) y cloruro de metileno (6,7 l) para formar una suspensión de color blanco. Se cargó TEA (230 g) gota a gota. La mezcla se agitó a 15-25 °C durante 15 minutos para formar una solución transparente de color amarillo claro. Después se cargaron Boc-Gly-OH (440 g) y 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida HCl (EDAC) (490 g) sucesivamente mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 25 °C. La mezcla de reacción se agitó a 15 a 25 °C durante 1 h. El análisis por HPLC indicó <3 % (en área) de material de partida. Se cargó agua (3,4 l) a la mezcla de reacción. Se separaron las fases. La fase acuosa superior se extrajo con cloruro de metileno (1,8 l). Las fases orgánicas combinadas se extrajeron sucesivamente con HCl 0,5N (1,8 l), solución acuosa de NaHCO₃ al 1 % (1,8 l) y agua (1,8 l). El cloruro de metileno se separó mediante destilación a presión atmosférica y se reemplazó por 10-15 l de acetona. La acetona se separó mediante destilación a presión atmosférica hasta un volumen de aproximadamente 6 l. La solución se enfrió a -5 a -15 °C durante 1 h. El producto comenzó a cristalizar a ~40 °C. La suspensión se agitó durante 2 h, se filtró, se lavó con heptano (3 kg) y se secó para proporcionar el producto en forma de un sólido de color blanco, 930 g (rendimiento del 85,8 %, corregido para la acetona residual). Porcentaje de área por HPLC: 99,2 %. Nota: El producto se aísla en forma de un solvato de acetona. RMN ¹H (CDCl₃, δ, ppm, dos confórmeros): 7,79-7,61 (m, 2H), 7,53-7,39 (m, 3H), 6,85 y 6,69 (dos dobletes, *J* = 6,4 y 6,8, 1H), 5,32 (a, 1H), 4,84-4,79 (m, 1H), 4,66-4,61 (m, 1H), 4,08-3,91 (m, 2H), 3,78-3,62 (m, 2H), 3,73 (s, 3H), 2,58-2,27 (m, 2H), 1,41 (s, 9H); EM (*m/z*, IEN positivo, para M+Na): 428.

Etapa 3: Síntesis de ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico

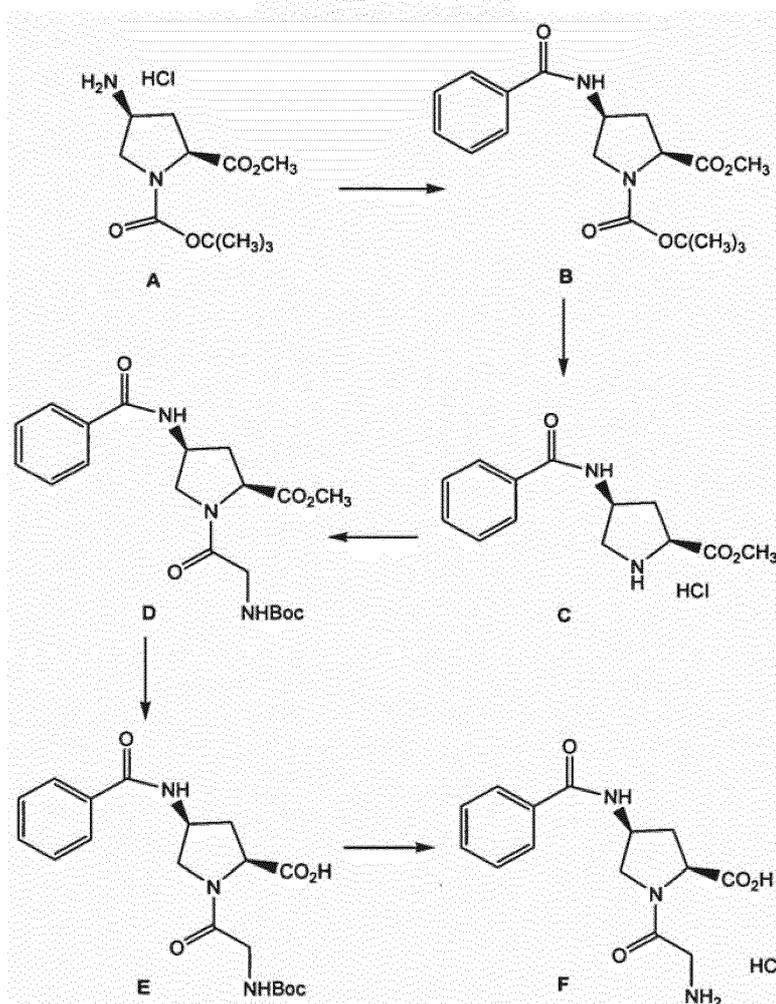
25 Una suspensión de 4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (800 g, 1,97 moles) en MeOH (6,5 l) se calentó a 35 °C para la disolución. La solución se enfrió a 12 °C. Una solución de NaOH (preparada a partir de 273 g de NaOH acuoso al 50 % y 1,7 kg de agua) se añadió gota a gota, mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción a 10-15 °C. La reacción se agitó a 10-15 °C durante 1 h y se monitorizó mediante HPLC. Cuando se consideró que la reacción estaba completa (<0,5 % del material de partida) por HPLC, una solución de HCl 2N (1 l) se añadió lentamente mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 20 °C. El MeOH se eliminó al vacío y se cargó EtOAc (11,5 l). Se añadió más HCl 2N para ajustar la solución a pH 1-2. La fase orgánica se separó y se lavó con agua (0,8 , 2 veces). El acetato de etilo se separó por destilación al vacío hasta que el volumen del lote alcanzó aproximadamente 3,5 l. Se añadió acetona (6,5 l). La acetona se destiló a presión atmosférica hasta que el volumen final alcanzó aproximadamente 3,5 l. La mezcla se enfrió a 45 °C. Se añadió heptano (3,3 l) durante 10 min a 45-50 °C. La suspensión resultante se enfrió a temperatura ambiente durante 30 min y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido de color blanco se filtró y se lavó con acetona (1 l, 2 veces). La torta húmeda se secó al vacío para proporcionar 650 g de producto (85 %). La pureza del área por HPLC fue >99 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, dos confórmeros): 12,6 (sa, 1H), 8,63 y 8,56 (dos dobletes, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,86-7,82 (m, 2H), 7,57-7,45 (m, 3H), 6,88-6,80 y 6,49 (dos multipletes, 1H), 4,66-4,59 (m, 1H), 4,43-4,38 (m, 1H), 3,87-3,64 (m, 3H), 3,48-3,42 (m, 1H), 2,39-2,11 (m, 2H), 1,38 (s, 9H); EM (*m/z*, IEN positivo) para M+H: 392; para M+Na: 41. EM (*m/z*, IEN positivo) para M+H: 392; para M+Na: 414.

Etapa 4: Síntesis de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico

45 A una suspensión de ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico (650,2 g) en acetona (4,1 l) se le añadió ácido clorhídrico conc. (322 g). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 15 min y se agitó a 50 °C. La reacción se controló mediante HPLC para determinar la finalización. Se añadió agua (520 g). La mezcla se calentó a reflujo para disolver el revestimiento sólido. La solución transparente resultante se enfrió a 40 °C. Se añadió acetona (7,0 l) durante 15 min mientras que la temperatura se mantuvo a 30-40 °C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente durante 30 min y se agitó hasta que se formó una suspensión de color blanco. Se añadió acetona adicional (7,0 l) durante 10 min. La mezcla se agitó durante la noche a aproximadamente 22-24 °C. Los sólidos precipitados se filtraron a través de un embudo de Buchner forrado con polipropileno y se lavaron con acetona (2 l, 2 veces), se secaron en el embudo para proporcionar 530 g (93,8 %) de producto en forma de un monohidrato. La pureza del área por CL fue del 99,7 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, para dos confórmeros): 8,77 (d, *J* = 7 Hz, 0,8H), 8,71 (d, *J* = 7 Hz, 0,2H), 8,68-7,95 (a, 2H), 7,92-7,83 (m, 2H), 7,59-7,43 (m, 3H), 4,87-4,79 (m, 0,2H), 4,68-4,54 (m, 0,8H), 4,54-4,44 (m, 1H), 4,0-3,47 (m, 4H), 2,47-2,12 (m, 2H). EMAR calc. para C₁₄H₁₈N₃O₄ (M+H): 292,1297, descubierta: 292,1294.

60 Ejemplo 3: Síntesis de clorhidrato del ácido (2S,4S)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico

Esquema 7



Etapa 1: Síntesis de 4-benzamidopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4S)-1-*terc*-butilo 2-metilo

- 5 A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml, con agitación mecánica, se le cargaron 4,8 g (56,8 μ mmol) de bicarbonato de sodio seguidos de 48 ml de agua. A esta solución agitada se le cargaron clorhidrato de 4-aminopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4S)-1-*terc*-butilo 2-metilo **A** (4 g, 14,2 μ mmol; preparado a partir de 4-aminopirrolidin-2-carboxilato de metilo disponible en el mercado) y EtOAc (40 ml) (se observaron dos capas turbias).
 10 La mezcla de reacción se enfrió a 5-10 $^{\circ}$ C con un baño de hielo. Se cargó cloruro de benzoílo (2,0 g, 14,2 μ mmol) en 8 ml de EtOAc gota a gota durante 10 min manteniendo la temperatura entre 5-10 $^{\circ}$ C. La mezcla se agitó a 5-10 $^{\circ}$ C durante 1 h y se controló mediante CL, que mostró menos del 0,5 % en área de cloruro de benzoílo. Se detuvo la agitación y se separaron las fases. La fase acuosa inferior se extrajo con EtOAc (20 ml, 2 veces). La capa de EtOAc combinada se lavó con HCl 1N (20 ml), solución saturada acuosa de NaHCO₃ (20 ml), salmuera (20 ml) y se secó con Na₂SO₄. La solución de EtOAc se filtró y el filtrado se evaporó para proporcionar 4,87 g de 4-benzamidopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4S)-1-*terc*-butilo 2-metilo **B** en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 98,2 %). La RMN se ajusta a la estructura. Porcentaje de área por HPLC: 99,3 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ , ppm): 8,46 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H), 7,81 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,56-7,44 (m, 3H), 4,48-4,41 (m, 1H), 4,27 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,79-3,71 (m, 1H), 3,69 (d, *J* = 11,7, 3H), 3,34-3,25 (m, 1H), 2,59-2,50 (m, 1H), 2,08-1,99 (m, 1H), 1,38 (d, *J* = 18,9 Hz, 9H). EM (*m/z*, IEN positivo, para M+H): 349.

Etapa 2: Síntesis de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S, 4S)-metilo

- 25 En un matraz de tres bocas de fondo redondo de 250 ml, con agitación mecánica, se suspendieron 4,75 g (13,6 μ mmol) de **B** en 20 ml de éter. Se añadieron 50 ml de HCl 2N en éter y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La HPLC mostró un 50 % de conversión. Se añadieron 50 ml de HCl 2N en éter y se agitaron durante aproximadamente 60 h a temperatura ambiente. No se observó material de partida por HPLC. La mezcla se filtró, se lavó con éter y se secó en un embudo, para proporcionar 3,85 g de un sólido de color blanco 4-

benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S, 4S)-metilo **C** (rendimiento del 99,4 %). La RMN se ajusta a la estructura. Porcentaje de área por HPLC: 97,9 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm): 8,82 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H), 7,88 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,58-7,46 (m, 3H), 4,64-4,50 (m, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,52-3,46 (m, 1H), 3,36-3,30 (m, 1H), 2,72 (m, 1H), 2,26-2,17 (m, 1H). EM (*m/z*, IEN positivo, para M+H): 249.

5 **Etap 3: Síntesis de clorhidrato de 4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxilato de (2S,4S)-metilo**

10 A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml, se le cargaron **C** (2,5 g) y EtOAc (50 ml) para formar una suspensión de color blanco. Se cargó TEA (2,5 ml) gota a gota. La mezcla se agitó a 15-25 °C durante 10 min para formar una solución transparente de color amarillo claro. Después se cargaron Boc-Gly-OH (1,85 g) y EDAC (2,01 g) sucesivamente, mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 25 °C. (Nota: se observó un desprendimiento de calor moderado). La mezcla de reacción se agitó a 15 a 25 °C durante 1 h. La reacción se consideró completa mediante análisis por HPLC. Se cargó agua (50 ml). Se separaron las fases. La fase

15 acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (25 ml, 2 veces). La fase orgánica combinada se lavó sucesivamente con HCl 2N (25 ml), solución saturada acuosa de NaHCO₃ (25 ml) y salmuera (25 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar 3,35 g de clorhidrato de 4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxilato de (2S,4S)-metilo **D** en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 94,1 %). La RMN se ajusta a la estructura. Porcentaje de área por HPLC: 99,4 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm): 8,49 (d, *J* = 6 Hz, 0,8H), 8,32 (d, *J* = 6 Hz, 0,2H), 7,84-7,76 (m, 2H), 7,57-7,45 (m, 3H), 6,90-6,86 (m, 1H), 4,60-4,54 (c, *J* = 6 Hz, 1H), 4,35 (t, *J* = 6 Hz, 1H), 3,88-3,62 (m, 3H), 3,62 (s, 3H), 3,52-3,43 (m, 1H), 2,55-2,46 (m, 1H), 2,05-1,96 (m, 1H), 1,38 (s, 9H). EM (*m/z*, IEN positivo, para M+Na): 428.

25 **Etap 4: Síntesis de ácido (2S,4S)-4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico**

Una solución de **D** (3,2 g) en MeOH (50 ml) se enfrió a -5 a 0 °C. Una solución de NaOH 2N (20 ml) se añadió gota a gota, mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 0 °C. La reacción se agitó a aproximadamente 0 °C y se controló mediante HPLC. Cuando se consideró que la reacción se había completado por HPLC, una solución de HCl 2N (20 ml) se añadió lentamente mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 0 °C. El MeOH se eliminó al vacío y se cargó EtOAc (50 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (25 ml, 2 veces). La fase combinada de EtOAc se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar 2,9 g de ácido (2S,4S)-4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidin-2-carboxílico **E** en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 94 %). La RMN se ajusta a la estructura. Porcentaje de área por HPLC: 98,7 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm): 8,46 (d, *J* = 6,9 Hz, 0,8H), 8,35 (d, *J* = 6 Hz, 0,2H), 7,84-7,78 (m, 2H), 7,57-7,43 (m, 3H), 6,88-6,81 (m, 1H), 4,58-4,52 (c, *J* = 6 Hz, 1H), 4,24 (t, *J* = 9 Hz, 1H), 3,92-3,65 (m, 3H), 3,49-3,43 (m, 1H), 2,54-2,45 (m, 1H), 2,08-1,99 (m, 1H), 1,38 (s, 9H). EM (*m/z*, IEN positivo): M+Na: 414.

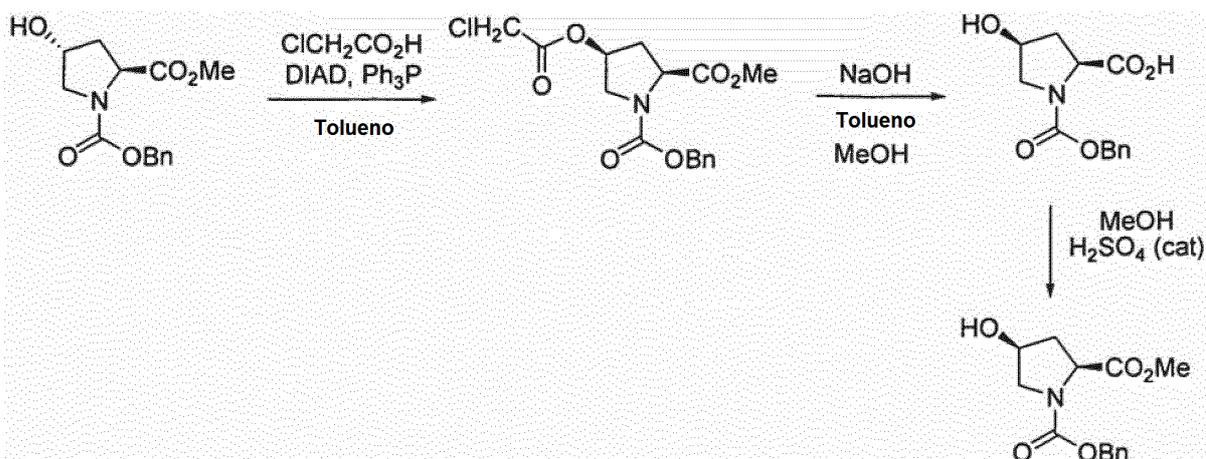
40 **Etap 5: Síntesis de clorhidrato del ácido (2S,4S)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico**

Se agitó una solución de **E** (2,5 g) en acetona (25 ml). Se añadió HCl concentrado (1,26 g) a la mezcla de reacción turbia a temperatura ambiente. La reacción se agitó a 48-50 °C y se controló mediante HPLC. Después de 1 h, se descubrió que los sólidos se adherían a las paredes del matraz. Se añadieron 25 ml de acetona y el calentamiento continuó a 45-50 °C. Después de 3 h, todos los sólidos de la pared se suspendieron y se obtuvo una suspensión.

45 Cuando se consideró que la reacción se había completado por HPLC (5 h) la temperatura de la mezcla de reacción se enfrió a 25 °C. Los sólidos precipitados se filtraron a través de un embudo de Buchner forrado con polipropileno y se lavó con acetona (5 ml, 2 veces). El producto clorhidrato del ácido (2S,4S)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico **F** se secó al aire para proporcionar 1,8 g (rendimiento del 86 %). La RMN se ajusta a la estructura. Porcentaje de área por HPLC: 95,8 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, δ, ppm, para dos conformeros): 8,46 (d, *J* = 6,9 Hz, 0,8H), 8,33 (d, *J* = 6 Hz, 0,2H), 7,84-7,78 (m, 2H), 7,54-7,44 (m, 3H), 6,87-6,78 (m, 1H), 4,59-4,52 (m, 1H), 4,29-4,24 (m, 1H), 3,92-3,66 (m, 3H), 3,51-3,44 (m, 1H), 2,55-2,45 (m, 1H), 2,05-1,97 (m, 1H), 1,38 (s, 9H).

55 **Ejemplo 4: Síntesis de clorhidrato de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (clorhidrato de (4R)-4-(benzoilamino)-L-prolinato de metilo)**

Etap 1: Síntesis de (2S,4S)-4-hidroxi-pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-benzoilo 2-metilo



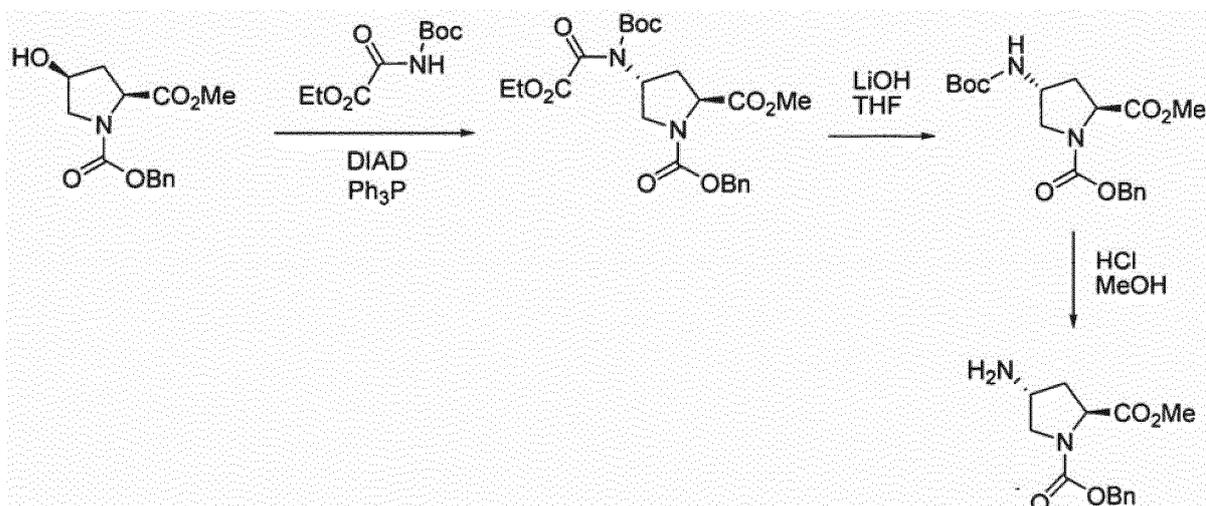
Se preparó (2S,4R)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo a partir de *trans*-4-hidroxi-L-prolina disponible en el mercado basándose en referencias de la bibliografía (por ejemplo, Bridges *et al. J. Med. Chem.* 1991, 34, 717; Gregson *et al. J. Med. Chem.* 2004, 47, 1161). Una solución de (2S,4R)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo (éster metílico de *trans*-4-hidroxi-N-Cbz-L-prolina, 15 g, 53,7 μ mmol), ácido cloroacético (8,4 g, 88,6 μ mmol) y trifetilfosfina (23,2 g, 88,6 μ mmol) en tolueno (100 ml) se enfrió a 0-10 °C, con agitación mecánica. A esta solución agitada se le cargó lentamente DIAD (17,9 g, 88,6 μ mmol) mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción a 0-10 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h.

La mezcla de reacción agitada se enfrió a 0-10 °C y se cargó con metanol (40 ml). A la mezcla de reacción agitada se le cargó NaOH 5N (40 ml) mientras se mantenía la temperatura de reacción a 0-10 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0-10 °C durante 2 h. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con tolueno (30 ml, 4 veces). La fase acuosa se enfrió a 0-10 °C y se acidificó con HCl concentrado (18 ml) a pH 2. La solución acuosa acidificada se extrajo con acetato de etilo (40 ml, 3 veces). La solución de acetato de etilo combinada se concentró al vacío para proporcionar 23 g de un aceite.

El aceite se disolvió en metanol (150 ml). La solución agitada se cargó con ácido sulfúrico concentrado (1 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 h. La mezcla se concentró a aproximadamente 75 ml. Una solución acuosa de bicarbonato de sodio (75 ml, preparado a partir de 10 ml de bicarbonato de sodio saturado y 65 ml de agua) se cargó gota a gota, seguido de la adición de agua (150 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h. La suspensión se filtró y la torta húmeda se secó al vacío (40 °C) durante 16 h para proporcionar 9,0 g del compuesto del título (rendimiento del 60 %) RMN ^1H (CDCl_3 , δ , ppm): 7,61-7,09 (m, 5H), 5,42-5,04 (m, 2H), 4,47-4,38 (m, 2H), 3,81-3,57 (m, 5H), 3,37-3,20 (m, 1H), 2,39-2,11 (m, 2H). EM (m/z , IEN positivo, para M+H): 280.

Etapa 2: Síntesis de (2S,4R)-4-aminopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo

Método A



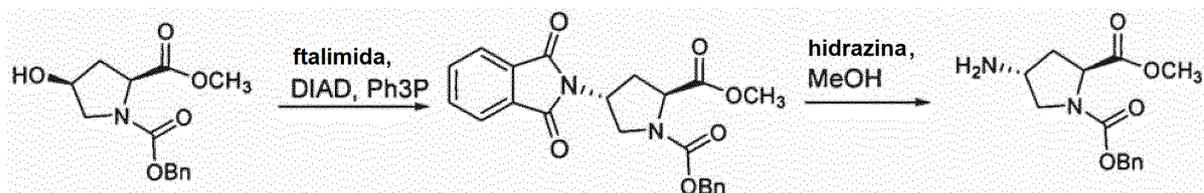
Una solución de (2S,4S)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo (2,0 g, 7,2 μ mmol), trifetilfosfina

(2,8 g, 10,7 μ mol), oxamato de N-Boc-etil (2,3 g, 10,7 μ mol) en THF (20 ml) se enfrió a 0-10 $^{\circ}$ C. A la solución agitada se le cargó DIAD (2,2 g, 10,7 μ mol) mientras se mantenía la temperatura de reacción a 0-10 $^{\circ}$ C. La reacción se agitó a 0-15 $^{\circ}$ C durante 3 h.

- 5 Una solución de monohidrato de hidróxido de litio (0,9 g, 21,5 μ mol) en agua (100 ml) se cargó mientras se mantenía la temperatura de reacción a 0-10 $^{\circ}$ C. La reacción se agitó a 0-10 $^{\circ}$ C durante 1 h. La reacción se diluyó con agua (10 ml) y acetato de etilo (30 ml). Se separaron las fases. La fase orgánica se extrajo con agua (15 ml) y salmuera (15 ml).
- 10 La solución de acetato de etilo se concentró al vacío y el residuo resultante se disolvió en tolueno (20 ml). A la solución agitada se le cargó metanol (6 ml) y cloruro de acetilo (1 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con HCl 0,5N (30 ml). Se separaron las fases. La fase de tolueno se extrajo con HCl 0,5N (15 ml). La fase acuosa combinada se extrajo con EtOAc (30 ml, 3 veces).
- 15 La solución acuosa anterior se enfrió a 0-10 $^{\circ}$ C y se basificó con NaOH 10N a pH 11. La solución acuosa se extrajo con EtOAc (30 ml, 3 veces). La fase acuosa combinada se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo, 0,5 g (rendimiento del 25 %).

Método B:

20



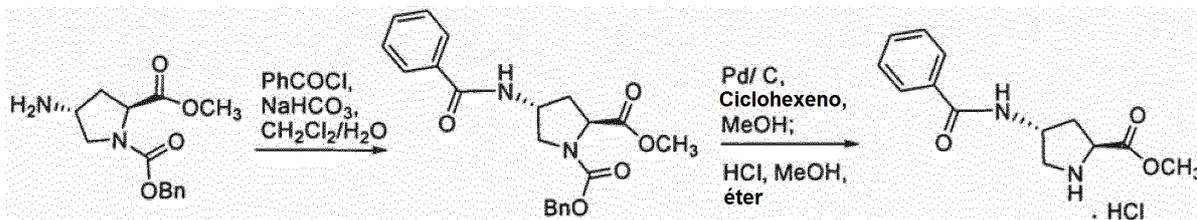
- A una suspensión agitada de (2S,4S)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo (40,5 g, 0,145 mol), trifenilfosfina (47,5 g, 0,181 mol), ftalimida (26,6 g, 0,181 mol) en tolueno (245 ml) a 15 $^{\circ}$ C, se le añadió azodicarboxilato de diisopropilo (38,3 g, 0,189 mol) durante 12 min mientras la temperatura se mantenía a 15-25 $^{\circ}$ C. La mezcla se agitó a 15-25 $^{\circ}$ C durante 30 min antes de concentrarse a aproximadamente 250 ml. El concentrado se enfrió a 0-5 $^{\circ}$ C en un baño de hielo y se agitó a la misma temperatura durante 2 h. El sólido precipitado se filtró, se lavó con tolueno frío (100 ml) y se desechó. El filtrado se lavó con solución de hidróxido de sodio acuoso 0,1N (200 ml, 2 veces) y después con agua (100 ml). La fase orgánica se concentró a un residuo de aproximadamente 130 g de 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-1-bencilo 2-metilo en bruto en tolueno. Una pequeña muestra analítica se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,86-7,83 (m, 2H), 7,77-7,72 (m, 2H), 7,39-7,29 (m, 5H), 5,26-5,00 (m, 3H), 4,71-4,66 (m, 1H), 3,95-3,90 (m, 2H), 3,79, 3,63 (dos s, 3H), 3,10-2,99 (m, 1H), 2,29-2,20 (m, 1H).

- 35 Otros disolventes tales como el tetrahidrofurano, el diclorometano, el acetato de etilo pueden sustituir al tolueno eficazmente. La reacción puede realizarse en un intervalo de aproximadamente -5 a 35 $^{\circ}$ C con poco efecto en los resultados.

- 40 La solución en tolueno anterior se transfirió a un matraz de 2 l con 30 ml de solución de aclarado de tolueno. La solución se diluyó con metanol (800 ml). A la solución diluida se le añadió hidrato de hidrazina (20,5 g, 0,347 mol). Después de agitar a 20-25 $^{\circ}$ C durante 10 min, la mezcla se calentó a 55-60 $^{\circ}$ C durante 15 min y se mantuvo a la misma temperatura durante 3 h. La HPLC mostró que la reacción era completa. La mezcla se enfrió a 20-25 $^{\circ}$ C antes que se añadiera agua (30 g) para facilitar la agitación. El sólido esponjoso se filtró, se lavó con tolueno (100 ml) y se desechó. El filtrado se acidificó a pH 3 con HCl 4N (aproximadamente 65 ml). La mezcla ácida se concentró al vacío a un volumen residual de aproximadamente 200 ml y se acidificó adicionalmente con ácido clorhídrico a pH \sim 1. Se añadieron diclorometano (170 ml) y agua (65 ml) al concentrado anterior con agitación eficiente. La fase orgánica se separó, se extrajo con agua (50 ml) y se desechó. Las fases acuosas combinadas se lavaron con diclorometano (170 ml) y después se diluyeron con más diclorometano (150 ml). La mezcla bifásica se neutralizó con solución acuosa de hidróxido de sodio 5N a pH \sim 12. La fase acuosa se separó y se extrajo con diclorometano (150 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con hidróxido de sodio acuoso 0,025 N (100 ml) y después con agua (50 ml). La fase orgánica final se concentró para proporcionar (2S,4R)-4-aminopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo en forma de un aceite (26,8 g, rendimiento global del 66 % a partir de (2S,4S)-4-hidroxipirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo). RMN ¹H (CDCl₃, δ , ppm): 7,62-7,08 (m, 5H), 5,40-4,99 (m, 2H), 4,50-4,44 (m, 1H), 3,81-3,57 (m, 5H), 3,30-3,18 (m, 1H), 2,19-1,81 (m, 2H), 1,30-1,25 (m, 2H). EM (*m/z*, IEN positivo, para M+H): 279.

- La reacción generalmente es más efectiva en disolventes alcohólicos tales como el metanol, el etanol o el propanol, pero otros disolventes tales como el tetrahidrofurano, el acetonitrilo también proporcionan resultados satisfactorios. Las temperaturas de reacción pueden variar hasta los puntos de ebullición de los disolventes utilizados.

60

Etapa 3: Síntesis de clorhidrato de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (clorhidrato de (4R)-4-(benzoilamino)-L-prolinato de metilo)

5 A una solución de (2S,4R)-4-aminopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo (26,8 g, 0,096 mol) en diclorometano (75 ml) a 0-5 °C, se le cargaron agua (140 ml) y bicarbonato de sodio (20,2 g, 0,24 mol), seguidos de la adición lenta de cloruro de benzoilo (13,4 g, 0,095 mol) en diclorometano (50 ml) mientras la temperatura se mantenía a 0-10 °C. Después de agitar durante 5 min, la mezcla se calentó a 20-25 °C. Se añadió agua (60 ml) para disolver el sólido. La fase orgánica se separó y se lavó con ácido clorhídrico 1N (25 ml), bicarbonato de sodio acuoso al 5 % (30 ml) y agua (55 ml). La fase orgánica se separó por destilación y el diclorometano se reemplazó por metanol para proporcionar 75 g de un concentrado residual. Una pequeña muestra del producto, 4-benzamidopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-1-bencilo 2-metilo, se tomó para su análisis. RMN ¹H (300 Hz, CDCl₃) δ 7,81-7,72 (m, 2H), 7,52-7,19 (m, 8H), 6,48-6,40 (m, 1H), 5,21-4,99 (m, 2H), 4,77-4,74 (m, 1H), 4,52-4,45 (m, 1H), 3,98-3,89 (m, 1H), 3,74, 3,59 (dos s, 3H), 3,58-3,47 (m, 1H), 2,41-2,26 (m, 2H).

En esta reacción, disolventes tales como el tolueno, el acetato de etilo o el tetrahydrofurano pueden sustituir al diclorometano. Esta transformación también puede realizarse en condiciones no acuosas utilizando bases tales como la trietilamina, la *N,N*-diisopropiletilamina.

Al anterior concentrado de metanol de 4-benzamidopirrolidin-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-1-bencilo 2-metilo, se le añadieron una suspensión de Pd al 10 %/C (seco, 4,1 g) en metanol (100 ml) y ciclohexeno (80 ml). La mezcla se calentó a reflujo (57 °C) durante 7 h antes de enfriarse a 20-25 °C. El catalizador de paladio se separó por filtración a través de un lecho de Celite y se lavó con metanol. El filtrado se concentró y el ciclohexeno se retiró en forma de un azeótropo de metanol. A la solución final de metanol se le añadió cloruro de hidrógeno 1N en éter dietílico (110 ml, 0,11 mol) mientras la temperatura se mantenía a 20-25 °C. La suspensión resultante se enfrió a 10-15 °C durante 20 min. El producto sólido se filtró y se lavó con tolueno. El sólido húmedo se secó a 60 °C al vacío para proporcionar 22,4 g de clorhidrato de 4-benzamidopirrolidin-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo en forma de un sólido de color blanco (rendimiento global del 81,7 % a partir de (2S,4R)-4-aminopirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencilo 2-metilo). RMN ¹H (CDCl₃, δ, ppm): 9,99 (sa, 2H), 8,95 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H), 7,97-7,94 (m, 2H), 7,58-7,45 (m, 3H), 4,71 (t, *J* = 8,7 Hz, 1H), 4,68-4,61 (m 1H), 3,78 (s, 3H), 3,58 (dd, *J* = 11,9, 6,6 Hz, 1H), 3,32 (dd, *J* = 11,9, 4,2 Hz, 1H), 2,41 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 2,39 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H).

El ciclohexeno puede reemplazarse por otros agentes de transferencia de hidrógeno tales como 2-metil-ciclohexeno, ciclohexadieno, formiato de amonio. El grupo benciloxicarbonilo también puede retirarse mediante hidrogenación catalítica.

Ejemplo 5: Preparación del monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico cristalino**Método 1:**

Se disolvieron 32 mg de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico amorfo en tres volúmenes de un disolvente mixto de isopropanol/agua (relación 19,5:0,5 en volumen) a temperatura ambiente. El recipiente se dejó abierto y se recogieron los cristales que se habían formado. El sólido cristalino se secó a 40-50 °C al vacío para proporcionar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico cristalino.

Método 2:

Se disolvieron 60,5 mg de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico amorfo en un sistema de disolvente mixto de 0,3 ml de isopropanol/éter metil *t*-butílico (relación 7:3 en volumen) y de 2,0 ml de acetona/agua (relación 19:1 en volumen) a temperatura ambiente. El recipiente se dejó abierto y se recogieron los cristales que se habían formado. El sólido cristalino se secó a 40-50 °C al vacío para proporcionar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico cristalino.

Método 3:

Se disolvieron 36,5 mg de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico amorfo

ES 2 558 856 T3

en 0,5 ml de un disolvente mixto de acetona/agua (relación 19,5:0,5 en volumen) a temperatura ambiente. El recipiente se agitó y se recogieron los cristales que se habían formado. El sólido cristalino se secó a 40-50 °C al vacío para proporcionar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico cristalino.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.
- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene una temperatura de comienzo de desolvatación de 104 °C.
3. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene dos transiciones endotérmicas con temperaturas de comienzo de 104 °C y 168 °C.
- 10 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene picos de difracción de rayos X de polvo a 12,5° 2θ y 19,0° 2θ, que tiene opcionalmente además picos de difracción de rayos X de polvo a 17,1° 2θ, 19,7° 2θ, 20,5° 2θ, 21,8° 2θ, 23,3° 2θ y 23,4° 2θ, que tiene opcionalmente además picos de difracción de rayos X de polvo a 5,4° 2θ, 20,7° 2θ, 21,2° 2θ, 23,1° 2θ, 26,4° 2θ y 27,4° 2θ.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en terapéutica.
- 20 7. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, inflamación del epitelio de las vías respiratorias, trastornos del tejido alveolar, incontinencia vesical, deficiencia auditiva, lesiones endoteliales, diabetes de Tipo I o de Tipo II, retinopatía diabética, neuropatía diabética, aterosclerosis, afecciones relacionadas con el SNC, convulsiones, isquemia, trastornos del tejido dental, enfermedades renales, anemia, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, heridas superficiales, heridas profundas resultado de traumatismos, fracturas óseas, disfunción eréctil, incontinencia de la vejiga urinaria, el dolor neuropático, inflamación subcrónica y crónica, cáncer, insuficiencia medular, trasplantes de células madre, afecciones que surgen durante el trasplante de células y de tejidos, afecciones que surgen durante procedimientos médicos, enfermedades causadas por un exceso de especies reactivas de oxígeno, de radicales libres o de óxido nítrico, enfermedades o trastornos del embarazo, infertilidad femenina o ictus, preferentemente para su uso en un método de tratamiento de enfermedades cardiovasculares o en un método de tratamiento de isquemia.
- 25 30 8. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de prevención o de tratamiento de lesión isquémica en uno o más órganos de un mamífero, en donde el órgano se selecciona opcionalmente entre el corazón, el sistema nervioso central, el riñón, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones y las extremidades.
- 35 9. Uso de un compuesto de una cualquiera de reivindicaciones 1 a 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, inflamación del epitelio de las vías respiratorias, trastornos del tejido alveolar, incontinencia vesical, deficiencia auditiva, lesiones endoteliales, diabetes de Tipo I o de Tipo II, retinopatía diabética, neuropatía diabética, aterosclerosis, afecciones relacionadas con el SNC, convulsiones, isquemia, trastornos del tejido dental, enfermedades renales, anemia, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, heridas superficiales, heridas profundas resultado de traumatismos, fracturas óseas, disfunción eréctil, incontinencia de la vejiga urinaria, dolor neuropático, inflamación subcrónica y crónica, cáncer, insuficiencia medular, trasplantes de células madre, afecciones que surgen durante el trasplante de células y de tejidos, afecciones que surgen durante los procedimientos médicos, enfermedades causadas por un exceso de especies reactivas de oxígeno, de radicales libres o de óxido nítrico, enfermedades o trastornos del embarazo, infertilidad femenina o ictus, preferentemente para su uso en un método de tratamiento de enfermedades cardiovasculares o en un método de tratamiento de isquemia.
- 40 45 50 10. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la lesión isquémica en uno o más órganos de un mamífero, en donde el órgano se selecciona opcionalmente entre el corazón, el sistema nervioso central, el riñón, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones y las extremidades.
- 55 11. Un método para preparar un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende proporcionar una solución de clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico en un medio de cristalización, en donde el medio de cristalización comprende al menos un disolvente orgánico miscible en agua y agua, y mantener la solución durante un tiempo y en condiciones adecuados para formar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico.
- 60 12. El método de preparación de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el al menos un disolvente orgánico miscible en agua comprende al menos un disolvente seleccionado entre alcoholes miscibles en agua, cetonas miscibles en agua y éteres miscibles en agua, preferentemente seleccionado entre alcoholes C₁-C₄ miscibles en agua, cetonas C₁-C₆ miscibles en agua y éteres
- 65

C₁-C₆ miscibles en agua.

5 13. El método de preparación de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el al menos un disolvente orgánico miscible en agua comprende una mezcla de isopropanol, acetona y éter metil *t*-butílico.

10 14. El método de preparación de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las condiciones adecuadas para formar el monohidrato del clorhidrato del ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidin-2-carboxílico comprenden mantener la solución a temperatura ambiente.

15. El método de preparación de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el medio de cristalización comprende hasta el 5 % en volumen de agua.

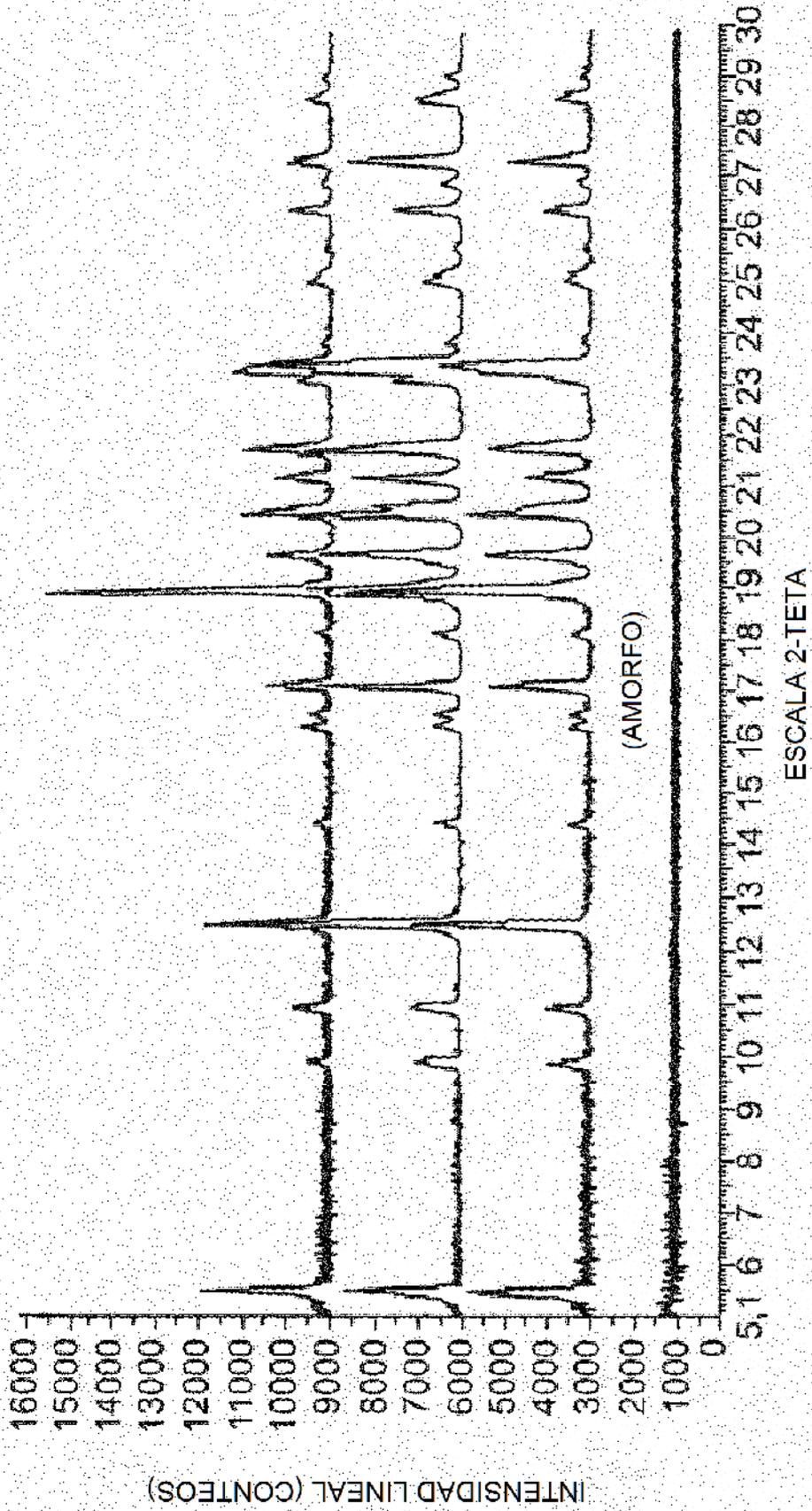
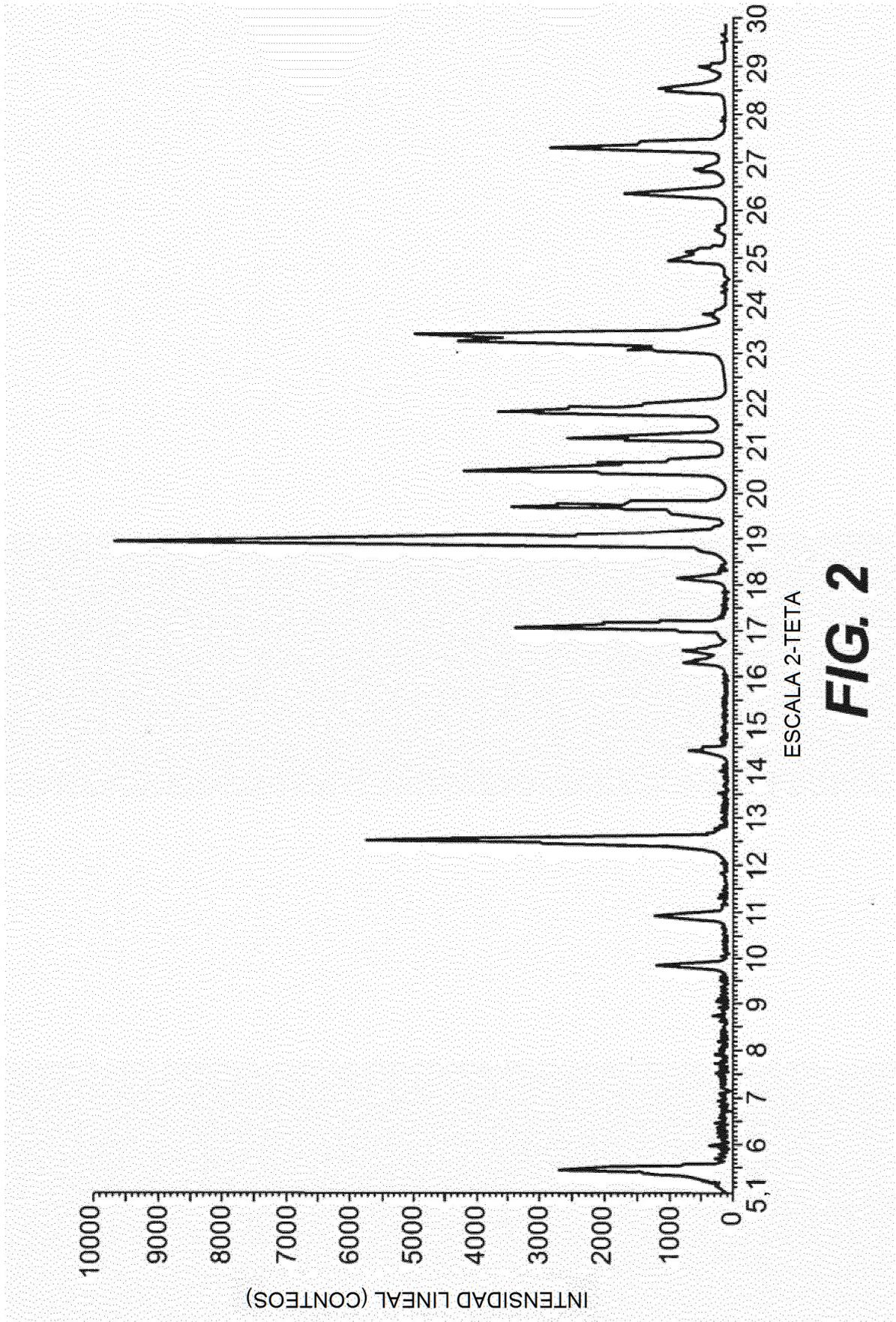
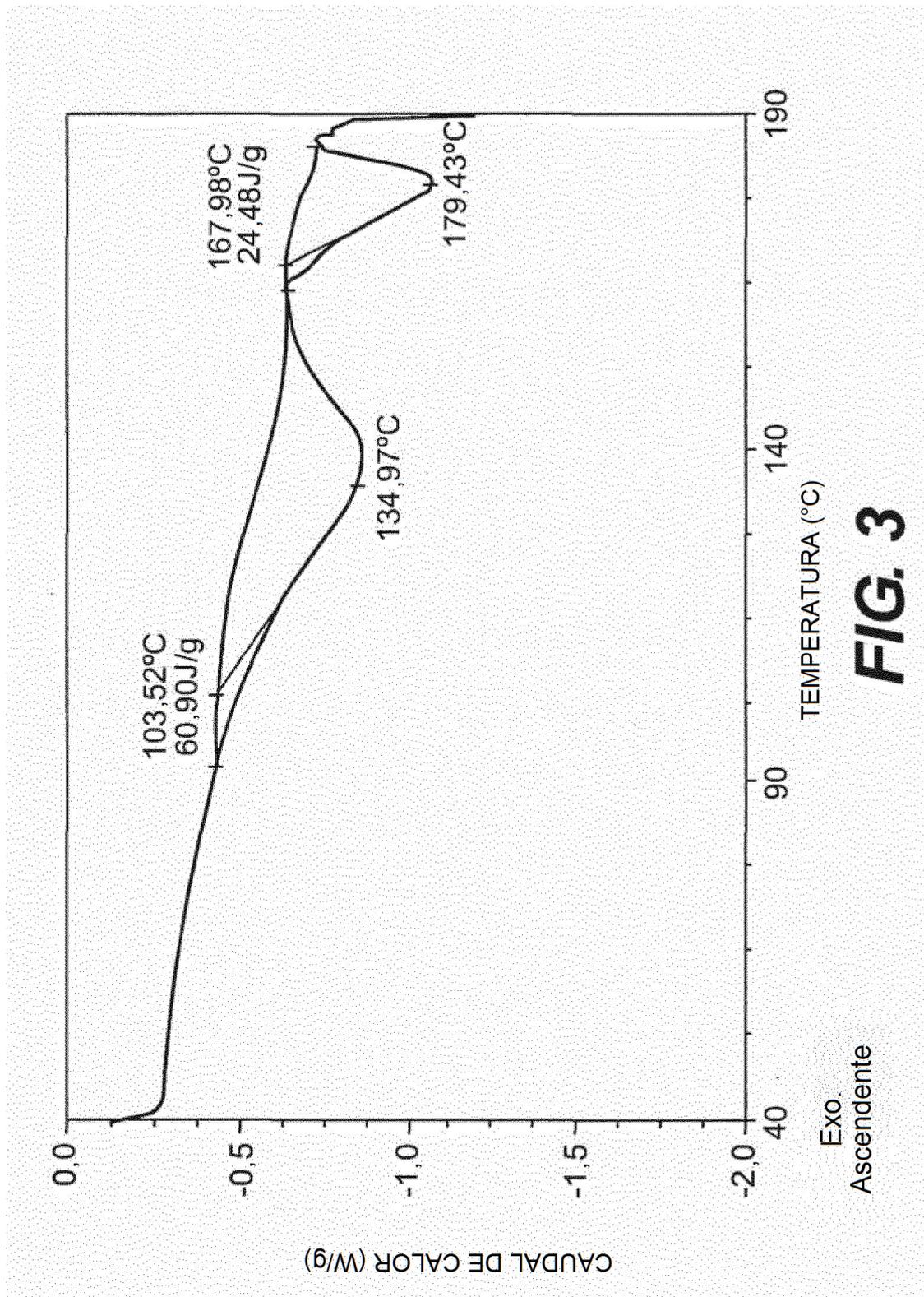


FIG. 1





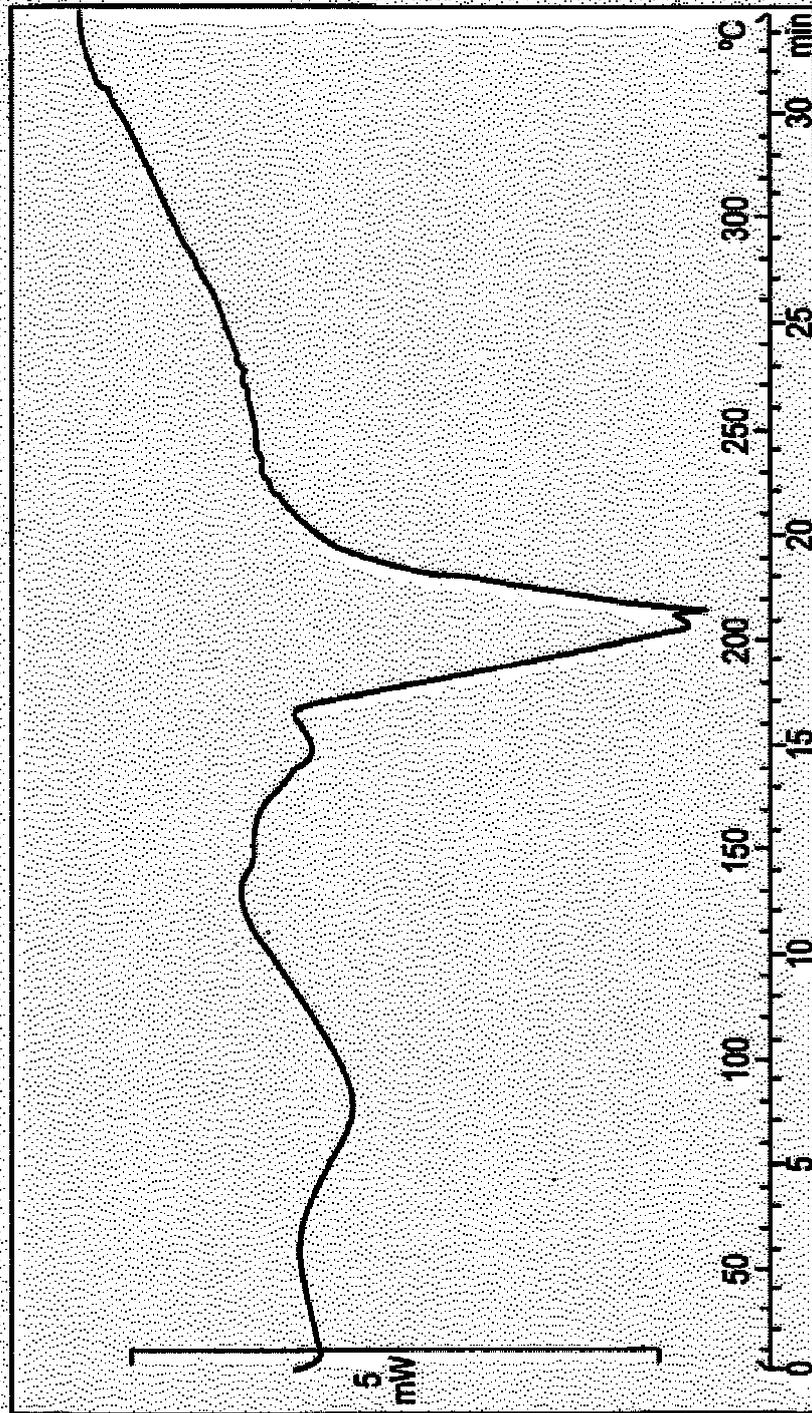
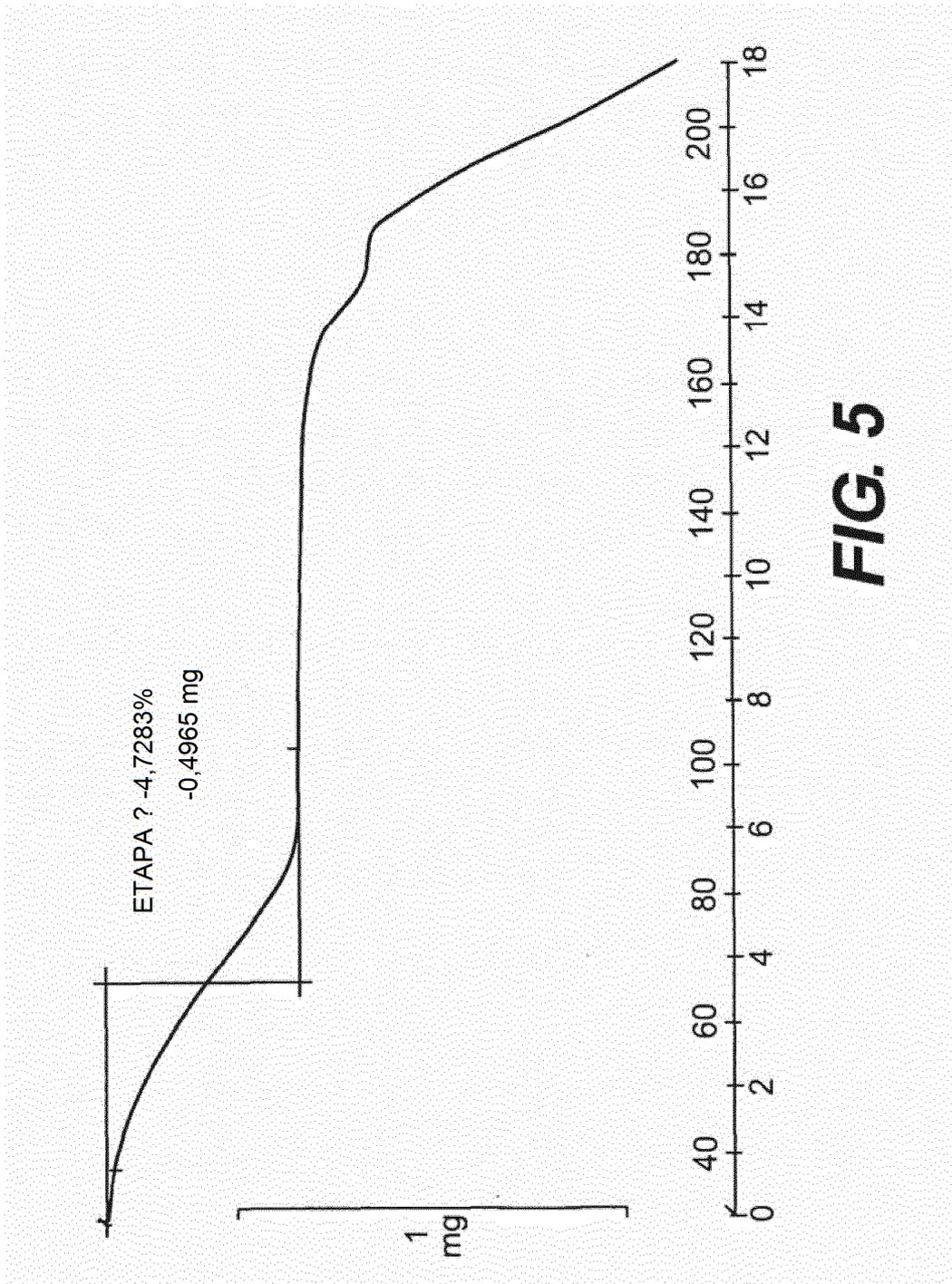


FIG. 4



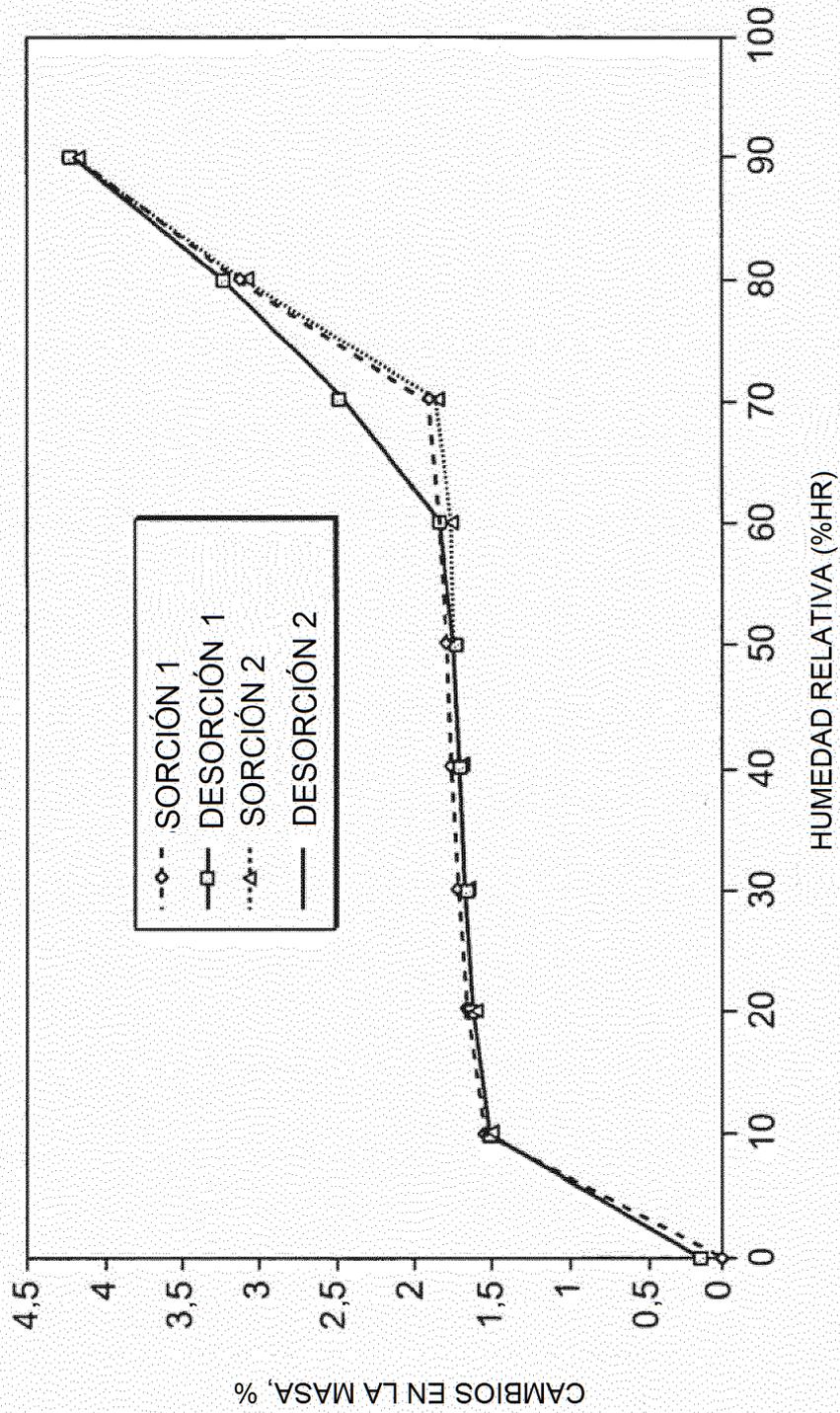


FIG. 6

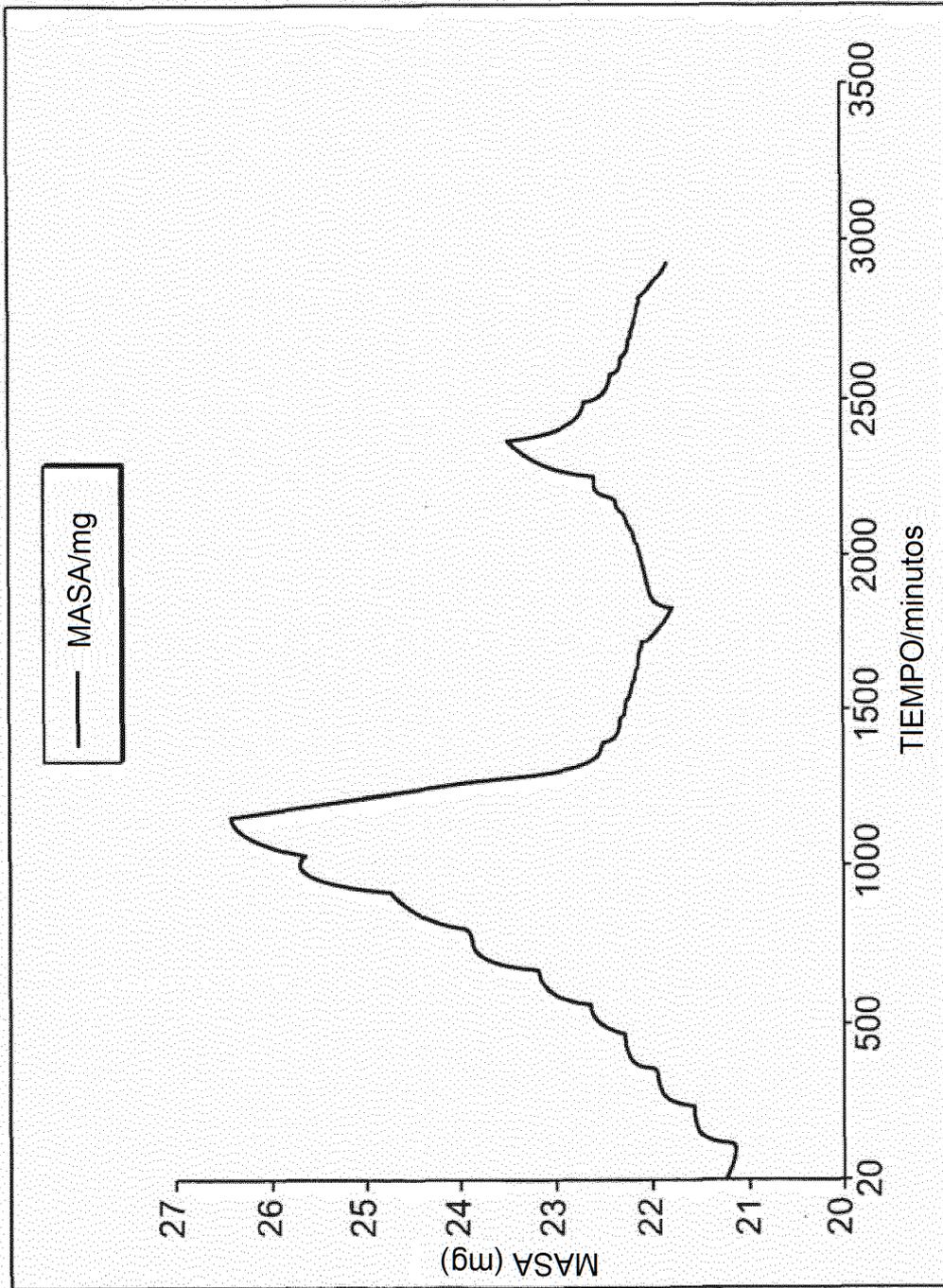


FIG. 7