

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 610**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11710087 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2552906**

54 Título: **Antagonista del receptor de CGRP**

30 Prioridad:

30.03.2010 US 319015 P

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**CHATURVEDULA, PRASAD V.;
DUBOWCHIK, GENE M. y
MACOR, JOHN E.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 562 610 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonista del receptor de CGRP

5 **Antecedentes de la invención****Referencia a solicitudes relacionadas**

10 Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos nº 61/319.015 presentada el 30 de marzo de 2010.

15 La divulgación, en general, se refiere al compuesto (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-oxopropan-2-il)-4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamida (compuesto I o el compuesto de fórmula I), incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, que es un antagonista del receptor de CGRP. La divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas y a procedimientos para usar el compuesto en el tratamiento de trastornos relacionados con CGRP incluyendo migraña, vasodilatación neurógena, inflamación neurógena, daño térmico, choque circulatorio, sofoco asociado a menopausia, enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y cáncer.

20 El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) es un péptido de 37 aminoácidos que se da en la naturaleza identificado por primera vez en 1982 (Amara, S. G. y col, Science 1982, 298, 240-244). Se expresan dos formas del péptido (α CGRP y β CGRP) que difieren en uno y tres aminoácidos en ratas y seres humanos, respectivamente. El péptido está distribuido ampliamente tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC), localizado principalmente en neuronas sensoriales aferentes y centrales, y presenta un número de efectos biológicos, incluyendo vasodilatación.

30 Cuando se libera de la célula, CGRP se une a receptores acoplados a proteína G de la superficie celular específicos y ejerce su acción biológica predominantemente mediante la activación de adenilato ciclasa intracelular (Poyner, D. R. y col, Br J Pharmacol 1992, 105, 441-7; Van Valen, F. y col, Neurosci Lett 1990, 119, 195-8.). Se han propuesto dos clases de receptores de CGRP, CGRP1 y CGRP2, basándose en las propiedades antagonistas del fragmento peptídico CGRP(8-37) y la capacidad de los análogos lineales de CGRP para activar receptores CGRP2 (Juaneda, C. y col. TIPS 2000, 21, 432-438). Sin embargo, hay una falta de evidencia molecular para el receptor CGRP2 (Brain, S. D. y col, TIPS 2002, 23, 51-53). El receptor CGRP1 tiene tres componentes: (i) un receptor similar a receptor de calcitonina con 7 dominios transmembrana (CRLR); (ii) el tipo uno de proteína que modifica la actividad del receptor transmembrana individual (RAMP1); y (iii) la proteína componente del receptor intracelular (RCP) (Evans B. N. y col., J Biol Chem. 2000, 275, 31438-43). RAMP1 se requiere para el transporte de CRLR a la membrana plasmática y para la unión de ligando al receptor de CGRP (McLatchie, L. M. y col, Nature 1998, 393, 333-339). RCP se requiere para transducción de señales (Evans B. N. y col., J Biol Chem. 2000, 275, 31438-43). Hay diferencias específicas de especie conocidas en la unión de antagonistas de moléculas pequeñas al receptor de CGRP con afinidad normalmente mayor vista para el antagonismo del receptor humano que para otras especies (Brain, S. D. y col, TIPS 2002, 23, 51-53). La secuencia de aminoácidos de RAMP1 determina la selectividad de especie, en particular, el resto de aminoácido Trp74 es responsable para el fenotipo del receptor humano (Mallee y col. J Biol Chem 2002, 277, 14294-8).

45 Se postula que los inhibidores a nivel de receptor de CGRP son útiles en afecciones patofisiológicas donde se ha producido una activación de receptor de CGRP excesiva. Algunas de éstas incluyen vasodilatación neurógena, inflamación neurógena, migraña, cefaleas en racimo y otras cefaleas, daño térmico, choque circulatorio, sofocos de la menopausia y asma. La activación del receptor de CGRP se ha implicado en la patogénesis de la migraña (Edvinsson L. CNS Drugs 2001;15(10):745-53; Williamson, D. J. Microsc. Res. Tech. 2001, 53, 167-178.; Grant, A. D. Brit. J. Pharmacol. 2002, 135, 356-362.). Los niveles séricos de CGRP están elevados durante la migraña (Goadsby PJ, y col. Ann Neurol 1990; 28: 183-7) y el tratamiento con fármacos contra la migraña devuelve los niveles de CGRP a normales, coincidiendo con el alivio de la cefalea (Gallai V. y col. Cephalalgia 1995;15: 384-90). Los migrañosos presentan niveles de CGRP basales elevados en comparación con los controles (Ashina M, y col., Pain 2000, 86(1-2):133-8.2000). La infusión intravenosa de CGRP produce cefalea duradera en migrañosos (Lassen LH, y col. Cephalalgia Febrero 2002; 22(1):54-61). Estudios preclínicos en ratas y perros comunican que el bloqueo de CGRP sistémico con el antagonista peptídico CGRP(8-37) no altera las hemodinámicas sistémicas en reposo ni el flujo sanguíneo regional (Shen, Y-T. y col., J Pharmacol Exp Ther 2001, 298, 551-8). Así, los antagonistas del receptor de CGRP pueden presentar un tratamiento novedoso para migraña que evita las desventajas cardiovasculares de la vasoconstricción activa asociada a agonistas no selectivos de 5-HT1B/1D, 'triptanos' (por ejemplo, sumatriptano).

65 Los antagonistas de CGRP han mostrado eficacia en ensayos clínicos con seres humanos. Véase Davis CD, Xu C. *Curr Top Med Chem*. 2008 8(16):1468-79; Benemei S, Nicoletti P, Capone JG, Geppetti P. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 9(1):9-14. Epub 20 de enero de 2009; Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, Leibensperger H, Froman S, Assaid C, Lines C, Koppen H, Winner PK. *Lancet*. 2008 372:2115. Epub 25 de noviembre de 2008; Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, Jones CJ, Lines CR, Rapoport AM; *Neurology* 2008 70:1304. Epub 3 de

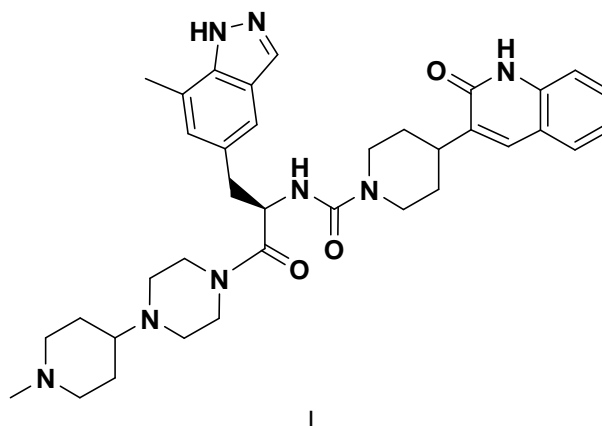
octubre de 2007.

La invención proporciona ventajas técnicas, por ejemplo, el compuesto es novedoso e inhibe el CGRP. Adicionalmente, el compuesto proporciona ventajas para usos farmacéuticos, por ejemplo, con respecto a uno o más de sus mecanismos de acción, de unión, de eficacia de inhibición, de selectividad del objetivo, de solubilidad, de perfiles de seguridad o de biodisponibilidad.

Se dan a conocer antagonistas del receptor de CGRP en publicaciones PCT incluyendo los documentos WO2003/104236 y WO2005/065779.

Descripción de la invención

La invención incluye (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-oxopropan-2-il)-4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamida (compuesto I o el compuesto de fórmula I) y composiciones farmacéuticas y que son útiles en procedimientos para modular el CGRP y tratar a pacientes con afecciones médicas asociadas a niveles aberrantes de señalización de CGRP o de receptor de CGRP.



La invención incluye todas las formas de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos. Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas en las que los contraiones no contribuyen significativamente a la actividad fisiológica o a la toxicidad de los compuestos y como tales funcionan como equivalentes farmacológicos. Estas sales se pueden preparar de acuerdo con técnicas orgánicas comunes empleando reactivos disponibles comercialmente. Algunas formas salinas aniónicas incluyen acetato, acistrato, besilato, bromuro, cloruro, citrato, fumarato, glucuronato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, yoduro, lactato, maleato, mesilato, nitrato, pamoato, fosfato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y xinofoato. Algunas formas de sales catiónicas incluyen amonio, aluminio, benzatina, bismuto, calcio, colina, dietilamina, dietanolamina, litio, magnesio, meglumina, 4-fenilciclohexilamina, piperazina, potasio, sodio, trometamina y cinc.

Se desea que la invención incluya todos los isótopos de átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Como ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . Los compuestos de la invención marcados isotópicamente se pueden preparar generalmente usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procedimientos análogos a los descritos en el presente documento, usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado que se emplea en otros casos. Tales compuestos pueden tener diversos usos potenciales, por ejemplo como estándares y reactivos en la determinación de actividad biológica. En el caso de los isótopos estables, dichos compuestos pueden tener el potencial de modificar favorablemente propiedades biológicas, farmacológicas o farmacocinéticas.

Procedimientos de síntesis

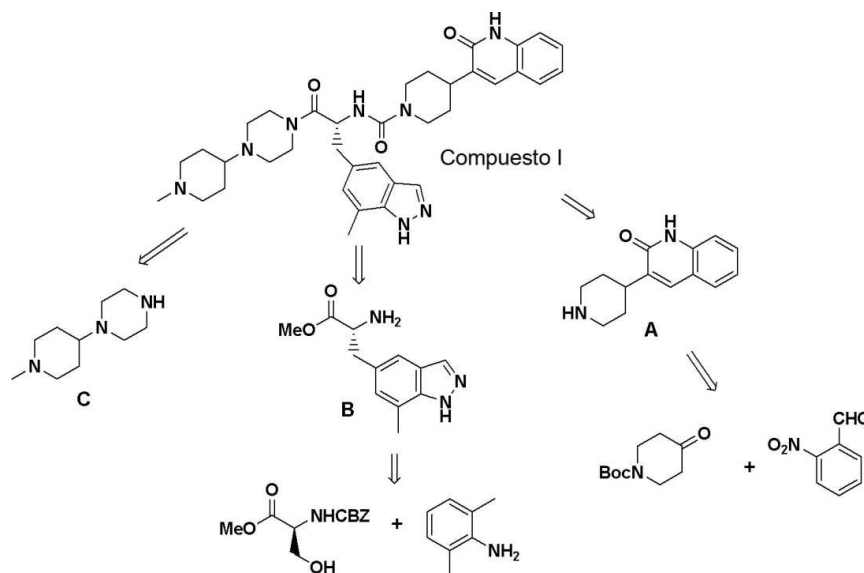
Las abreviaturas generalmente siguen las convenciones usadas en la técnica. Las abreviaturas químicas usadas en la memoria y en los ejemplos se definen como sigue: "NaHMDS" para bis(trimetilsilil)amida de sodio; "DMF" para N,N-dimetilformamida; "MeOH" para metanol; "NBS" para N-bromosuccinimida; "Ar" para arilo; "TFA" para ácido trifluoroacético; "LAH" para hidruro de litio y aluminio; "BOC", "DMSO" para dimetilsulfóxido; "h" para horas; "ta" para temperatura ambiente o "tr" para tiempo de retención; "min" para minutos; "EtOAc" para acetato de etilo; "THF" para tetrahidrofurano; "EDTA" para ácido etilendiaminotetraacético; "Et₂O" para éter dietílico; "DMAP" para 4-dimetilaminopiridina; "DCE" para 1,2-dicloroetano; "ACN" para acetonitrilo; "DME" para 1,2-dimetoxietano; "HOBt" para hidrato de 1-hidroxibenzotriazol; "DIEA" para diisopropiletilamina, "Nf" para CF₃(CF₂)₃SO₂-; y "TMOF" para trimetilortoformiato.

Las abreviaturas, tal como se usan en el presente documento, se definen como sigue: "1 x" para una vez, "2 x" para

dos veces, "3 x" para tres veces, "°C" para grados Celsius, "eq" para equivalente o equivalentes, "g" para gramo o gramos, "mg" para miligramo o miligramos, "l" para litro o litros, "ml" para mililitro o mililitros, "μl" para microlitro o microlitros, "N" para normal, "M" para molar, "mmol" para milimol o milimoles, "min" para minuto o minutos, "h" para hora u horas, "ta" para temperatura ambiente, "TR" para tiempo de retención, "atm" para atmósfera, "psi" para libras por pulgada cuadrada, "conc." para concentrado, "sat" para saturado, "MW" para peso molecular, "pf" para punto de fusión, "ee" para exceso enantiomérico, "EM" o "Espec. de masas" para espectrometría de masas, "ESI" para espectroscopía de masas de ionización por electropulverización, "HR" para alta resolución, "HREM" para espectrometría de masas de alta resolución, "CLEM" para espectrometría de masas de cromatografía líquida, "HPLC" para cromatografía de líquidos de alta presión, "RP HPLC" para HPLC de fase inversa, "TLC" o "tlc" para cromatografía en capa fina, "RMN" para espectroscopía de resonancia magnética nuclear, "1H" para protón, "δ" para delta, "s" para singlete, "d" para doblete, "t" para triplete, "c" para cuartete, "m" para multiplete, "a" para amplio, "Hz" para hertzio, y "α", "β", "R", "S", "E" y "Z" son designaciones estereoquímicas familiares para un experto en la técnica.

Se puede preparar el compuesto I de acuerdo con el esquema 1. Esta síntesis es de 14 etapas químicas y altamente convergente, acoplando los tres fragmentos principales en las tres últimas etapas. Como tal, la síntesis se inicia con la preparación de los fragmentos principales A (esquema 2) y B (esquema 3).

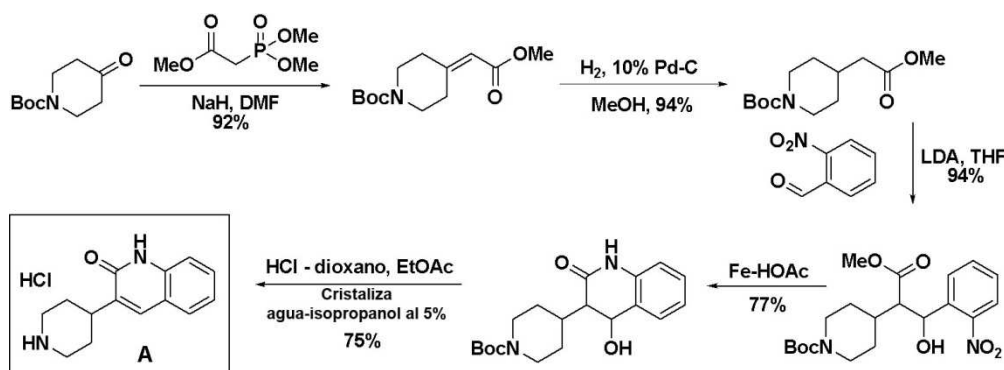
Esquema 1



La síntesis del fragmento A se inicia con la reacción de Horner-Emmons de *N*-Boc-4-piperidona con el iluro generado a partir de trimetilfosonoacetato para dar 4-(2-metoxi-2-oxoetiliden)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo con un rendimiento excelente (esquema 2). La hidrogenación catalítica mediada por paladio sobre carbón reduce el doble enlace insaturado. El tratamiento de 4-(2-metoxi-2-oxoetil)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo con LDA genera el enolato que, tras atrapararlo con 2-nitrobenzaldehído proporciona el nitro-alcohol. La reducción del grupo nitro con hierro en ácido acético seguido del tratamiento con cloruro de hidrógeno en dioxano completa la síntesis del fragmento A.

La síntesis de aminoácido de indazol B se inicia con la yodación de 2,6-dimetilanilina mediante la acción de

Esquema 2

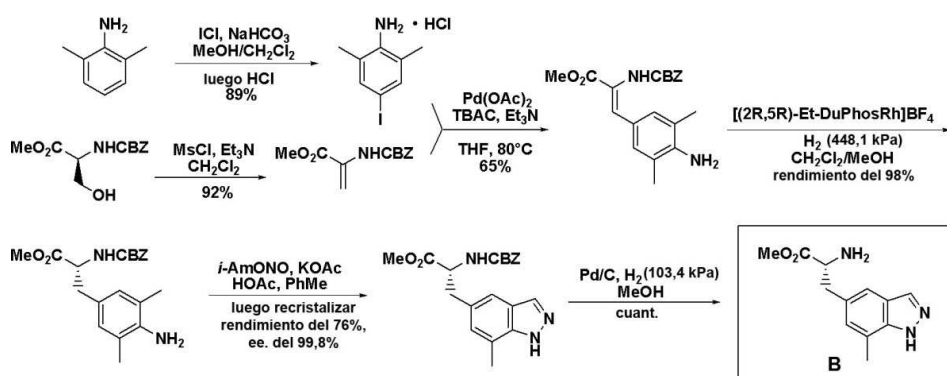


La síntesis de aminoácido de indazol B se inicia con la yodación de 2,6-dimetilanilina mediante la acción de

monocloruro de yodo (esquema 3). Este intermedio se apartó temporalmente. El éster metílico de *N*-CBZ-*L*-serina sufre la reacción de metansulfonilación/eliminación en un recipiente para dar el éster metílico de *N*-CBZ-deshidroalanina. Con el yoduro y la deshidroalanina preparados, éstos se acoplan eficazmente usando acetato de paladio (II) en un acoplamiento de Heck para dar el producto con un rendimiento del 65 %. En este punto, se instala el centro quiral usando una hidrogenación asimétrica catalítica utilizando tetrafluoroborato de (-)-1,2-bis((2*R*,5*R*)-2,5-dietilfosfolano)benceno(ciclooctadieno)rodio(II) e hidrógeno (60 psi, 413,7 kPa) para dar el aminoácido quiral en con un ee. del ~96 %. Luego se forma el anillo de indazol mediante la acción de nitrato de *iso*-amilo. El imidazol resultante es altamente cristalino. Una recrystalización a partir de acetona/hexanos da el aminoácido de indazol de una pureza excelente y con un ee. mejorado del 99,8 %. La eliminación del grupo protector CBZ bajo condiciones de hidrogenación completa la preparación del fragmento B. El aminoácido de indazol B también se puede preparar usando resolución enzimática del aminoácido racémico o cetoácido (Hanson, Ronald L.; Davis, Brian L.; Goldberg, Steven L.; Johnston, Robert M.; Parker, William L.; Tully, Thomas P.; Montana, Michael A.; Patel, Ramesh N. Process Research and Development, Bristol-Myers Squibb, New Brunswick, NJ, EE.UU. Organic Process Research & Development (2008), 12(6), 1119-1129.).

15

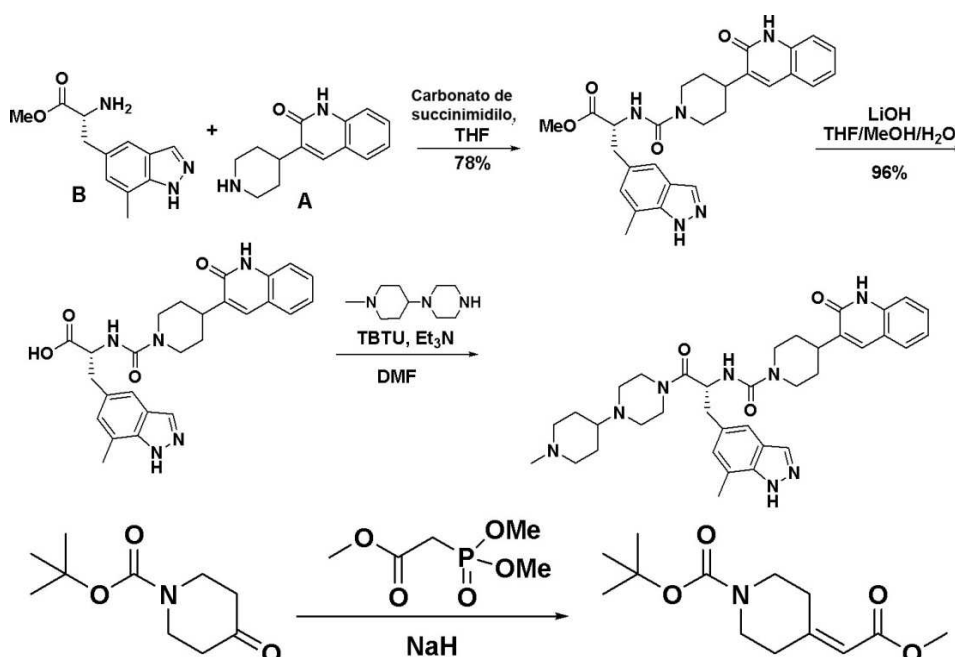
Esquema 3



Los fragmentos A y B se acoplan eficazmente usando carbonato de *N,N'*-disuccinimido para instalar el resto de urea con un rendimiento del 78 % (esquema 4). La saponificación del éster metílico con hidróxido de litio proporciona un rendimiento casi cuantitativo del ácido carboxílico. El acoplamiento mediado por TBTU[®] del ácido con 1-(1-metilpiperidin-4-il)piperazina completa la síntesis del compuesto I. La cromatografía ultrarrápida da el producto como un polvo amorfo que se puede cristalizar a partir de acetona para dar el compuesto I como un polvo cristalino blanco fino.

25

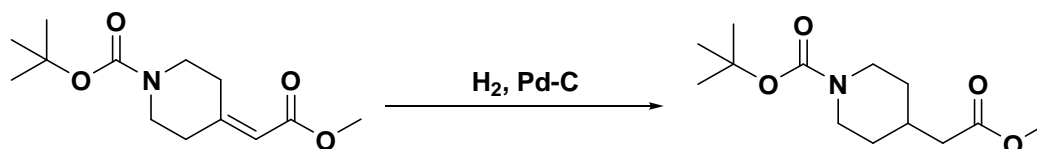
Esquema 4



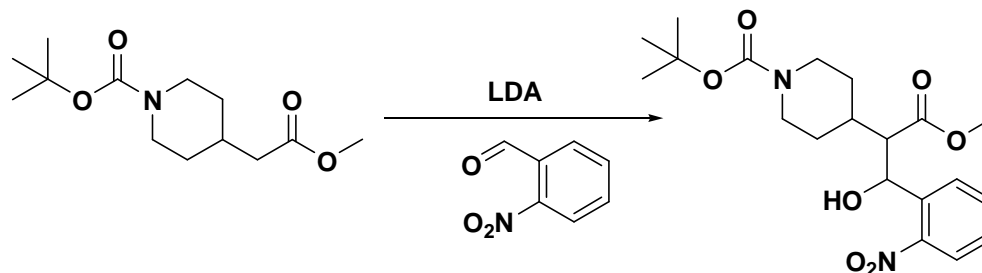
4-(2-metoxi-2-oxoetiliden)piperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo. Se lavó con hexanos el hidruro de sodio en aceite

30

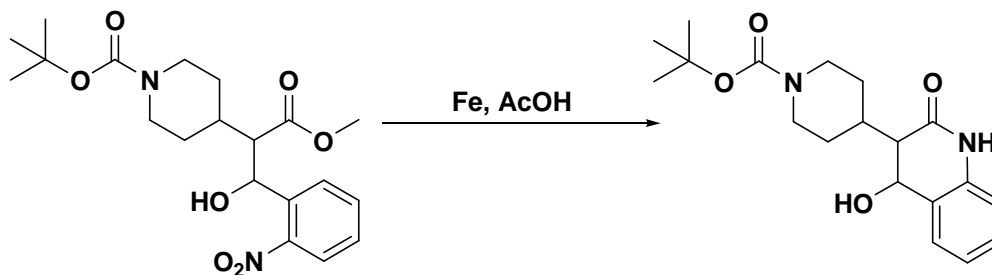
mineral (60 %, 7,92 g, 198,02 mmol), luego se suspendió en dimetilformamida (220 ml). Se enfrió la mezcla hasta 10 °C. Se añadió gota a gota fosfonoacetato de trimetilo (29,0 ml, 189,82 mmol) a la mezcla de reacción agitada. Después de 20 min a 0 °C, se añadió a la mezcla gota a gota una solución de *N*-*tert*-butoxicarbonil-4-piperidona (30,41 g, 152,62 mmol) en dimetilformamida (80 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 h y luego se diluyó con éter dietílico (650 ml). Se lavó la mezcla una vez con agua y se extrajo una vez la capa acuosa con éter dietílico. Se lavaron 4 veces con agua las capas orgánicas combinadas y se desechó la fase acuosa. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró hasta sequedad. Se obtuvo el compuesto del título como un sólido blanco con un rendimiento del 92 %. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 5,68 (s, 1 H), 3,66 (s, 3 H), 3,40-3,51 (m, 4 H), 2,90 (t, *J* = 5,49, 2 H), 2,25 (t, *J* = 5,49, 2 H), 1,44 (s, 9 H).



4-(2-metoxi-2-oxoetil)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo. Se trató cuidadosamente una solución de 4-(2-metoxi-2-oxoetilideno)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (35,71 g, 140 mmol) en una mezcla de acetato de etilo/etanol 1:1 (220 ml) con paladio al 10 % sobre carbón húmedo al 50 % (3,3 g). Se cargó el recipiente de reacción con 55 psi (379,21 kPa) de gas hidrógeno y se agitó la mezcla en un aparato Parr a temperatura ambiente durante 16 h. Luego, se filtró la mezcla de reacción para retirar el catalizador y se concentró el filtrado a vacío. Se obtuvo el compuesto del título como un aceite incoloro transparente con un rendimiento del 97 %. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 4,04 (d, *J* = 10,25, 2 H), 3,64 (s, 3 H), 2,68 (t, *J* = 12,44, 2 H), 2,21 (d, *J* = 6,95, 2 H), 1,98-1,77 (m, 1 H), 1,64 (d, *J* = 13,54, 2 H), 1,41 (s, 9 H), 1,25-0,99 (m, 2 H).

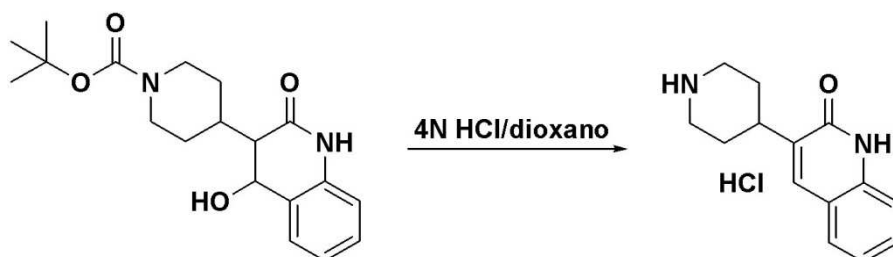


Éster *tert*-butílico del ácido 4-[2-hidroxi-1-metoxicarbonil-2-(2-nitro-fenil)-etil]-piperidina-1-carboxílico. Se disolvió *N,N*-diisopropilamina (4,40 ml, 31,3 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml). Se enfrió la mezcla hasta -78 °C. Se añadió gota a gota butillitio (2,5 M en hexanos, 12,4 ml, 31 mmol) a la solución agitada. Después de agitar a -78 °C durante 30 min, se añadió a la mezcla gota a gota una solución de 4-(2-metoxi-2-oxoetil)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (6,65 g, 25,8 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml). Se continuó la agitación a -78 °C durante 1 h. Luego, se añadió a la mezcla gota a gota una solución de 2-nitrobenzaldehído (3,90 g, 25,8 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml), y luego se continuó la agitación a -78 °C durante 2,5 h adicionales. Se desactivó la reacción con cloruro de amonio acuoso frío y luego se diluyó con agua. Se extrajo la mezcla dos veces con acetato de etilo y se desechó la fase acuosa. Se secó el material (sulfato de magnesio), se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en gel de sílice dio el producto deseado con un rendimiento del 94 % como una espuma amarillo claro. EM m/e (M-C₄H₈+H)⁺ = 353,1.



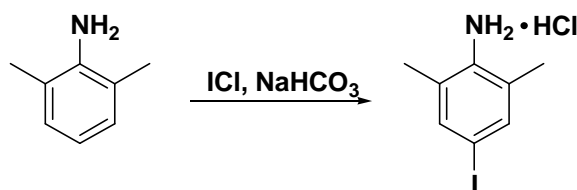
Éster *tert*-butílico del ácido 4-(4-Hidroxi-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-3-il)-piperidina-1-carboxílico. En un matraz de 3 bocas equipado con una entrada de nitrógeno, un termómetro y un agitador mecánico, se disolvió éster *tert*-butílico del ácido 4-[2-hidroxi-1-metoxicarbonil-2-(2-nitro-fenil)-etil]-piperidina-1-carboxílico (9,93 g, 24,3 mmol) en ácido acético (1,75 moles, 100 ml). Se añadió polvo de hierro (8,90 g, 159 mmol) al recipiente con agitación. Se calentó lentamente la mezcla agitada hasta 80 °C durante 30 min y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Luego se diluyó acetato de etilo y se filtró a través de una almohadilla de celite. Se lavaron los sólidos con acetato de

etilo/metanol al 20 % y luego con metanol. Se concentró el filtrado y se fraccionó el residuo entre acetato de etilo y carbonato de sodio acuoso. Se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa resultante dos veces con acetato de etilo. Se combinaron las capas orgánicas. Se lavó la mezcla dos veces con agua y se desechó la fase acuosa. Se secó el material (sulfato de magnesio), se filtró y se concentró hasta sequedad. La cromatografía en gel de sílice dio el compuesto del título como una espuma amarillo claro con un rendimiento del 77 %. EM m/e (M-H)⁻ = 345,1.



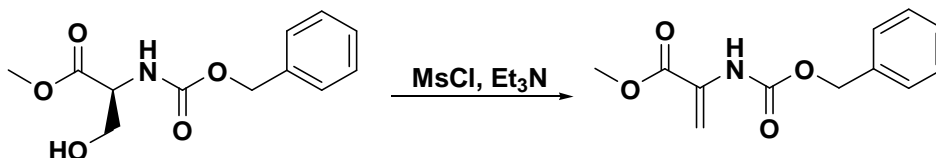
10 *Clorhidrato de 3-(piperidin-4-il)quinolina-2(1H)*. Se trató una solución agitada de éster *tert*-butílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-3-il)-piperidina-1-carboxílico (5,60 g, 16,2 mmol) en acetato de etilo (70 ml) con HCl en dioxano (4 N, 40 mmol, 10 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 45 min. Luego, se añadió más HCl en dioxano (4N, 120 mmol, 30 ml) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Se recogió por filtración el sólido resultante y se lavó con acetato de etilo. Luego, se suspendió en agua-isopropanol al 5 % (100 ml) y se calentó la mezcla a reflujo y se agitó durante 20 min. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se recogió el sólido mediante filtración, se lavó con isopropanol y se secó a alto vacío. Se obtuvo el compuesto del título como un sólido blanco con un rendimiento del 75 %. RMN de ¹H- (DMSO-d₆) δ 11,85 (s, 1 H), 9,02 (bs, 1 H), 8,88 (bs, 1 H), 7,70 (t, *J* = 3,81 Hz, 2 H), 7,53 – 7,30 (d, *J* = 8,24 Hz, 1 H), 7,17 (t, *J* = 7,48 Hz, 2 H), 3,36 (d, *J* = 12,51 Hz, 2 H), 3,10 – 2,94 (m, 3 H), 2,01 (d, *J* = 13,43 Hz, 2 H), 1,87 – 1,73 (m, 2 H); EM m/e (M+H)⁺ = 229,0.

20



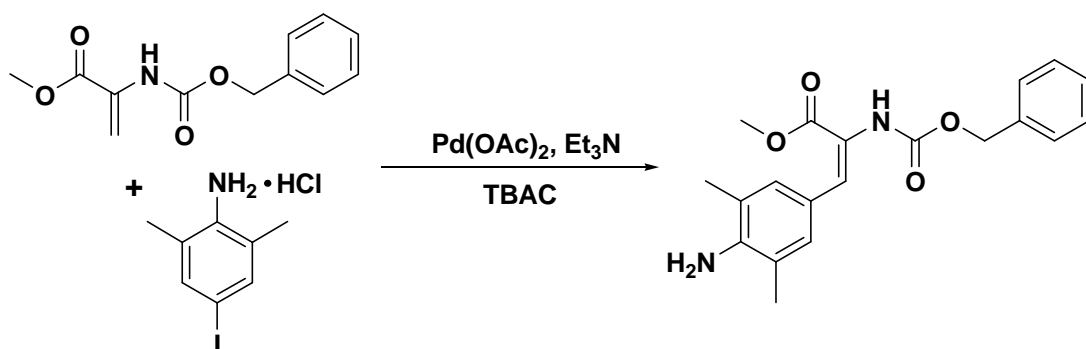
25 *Clorhidrato de 4-yodo-2,6-dimetilbencenamina*. A una suspensión de bicarbonato de sodio (126 g, 1,5 moles) y 2,6-dimetilanilina (61,5 ml, 500 mmol) en metanol (700 ml) se añadió monocloruro de yodo (1,0 M en diclorometano, 550 ml, 550 mmol) a temperatura ambiente sobre 1 h. Después de que se completara la reacción, se continuó la agitación durante 3 h. Se filtró la reacción para retirar el bicarbonato de sodio en exceso y se retiró el disolvente a vacío. Se redisolvió el residuo en dietil éter (1,5 l) y se trató con ácido clorhídrico (2 M en éter, 375 ml, 750 mmol). Se almacenó la suspensión resultante en el congelador (-15 °C) durante toda la noche. Se filtró el sólido y se lavó con dietil éter hasta que se volvió incoloro para proporcionar 126,5 g (89 %) como un polvo verde grisáceo. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 2,33 (s, 6 H), 7,48 (s, 2 H), 9,05 (bs, 3 H); RMN de ¹³C (DMSO-d₆) δ 17,4, 91,5, 133,1, 131,2, 136,9.

30

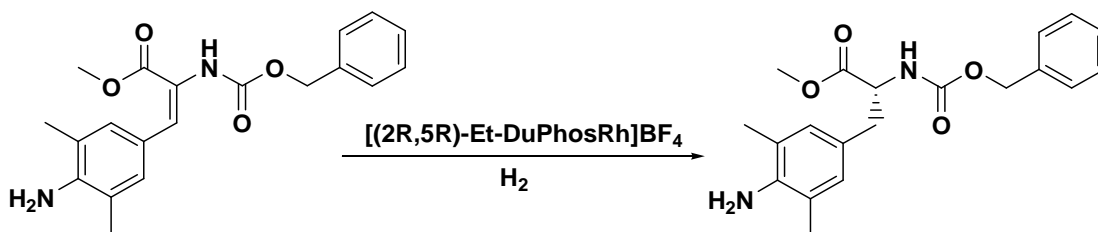


35 *2-(Benziloxicarbonil)acrilato de metilo*. A un matraz de fondo redondo de 3 bocas secado con llama, equipado con un agitador mecánico, se añadió 2-(benciloxicarbonil)-3-hidroxiopropanoato de (S)-metilo (129 g, 509 mmol), diclorometano anhidro (2 l) y cloruro de metanosulfonilo (49,3 ml, 636 mmol). Se enfrió la mezcla hasta -15 °C y se trató con trietilamina (213 ml, 1527 mmol), gota a gota, para asegurar que la temperatura de la mezcla de reacción no excediera de 0 °C. La adición del primer equivalente de trietilamina fue exotérmica. Después de la adición de trietilamina, se agitó la mezcla a 0 °C durante 30 min. Se retiró el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla temperatura ambiente durante 1,5 h. Se desactivó la reacción mediante la adición de metanol (21 ml). Se lavó la mezcla con bisulfato de potasio acuoso al 0,5 % hasta que los lavados fueron de pH 5, luego con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo/hexanos 1:9) proporcionó 111 g (92 %) como un aceite incoloro viscoso, que cristalizó tras dejar en reposo. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 3,71 (s, 3 H), 5,10 (s, 2 H), 5,60 (s, 1 H), 5,76 (s, 1 H), 7,39-7,35 (m, 5 H), 8,96 (s, 1 H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 52,3, 65,9, 127,8, 128,1, 128,3, 128,8, 133,3, 136,3, 153,5, 163,7.

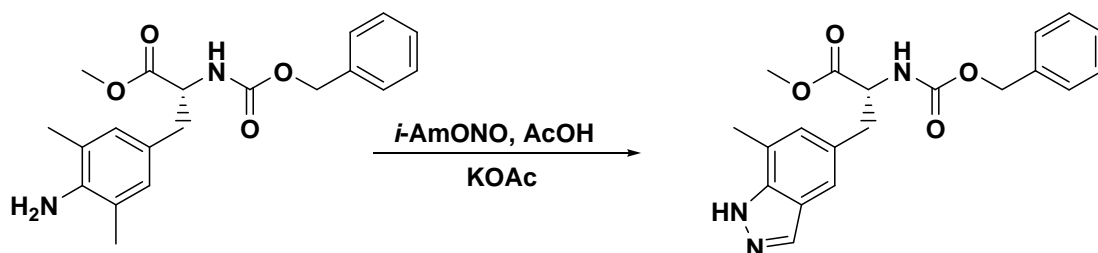
45



3-(4-amino-3,5-dimetilfenil)-2-(benciloxicarbonil)acrilato de (Z)-metilo. En un matraz de fondo redondo de 2 l se cargó la sal de clorhidrato de 4-yodo-2,6-dimetilbencenamina (55 g, 194 mmol), 2-(benciloxicarbonil)acrilato de metilo (59,2 g, 252 mmol), cloruro de tetrabutilamonio (59,2 g, 213 mmol), acetato de paladio (II) (4,34 g, 19,4 mmol) y tetrahidrofurano (1,2 l, desgasificado mediante un flujo de nitrógeno durante 30 min). Se agitó la mezcla para que se formara una suspensión y luego se desgasificó mediante un flujo de nitrógeno durante 30 min. Se añadió trietilamina (110 ml, 789 mmol) y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de celite, se levó con tetrahidrofurano (2 × 100 ml) y se concentró. Se disolvió el residuo en diclorometano, se lavó con agua (3X) y salmuera (2X), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, usando acetato de etilo/diclorometano 1:9) proporcionó un sólido de color canela. Se recrystalizó el sólido a partir de metanol templado (210 ml) y agua (100 ml). Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche, luego a 0 °C durante 2 h, y finalmente a -15 °C durante 2 h. Se filtró el sólido resultante, se lavó con metanol/agua 1:1 enfriado con hielo y se secó a alto vacío durante toda la noche para dar 44,7 g (65 %) como un sólido de color canela claro que fue una mezcla de isómeros Z/E (73:27). RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 2,05 (s, 6 H), 3,61 (s, 0,8 H), 3,68 (s, 2,2 H), 5,00 (s, 0,54 H), 5,13 (s, 1,46 H), 5,24 (s, 2 H), 7,40-7,21 (m, 8 H), 8,51 (s, 0,27 H), 8,79 (s, 0,73 H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 17,8, 51,7, 65,3, 119,4, 120,0, 120,3, 127,3, 127,7, 128,3, 130,9, 135,8, 137,2, 146,9, 154,7, 166,0.

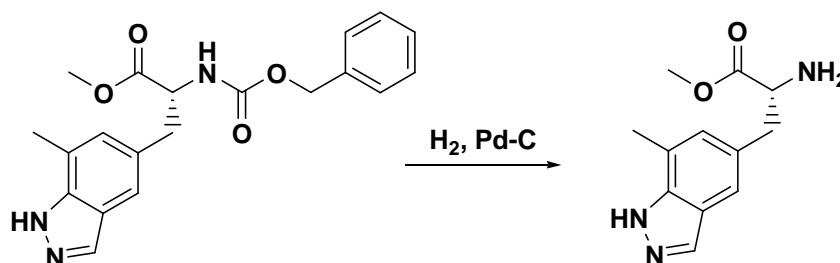


3-(4-amino-3,5-dimetilfenil)-2-(benciloxicarbonil)propanoato de (R)-metilo. Un recipiente de hidrogenación Parr de 2 l secado con llama se cargó con 3-(4-amino-3,5-dimetilfenil)-2-(benciloxicarbonil)acrilato de (Z)-metilo (84,5 g, 239 mmol), diclorometano (300 ml) y metanol (300 ml). Se removió el recipiente para que se formara una suspensión marrón claro. Se desgasificó la mezcla usando un flujo de nitrógeno durante 30 min. A ésta se añadió rápidamente tetrafluoroborato de (-)-1,2-bis((2R,5R)-2,5-dietilfosfolano)-benceno(ciclooctadieno)rodio (I) ([[(2R,5R)-Et-DuFosRh]BF₄]) (2,11 g, 3,20 mmol). Inmediatamente se sujetó el recipiente a un hidrogenador Parr. Después de 5 ciclos de hidrógeno (60 psi, 413,7 kPa) y vacío, se presurizó el recipiente hasta 65 psi (448,16 kPa) y se agitó la suspensión a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción se volvió homogénea. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo/diclorometano 1:9) para dar 82,9 g (98 %). RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 2,04 (s, 6 H), 2,65 (dd, J = 13,4, 9,8 Hz, 1H), 2,82 (dd, J = 13,7, 5,2 Hz, 1 H), 3,62 (s, 3 H), 4,15-4,10 (m, 1H), 4,41 (s, 2 H), 5,00 (s, 2 H), 6,68 (s, 2 H), 7,37-7,28 (m, 5 H), 7,70 (d, J = 7,9 Hz, 1 H); RMN de ¹³C (DMSO-d₆) δ 17,7, 35,9, 51,7, 56,1, 65,3, 120,4, 124,0, 127,5, 127,7, 128,2, 128,3, 136,9, 142,6, 155,9, 172,5.

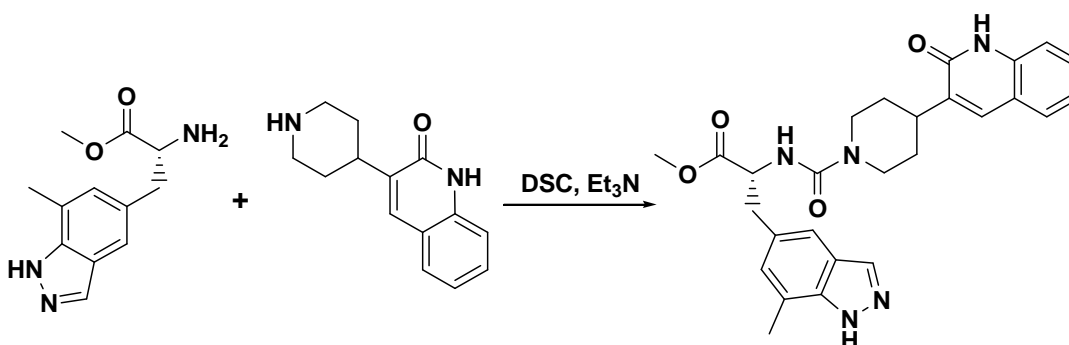


2-(benciloxicarbonil)-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)propanoato de (R)-metilo. Se pesó el 3-(4-amino-3,5-dimetilfenil)-2-

(benciloxicarbonil)propanoato de (R)-metilo (50,0 g, 140 mmol) en un matraz de fondo redondo de tres bocas secado con llama de 5 l, seguido de la adición de tolueno (2,4 l) y ácido acético glacial (120 ml, 2,1 moles). La mezcla se agitó mecánicamente para formar una solución transparente y luego, se añadió acetato de potasio (103 g, 1,05 moles). A la suspensión blanca resultante, se añadió nitrato de *iso*-amilo (20,7 ml, 154 mmol) a temperatura ambiente y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió bicarbonato de sodio saturado (1 l), seguido de la adición cuidadosa de bicarbonato de sodio sólido para neutralizar el ácido acético. Se extrajo la mezcla con una mezcla de diclorometano (2 l) y salmuera (1,5 l). Después de la separación, se extrajo la capa acuosa con diclorometano (500 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro y se filtraron. Se retiraron los disolvente para dar un sólido de color canela, que se lavó con hexanos (2 l) y tolueno (150 ml). Se recristalizó el sólido a partir de acetona caliente (260 ml) y hexanos (700 ml). Se dejó que la mezcla ligeramente turbia se enfriara hasta temperatura ambiente lentamente, luego hasta 0 °C durante 1,5 h y finalmente hasta -15 °C durante 1,5 h. Se filtró el sólido resultante y se lavó con acetona/hexanos (1:1, 200 ml) enfriado con hielo para dar 39,1 g (rendimiento del 76 %). La HPLC analítica mostró una pureza de UV >98 %. Se determinó que el exceso enantiomérico (ee) fue del 99,8 % (condiciones: columna Chiralpak AD, 4,6 x 250 mm, 10 µm; A = etanol, B = dietilamina/heptano al 0,05 %; 85 %B a 1,0 ml/min durante 55 min. Los tiempos de retención para R fueron de 44,6 min y para S fue de 28,8 min). RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 2,48 (s, 3 H), 2,93 (dd, J = 13,4, 10,7 Hz, 1H), 3,10 (dd, J = 13,7, 4,9 Hz, 1H), 3,63 (s, 3H), 4,32-4,27 (m, 1 H), 4,97 (s, 2 H), 7,03 (s, 1 H), 7,24-7,22 (m, 2 H), 7,29 -7,27 (m, 3 H), 7,41 (s, 1 H), 7,83 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 13,1 (s, 1 H); RMN de ¹³C (DMSO-d₆) δ 16,7, 36,5, 51,8, 56,0, 65,3, 117,6, 119,6, 122,7, 127,2, 127,4, 127,6, 128,2, 129,3, 133,4, 136,8, 139,2, 155,9, 172,4. Espec. de masas: 368,16 (MH)⁺.

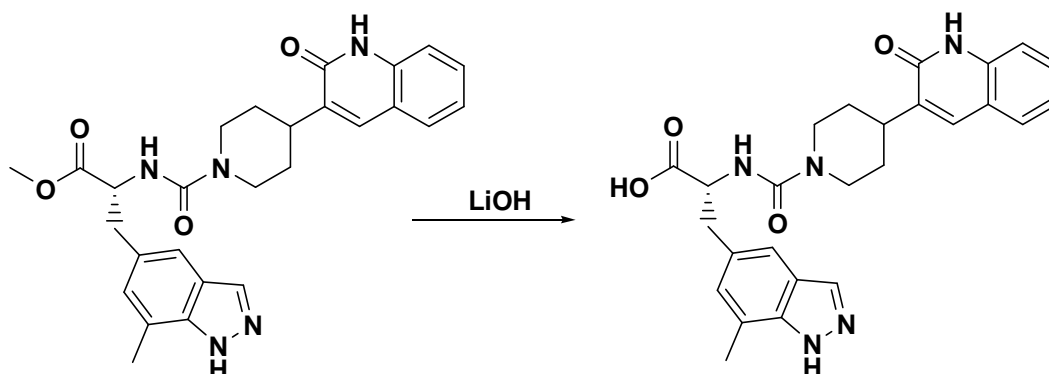


2-Amino-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)propanoato de (R)-metilo. Un recipiente de hidrogenación Parr se cargó con 2-(benciloxicarbonil)-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)propanoato de (R)-metilo (11,0 g, 29,9 mmol) y metanol (75 ml). Se purgó la suspensión con nitrógeno y se trató con paladio (10 % sobre carbón vegetal, 700 mg). Se agitó el recipiente bajo hidrógeno (15 psi, 103,42 kPa) durante la noche. Se filtró la mezcla a través de una almohadilla de celite para retirar el catalizador. La concentración del eluyente proporcionó 7,7 g (cuant.) como un aceite que se usó sin purificación adicional. RMN de ¹H (CD₃OD) δ 2,54 (s, 3 H), 2,98 (dd, J = 13,5, 7,0 Hz, 1 H), 3,09 (dd, J = 13,5, 5,9 Hz, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,75 (dd, J = 7,0, 6,2 Hz, 1 H), 7,01 (s, 1 H), 7,39 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H). Espec. de masas: 232,34 (M-H)⁺.

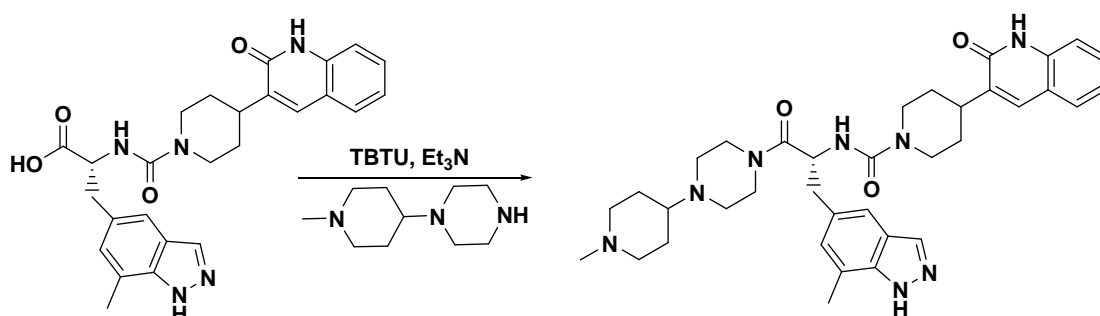


3-(7-Metil-1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamido)propanoato de (R)-metilo. A una solución de clorhidrato de 2-amino-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)propanoato de (R)-metilo (7,26 g, 27,0 mmol) en dimetilformamida (50 ml) a temperatura ambiente se añadió carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (7,60 g, 29,7 mmol) seguido de trietilamina (11,29 ml, 81 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 30 min y se trató con 3-(piperidin-4-il)quinolin-2(1H)-ona (6,77 g, 29,9 mmol) en partes. Se dejó que la reacción se agitara durante 24 h. Se concentró la mezcla, se disolvió en acetato de etilo y se lavó secuencialmente con agua, salmuera y HCl 0,5 N (2X). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo/metanol 20:1) para dar 11,9 g (78 %). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 13,0 (s, 1 H), 11,8 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H), 7,63 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 7,45 - 7,41 (m, 2 H), 7,27 (d, J = 8,2Hz, 1 H), 7,16 (t, J = 7,9 Hz, 1 H), 7,03 (s, 1 H), 6,85 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 4,31 - 4,26 (m, 1 H), 4,10 - 4,08 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,07 - 3,01 (m, 2 H), 2,93 - 2,88 (m, 1 H), 2,77 - 2,67 (m, 2 H), 2,48 (s, 3 H), 1,78 - 1,72 (m, 2 H),

1,34 – 1,26 (m, 2 H). Espec. de masas: 488,52 (MH)⁺.



5 *Ácido (R)-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamido)propanoico. Una solución de 3-(7-Metil-1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamido)propanoato de (R)-metilo (5,50 g, 11,3 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) y metanol (10 ml) se enfrió hasta 0 °C. A esto se añadió una solución fría (0 °C) monohidrato de hidróxido de litio (0,95 g, 22,6 mmol) en agua (20 ml), gota a gota durante 15 min. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 h adicionales. Se concentró la mezcla para retirar los disolventes orgánicos. Se disolvió el residuo resultante en una cantidad mínima de agua, se enfrió hasta 0 °C y se trató con HCl 1 N frío (0 °C) hasta que se logró pH 2. Se recogió el sólido resultante se recogió mediante filtración, se lavó con agua fría y éter y luego se secó durante toda la noche a alto vacío para dar 5,0 g (94 %) como un sólido blanco. RMN de ¹H- (DMSO-d₆) δ 13,05 (bs, 1 H), 11,77 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H), 7,62 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,55 (s, 1 H), 7,44 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 7,42 (s, 1 H), 7,27 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 7,16 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,05 (s, 1 H), 6,65 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 4,27 – 4,22 (m, 1 H), 4,10 – 4,07 (m, 2 H), 3,12 – 3,07 (m, 1 H), 3,03 – 2,99 (m, 1 H), 2,93 – 2,88 (m, 1 H), 2,77 – 2,66 (m, 2 H), 2,47 (s, 3 H), 1,77 – 1,74 (m, 2 H), 1,34 – 1,27 (m, 2 H). Espec. de masas: 474,30 (MH)⁺.*

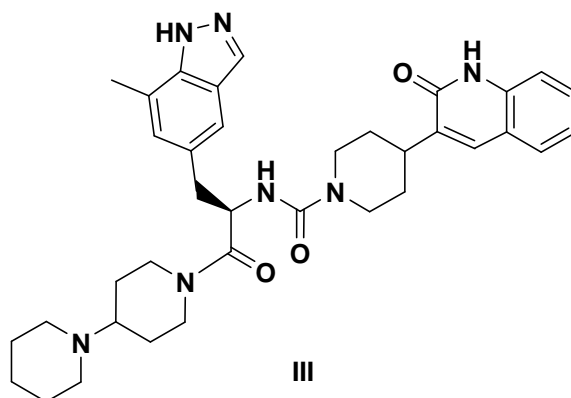
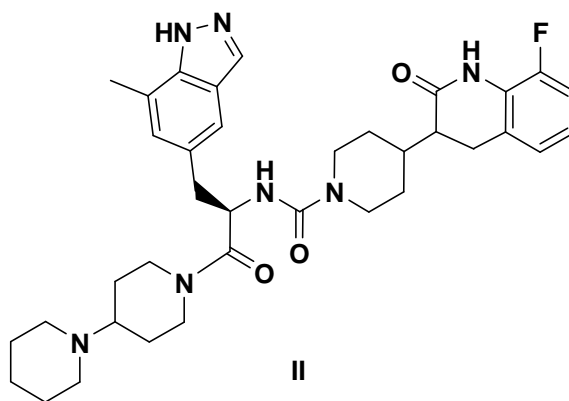
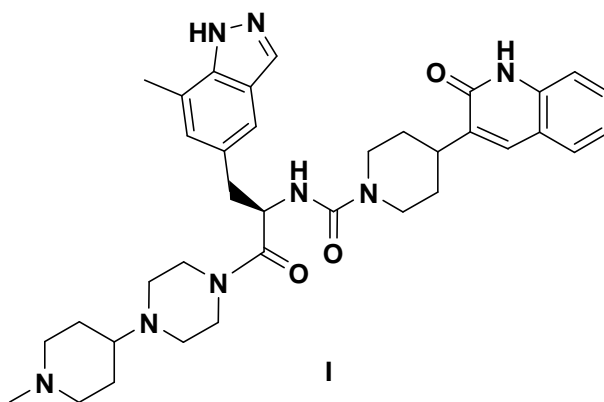


20 *(R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-oxopropan-2-il)-4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamida (I). Se cargó un matraz con (R)-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamido)propanoico (2,9 g, 6,11 mmol), trietilamina (3,00 ml, 21,5 mmol), 1-(1-metilpiperidin-4-il)piperazina (1,23 g, 6,72 mmol) y dimetilformamida (10 ml). Se trató la solución resultante con tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (2,26 g, 7,03 mmol) en partes. Se dejó que la reacción se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla a vacío para eliminar dimetilformamida. Se disolvió el producto bruto en metanol al 7 % en diclorometano y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida usando metanol al 7 % en diclorometano que contenía un 2 % de hidróxido de amonio acuoso como eluyente. Se recogieron las fracciones puras y se retiró el disolvente a vacío. Se cristalizó el producto deseado a partir de acetona caliente para dar el **compuesto I** con un rendimiento del 77 %. La HPLC analítica*

30 *mostró una pureza de UV >99,0 % a 230 nm. Se determinó que el exceso enantiomérico (ee) fue del >99,9 % (condiciones: columna Chiralpak AD, 4,6 × 250 mm, 10 μm; eluyente: 70 % (dietilamina al 0,05 %)/heptano/etanol al 30 %; a 1,0 ml/min durante 45 min. Los tiempos de retención fueron de 18,7 min para R y de 28,1 min para S). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 13,01 (s, 1 H), 11,76 (s, 1 H), 7,96 (s, 1 H), 7,62 (d, J = 7,10 Hz, 1 H), 7,60 (s, 1 H), 7,42 (m, 1 H), 7,36 (s, 1 H), 7,26 (d, J = 8,25 Hz, 1 H), 7,14 (m, 1 H), 7,00 (s, 1 H), 6,69 (d, J = 8,25 Hz, 1 H), 4,78 (q, J = 7,79 Hz, 1 H), 4,14 (d, J = 12,37 Hz, 2 H), 3,54 (dd, J = 9,16, 4,58 Hz, 1 H), 3,24 (m, 1 H), 3,11 (m, 1 H), 2,97 (m, 1 H), 2,89 (m, 2 H), 2,69 (m, 4 H), 2,32 (m, 1 H), 2,21 (m, 1 H), 2,07 (m, 4 H), 1,95 (t, J = 8,25 Hz, 1 H), 1,87 (m, J = 11,28, 11,28, 3,55, 3,44 Hz, 1 H), 1,76 (t, J = 12,03 Hz, 2 H), 1,68 (t, J = 11,11 Hz, 2 H), 1,53 (t, J = 8,25 Hz, 1 H), 1,32 (m, 4 H), 1,16 (m, 2 H); RMN de ¹³C (DMSO-d₆) δ 16,80, 27,30, 30,51, 30,51, 30,67, 35,50, 38,04, 41,74, 44,00, 44,16, 45,35, 45,78, 48,14, 48,39, 51,45, 54,76, 54,76, 60,61, 114,53, 117,79, 119,29, 119,34, 121,57, 122,78, 127,46, 127,79, 129,29, 129,79, 133,31, 133,72, 136,98, 137,41, 139,12, 156,50, 161,50, 170,42. Análisis de masa precisa: m/z 639,3770, [MH]⁺, Δ = -0,2 ppm. Rotación óptica: -27,36° a 589 nm, concentración = 4,71 mg/ml en metanol.*

Procedimientos biológicos y otras propiedades

Esquema 5. Compuesto I compuestos de comparación II y III.



5

10 *Solubilidad acuosa.* Se mezcló base libre de sólido con tampones de carbonato y etanolamina. Se ajustó el pH de una tercera muestra con HCl. Se mezclaron los sólidos con los vehículos usando un mezclador que estaba contenido dentro de un incubador ajustado a 25C. Después de la equilibración, se retiraron las muestras del sobrenadante, se diluyó lo apropiado y se analizó mediante HPLC.

15 *Solubilidad en medio acuoso, dependencia de pH.* Se convirtió el compuesto I cristalino a una fase gelatinosa durante la medida del perfil de solubilidad de pH. La ausencia de una fase cristalina en equilibrio con agua evita una evaluación confiada del intervalo de pH en el que se puede formular el compuesto I como una solución termodinámicamente estable. Están en curso esfuerzos para generar una forma de base libre cristalina del compuesto I que se pueda equilibrar en agua. Los datos recogidos sobre la fase gelatinosa se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1: Solubilidad de compuesto I en medio acuoso a 25C

Vehículo	Solubilidad (mg/ml)
Tampón de carbonato, pH=10,4	0,2
Tampón de etanolamina, pH=9,4	0,5
Valoración parcial del compuesto I con HCl, pH=8,5	105
pH < 8,5	> 300

- 5 *Estabilidad del estado de solución.* Se evaluó la estabilidad del estado de solución del compuesto I en función de la temperatura, pH, luz de alta intensidad (HIL), concentración del tampón y concentración del fármaco. La matriz experimental usada se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Matriz de estabilidad del estado de solución

Muestra	pH	Temp (°C)	Conc. de fármaco (mg/ml)	Conc. de tampón (M)
A	4	40	0,1	0,05
B	5	25	0,1	0,05
C	5	25/luz	0,1	0,05
D	5	60	0,1	0,05
E	5	40	0,1	0,05
F	6	40	0,1	0,05
G	4	40	40	0,05
H	5	40	40	0,05
I	6	40	40	0,05
J	5	40	0,1	0,01

- 10 Se usó tampón de succinato para todas las soluciones. Para muestras expuestas a la luz, se usó una cámara de fotoestabilidad de acuerdo con las directrices de ICH (1,2 millones de lux-hora de exposición a la luz visible y 200 watos hora/m² a UV). Se realizaron análisis en 4, 8 y 12 semanas.

- 15 Se encontraron diez degradantes durante el estudio de estabilidad de la solución. El porcentaje de cada degradante encontrado en muestras después de 12 semanas de almacenamiento se enumera en la tabla 3. Anótese que en el punto temporal inicial, los degradantes B y G eran los únicos degradantes presentes y sus concentraciones iniciales fueron del 0,17 % y del 0,06 % respectivamente.

- 20 Se realizó una evaluación espectroscópica de masas sobre estos degradantes presentes en cantidad suficiente para permitir una determinación de masas. Los resultados se enumeran en la tabla 4. Se enumeran dos picos bajo el degradante B debido a que se descubrió que los dos degradantes no están bien separados por el procedimiento de HPLC actual. Los degradantes A y C corresponden a productos de hidrólisis (figura 2).

- 25 Bajo la condición más favorable examinada, la condición I en la tabla 2, el compuesto I mostró solo una degradación del 0,3 % después de 12 semanas a 40C. Esto sugiere que se puede encontrar una formulación acuosa que cumpla las directrices de ICH durante al menos un año de estabilidad química.

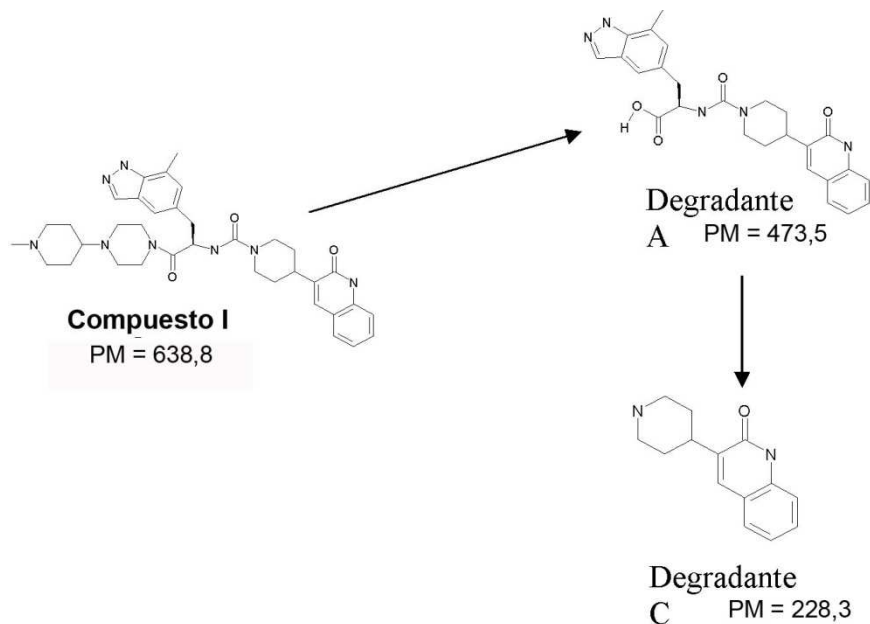
Tabla 3: Porcentaje de área de degradantes observados a las doce semanas y sus tiempos de retención (minutos)

	Deg A <i>t_r</i> =3,9	Deg B <i>t_r</i> =5,4	Deg C <i>t_r</i> =4,6	Deg D <i>t_r</i> =4,1	Deg E <i>t_r</i> =5,0	Deg F <i>t_r</i> =6,6	Deg G <i>t_r</i> =7,5	Deg H <i>t_r</i> =6,7	Deg I <i>t_r</i> =4,3	Deg J <i>t_r</i> =5,6
A	2,0	-	10,5	-	-	-	-	-	-	-
B	,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
C	16,9	2,9	2,8	5,2	1,0	7,7	-	-	5,7	-
D	1,2	-	55,0	-	-	-	-	-	-	-
E	1,9	0,2	-	-	,1	-	-	-	-	-
F	,4	0,1	-	-	,1	-	-	-	-	-
G	4,9	-	-	-	3,5	-	0,1	,1	-	0,1
H	1,2	0,1	-	-	0,0	-	0,1	-	-	0,0
I	,2	0,1	0,0	-	0,0	-	0,1	-	-	0,1
J	1,1	0,1	-	-	,1	-	-	0,5	-	-

Tabla 4: Pesos moleculares del degradante

Marcador de degradante	Peso molecular
A	473,5
B	541,4
	612,4
C	228,3

Esquema 6.



5

Estabilidad de solución: El efecto de la temperatura. El efecto de la temperatura se resume en la tabla 5. La mejora en la tasa de degradación con la temperatura es debida mayormente a la mejora en la hidrólisis. A la temperatura más alta la degradación provenía en su totalidad del producto C, pero a temperaturas menores la degradación se detenía en el producto A (figura 2).

10

Tabla 5: Estabilidad y temperatura de solución

pH	Degradantes totales (25C)	Degradantes totales (40C)	Degradantes totales (60C)
5	0,6 %	2,2 %	56,2 %

Estabilidad de solución: El efecto de la luz. Se resume el efecto de la luz en la tabla 6. Se anotaron siete degradantes para determinar muestras expuestas a la luz, tres de los cuales no aparecieron en muestras almacenadas bajo cualquier otra condición. Se mejoró la hidrólisis (degradante A) mediante exposición a la luz.

15

Tabla 6: Estabilidad y luz de solución

pH	Temperatura (C)	Condición de luz:	Degradantes totales
5	25	Oscuridad	2,3 %
5	25	Luz	72 %

Estabilidad de solución: el efecto del pH. Se resume el efecto del pH sobre la tasa de degradación en la tabla 7. La mejora en la tasa de degradación varió inversamente con el pH y estaba dominada por una mejora en la hidrólisis. A pH 4, la degradación provenía del producto de hidrólisis C, pero a pH 5 y 6 la degradación se detenía en el producto de hidrólisis A.

20

Tabla 7: Estabilidad y pH de solución

pH	Degradantes totales
4	12,5 %
5	2,2 %
6	0,62 %

Estabilidad de solución: el efecto de la concentración de tampón. Concentraciones más altas de tampón de succinato tendieron a producir una tasa más alta de hidrólisis al degradante A (tabla 8).

Tabla 8: Estabilidad de solución y concentración de tampón de succinato

pH	Degradantes totales [tampón]= 0,01 M	Degradantes totales [tampón]= 0,05 M
5	1,8 %	2,2 %

5 Estabilidad de solución: el efecto de la concentración de fármaco. La carga de fármaco alta descendió la tasa de hidrólisis y limitó la hidrólisis a la formación de degradante A (tabla 9). El degradante G, que solo se detectó en las muestras de concentración alta, no creció notablemente en concentración durante el estudio y pudo ser simplemente una impureza. El degradante J solo se pudo detectar en el punto temporal final.

Tabla 9: Estabilidad de solución y concentración de compuesto I

pH	Degradantes totales [Fármaco]= 0,1 mg/ml	Degradantes totales [Fármaco]= 40 mg/ml
4	12,5 %	8,6 %
5	2,2 %	1,5 %
6	0,62 %	0,5 %

10 Competición para unión a [¹²⁵I]CGRP

Ensayo de Unión. El homogenado de membrana celular SK-N-MC sirve como fuente de receptor. Se usan células SK-N-MC de neuroblastoma humano para ensayos *in vitro* ya que expresan de manera endógena el receptor de CGRP con una secuencia idéntica al receptor de CGRP humano clonado (Aiyar y col., 2001). Se cultivaron células a 37 °C en CO₂ al 5 % en medio constituido por MEM con sales de Earle y L-glutamina suplementado con suero bovino fetal al 10 % hasta alcanzar la confluencia. Se recogieron las células aclarando dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se incubaron durante 5-10 minutos a 4 °C en tampón de lisis hipotónica constituido por Tris 10 mM (pH 7,4) y EDTA 5 mM. Se recogieron las células y se transfirieron a tubos de polipropileno y se homogeneizaron usando un politrón. Se centrifugan los homogenados a 32.000 x g durante 30 min. Se resuspenden los sedimentos en tampón de lisis hipotónico frío con coctel inhibidor de proteasa de mamífero al 0,1 % y se sometieron a ensayo para determinar la concentración de proteínas. Luego se alicuotó el homogenado de membrana y se almacenó a -80 °C hasta el día del ensayo.

Se midió la capacidad del compuesto I para competir por el péptido endógeno CGRP alfa humano (hαCGRP) radiomarcado ([¹²⁵I]CGRP, Amersham Biosciences) usando un ensayo de competición de radioligando. En primer lugar se solubiliza el compuesto I y se lleva a cabo a través de diluciones en serie usando DMSO al 100 %. El compuesto se diluye adicionalmente 25 veces en tampón de ensayo (Tris-Cl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, Tritón X-100 al 0,005 %) y se transfirieron (50 µl) en placas de ensayo de 96 pocillos. Se diluyó [¹²⁵I]-CGRP a 600 pM en tampón de ensayo y se añadió un volumen de 50 µl a cada pocillo concentración final de 15 pM en ensayo). Se descongelaron sedimentos de membrana de SK-N-MC, se diluyeron en tampón de ensayo con cóctel inhibidor de proteasas de mamíferos al 0,1 % recién preparado y se homogeneizaron tal como se describió previamente. Luego, se añadieron de cinco a diez µg de proteína por pocillo en un volumen de 100 µl. Luego, se incubaron las placas de ensayo a temperatura ambiente (25 °C) durante dos horas. Se terminaron los ensayos mediante la adición de tampón de lavado frío en exceso (Tris-Cl 20 mM pH 7,5, BSA al 0,1 %) inmediatamente seguido de filtración sobre filtros de fibra de vidrio agitados previamente en PEI al 0,5 %. La unión no específica se define con β-CGRP 1 µM. Se midió la radioactividad unida a proteína usando un contador de centelleo gamma. La CI₅₀ se define como la concentración de compuesto requerida para inhibir el 50 % de la unión a radioligando.

40 **Resultados.** El compuesto I presenta inhibición dependiente de la concentración de la unión de [¹²⁵I]CGRP al receptor de CGRP expresado de manera endógena en membranas de células SK-N-MC. K_i promedio es de 22,7 ± 1,6 pM.

Interacción con péptido CGRP

45 **Procedimientos.** La naturaleza de la interacción entre el péptido CGRP endógeno y el compuesto I se estudia en detalle usando experimentos de unión de saturación. En resumen, la unión de [¹²⁵I]CGRP a la preparación de membrana de células SK-N-MC se mide con un incremento de concentración de [¹²⁵I]CGRP sin (condición de control) o en presencia de (condiciones de prueba) una de las dos concentraciones (30 pM y 100 pM) del compuesto I. Se analizaron los datos de saturación con ecuaciones hiperbólicas usando software de Kell (Biosoft, Cambridge, UK) para estimar la constante de disociación (K_d) y el número máximo de sitios de unión (B_{max}). Se midió y se comparó el impacto de la adición del compuesto I a los parámetros de unión (K_d , B_{max}) de [¹²⁵I]CGRP.

55 **Resultados.** El compuesto I incrementa dependientemente de la concentración la constante de disociación K_d de la unión a [¹²⁵I]CGRP (disminuye su afinidad), sin cambiar significativamente el número máximo de sitios de unión de unión a [¹²⁵I]CGRP (B_{max}). Esto indica un mecanismo competitivo de inhibición por el compuesto I a la unión de [¹²⁵I]CGRP al receptor humano (tabla 10).

Tabla 10. K_d , B_{max} de [125]CGRP para la preparación de membrana de células SK-N-MC con o sin la presencia del compuesto I.

	Control	Compuesto I 30 pM	Compuesto I 100 pM
K_d (pM)	23,1 ± 5,0	58,0 ± 19,6	129,7 ± 31,9
B_{max} (fmol/mg de proteína)	142,6 ± 10,6	112,1 ± 20,6	146,8 ± 6,4

Ensayo funcional celular - ensayo de AMP cíclico

5 *Procedimientos.* El complejo del receptor de CGRP se acopla a la clase Gs de proteínas G. La unión de CGRP a este complejo conduce a la producción de AMP cíclico (adenosina monofosfato 3'5'-cíclico) por medio de la activación dependiente de Gs de adenilato ciclasa.

10 El antagonismo funcional por el compuesto I se determina midiendo su capacidad para inhibir la formación estimulada por CGRP de AMP cíclico en células SK-N-MC completas unidas. Se incuban células SK-N-MC a temperatura ambiente con CGRP 0,3 nM solo durante 30 minutos, o se incuban previamente con diversas concentraciones de compuesto durante 15 minutos antes de la adición de CGRP 0,3 nM y luego se incuban adicionalmente durante 30 minutos. El AMP cíclico (cAMP) producido se extrajo usando el "reactivo de lisis" y su concentración se determinó mediante radioinmunoensayo usando el kit de ensayo de rastreo directo SPA de AMP cíclico RPA559 (Amersham Pharmacia Biotech). Los valores de CI_{50} se definen como la concentración de compuesto requerida para inhibir el 50 % de la producción de cAMP estimulada con CGRP 0,3 nM. Y_{max} se define como la inhibición en porcentaje máxima de la producción de cAMP estimulada por CGRP 0,3 nM.

20 *Resultados.* El compuesto I presenta inhibición dependiente de la concentración de la producción de cAMP estimulada por CGRP en células SK-N-MC completas unidas, con una CI_{50} de $38,6 \pm 4,2$ pM y una Y_{max} de $95,4 (\pm 1,3)$ %. La inhibición máxima (ca. 100 %) observada indica el antagonismo completo en el receptor de CGRP.

Análisis Schild

25 *Procedimientos.* El análisis Schild se usa para caracterizar la naturaleza del antagonismo del compuesto I. La respuesta de dosis de la producción de cAMP estimulada por CGRP se genera con CGRP solo o bien con CGRP en presencia de diversas concentraciones del compuesto I. Específicamente, la estimulación de cAMP dependiente de dosis mediante CGRP se somete a ensayo con o sin cinco concentraciones diferentes del compuesto I. La concentración del compuesto I se representa en el eje X frente a la razón de dosis menos 1 en el eje Y (razón de dosis se define como la CE_{50} de CGRP en presencia de compuesto I dividido entre la EC_{50} de CGRP solo). Luego se realiza la regresión lineal con ambos ejes X e Y transformados en log. Una pendiente que no difiere significativamente de la unidad (1) indica antagonismo competitivo. K_b es la constante de disociación de antagonista.

35 *Resultados.* El análisis Schild para el compuesto I revela una pendiente promedio de $1,02 \pm 0,04$ y una constante de disociación de antagonista promedio K_b de $21,5 \pm 9,4$ pM. La desviación a la derecha paralela de la respuesta a la concentración de CGRP en presencia de un incremento de concentración del compuesto I indica antagonismo competitivo por el compuesto I de la producción de cAMP estimulada por CGRP. La pendiente de 1,02 de la curva de Schild apoya adicionalmente la interacción competitiva entre el compuesto I y la función de CGRP. K_b de 21,5 pM está de acuerdo con la K_i de unión (22,7 pM).

Reversión de la dilatación inducida por CGRP en arteria intracraneal humana *ex vivo*

45 Para dar una medida *ex vivo* que imite las afecciones clínicas (en las que la liberación de CGRP relacionado con migraña precede el inicio de la terapia), en primer lugar se dilatan los vasos mediante CGRP y luego se revierte la dilatación con el compuesto I. En el protocolo de reversión, el post-tratamiento con antagonista revierte la dilatación de arteria inducida por CGRP (usando una dosis de agonista sola y dosis de antagonistas múltiples). En resumen, se contraen anillos de arteria montados en catéter con ión potasio (para imitar el tono endógeno), completamente dilatados con CGRP, y la dilatación se revierte con un incremento de las concentraciones del compuesto I antagonista de CGRP. El post-tratamiento con compuesto I es eficaz en revertir la dilatación inducida por CGRP de arterias intracraneales humanas *ex vivo*.

55 *Muestras de tejido.* Se obtienen muestras de autopsia de arterias humanas a partir de proveedores para adquisición de tejidos. Todos los vasos se transportan en tampón HEPES enfriado con hielo (composición en mM: NaCl 130, KCl 4, KH_2PO_4 1,2, $MgSO_4$ 1,2, $CaCl_2$ 1,8, Glucosa 6, $NaHCO_3$ 4, HEPES 10, EDTA 0,025). Tras su recepción, se colocan los vasos en tampón Krebs frío (composición en mM: NaCl 118,4, KCl 4,7, KH_2PO_4 1,2, $MgSO_4$ 1,2, $CaCl_2$ 1,8, Glucosa 10,1, $NaHCO_3$ 25) saturado con carbógeno (CO_2 al 5 % y oxígeno al 95 %).

60 *Procedimientos.* Los vasos están limpios de tejido conectivo y se cortan en segmentos cilíndricos de 4-5 mm de longitud. Luego, se montan los vasos en baños de tejidos entre dos ganchos de acero inoxidable, de los que uno está fijo y el otro está conectado a un transductor de desplazamiento de fuerza. La tensión del vaso se registra de manera continua usando un sistema de adquisición de datos (Powerlab, AD Instruments, Mountain View, CA). Los

baños de tejidos que contienen el tampón Krebs y los vasos montados se controlan por temperatura (37 °C) y pH (7,4) y se burbujea continuamente con carbógeno. Se deja que los segmentos de arteria se equilibren durante aproximadamente 30-45 minutos hasta que se logre un tono de descanso estable (de 0,25 a 0,5 g). Antes del ensayo, los vasos se ceban (se condicionan) con KCl 100 mM y se lavan posteriormente.

5 Para probar el efecto antidilatador del compuesto I, en primer lugar se contraen los vasos con cloruro de potasio 10 mM (KCl) para imitar el tono endógeno, luego se dilatan completamente con hCGRP 1 nM, y finalmente se revierte la dilatación mediante la adición acumulativa de concentraciones incrementadas del compuesto I en unidades de log a la mitad (permitiendo el cálculo de CE_{50}). En cada concentración, los efectos de los fármacos se expresan como
10 reversión en % de la dilatación inducida por CGRP en cada vaso. Se realiza el análisis de datos para cada vaso individualmente, ajustando los datos de respuesta a concentración a una función logística de cuatro parámetros mediante análisis de regresión no lineal, para estimar los valores de CE_{50} .

15 **Resultados.** El compuesto I muestra una reversión potente y completa de la dilatación inducida por CGRP de arterias intracraneales humanas *ex vivo* con $CE_{50} = 880 \pm 50$ pM.

Análisis Schild: Inhibición de la curva de respuesta de concentración de CGRP en arteria intracraneal humana *ex vivo*

20 Para evaluar el antagonismo funcional frente a un intervalo de concentraciones de CGRP, se incubaba previamente el compuesto I con anillos de arteria individuales en el baño de tejidos y luego se genera una curva de respuesta de concentración de CGRP para lograr la dilatación completa (usando dosis de agonista múltiples y de antagonista múltiples). Concentraciones más altas de antagonista producen un 'desplazamiento a la derecha' en la curva de
25 respuesta de concentración de CGRP, requiriendo concentraciones mayores de agonista para superar la presencia de antagonista y lograr la dilatación completa. En resumen, se incuban previamente los anillos de arteria montados en catéter con antagonista, luego se contraen con KCl (para imitar el tono endógeno), y seguido de la adición de concentraciones incrementadas de CGRP para lograr la relajación completa. El pretratamiento con compuesto I es eficaz en la inhibición de la dilatación inducida por CGRP de arterias intracraneales humanas, y presenta una
30 desviación a la derecha paralela de la curva de respuesta de concentración de CGRP.

Procedimientos. Se incubaba previamente cada anillo de arteria montados en catéter durante 30 minutos con una única concentración (0,1-30 nM) del compuesto I de antagonista, luego se contrae con KCl 10 nM (para imitar el tono
35 endógeno), seguido de la adición de concentraciones incrementadas de CGRP para lograr la relajación completa. Se deja que la contracción de KCl se estabilice, para que el tiempo de pretratamiento de antagonista total sea aproximadamente 45 min antes de la aplicación de CGRP.

Resultados. El compuesto I produce una desviación a la derecha paralela de la curva de respuesta de concentración de CGRP en arterias intracraneales humanas *ex vivo*. El análisis Schild revela una K_b de 91 pM. Estos resultados se comparan favorablemente con los ensayos de unión *in vitro* ($K_i = 22,7$ pM) y funcionales ($K_b = 21,5$ pM).
40

Eficacia *in vivo* del compuesto I en el flujo sanguíneo facial de tití

Para evaluar la eficacia *in vivo* de antagonistas de receptores de CGRP novedosos, los titís recibieron una serie de cuatro inyecciones intravenosas de hCGRP (a intervalos de 45 min). El primero sirve como control del valor de
45 referencia, y está seguido de la administración subcutánea del artículo de prueba. Las tres exposiciones de CGRP subsiguientes proporcionan una evaluación del antagonismo de CGRP funcional *in vivo*. En el presente estudio, el compuesto I demostró antagonismo de CGRP duradero, sólido.

Procedimientos. Se anestesian titís y se incrementa el flujo sanguíneo facial mediante administración intravenosa
50 (IV) de hCGRP a intervalos de 45 min (-30, 15, 60 y 105 min). El efecto del compuesto de prueba, suministrado a 0 min, sobre los cambios inducidos por hCGRP en el flujo sanguíneo facial se mide mediante flujometría de láser Doppler. Los compuestos eficaces suprimirían el incremento inducido por hCGRP en el flujo sanguíneo facial observado a los 15, 60 y 105 min (comparado con el efecto de hCGRP del valor de referencia observado a los -30 min).
55

Sujetos: Titís comunes machos y hembras adultos (*Callithrix jacchus*) que pesan 350-650 g sirven como sujetos.

Anestesia y preparación: Se anestesiaron los animales mediante inhalación de isoflurano en una cámara de inducción (inducción rápida del 4-5 %, mantenida con el 1-2,5 %; Solomon y col., 1999). Se mantiene la anestesia
60 suministrando un suministro constante de aire:oxígeno (50:50) e isofluran por medio de intubación y ventilación (con monitorización de gas en sangre). Se mantiene la temperatura corporal a $38 \pm 0,5$ °C colocándolos sobre una superficie de temperatura controlada automática con una sonda rectal. Se retira una pequeña área del pelo (aproximadamente de 1,5 cm cuadrados) de uno o de ambos lados de la cara mediante aplicación de una crema depilatoria y/o afeitado. Se recortan las áreas quirúrgicas y se preparan con betadine. Se coloca una línea IV en la vena safena para la administración de compuestos de prueba y del hCGRP agonista del receptor CGRP.
65 Adicionalmente, esta línea IV proporciona la retirada de muestras de sangre (máx. 2,5 ml, 10 %) para la

monitorización de gas en sangre y el análisis de los niveles plasmáticos de compuesto. Una solución de dextrosa al 5 % se administra IV para mantener los niveles de glucemia. Se monitoriza la anestesia profunda midiendo la presión arterial y la frecuencia cardíaca usando un procedimiento de manguito para brazo no invasivo y un pulsómetro, respectivamente. Se proporciona guanetidina 5-10 mg/kg IV, suplementado con 5 mg/kg IV como sea necesario, para estabilizar el flujo de pico en el flujo sanguíneo facial que de lo contrario muestra la reducción progresiva tras la estimulación repetitiva (Escott y col., 1995). Se monitoriza el flujo sanguíneo microvascular sujetando una sonda de flujo de láser Doppler autoadhesiva a la piel facial. La sonda registra el número de eritrocitos que cruzan el trayecto de dos haces de láser, multiplicado por su velocidad (comunicado como cambios en el flujo).

10 Suministro de fármaco: Se administran los compuestos de prueba SC (0,1–0,6 ml/kg) en la nuca del cuello. El agonista del receptor de CGRP, hαCGRP se suministra IV (1 ml/kg) en una dosis de 10 µg/kg.

15 *Protocolo de pruebas:* Para evaluar la eficacia *in vivo* y la duración de la acción, se induce un incremento de control en el flujo sanguíneo facial mediante la administración de hαCGRP (10 µg/kg IV) 30 min antes (-0,5 h) de la administración del fármaco. Luego se administra el compuesto I a tiempo cero (0 min) y de nuevo hαCGRP se suministran a intervalos de 45 min durante ~2 h (datos recogidos a 0,25, 1 y 1,75 h después de la dosis). Se dosifica el compuesto I a 0,003, 0,01 y 0,03 mg/kg, SC. Se obtienen muestras de plasma justo antes de cada administración de hαCGRP. Tras las pruebas, los animales vuelven a la jaula de transporte que se coloca sobre una superficie de temperatura controlada que mantiene a los animales calientes hasta que despiertan totalmente y pueden andar. Los animales se someten a prueba de nuevo después de un periodo de 14-21 días de descanso y lavado.

25 Resultados. El compuesto I (0,003-0,03 mg/kg, SC) muestra una inhibición dependiente de dosis de incrementos inducidos por CGRP en el flujo sanguíneo facial de titís. Se observa una inhibición sólida (53-80 %) a 0,03 mg/kg, a 0,25, 1 y 1,75 h después de la dosis. Se observa una inhibición significativa (35-40 %) a lo largo de todos los tiempos de prueba después de las dosis a 0,01 mg/kg. A 0,003 mg/kg, se observa una inhibición leve (20 %) pero significativa a 0,25 h, sin ningún efecto en los tiempos de prueba más tardíos.

30 Comparando la eficacia frente a la exposición, los niveles de plasma ≥ 8 nM se asocian a eficacia *in vivo* significativa y los niveles ≥ 25 nM con eficacia máxima para el compuesto I.

Estudios de irritación intranasal en ratas

35 *Compuesto I y compuesto III: Estudio de irritación intranasal comparativo de una semana en ratas.* Se llevó a cabo este estudio para comparar la irritación nasal potencial del compuesto I con respecto al compuesto III cuando se proporciona por vía intranasal a ratas macho durante 1 semana. Se infundieron intranasalmente a ratas macho (10/grupo) soluciones de compuesto I o compuesto III (25, 75 o 175 mg/l en ácido succínico 225 mM, cloruro de benzalconio al 0,02 %, dextrosa anhidra al 1,25 %, pH 5,8-6,2) una vez diariamente en un volumen de dosis 100 µl/fosa nasal. Usando este paradigma de dosificación, se suministraron diariamente dosis fijas de 5, 15 o 35 mg de artículo. Como consecuencia, las dosificaciones normalizadas al peso corporal disminuyeron con el tiempo al crecer las ratas. A un grupo de control se le proporcionó un vehículo de succinato y a un grupo de control simulado se le proporcionó solución salina mediante instilación intranasal. Los parámetros evaluados incluyeron observaciones clínicas, peso corporal, consumo de alimento, toxicocinética y evaluación histológica de tejidos nasales.

45 Los valores para los parámetros toxicocinéticos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Datos toxicocinéticos derivados del compuesto I.

Compuesto I						
Dosis, mg	5		15		35	
Dosis, mg/cm ² (³)	0,357		1,07		2,50	
Parámetro	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
Dosificación promedio (mg/kg)	21	19	62	56	144	132
C _{max} promedio (µM)	0,33	0,66	2,2	0,83	1,5	1,2
ABC _{0-24h} compuesto (µM•h)	1,6	2,6	4,6	5,2	7,9	5,4
T _{max} promedio (h)	0,50	1,0	1,0	0,50	2,0	1,0
T _{1/2} promedio (h)	7,1	5,6	5,1	6,7	ND ¹	6,0
C _{24h} promedio (µM)	0,022	0,015	0,017	0,059	0,12	0,036

¹No determinado debido a exposición prolongada.

²Biocapacidad absoluta basada en una ABC_{0-24h} de 7,7 µM•h en ratas tras la administración intravenosa de 1 mg/kg.

³Área de superficie de mucosa nasal de rata estimada=14cm²

La dosificación intranasal del compuesto I proporcionó exposición sistémica en ratas fuera de las 24 h, y se observó una pequeña diferencia el primer y el último día de dosificación en este estudio de 1 semana.

50

La administración intranasal del compuesto I se toleró bien; los hallazgos en vida se limitaron al incremento de la salivación en todos los grupos de dosis y controles de vehículo, y posiblemente estaba relacionado con el volumen de dosificación excesivamente grande usado para el estudio. No se observó salivación en ratas a las que se les proporcionó solución salina.

Se observó irritación nasal para ambos compuestos, pero el compuesto I provocó claramente menor atrofia epitelial olfatoria que el compuesto III sobre el intervalo de dosis (tabla 12). El tipo de lesión observada era consistente con las observaciones hechas para el compuesto II. La gravedad y la incidencia de los hallazgos nasales demostraron que el compuesto I tenía un perfil de toxicidad nasal superior al del compuesto III.

Tabla 12: Incidencia y gravedad de atrofia epitelial olfatoria tras instilación nasal del compuesto III o compuesto I en ratas

Dosis (mg)	5		15		35	
Dosis, (mg/cm ²) ⁽¹⁾	0,357		1,07		2,50	
Gravedad	Compuesto III	Compuesto I	Compuesto III	Compuesto I	Compuesto III	Compuesto I
Ninguna	1	8	1	1	3	4
Mínima	6	1	0	6	0	3
Leve	2	0	2	2	2	2
Moderada	0	0	6	0	3	0
Pronunciada	0	0	0	0	1	0

¹El área de superficie de mucosa nasal total estimada de la rata es de 14 cm²

Compuesto I y compuesto II: Estudio de irritación intranasal exploratorio de una semana en ratas. También se compararon directamente el compuesto I y el compuesto II para determinar la irritación intranasal. Se infundieron intranasalmente a ratas macho (6/grupo) soluciones de compuesto I o compuesto II (75 o 175 mg/l) en ácido succínico 225 mM, dextrosa anhidra al 1,25 %, pH 5,8-6,2) una vez diariamente en un volumen de dosis 12,5, 25 o 100 µl/fosa nasal. El único punto final evaluado en este estudio fue la evaluación histológica de los turbinados nasales.

La atrofia epitelial olfatoria provocada por el compuesto I era claramente menos grave que la producida por el compuesto II en cada dosis (volumen x concentración) evaluada (tabla 13).

Tabla 13: Toxicidad epitelial olfatoria, valores de gravedad para el compuesto I y el compuesto II.

Compuesto	volumen/fosa nasal	12,5 µl		25 µl		100 µl	
		75	175	75	175	75	175
	mg/ml						
	(mg/rata/día)	1,875	4,375	3,75	8,75	15	35
	mg/cm ² (¹)	0,134	0,313	0,268	0,625	1,071	2,500
Compuesto I	Ninguno	5	5	2	4		
	Mínima			3	1		
	Ligera					5	1
	Leve						4
Compuesto II	Ninguna	3	3	2	1		
	Mínima		1	2	3		
	Ligera	1		1	1	4	
	Leve	1	1			1	2
	Moderada						3

Se evaluó la gravedad de las lesiones en una escala de 1 a 5. Los valores corresponden al número de animales que mostraron cada grado de gravedad. Los valores incluyen atrofia epitelial olfatoria, exudato y necrosis monocelular. Se valoró separadamente cada tipo de daño y el valor más grave se muestra en el presente documento. No se produjeron lesiones en los animales dosificados con vehículo. n=5 animales por grupo. No se obtuvieron datos de exposición en este estudio de irritación comparativo.

¹El área de superficie de mucosa nasal total estimada de la rata es de 14 cm²

La relación de dosis-respuesta del compuesto II fue consistente con lo observado en otros estudios. Tanto el incremento de volumen como el incremento de concentración contribuyeron a una toxicidad nasal más significativa pero la concentración es probablemente el factor más importante.

En resumen, el compuesto I demostró superioridad con respecto al compuesto II, con respecto a la irritación nasal.

Potencial de suministro nasal. La ruta de administración intranasal (IN) para antagonistas de CGRP es atractiva ya que permite un suministro no invasivo con el potencial para un rápido comienzo de acción. La barrera epitelial nasal altamente permeable, el tejido de mucosa bien perfundido y el tiempo de residencia de tejido/capacidad metabólica limitada son características potencialmente útiles que apoyan el suministro intranasal de un compuesto como el compuesto I que muestra una absorción oral pobre.

Se evaluó la viabilidad del suministro nasal en el modelo de conejo IN comparando los perfiles de concentración-tiempo en plasma y parámetros farmacocinéticos (C_{max} , T_{max} , ABC y biocapacidad) para el compuesto I suministrado por vía nasal con el suministrado mediante la ruta IV. La concentración de la solución de dosificación y el volumen de suministro están incluidos en las tablas de datos para cada estudio. Se describen composiciones de vehículo en las notas al pie a continuación de la tabla.

Procedimientos. Grupos de tres conejos New Zealand White machos, que varían en peso de 3-3,5 kg, recibieron una dosis única de fármaco en uno de los tratamientos siguientes: 0,5 mg/kg de inyección IV en bolo durante 30 segundos, o 0,3-3 mg/kg administrados IN con un micropulverizador tipo jeringuilla. Antes de la dosificación IN, se sedaron ligeramente los conejos para operar con el anestésico inhalante, Sevoflurano. Los conejos recuperaron el conocimiento en 2-5 min. Se recogieron muestras de sangre en serie en tubos vacutainer que contenían heparina a dosis previa, 2, 5, 10, 15, 30 min y 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la dosis. Se centrifugaron inmediatamente las muestras de sangre a 4 °C y se almacenó el plasma separado a -80 °C hasta realizar un análisis adicional mediante el ensayo LC/EM/EM.

Resultados. El perfil farmacocinético indica que el compuesto I se absorbe rápidamente a partir de la cavidad nasal de los conejos cuando se pulverizó como una solución. El tiempo para alcanzar concentraciones pico (T_{max}) se produce dentro de 0,2-0,3 h (15-20 min) para todas las dosis estudiadas. La biocapacidad absoluta a 0,3, 1 y 3 mg/kg variaba desde el 13 hasta el 30 % y la C_{max} variaba desde 0,12 hasta 2,0 μM (tabla 14).

Tabla 14: Parámetros farmacocinéticos para el compuesto I en el conejo después de administración IV e IN.

Parámetro	IV (n=3, promedio \pm DE)	IN (dosis baja) (n=3, promedio \pm DE)	IN (dosis media) (n=3, promedio \pm DE)	IN (dosis alta) (n=3, promedio \pm DE)
Dosis (mg/kg)	0,5	0,3	1,0	3,0
Volumen de dosificación (μl)		100 (50/fosa nasal)	100 (50/fosa nasal)	100 (50/fosa nasal)
Concentración de dosificación (mg/ml)	5	10	30	100
C_{max} (μM)	13,7 \pm 1,8	0,12 \pm 0,69	0,55 \pm 0,26	2,03 \pm 1,0
T_{max} (h)		0,25	0,25	0,33
ABC_{tot} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	1,8 \pm 0,58	0,14 \pm 0,07	0,69 \pm 0,33	3,27 \pm 1,17
Cl (ml/min/kg)	7,9 \pm 3,0	-	-	-
V_{ss} (l/kg)	0,16 \pm 0,01	-	-	-
$T_{1/2}$ (h)	1,3 \pm 0,26	-	-	-
MRT (h)	0,38 \pm 0,15	-	-	-
Biodisponibilidad (F %)	-	12,5 \pm 6,56	18,8 \pm 8,96	30,2 \pm 10,82
Formulación IV: 50 mM de tampón succinato/vehículo D5W, pH 5. Formulación IN: 50 mM de tampón succinato, pH 5.				

La absorción IN del compuesto I en el conejo fue muy rápida. Se midieron niveles plasmáticos >10 nM a los 5 min. Se detectó el fármaco en plasma durante al menos 6 h después de la dosis y hasta 24 h en la dosis alta.

Previamente, con el compuesto II se produjo mayor desviación de la linealidad cuando se cambió el volumen de suministro intranasal que cuando se cambió la concentración de dosificación. Manteniendo constante el volumen de suministro del compuesto I y variando la concentración de solución de dosificación, la ABC IN y la C_{max} mostraron una tendencia hacia la linealidad dependiente de la dosis (tabla 15). La variabilidad en estos parámetros también se incrementó con la dosis. En un examen más detallado, parecía que la biodisponibilidad IN se incrementó con la dosis (o concentración de dosificación) para las tres dosis probadas (tabla 15).

Tabla 15: Linealidad de dosis del compuesto I IN en conejos

Dosis (mg/kg) (n=3, promedio \pm DE)	C_{max} (μM)	ABC_{tot} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)
0,3	0,12 \pm 0,07	0,14 \pm 0,07
1,0	0,55 \pm 0,26	0,69 \pm 0,33

3,0	2,03 ± 1,0	3,27 ± 1,17
Línea de tendencia R ²	0,99	0,99
Las concentraciones de dosificación fueron 10, 30 y 100 mg/ml en 50 mM de vehículo de tampón succinato, pH 5.		

En resumen, la ruta de administración intranasal para el compuesto I proporciona una absorción sistémica rápida u niveles de plasma relativamente prolongados comparado con la ruta oral. La solubilidad acuosa alta y la estabilidad de solución mejorada apoyan la viabilidad de un producto de vaporización nasal en un dispositivo de vaporización apropiado. Se espera que el suministro de solución de fármaco y su depósito en la cavidad nasal sean más sólidos y reproducibles de lo posible con modelos de animal IN preclínicos. Está previsto que las formulaciones del compuesto I se suministren en dispositivos de pulverización nasas de dosis unitaria desechable o de dosis múltiple reutilizable.

Composiciones farmacéuticas y Procedimientos de tratamiento

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el compuesto I con un coadyuvante, vehículo, o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El compuesto I se proporcionará generalmente como una composición farmacéutica que consta de una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto I, o una sal farmacéuticamente aceptable, y un vehículo farmacéuticamente aceptable y puede contener excipientes convencionales. Una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad necesaria para dar un beneficio al paciente significativo tal como de determina por los médicos en esa técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son los conocidos convencionalmente que presentan perfiles de seguridad aceptables. Las composiciones abarcan todas las formas sólidas y líquidas comunes incluyendo cápsulas, comprimidos, pastillas, y polvos así como suspensiones líquidas, jarabes, elixires y soluciones. Las composiciones sólidas se pueden formar en formulaciones de liberación cronometradas o mantenidas. Las composiciones se preparan usando técnicas de formulación comunes y excipientes convencionales (tales como agentes de unión y agentes humectantes) y vehículos (tales como agua y alcoholes).

Las composiciones sólidas se formulan normalmente en unidades de dosificación que proporcionan desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 mg del ingrediente activo por dosis. Algunos ejemplos de unidades de dosificación sólidas son 0,1 mg, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 500 mg, y 1000 mg. Generalmente, las composiciones líquidas están en un intervalo de dosificación unitario de 1-100 mg/ml. Algunos ejemplos de unidades de dosificación líquidas son 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, y 100 mg/ml.

La invención comprende todos los modos convencionales de administración incluyendo procedimientos orales, parenterales, intranasales, sublinguales, y transdérmicos. Normalmente, la dosificación diaria será de 0,01-100 mg/kg de peso corporal diariamente. Generalmente, se requiere más compuesto oralmente y menos parenteralmente. El régimen de dosificación específica, sin embargo, se determinaría por un médico usando juicio médico sólido.

Otro aspecto de esta invención es la administración intranasal.

Los inhibidores a nivel del receptor de CGRP se postulan para ser útiles en afecciones patofisiológicas donde se ha producido una activación del receptor de CGRP excesiva. Algunas de éstas incluyen vasodilatación neurógena, inflamación neurógena, migraña, cefaleas en racimo y otras cefaleas, daño térmico, choque circulatorio, sofocos de la menopausia y asma. La activación del receptor de CGRP se ha implicado en la patogénesis de la migraña (Edvinsson L. CNS Drugs 2001;15(10):0,745-53; Williamson, D. J. Microsc. Res. Tech. 2001, 53, 167-178.; Grant, A. D. Brit. J. Pharmacol. 2002, 135, 356-362.). Los niveles de suero de CGRP son elevados durante la migraña (Goadsby P. J. y col. Ann Neurol 1990; 28: 183-7) y el tratamiento con fármacos contra la migraña devuelve los niveles de CGRP a normales coincidentes con el alivio de la cefalea (Gallai V. y col. Cephalalgia 1995, 15, 384-90). Los migrañosos presentan niveles de CGRP basales elevados comparados con los controles (Ashina M, y col., Pain 2000, 86(1-2):133-8). La infusión de CGRP intravenosa produce cefalea duradera en migrañosos (Lassen LH, y col. Cephalalgia. 2002, 22(1), 54-61). Estudios preclínicos en ratas y perros comunican que el bloqueo de CGRP sistémico con el antagonista peptídico CGRP(8-37) no altera las hemodinámicas sistémicas en reposo ni el flujo sanguíneo regional (Shen, Y-T. y col., J Pharmacol Exp Ther 2001, 298, 551-8). Así, los antagonistas del receptor CGRP pueden presentar un tratamiento novedoso para migraña que evita las desventajas cardiovasculares de vasoconstricción activa asociada a agonistas no selectivos de 5-HT_{1B/1D}, "triptanos" (por ejemplo, sumatriptano).

El compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo también es útil en un procedimiento de inhibición del receptor de CGRP que comprende poner en contacto el receptor CGRP con un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto de la invención también es útil en un procedimiento para tratar afecciones asociadas a niveles aberrantes de la señalización de CGRP o del receptor de CGRP que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I a un paciente.

Otro aspecto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula I en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de afecciones relacionadas con niveles aberrantes de la señalización de CGRP o del receptor de CGRP.

5 Otro aspecto de la invención es el compuesto de fórmula I para su uso en un procedimiento de tratamiento de la migraña.

Otro aspecto de la invención es el compuesto de fórmula I para su uso en un procedimiento de tratamiento de dolor neuropático.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto de fórmula I para su uso en un procedimiento de tratamiento de inflamación (particularmente inflamación neurógena), dolor, daño término, choque circulatorio, diabetes, síndrome de Reynaud, insuficiencia arterial periférica, hemorragia subaracnoidea/craneal, crecimiento tumoral y sofoco asociado a menopausia. El tratamiento se puede llevar a cabo por el antagonismo del receptor de CGRP mediante la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I tal como se define en el presente documento.

El compuesto de fórmula I también es útil en procedimientos seleccionados del grupo constituido por (a) regulación inmune en mucosa del intestino (b) efecto protector contra daño anafiláctico cardiaco (c) estimular o evitar interleucina-1b (estimulación de IL-1b) de resorción ósea (d) modular expresión de receptores de NK1 en neuronas espinales y (e) enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica incluyendo asma. Véase (a) Calcitonin Receptor-Like Receptor Is Expressed on Gastrointestinal Immune Cells. Hagner, Stefanie; Knauer, Jens; Haberberger, Rainer; Goeke, Burkhard; Voigt, Karlheinz; McGregor, Gerard Patrick. Institute of Physiology, Philipps University, Marburg, Alemania. *Digestion* (2002), 66(4), 197-203; (b) Protective effects of calcitonin gene-related peptide-mediated evodiamine on guinea-pig cardiac anaphylaxis. Rang, Wei-Qing; Du, Yan-Hua; Hu, Chang-Ping; Ye, Feng; Tan, Gui-Shan; Deng, Han-Wu; Li, Yuan-Jian. School of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacology, Central South University, Xiang-Ya Road 88, Changsha, Hunan, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2003), 367(3), 306-311; (c) The experimental study on the effect calcitonin gene-related peptide on bone resorption mediated by interleukin-1. Lian, Kai; Du, Jingyuan; Rao, Zhenyu; Luo, Huaican. Department of Orthopedics, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Peop. Rep. China. *Journal of Tongji Medical University* (2001), 21(4), 304-307, (d) Calcitonin gene-related Peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons. Seybold VS, McCarson KE, Mermelstein PG, Groth RD, Abrahams LG. *J. Neurosci.* 2003 23 (5): 1816-1824. Department of Neuroscience, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455, and Department of Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas 66160 (e) Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. Aoki-Nagase, Tomoko; Nagase, Takahide; Oh-Hashi, Yoshio; Shindo, Takayuki; Kurihara, Yukiko; Yamaguchi, Yasuhiro; Yamamoto, Hiroshi; Tomita, Tetsuji; Ohga, Eijiro; Nagai, Ryozo; Kurihara, Hiroki; Ouchi, Yasuyoshi. Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan. *American Journal of Physiology* (2002), 283(5,Pt. 1), L963-L970; (f) Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. Springer, Jochen; Geppetti, Pierangelo; Fischer, Axel; Groneberg, David A. Charite Campus-Virchow, Department of Pediatric Pneumology and Immunology, Division of Allergy Research, Humboldt-University Berlin, Berlin, Alemania. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (2003), 16(3), 121-130; and (g) Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. Helyes, Zsuzsanna; Pinter, Erika; Nemeth, Jozsef; Szolcsanyi, Janos. Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Pecs, Pecs, Hung. *Current Medicinal Chemistry: Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* (2003), 2(2), 191-218.

Otro aspecto de esta invención se refiere al compuesto de fórmula I para su uso en un procedimiento de tratamiento para el cáncer de mama o glioma o enfermedades proliferativas. También se ha sugerido que los antagonistas de CGRP muestran utilidad en el tratamiento de enfermedad maligna, particularmente frente a gliomas y cáncer de mama que metastatiza al cerebro. Los antagonistas de CGRP pueden ser especialmente útiles frente a tumores hipóxicos y en la prevención de implantación metastática. Véase la publicación de aplicación PCT WO201006168.

El compuesto de fórmula I también es útil en un procedimiento de tratamiento usando combinaciones de compuestos de fórmula I con uno o más agentes seleccionados del grupo constituido por inhibidores de COX-2, NSAIDS, aspirina, acetaminofeno, triptanos, ergotamina y cafeína para el tratamiento de migraña.

"Migraña", "cefalea" y términos relacionados son tal como se entienden por los practicantes de la medicina. La migraña comprende todas las clases de migraña incluyendo común, clásica, en racimo, fulgurante, hemipléjica, oftalmopléjica, y oftálmica.

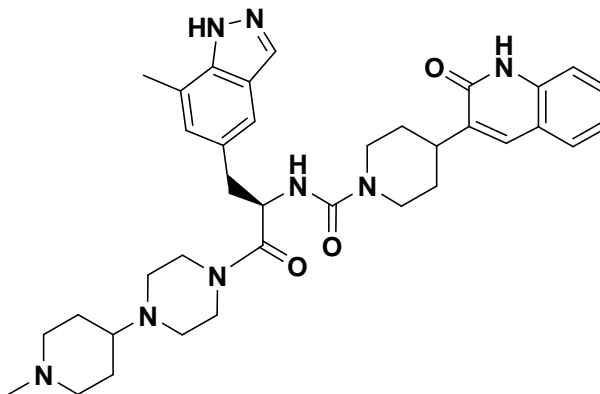
"Terapéuticamente efectiva" quiere decir que hay un beneficio del paciente significativo como se entiende por los practicantes de la medicina.

"Paciente" quiere decir una persona que puede beneficiarse del tratamiento como se determina por practicantes de la medicina.

REIVINDICACIONES

1. El compuesto (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-oxopropan-2-il)-4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5



2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-oxopropan-2-il)-4-(2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)piperidina-1-carboxamida en asociación a un adyuvante, un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.

10

3. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un procedimiento para tratar la inflamación, el dolor, la lesión térmica, el choque circulatorio, la diabetes, el síndrome de Reynaud, la insuficiencia arterial periférica, la hemorragia subaracnoidea/craneal, el crecimiento tumoral y el sofoco asociado a menopausia.

15

4. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento para tratar la migraña.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento para tratar el dolor neuropático.

20

6. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad proliferativa.

25

7. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad proliferativa es cáncer de mama o glioma.