

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 752**

51 Int. Cl.:

C07D 453/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 11194161 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2465501**

54 Título: **Método para la preparación de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2- carboxamida**

30 Prioridad:

02.08.2007 US 953610 P
02.08.2007 US 953613 P
02.08.2007 US 953614 P
12.09.2007 US 971654 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2017

73 Titular/es:

ATTENUA, INC. (100.0%)
250 West 50th St., Suite 17H
New York, NY 10019, US

72 Inventor/es:

DULL, GARY MAURICE;
GENUS, JOHN y
MATHEW, JACOB

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 606 752 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

Método para la preparación de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2- carboxamida

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para la fabricación de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida.

Antecedentes de la invención

10 Los receptores nicotínicos neuronales (NNR) característicos del sistema nervioso central (SNC) han mostrado ocurrir en varios subtipos, los más comunes de los cuales son los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$. Véase, por ejemplo, Schmitt, *Current Med. Chem.* 7: 749 (2000). Los ligandos que interactúan con el subtipo NNR $\alpha 7$ se han propuesto como útiles en el tratamiento de una variedad de afecciones y trastornos. Véase Mazurov et al., *Curr. Med. Chem.* 13: 1567-1584 (2006) y las referencias en él con respecto a la comprensión de fondo del subtipo neuronal de receptor nicotínico $\alpha 7$. Destacados entre esas afecciones y trastornos están el deterioro cognitivo, la esquizofrenia, la inflamación, la angiogénesis, el dolor neuropático, y la fibromialgia.

15 Hay un número reducido de NNR del hipocampo en el tejido cerebral postmortem de pacientes esquizofrénicos. Además, existe un mejor efecto psicológico en pacientes con esquizofrenia fumadores en comparación con los no fumadores. La nicotina mejora los déficits de sincronización sensorial en animales y esquizofrénicos. El bloqueo del subtipo NNR $\alpha 7$ induce un déficit de sincronización similar al observado en la esquizofrenia. Véase, por ejemplo, Leonard et al, *Schizophrenia Bulletin* 22 (3): 431 (1996). Estudios bioquímicos, moleculares y genéticos del proceso sensorial, en pacientes con déficit de sincronización potencial P50 evocado auditivamente sugieren que el subtipo NNR $\alpha 7$ puede funcionar en una vía neuronal inhibitoria. Véase, por ejemplo, Freedman et al., *Biological Psychiatry* 38 (1): 22 (1995).

20 Más recientemente, se ha propuesto que los NNR $\alpha 7$ son mediadores de la angiogénesis, como se describe por Heeschen et al., *J. Clin. Invest.* 100: 527 (2002). En estos estudios, se demostró que la inhibición del subtipo $\alpha 7$ disminuye la angiogénesis inflamatoria. También, los NNR $\alpha 7$ se han propuesto como objetivos para el control del crecimiento tumoral y la neurogénesis (Utsugisawa et al, *Molecular Brain Research* 106 (1-2): 88 (2002) y la solicitud de patente US 2002/0016371). Por último, el papel del subtipo $\alpha 7$ en la cognición (Levin y Rezvani, *Current drug targets: CNS and Neurological disorders* 1(4): 423 (2002)), neuroprotección (O'Neill et al, *Current drug targets: CNS and Neurological disorders* 1 (4): 399 (2002) y Jeyarasasingam et al., *Neuroscience* 109(2):275 (2002)) y el dolor neuropático (Xiao et al, *Proc Nat Acad Sci (EE.UU.)*, 99(12): 8360 (2002)) ha sido reconocido recientemente.

30 Se ha informado que varios compuestos interactúan con el NNR $\alpha 7$ y se han propuesto como terapias sobre esa base. Véase, por ejemplo, PCT WO 99/62505, PCT WO 99/03859, PCT WO 97/30998, PCT WO 01/36417, PCT WO 02/15662, PCT WO 02/16355, PCT WO 02/16356, PCT WO 02/16357, PCT WO 02/16358, PCT WO 02/17358, Stevens et al., *Psychopharm.* 136: 320 (1998), Dolle et al, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 44: 785 (2001) y Macor et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:319 (2001) y las referencias incluidas, con respecto a la enseñanza de antecedentes del NNR $\alpha 7$ y a las terapias propuestas. Entre estos compuestos, un tema estructural común es el de la amina bicíclica terciaria sustituida (por ejemplo, quinuclidina). También se ha informado que similares compuestos sustituidos de quinuclidina se unen a receptores muscarínicos. Véase, por ejemplo, las Patentes US 5.712.270 de Sabb y PCTs WO 02/00652 y WO 02/051841 con respecto a tales compuestos.

40 Una limitación de algunos compuestos nicotínicos es que están asociados con varios efectos secundarios indeseables, por ejemplo, estimulando músculos y receptores ganglionares. Sigue existiendo una necesidad de compuestos, composiciones, y métodos para prevenir o tratar varias afecciones o trastornos, tales como trastornos del SNC, incluyendo el alivio de síntomas de estos trastornos, donde los compuestos exhiben farmacología nicotínica con un efecto beneficioso, en concreto sobre el funcionamiento del SNC, pero sin significativos efectos secundarios asociados. Hay una necesidad de compuestos, composiciones, y métodos que afecten al funcionamiento del SNC sin afectar significativamente a los subtipos de receptores nicotínicos que tienen potencial para inducir efectos secundarios indeseables, tales como una actividad apreciable en lugares de músculo esquelético y cardiovascular. La presente invención proporciona tales compuestos, composiciones y métodos.

Resumen de la invención

50 Un aspecto de la presente descripción es (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Otro aspecto es (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2 oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, en forma sustancialmente pura, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un aspecto adicional es (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2 oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, sustancialmente libre de isómeros (2S,3S), (2R,3S) o (2R,3R), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, otro aspecto es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida estereoisomericamente enriquecido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 El exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 90% o mayor. El exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 95% o mayor. El exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 98% o mayor. El exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 99% o mayor. El exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 99,5% o mayor.

10 Otro aspecto de la presente descripción es una sal ácida de (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, en la que el ácido se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido maleico, ácido p-toluenosulfónico, ácido galactárico (múxico), ácido D-mandélico, ácido D-tartárico, ácido metanosulfónico, ácidos R- y S-10-camforsulfónico, ácido cetoglutárico, o ácido hipúrico.

La estequiometría de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida al ácido puede ser 2:1, 1:1, o 1:2.

La estequiometría puede ser 1:1.

15 También se describe en la presente memoria un clorhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o uno de sus hidratos o solvatos, incluyendo hidratos o solvatos parciales. Una descripción adicional es monoclorhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o un hidrato o solvato del mismo, incluyendo hidratos o solvatos parciales.

La presente invención proporciona unas síntesis escalable de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y nuevos intermedios.

20 Breve descripción de las Figuras

Figuras 1A1-1A4 ilustran respuestas de receptores $\alpha 7$ de rata expresados en células de mamífero GH4C1 a (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida; el racemato, concretamente una mezcla de (2S,3R), (2R,3S), (2R,3R) y (2S,3S); los estereoisómeros individuales, y acetilcolina (ACh).

25 La Figura 1B ilustra una comparación de las respuestas de receptores funcionales de rata $\alpha 7$ expresados en células de mamíferos GH4C1 a (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida; el racemato, concretamente una mezcla de (2S,3R), (2R,3S), (2R,3R) y (2S,3S), y los estereoisómeros individuales dentro del rango efectivo de concentración de plasma.

La Figura 2A ilustra respuestas de receptores humanos $\alpha 7$ expresados en ovocitos de Xenopus a (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida.

30 La Figura 2B ilustra respuestas de control de receptores humanos $\alpha 7$ después de la aplicación del compuesto en las concentraciones indicadas. Los datos se normalizaron a las respuestas de carga neta de control 300 μ M ACh obtenidas 5 min antes de las respuestas experimentales evocadas por agonistas. Cada punto representa el promedio \pm EEM de las respuestas normalizadas de al menos 4 oocitos.

35 La Figura 3 ilustra una evaluación de los efectos cognitivos en un paradigma de reconocimiento de objetos (OR), que demuestra que (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida tiene efectos positivos a 0,3 y 1 mg/kg administrados i.p., * $p < 0,5$.

La figura 4 ilustra una evaluación de los efectos cognitivos en un paradigma OR, que demuestra que (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida administrada por vía oral tiene efectos positivos en un amplio rango de dosis (0,3 - 10 mg/kg), * $p < 0,5$.

40 La Figura 5 ilustra los efectos de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida administrada i.p. en la prevención de déficits cognitivos inducidos por MK-801, también conocido como dizocilpina, un antagonista comercialmente disponible no competitivo del receptor NMDA, en la tarea OR.

45 La figura 6 muestra que un tiempo medio de permanencia en el objeto A contra el objeto B, en la tarea OR, en el grupo tratado a 30 min, a 6 h, o 24h después del ensayo de administración subaguda final (oral) no fue significativamente diferente ($p = 0,17$; $p = 0,35$ y $p = 0,12$, respectivamente). Alternativamente, en 30 min, 2 h, 6 h, y 18 h después de la administración sub-aguda final de 0,3 mg/kg de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil) metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ilo)benzofuran-2-carboxamida, los sujetos gastan significativamente ($P < 0,05$) más tiempo investigando el objeto B (nuevo) que un objeto A (familiar). Por otra parte, a las 2 horas (75%) y 6 h (71%) el índice de reconocimiento se mejoró significativamente en los animales tratados con 0,3 mg/kg de (2S,3R)-N-(2-((3 - piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida en comparación con el índice de reconocimiento (54%) del grupo tratado con vehículo a los 30 minutos después de la administración final.

50

- La Figura 7 ilustra una evaluación de los efectos cognitivos en un paradigma de laberinto de brazos radiales (RAM). Se administraron p.o. (0,1, 0,3 y 1,0 mg/kg) de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida 30 minutos antes de la sesión diaria. Se evidencia una mejora en el rendimiento en la tarea en el grupo tratado con 0,3 mg/kg de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida durante la segunda semana de administración.
- La Figura 8 ilustra un estudio de efectos antipsicóticos, medidos como el comportamiento de hiperactividad inducido por sobreestimulación de dopamina, mostrando que (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (0,3 y 1,0 mg/kg; s.c.) atenúa la hiperactividad locomotora inducida por la apomorfina (1,0 mg/kg) después de la administración subcutánea en ratas.
- La Figura 9 ilustra una evaluación antipsicótica, la inhibición del prepulso, indicando que los déficits inducidos por apomorfina se invierten con el pretratamiento de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida tras administración subcutánea.
- La Figura 10A ilustra los resultados del análisis cristalográfico de rayos X de monoclóhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, constituyendo la estereoquímica absoluta de este material. El compuesto representado es la sal de clorhidrato parcialmente hidratada, como se muestra con el anión de cloruro totalmente ordenada y molécula de agua parcialmente ocupada en la unidad asimétrica.
- La Figura 10B ilustra los resultados del análisis cristalográfico de rayos X de monoclóhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, constituyendo la estereoquímica absoluta de este material, representado con un esquema de numeración para referencia. La vista mira hacia abajo del eje cristalográfico *b* de la celda unitaria. Los enlaces de hidrógeno inter-molecular se muestran como líneas discontinuas.
- La Figura 11A ilustra los resultados del análisis cristalográfico de rayos X de p-clorobenzoato de (2R,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, constituyendo de la estereoquímica absoluta de este material.
- La Figura 11B ilustra los resultados del análisis cristalográfico de rayos X de p-clorobenzoato de (2R,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, constituyendo la estereoquímica absoluta de este material, representado con un esquema de numeración para referencia.
- La Figura 12 ilustra un cromatograma completo caracterizando cuatro estereoisómeros de N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, donde el 2S,3R muestran un pico a un tiempo de retención de 5,3 minutos, el 2R,3S muestra un pico a un tiempo de retención de 7,3 minutos, el 2R,3R muestra un pico a un tiempo de retención de 8,2 minutos, y 2S,3S muestra un tiempo de retención de 12,4 minutos. Como se describe aquí, la fase móvil requiere un análisis para proporcionar una resolución adecuada, resultando en una composición de 60:40:0,2 hexanos: etanol: di-nbutilamina a 1,0 ml/min, con una temperatura de columna de 20°C, y detección UV a 270 nm.
- La Figura 13 es un XRPD de monoclóhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida ilustrando ambos patrones observados (más claro) y calculada (más oscuro). Ambos patrones están de acuerdo con respecto a 2θ valores y las diferencia menores en intensidades y anchos de pico pueden atribuirse a la resolución del instrumento y a efectos de orientación preferida. Como se describe aquí, otras diferencias menores pueden atribuirse a un cambio de temperatura debido a que los datos observados se recogen a temperatura ambiente y los datos calculados a partir de una estructura a 120K.
- La Figura 14 es un XRPD de monosilato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida.

Descripción detallada de la invención

Un compuesto específico (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida con afinidad (valor $K_i \leq 1$ nM) y selectivo para el subtipo NNR $\alpha 7$ demuestra eficacia en modelos animales de cognición (mejora cognitiva) y psicosis (efectos antipsicóticos).

Se describe en esta memoria descriptiva (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro aspecto es (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, en forma sustancialmente pura, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un aspecto adicional es (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, sustancialmente libre de isómeros (2S,3S), (2R,3S) o (2R,3R), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, otro aspecto es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida estereoisoméricamente enriquecido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 90% o mayor. El exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 95% o mayor.

El exceso enantiomérico y/o diastereomérico puede ser 98% o mayor. El exceso enantiomérico y/o diastereomérico puede ser 99% o mayor. El exceso enantiomérico y/o diastereomérico puede ser 99,5% o mayor.

Otro aspecto de la presente descripción es una sal ácida de (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, en la que el ácido se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido maleico, ácido p-toluenosulfónico, ácido galactárico (múcido), ácido D-mandélico, ácido D-tartárico, ácido metanosulfónico, ácidos R-y S-10-canforsulfónicos, ácido cetoglutarico, o ácido hipúrico. En un aspecto, la estequiometría de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida al ácido es 2:1, 1:1, o 1:2. En un aspecto, la estequiometría es 1:1. Una realización de la presente invención es clorhidrato de (2S,3R) N-(2-((3-piridinil)metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o uno de sus hidratos o solvatos, incluyendo hidratos o solvatos parciales. También se describe en esta memoria descriptiva monoclóhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o un hidrato o solvato del mismo, incluyendo hidratos o solvatos parciales.

También se describe en la presente memoria descriptiva (2S,3R)-(2-((3-piridinil)metil)-3-amino-1-azabicyclo[2.2.2]octano.

También se describe en la presente memoria descriptiva una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

También se describe en la presente memoria descriptiva un método para tratar o prevenir un trastorno del sistema nervioso central, inflamación, dolor o neovascularización que comprende administrar un compuesto de la presente invención. En un aspecto de la descripción, el trastorno del sistema nervioso central se caracteriza por una alteración en la liberación normal del neurotransmisor. En un aspecto, el trastorno del sistema nervioso central se selecciona entre deterioro cognitivo leve, deterioro de memoria asociado a la edad, demencia pre-senil, aparición precoz de enfermedad de Alzheimer, demencia senil, demencia tipo Alzheimer, enfermedad de Alzheimer, demencia de cuerpos de Lewy, demencia por micro infarto, demencia relacionada con SIDA, demencia de VIH, infartos cerebrales múltiples, Parkinsonismo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, Corea de Huntington, discinesia tardía, hiperquinesia, manía, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, ansiedad, depresión, dislexia, esquizofrenia, disfunción cognitiva en la esquizofrenia, depresión, trastornos obsesivo-compulsivos o síndrome de Tourette. En un aspecto, el trastorno del sistema nervioso central se selecciona de Enfermedad de Alzheimer, manía, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, ansiedad, dislexia, esquizofrenia, disfunción cognitiva en esquizofrenia, depresión, trastornos obsesivo-compulsivos, o síndrome de Tourette.

Otro aspecto de la presente descripción incluye el uso de un compuesto de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno del sistema nervioso central, inflamación, dolor o neovascularización. En un aspecto, el trastorno del sistema nervioso central se caracteriza por una alteración en la liberación normal del neurotransmisor. En una realización, el trastorno del sistema nervioso central se selecciona entre deterioro cognitivo leve, deterioro de memoria asociado a la edad, demencia pre-senil, aparición precoz de enfermedad de Alzheimer, demencia senil, demencia tipo Alzheimer, enfermedad de Alzheimer, demencia de cuerpos de Lewy, demencia por micro infarto, demencia relacionada con SIDA, demencia de VIH, infartos cerebrales múltiples, Parkinsonismo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, Corea de Huntington, discinesia tardía, hiperquinesia, manía, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, ansiedad, depresión, dislexia, esquizofrenia, disfunción cognitiva en la esquizofrenia, depresión, trastornos obsesivo-compulsivos o síndrome de Tourette. En un aspecto, el trastorno del sistema nervioso central se selecciona de Enfermedad de Alzheimer, manía, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, ansiedad, dislexia, esquizofrenia, disfunción cognitiva en esquizofrenia, depresión, trastornos obsesivo-compulsivos, o síndrome de Tourette.

Otro aspecto de la presente descripción es un compuesto de la presente invención para el uso en el tratamiento o prevención de un trastorno del sistema nervioso central, inflamación, dolor, o neovascularización. En un aspecto, el trastorno del sistema nervioso central se caracteriza por una alteración en la liberación normal de neurotransmisores. En un aspecto, el trastorno del sistema nervioso central se selecciona entre deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado a la edad, demencia pre-senil, aparición temprana de enfermedad de Alzheimer, demencia senil, demencia tipo Alzheimer, enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, demencia por micro infarto, demencia relacionada con SIDA, demencia de VIH, múltiples infartos cerebrales, Parkinsonismo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, Corea de Huntington, discinesia tardía, hiperquinesia, manía, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, ansiedad, depresión, dislexia, esquizofrenia, disfunción cognitiva en la esquizofrenia, depresión, obsesivo-compulsivo trastornos, o el síndrome de Tourette. En un aspecto, el trastorno del sistema nervioso central se selecciona de la enfermedad de Alzheimer, manía, trastorno de déficit de atención, déficit de atención con hiperactividad, ansiedad, dislexia, esquizofrenia, disfunción cognitiva en la esquizofrenia, depresión, trastornos obsesivo-compulsivos, o el síndrome de Tourette.

En los métodos y usos anteriormente mencionados la dosis efectiva puede ser entre aproximadamente 1 mg y 10 mg por cada periodo de 24 horas.

La presente invención proporciona un método para la fabricación de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo mediante resolución dinámica secuencial y aminación reductora estereoselectiva de (2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ona.

La presente invención también proporciona un método para fabricar (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende el intermedio de sal (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona di-p-toluoil-D- tartrato. Dichos métodos de fabricación no pueden implicar el uso de purificación cromatográfica.

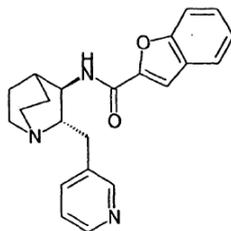
La presente invención proporciona sal (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona di-p-toluoil-D- tartrato.

El desarrollo comercial de los fármacos candidatos implica muchas etapas, incluyendo la ampliación de la síntesis y la purificación química, la búsqueda de formas óptimas de sal y similares. En la formulación de composiciones de fármacos, la sustancia del fármaco está preferiblemente en una forma en la que se puede manipular y procesar convenientemente. Las consideraciones incluyen la viabilidad comercial así como la constancia en fabricación. Además, en la fabricación de composiciones de fármacos, es importante que se proporcione un perfil farmacológico de concentración de plasma fiable, reproducible y constante después de la administración a un paciente.

La estabilidad química, estabilidad en estado sólido, y la "vida útil" de los ingredientes activos son también factores muy importantes. La sustancia farmacéutica, y las composiciones que la contienen, preferiblemente deben ser capaces de almacenarse eficazmente durante periodos de tiempo apreciables, sin mostrar ningún cambio significativo en las características fisicoquímicas del componente activo (por ejemplo, su composición química, densidad, higroscopicidad y solubilidad). Por otra parte, también es importante poder proporcionar un fármaco en una forma que sea tan químicamente pura como sea posible. Estas características de la invención se discuten en más detalle a continuación.

I. Compuestos

El compuesto de la presente invención es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, representado como Compuesto A a continuación, o formas de sal farmacéuticamente aceptables del Compuesto A.



COMPUESTO A

El compuesto racémico N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, una síntesis, y la utilidad en el tratamiento médico, se describe en la patente US 6.953.855 de Mazurov et al.

N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida racémico es un ligando de alta afinidad para el subtipo de receptor nicotínico $\alpha 7$ (NNR). N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida racémico contiene dos átomos de carbono sustituidos asimétricamente. Así, N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida racémico se produce en cuatro formas estereoisoméricas, concretamente (S,S), (S,R), (R,R) y (R,S). El (S,R), concretamente (2S,3R), es el Compuesto A.

Se describen métodos de preparación en la patente de EE.UU 6.953.855, en WO2004/076449 y en Bioorg. & Med. Chem. Letters 15:2073-2077 (2005).

Anteriormente, se creyó que las formas estereoisómeras predominantes producidas en la síntesis relatada, incluyendo la patente US 6.953.855, estaban caracterizadas por la configuración relativa *cis* en las posiciones 2 y 3 del anillo 1-azabicyclo[2.2.2]octano (quinuclidina). En otras palabras, hubo un entendimiento de que el diastereoisómero *cis* (el (2R,3R) y el par de enantiómeros (2S,3S)), eran las formas predominantes que resultaban cuando se preparaban por el método relatado. Esta determinación, de síntesis predominantemente *cis*, se basó en: (i) la comparación de las constantes ^1H de acoplamiento de núcleos de hidrógeno de posiciones 2 y 3 del anillo de quinuclidina y de los intermedios diastereoméricos (*cis* y *trans*) aislados a las constantes de acoplamiento descritas en la literatura, y en (ii) el resultado estereoquímico esperado de la química sintética que se utiliza para producir la

mezcla de compuestos, por analogía a la literatura, con referencia a Warawa et al., J. Med. Chem. 18(6): 587-593 (1975) y Viti et al, Tetrahedron Lett.. 35(32): 5939-5942 (1994). Así, había expectativa de que se formara la configuración *cis*. Por ello, los ensayos biológicos con el racemato produjeron resultados que fueron presuntamente atribuibles a la configuración *cis* predominante.

5 **0032]** Ahora se ha descubierto, a través de análisis de difracción de rayos X de formas de sales cristalinas y análogos, que el diastereómero predominante producido en la síntesis original era, de hecho, el diastereómero *trans*. Además, se ha descubierto que los dos enantiómeros con la estereoquímica relativa *trans*, a saber, el (2S,3R) y el (2R,3S), difieren sustancialmente entre sí en su capacidad de interactuar con el subtipo NNR $\alpha 7$. La configuración (2S,3R), Compuesto A, tiene mayor actividad.

10 Con análisis posterior, se ha descubierto que el Compuesto A tiene propiedades farmacológicas que le distinguen a partir de: i) cada uno de los otros tres estereoisómeros, considerados individualmente, ii) la mezcla de los cuatro estereoisómeros, es decir, el racemato; y iii) otros ligandos $\alpha 7$ NNR reportados en la bibliografía.

15 El (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (Compuesto A) es un agonista completo altamente selectivo en el receptor $\alpha 7$ NNR con un valor EC_{50} notablemente bajo (para activación) y una buena separación entre EC_{50} y el IC_{50} (para inhibición residual), proporcionando agonismo funcional en un amplio rango de concentraciones terapéuticamente útiles.

II. Síntesis escalable de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

20 Los pasos sintéticos particulares varían en su adaptabilidad a la ampliación. En las reacciones se encontraron carencias en su capacidad para llevarse a mayor escala por una variedad de razones, incluyendo preocupaciones de seguridad, costos de reactivo, difícil elaboración o purificación, energética de reacción (termodinámica o cinética), y rendimiento de reacción.

La síntesis de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida descrita aquí se ha utilizado para producir cantidades de kilogramos de material, y las reacciones de los componentes han sido llevadas a cabo a escala de múlti- kilogramos en alta producción.

25 La síntesis escalable utiliza tanto la resolución dinámica de una cetona racemizable (2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona) como la reducción estereoselectiva de la imina derivada (R)- α -metilbencilamina (aminación reductora) de la cetona resuelta. Las secuencias sintéticas reportadas aquí son fácilmente escalables y evitan purificaciones cromatográficas.

30 III. Preparación de nuevas formas de sal de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran 2-carboxamida

35 La (2S, 3 R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida como base libre es un polvo amorfo con muy limitada solubilidad en agua. La base libre reaccionará con ácidos tanto inorgánicos como orgánicos para hacer ciertas sales de adición ácida que tienen propiedades físicas y químicas ventajosas para la preparación de composiciones farmacéuticas, incluyendo pero no limitado a cristalinidad, solubilidad en agua, y estabilidad. La estequiometría de las sales de la presente invención puede variar.

Dependiendo de la forma en que se forman las sales aquí descritas, las sales pueden tener estructuras cristalinas que ocuyen disolventes que están presentes durante la formación de la sal. Así, las sales pueden producirse como hidratos y otros solvatos de estequiometría variable de disolvente respecto al (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida.

40 El método para preparar las formas de sal puede variar. La preparación de formas de sal de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida generalmente implica:

(i) mezclar la base libre o una solución de la base libre, a saber, (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida en un disolvente adecuado con un ácido puro o como una solución de un ácido en un disolvente adecuado;

45 (iia) enfriar la solución de sal resultante, si es necesario para provocar precipitación, o

(iib) añadir un anti-disolvente adecuado para provocar la precipitación, o

(iic) evaporar el primer disolvente y añadir un nuevo disolvente y repetir cualquiera de las etapas (iia) o (iib), y

(iii) filtrar y recoger la sal resultante.

50 En una descripción, el (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida puede ser enriquecido estereoisoméricamente. En una descripción, el exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser

90% o mayor. En una descripción, el exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 95% o mayor. En una descripción, el exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 98% o mayor. En una descripción, el exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 99% o mayor. En una descripción, el exceso enantiomérico y/o diastereoisomérico puede ser 99,5% o mayor.

- 5 La estequiometría, mezcla de disolvente, concentración de soluto, y temperatura empleada pueden variar. Disolventes representativos que pueden usarse para preparar o recristalizar las formas de sales incluyen, sin limitación, etanol, metanol, alcohol isopropilo, acetona, acetato de etilo, y acetonitrilo.

10 Ejemplos de sales adecuadas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos inorgánicos tales como cloruro, bromuro, sulfato, fosfato, y nitrato; sales de adición de ácido orgánico tales como acetato, galactarato, propionato, succinato, lactato, glicolato, malato, tartrato, citrato, maleato, fumarato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, y ascorbato; y sales con aminoácidos tales como aspartato y glutamato. Las sales pueden ser en algunos casos hidratos o solvatos de etanol. Sales representativas se proporcionan como se describe en la patente US 5.597.919 de Dull et al., 5.616.716 de Dull et al. y 5.663.356 de Ruecroft et al

15 El análisis de sal para la base libre (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida reveló que, mientras que pueden formarse muchas sales de ácidos farmacéuticamente aceptables, sólo unos pocos de estas sales tienen propiedades aceptables para la fabricación comercial. La capacidad de predecir las características ejemplificadas para una sal comercialmente viable, por lo tanto, no existe. Los ácidos que proporcionan sales que eran cristalinas, es decir, sales que demuestran cierto grado de cristalinidad, dependiendo del método por el que se preparan, incluyen el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido p-toluenosulfónico, galactárico (múico), ácido D-mandélico, ácido D-tartárico, ácido metanosulfónico, ácido R-y S-10-canforsulfónico, ácido maleico, ácido cetoglutárico y ácido hipúrico. De estas sales, el ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido maleico y sales ácidas p-toluenosulfónica exhibieron cada uno propiedades deseables, incluyendo puntos de fusión altos, buena solubilidad en agua y baja higroscopicidad. Estas características en estas sales fueron inesperadas.

25 **IV. Composiciones farmacéuticas**

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen las sales descritas aquí, en el estado puro o en la forma de una composición en la que los compuestos se combinan con cualquier otro producto farmacéuticamente compatible, que puede ser inerte o fisiológicamente activo. Las composiciones farmacéuticas resultantes pueden ser usadas para prevenir una afección o trastorno en un sujeto susceptible a tal afección o trastorno, y/o para tratar un sujeto que padece la afección o trastorno. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención incluyen el compuesto de la presente invención y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

35 La forma en que se administran los compuestos puede variar. Las composiciones se administran preferiblemente por vía oral (por ejemplo, en forma líquida en un disolvente tal como un líquido acuoso o no acuoso, o dentro de un vehículo sólido). Las composiciones preferibles para administración oral incluyen pastillas, tabletas, cápsulas, comprimidos oblongos, jarabes y soluciones, incluyendo cápsulas de gelatina dura y cápsulas de liberación prolongada. Los excipientes estándar incluyen aglutinantes, cargas, colorantes, solubilizantes, y similares. Las composiciones pueden formularse en forma de dosis única, o en dosis múltiples o subunitarias. Las composiciones preferidas son en forma líquida o semisólida. Se pueden usar las composiciones que incluyen un portador líquido farmacéuticamente inerte, tal como agua u otros líquidos o semisólidos farmacéuticamente compatibles. El uso de tales líquidos y semisólidos es bien conocido para los expertos en la técnica.

45 Las composiciones también se pueden administrar mediante inyección, es decir, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, por vía intraperitoneal, intraarterial, intratecal, e intracerebroventricular. La administración intravenosa es el método preferido de inyección. Los vehículos adecuados para inyección son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen soluciones de dextrosa 5%, solución salina y solución salina tamponada con fosfato. El producto farmacéutico también puede ser administrado como una infusión o inyección (Por ejemplo, como una suspensión o como una emulsión en un líquido o mezcla de líquidos farmacéuticamente aceptable).

50 Las formulaciones también se pueden administrar usando otros medios, por ejemplo, la administración rectal. Las formulaciones útiles para la administración rectal, tales como supositorios, son bien conocidas por los expertos en la técnica. El medicamento puede también ser administrado por inhalación (por ejemplo, en forma de un aerosol bien nasal o usando artículos de entrega del tipo de expuesto en la patente US 4.922.901 de Brooks et al.) de forma tópica (por ejemplo, en forma de loción); transdérmica (por ejemplo, usando un parche transdérmico) o iontoforética, o por administración sublingual o bucal. Aunque es posible administrar un compuesto en forma de un producto químico activo a granel, se prefiere presentar un producto de fármaco en forma de una composición o formulación farmacéutica para administración eficiente y eficaz.

Los ejemplos de métodos para la administración de compuestos serán evidentes para el experto en la técnica. La utilidad de estas formulaciones puede depender de la composición particular usada y el sujeto particular que recibe

el tratamiento Estas formulaciones pueden contener un portador líquido que puede ser aceitoso, acuoso, emulsionado o contener determinados disolventes adecuados para el modo de administración.

5 Las composiciones pueden ser administradas intermitentemente o a una tasa gradual, continua, constante o controlada a un animal de sangre caliente (por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, rata, gato, conejo, perro, cerdo, vaca, o mono), pero ventajosamente se administran a un ser humano. Además, la hora del día y el número de veces por día que la formulación farmacéutica se administre puede variar.

Otros métodos adecuados para la administración de los compuestos de la presente invención se describen en la patente US 5.604.231 de Smith et al.

10 Como apreciarán los expertos en la técnica, el compuesto de la presente descripción se puede administrar en combinación con otros compuestos terapéuticos. Por ejemplo, el compuesto se puede usar en combinación con otros ligandos NNR (como vareniclina), antioxidantes (como agentes eliminadores de radicales libres), agentes antibacterianos (como antibióticos de penicilina), agentes antivirales (como análogos de nucleósidos, como aciclovir y zidovudina), anticoagulantes (por ejemplo, la warfarina), agentes antiinflamatorios (como AINE), anti-piréticos, analgésicos, anestésicos (como se utiliza en cirugía), inhibidores de la acetilcolinesterasa (como donepezil y galantamina), antipsicóticos (como haloperidol, clozapina, lanzapina y quetiapina), inmunosupresores (como ciclosporina y metotrexato), agentes neuroprotectores, esteroides (como las hormonas esteroideas), corticosteroides (como dexametasona, predisona, e hidrocortisona), vitaminas, minerales, nutracéuticos, antidepresivos (como imipramina, fluoxetina, paroxetina, escitalopram, sertralina, venlafaxina, y duloxetina), ansiolíticos (por ejemplo, alprazolam y buspirona), anticonvulsivos (por ejemplo, fenitoína y gabapentina), vasodilatadores (como prazosina y sildenafil), estabilizadores del estado de ánimo (como valproato y aripiprazol), medicamentos contra el cáncer (como anti-antiproliferativos), antihipertensivos (atenolol, clonidina, amlodipino, verapamilo, y olmesartán), laxantes, purgantes, diuréticos (como furosemida), anti-espasmodicos (por ejemplo, dicyclomina), antidiscinéticos agentes y medicamentos antiulcerosos (como esomeprazol).

25 Los compuestos se pueden emplear solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Tal combinación de agentes farmacéuticamente activos puede administrarse junta o por separado y, cuando se administra por separado, la administración puede darse simultánea o secuencialmente, en cualquier orden. Las cantidades de los compuestos o agentes y los tiempos relativos de administración se seleccionarán para alcanzar el efecto terapéutico deseado. La administración en combinación puede ser mediante administración concomitante en: (1) una composición farmacéutica unitaria incluyendo múltiples compuestos, o (2) composiciones farmacéuticas separadas que incluyen cada uno de los compuestos. Alternativamente, la combinación se puede administrar separadamente de una manera secuencial en la que un agente de tratamiento se administra primero y el otro segundo o viceversa. Tal administración secuencial puede ser próxima o remota en el tiempo. Los compuestos pueden usarse en el tratamiento de una variedad de trastornos y afecciones y, por ello, los compuestos pueden utilizarse en combinación con una variedad de otros agentes terapéuticos adecuados útiles en el tratamiento o profilaxis de esos trastornos o afecciones.

35 La dosis apropiada del compuesto es la cantidad eficaz para prevenir la aparición de los síntomas del trastorno o para tratar algunos síntomas del trastorno que el paciente sufre. Como se ha indicado, por "cantidad eficaz", "cantidad terapéutica" o "dosis efectiva" se entiende la cantidad suficiente para producir el efecto farmacológico o terapéutico deseado, resultando así eficaz en la prevención o tratamiento del trastorno.

40 En el tratamiento de un trastorno del SNC, una cantidad eficaz de compuesto es una cantidad suficiente para pasar a través de la barrera hematoencefálica del sujeto, para unirse a sitios de receptores relevantes en el cerebro del sujeto y para modular la actividad de subtipos NNR pertinentes (por ejemplo, proporcionar secreción de neurotransmisores, resultando así eficaz en la prevención o tratamiento del trastorno). Un ejemplo de prevención de un trastorno se manifiesta retrasando la aparición de los síntomas del trastorno. Un ejemplo de tratamiento de un trastorno se manifiesta por una disminución en los síntomas asociados con el trastorno o una mejora de la recurrencia de los síntomas del trastorno. Preferiblemente, la cantidad eficaz es suficiente para obtener el resultado deseado, pero insuficiente para causar efectos secundarios apreciables

50 La dosis efectiva puede variar, dependiendo de factores tales como la condición del paciente, la gravedad de los síntomas del trastorno, y la manera en que se administra la composición farmacéutica. Para pacientes humanos, la dosis eficaz de compuestos típicos generalmente requiere la administración del compuesto en una cantidad suficiente para modular la actividad de los NNR pertinentes, pero la cantidad debe ser insuficiente para inducir efectos significativos sobre los músculos esqueléticos y ganglios en cualquier grado. La dosis efectiva de los compuestos, por supuesto, difiere de paciente a paciente, pero en general incluye cantidades iniciales donde los efectos del sistema nervioso central y otros efectos terapéuticos deseados ocurren pero por debajo de la cantidad donde se observan efectos musculares.

55 Los compuestos aquí descritos, cuando se emplean en cantidades eficaces de acuerdo con los métodos descritos en este documento, pueden proporcionar algún grado de prevención de la progresión de, mejorar los síntomas de, o mejorar, en algún grado, la recurrencia de trastornos del SNC u otros. Las cantidades eficaces de los compuestos están normalmente por debajo de la concentración umbral requerida para provocar efectos secundarios apreciables,

por ejemplo efectos en relación con el musculo esquelético o los ganglios. Los compuestos pueden ser administrados en una ventana terapéutica en la que ciertos trastornos del SNC y otros son tratados y ciertos efectos secundarios se evitan. Idealmente, la dosis efectiva de los compuestos aquí descritos es suficiente para proporcionar los efectos deseados sobre el trastorno, pero es insuficiente (es decir, no tiene un nivel suficientemente alto) para proporcionar indeseables efectos secundarios. Preferiblemente, los compuestos se administran a una dosis eficaz para el tratamiento de trastornos del SNC u otros pero menor que, a menudo menos de 1/5, y a menudo menos de 1/10, la cantidad requerida para provocar ciertos efectos secundarios significativos en cualquier grado.

Más preferiblemente, las dosis efectivas están en concentraciones muy bajas, donde se observa que ocurren efectos máximos con al menos efectos secundarios. Normalmente, la dosis efectiva de tales compuestos generalmente requiere la administración del compuesto en una cantidad de menos de 5 mg/kg de peso del paciente. A menudo, los compuestos de la presente invención se administran en una cantidad de menos de aproximadamente 1 mg/kg del peso del paciente y por lo general menos de unos 100 µg/kg del peso del paciente, pero frecuentemente entre unos 10 µg a menos de 100 µg/kg del peso del paciente. Las dosis efectivas precedentes, normalmente, representan esa cantidad administrada en una dosis única, o como una o más dosis administradas durante un período de 24 horas.

Para pacientes humanos, la dosis eficaz de compuestos típicos generalmente requiere administrar el compuesto en una cantidad de al menos alrededor de 1, a menudo al menos unos 10, y frecuentemente al menos unos 100 mg/24 horas/paciente. Para pacientes humanos, la dosis eficaz de compuestos típicos requiere que la administración del compuesto generalmente no exceda unos 500, a menudo no exceda de unos 400, y frecuentemente no exceda de unos 300 mg/24 horas/paciente. Además, las composiciones se administran ventajosamente en una dosis eficaz tal que la concentración del compuesto dentro del plasma del paciente normalmente no exceda de 50 ng/ml, a menudo no exceda 30 ng/ml, y frecuentemente no exceda de 10 ng/ml. En una realización de la presente invención, una dosis eficaz es de entre aproximadamente 1 mg y 10 mg en un periodo de 24 horas.

IV. Método de Uso de las composiciones farmacéuticas

Como se usa aquí, un "agonista" es una sustancia que estimula a su pareja de unión, normalmente un receptor. La estimulación se define en el contexto del ensayo particular, o puede ser evidente en la literatura a partir de una discusión aquí que hace una comparación a un factor o sustancia que es aceptada como un "agonista" o un "antagonista" de la pareja de unión particular bajo circunstancias sustancialmente similares como se aprecia por los expertos en la técnica. La estimulación puede definirse respecto a un incremento en un efecto o función particular que es inducido por la interacción del agonista o agonista parcial con una pareja de unión y puede incluir efectos alostéricos.

Como se usa aquí, un "antagonista" es una sustancia que inhibe a su pareja de unión, normalmente un receptor. La inhibición se define en el contexto del ensayo particular, o puede ser evidente en la literatura a partir de una discusión aquí que hace una comparación a un factor o sustancia que es aceptada como un "agonista" o un "antagonista" de la pareja de unión particular bajo circunstancias sustancialmente similares como es apreciado por los expertos en la técnica. La inhibición puede definirse respecto a una disminución en un efecto o función particular que es inducido por la interacción del antagonista con una pareja de unión, y puede incluir efectos alostéricos.

Como se usa aquí, un "agonista parcial" o un "antagonista parcial" es una sustancia que provee un nivel de estimulación o inhibición, respectivamente, a su pareja de unión que no es enteramente o completamente agonista o antagonista, respectivamente. Se reconocerá que la estimulación, y por lo tanto, la inhibición se define intrínsecamente para cualquier sustancia o categoría de sustancias que se definan como agonistas, antagonistas o agonistas parciales.

Como se utiliza aquí, "actividad intrínseca" o "eficacia" se refiere a alguna medida de efectividad biológica del complejo pareja de unión. Con respecto a la farmacología del receptor, el contexto en el que la actividad intrínseca o eficacia debe ser definido dependerá del contexto del complejo de la pareja de unión (por ejemplo, receptor/ligando) y de la consideración de una actividad relevante para un resultado biológico particular. Por ejemplo, en algunas circunstancias, la actividad intrínseca puede variar en función del segundo sistema mensajero implicado. Véase Hoyer, D. and Boddeke, H., Trends Pharmacol. Sci. 14(7): 270-5 (1993), respecto a dichas enseñanzas. Donde las evaluaciones de tales evaluaciones específicas contextuales son relevantes, y cómo podrían ser relevantes en el contexto de la presente invención, será evidente para alguien de experiencia ordinaria en la técnica.

Como se usa aquí, la modulación de un receptor incluye agonismo, agonismo parcial, antagonismo, antagonismo parcial, o agonismo inverso de un receptor.

Como se usa aquí, los neurotransmisores cuya liberación está mediada por los compuestos aquí descritos incluyen, pero no se limitan a, acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina y glutamato y los compuestos aquí descritos funcionan como moduladores del subtipo $\alpha 7$ de los NNR del SNC.

Como se usa aquí, los términos "prevención" o "profilaxis" incluyen cualquier grado de reducción de la progresión o retraso en la aparición de una enfermedad, trastorno o afección. El término incluye proporcionar efectos protectores

contra una determinada enfermedad, trastorno o afección, así como mejorar la recurrencia de la enfermedad, trastorno o afección. Así, en otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar o experimentar una recurrencia de un trastorno mediado por NNR o nAChR. Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para lograr un efecto terapéutico o profiláctico beneficioso, por ejemplo, en un sujeto con una disfunción del SNC.

Como se señaló anteriormente, los compuestos de base libre y sal de la presente invención, modulan el subtipo NNR $\alpha 7$, característico del SNC, y se pueden utilizar para prevenir o tratar varias afecciones o trastornos, incluyendo los del SNC, en sujetos que tienen o son susceptibles a tales afecciones o trastornos, por modulación del NNR $\alpha 7$. Los compuestos tienen la capacidad de unirse selectivamente al NNR $\alpha 7$ y expresan farmacología nicotínica, por ejemplo, para actuar como agonistas, agonistas parciales, antagonistas, como se ha descrito. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención, cuando se administran en cantidades eficaces a pacientes en necesidad de los mismos, proporcionan algún grado de prevención de la progresión del trastorno del SNC, es decir, proporcionan efectos protectores, mejora de los síntomas del trastorno del SNC, o mejora de la reaparición de los trastornos de SNC, o una combinación de los mismos.

Los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden usar para tratar o prevenir estos tipos de afecciones y trastornos para los que otros tipos de compuestos nicotínicos se han propuesto o se demuestra que son útiles como agentes terapéuticos. Véase, por ejemplo, las referencias anteriormente enumeradas en este documento, así como Williams et al., *Drug News Perspec.* 7(4): 205 (1994), Americ et al, *CNS Drug Rev.* 1(1): 1-26 (1995), Americ et al, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 5(1): 79-100 (1996), Bencherif et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 1413 (1996), Lippiello et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 1422 (1996), Damaj et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 390 (1999); Chiari et al, *Anesthesiology* 91: 1447 (1999), Lavand'homme y Eisenbach., *Anesthesiology* 91: 1455 (1999), Holladay et al, *J. Med.. Chem.* 40 (28): 4169-94 (1997), Bannon et al, *Science.* 279: 77 (1998), PCT WO 94/08992, PCT WO 96/31475, PCT WO 96/40682, y patentes US 5.583.140 de Bencherif et al., 5.597.919 de Dull et al., 5.604.231 de Smith et al. y 5.852.041 de Cosford et al con respecto a tal enseñanza terapéutica.

Los compuestos y sus composiciones farmacéuticas son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de trastornos del SNC, incluyendo trastornos neurodegenerativos, trastornos neuropsiquiátricos, trastornos neurológicos y adicciones. Los compuestos y sus composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para tratar o prevenir deficiencias cognitivas y trastornos relacionados con la edad y otros, trastornos atencionales y demencias, incluyendo las debidas a agentes infecciosos o trastornos metabólicos, para proporcionar neuroprotección, para tratar convulsiones e infartos cerebrales múltiples, para tratar trastornos del estado de ánimo, compulsiones y comportamientos adictivos, para proporcionar analgesia; para controlar inflamación, tal como la mediada por citocinas y factor nuclear kappa B; para tratar trastornos inflamatorios; para proporcionar alivio del dolor y para tratar trastornos metabólicos como diabetes o síndrome metabólico, y para tratar infecciones, como agentes anti-infecciosos para tratar infecciones por bacterias, hongos, y virus.

Trastornos del SNC

Entre los trastornos, enfermedades y afecciones que los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir están: deterioro de memoria asociado con la edad (AAMI), deterioro cognitivo leve (MCI), disminución cognitiva relacionada con la edad (ARCD), demencia pre-senil, inicio precoz de enfermedad de Alzheimer, demencia senil, demencia tipo Alzheimer, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo sin demencia (CIND), demencia con cuerpos de Lewy, demencia por VIH, demencia por SIDA, demencia vascular, síndrome de Down, trauma en la cabeza, lesión cerebral traumática (TBI), demencia pugilística, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob y las enfermedades priónicas, apoplejía, isquemia, trastorno de déficit de atención, déficit de atención con hiperactividad, dislexia, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, disfunción cognitiva en la esquizofrenia, déficits cognitivos en la esquizofrenia tales como memoria, incluyendo memoria a corto plazo, la función ejecutiva, atención, vigilancia, procesamiento de información y aprendizaje, demencia (sea leve, moderada o grave) asociada con la esquizofrenia, Parkinsonismo incluyendo la enfermedad de Parkinson, parkinsonismo postencefalítico, demencia - parkinsonismo de Gaum, demencia frontotemporal tipo Parkinson (FTDP), enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Huntington, corea de Huntington, disquinesia tardía, hiperquinesia, parálisis supranuclear progresiva, paresia supranuclear progresiva, síndrome de piernas inquietas, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedades de neuronas motoras (MND), múltiple atrofia de sistema (MSA), degeneración corticobasal, síndrome de Guillain-Barré (GBS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante, manía, ansiedad, depresión, disforia premenstrual, trastornos de pánico, bulimia, anorexia, narcolepsia, somnolencia diurna excesiva, trastornos bipolares, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo compulsivo, arrebatos de ira, trastorno de oposición desafiante, el síndrome de Tourette, autismo, adicción a drogas y a alcohol, tabaquismo, obesidad, caquexiala psoriasis, lupus, colangitis aguda, estomatitis aftosa, úlceras, asma, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, íleo postoperatorio, distonía espástica, diarrea, estreñimiento, pouchitis, pancreatitis, neumonitis viral, artritis, incluyendo artritis reumatoide y osteoartritis, endotoxemia, sepsis, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, dolor agudo, dolor crónico, neuropatías, incontinencia urinaria, diabetes y neoplasias.

Las deficiencias o disfunciones cognitivas pueden estar asociadas con trastornos psiquiátricos o afecciones, como esquizofrenia y otros trastornos psicóticos, que incluyen pero no se limitan a trastorno psicótico, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico breve, trastorno psicótico compartido, y los trastornos psicóticos debido a una o más condiciones médicas generales, demencias y otros trastornos cognitivos, incluyendo pero no limitado a deterioro cognitivo leve, demencia pre-senil, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, demencia tipo Alzheimer, deterioro de la memoria relacionada con la edad, demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, demencia por SIDA, dislexia, parkinsonismo incluyendo la enfermedad de Parkinson, deterioro cognitivo y demencia de enfermedad de Parkinson, deterioro cognitivo de esclerosis múltiple, deterioro cognitivo causado por lesión traumática cerebral, demencia debida a otras causas médicas, trastornos de ansiedad, incluyendo pero no limitado a trastorno de pánico sin agorafobia, trastorno de pánico con agorafobia, agorafobia sin historia de trastorno de pánico, fobia específica, fobia social, trastorno obsesivo-compulsivo, estrés post-traumático, trastorno de estrés agudo, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de ansiedad generalizada debido a una afección médica general, trastornos del estado de ánimo, incluyendo pero no limitado al trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión bipolar, manía bipolar, trastorno bipolar I, depresión asociada con manía, episodios depresivos o mixtos, trastorno bipolar II, trastorno ciclotímico, y trastornos del estado de ánimo debido a afecciones médicas generales, trastornos del sueño, incluyendo pero no limitado a trastornos de disomnia, insomnio primario, hipersomnia primaria, narcolepsia, trastornos de parasomnia, trastorno de pesadilla, trastorno de terror del sueño y trastorno de sonambulismo, retraso mental, trastornos del aprendizaje, trastorno de habilidades motoras, trastornos de comunicación, trastornos generalizados del desarrollo, déficit de atención y trastornos de comportamiento disruptivo, trastorno de déficit de atención, hiperactividad con déficit de atención, trastornos de alimentación y comida de la infancia, niñez, o adultos, trastornos de tics, trastornos de eliminación, trastornos relacionados con sustancias, incluyendo pero no limitado a dependencia de sustancias, abuso de sustancias, intoxicación por sustancias, abstinencia de sustancias, trastornos relacionados con alcohol, anfetaminas o similar a anfetaminas, trastornos relacionados con cafeína, trastornos relacionados con cannabis, trastornos relacionados con cocaína, relacionados con alucinógenos, trastornos relacionados con inhalantes, trastornos relacionados con nicotina, trastornos relacionados con opioides, trastornos relacionados con fenciclidina o trastornos relacionados con similares a fenciclidina, y trastornos relacionados con sedantes, hipnóticos, o ansiolíticos, trastornos de personalidad incluyendo, pero sin limitarse a trastorno obsesivo-compulsivo de personalidad y trastornos de control de impulsos.

Los síntomas de la esquizofrenia se dividen generalmente en tres categorías: positivos, negativos y cognitivos. Los síntomas positivos, también puede ser denominados "síntomas psicóticos", e incluyen delirios y alucinaciones. "Positivo" se refiere a tener síntomas patentes. Los síntomas negativos incluyen aplanamiento emocional o falta de expresión, incapacidad de iniciar y seguir adelante con actividades, discurso breve y carente de contenido, y falta de placer o interés en actividades. "Negativo" se refiere a falta de ciertas características que de otro modo estarían presentes en un individuo sano. Los síntomas cognitivos se refieren a los procesos de pensamiento. Los síntomas cognitivos incluyen déficits cognitivos como memoria, incluyendo memoria a corto plazo, función ejecutiva, atención, vigilancia, procesamiento de información y aprendizaje, con referencia a Sharma et al, Cognitive Function in Schizophrenia: Deficits, Functional Consequences and Future Treatment, Psychiatr. Clin. N. Am. 26 (2003) 25-40. La esquizofrenia también afecta el estado de ánimo. Si bien muchas personas afectadas de esquizofrenia se deprimen, algunos también tienen cambios de humor e incluso aparentes estados tipo bipolar.

Las anteriores afecciones y trastornos se analizan con más detalle, por ejemplo, en la Asociación Americana de Psiquiatría: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, Cuarta Edición, Texto Revisado, Washington, DC, Asociación Americana de Psiquiatría, 2000 con respecto a la definición de tales condiciones y trastornos. Se puede referir a este manual también para un mayor detalle sobre los síntomas y características de diagnóstico asociados con el consumo, el abuso y la dependencia de sustancias.

Preferiblemente, el tratamiento o la prevención de enfermedades, trastornos y afecciones se produce sin efectos secundarios adversos apreciables, incluyendo, por ejemplo, aumentos significativos en la presión arterial y la frecuencia cardíaca, efectos negativos significativos sobre el tracto gastrointestinal, y efectos significativos sobre el músculo esquelético.

Los compuestos de la presente invención, cuando se emplean en cantidades eficaces, se cree que modulan la actividad del NNR $\alpha 7$ sin interacción apreciable con los subtipos nicotínicos que caracterizan a los ganglios humanos, como se demuestra por la falta de la capacidad para provocar función nicotínica en tejidos cromafines suprarrenales, o músculo esquelético, demostrado además por una falta de capacidad de provocar función nicotínica en preparaciones celulares que aparecen en receptores nicotínicos de tipo muscular. Así, se cree que estos compuestos son capaces de tratar o prevenir enfermedades, trastornos y afecciones sin provocar efectos secundarios significativos asociados a la actividad en los sitios ganglionar y neuromuscular. Así, la administración de los compuestos se cree que proporciona siempre una ventana terapéutica para tratar determinadas enfermedades, trastornos y afecciones, y evita ciertos efectos secundarios. Es decir, una dosis eficaz del compuesto se cree suficiente para proporcionar los efectos deseados sobre la enfermedad, trastorno o afección, pero se cree insuficiente, es decir no tiene un nivel suficientemente alto, para proporcionar efectos secundarios indeseables.

Por tanto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia, tal como una terapia descrita anteriormente.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno del SNC, tal como un trastorno, enfermedad o afección descrita anteriormente.

Inflamación

5 El sistema nervioso, principalmente mediante el nervio vago, se sabe que regula la magnitud de la respuesta inmune innata mediante la inhibición de la liberación de factores de necrosis tumoral macrófagos (TNF). Este mecanismo fisiológico se conoce como la "vía anti-inflamatoria colinérgica" (véase, por ejemplo, Tracey, "The inflammatory reflex" Nature 420: 853-9 (2002), incorporado a esta por referencia). Inflamación excesiva y factor de necrosis tumoral causan morbilidad e incluso mortalidad en una variedad de enfermedades. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, endotoxemia, artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, asma, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, y enfermedad inflamatoria intestinal.

15 Las afecciones inflamatorias que pueden ser tratadas o prevenidas administrando los compuestos aquí descritos incluyen, pero no se limitan a, inflamación crónica y aguda, psoriasis, endotoxemia, gota, pseudogota aguda, artritis gotosa aguda, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, polimiositis, dermatomiositis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Still, enfermedad de Still del adulto, rechazo del aloinjerto, rechazo crónico de trasplantes, asma, aterosclerosis, lesión pulmonar mononuclear-fagocito dependiente, fibrosis pulmonar idiopática, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, angustia respiratoria del adulto, síndrome torácico agudo en enfermedad de células falciformes, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colangitis aguda, estomatitis aftósica, pouchitis, glomerulonefritis, nefritis por lupus, trombosis, y reacción de injerto contra huésped.

Respuesta inflamatoria asociada con la infección bacteriana y/o vírica

25 **[0080]** Muchas infecciones bacterianas y/o virales (por ejemplo, meningitis, hepatitis y nefritis) se asocian con efectos secundarios provocados por la formación de toxinas y la respuesta natural del cuerpo a la bacteria o virus y/o toxinas. Como se discutió anteriormente, la respuesta del cuerpo a la infección a menudo implica la generación de una cantidad significativa de TNF y/o otras citoquinas. La sobre-expresión de estas citoquinas puede dar como resultado una lesión significativa, tales como choque séptico (cuando la bacteria es sepsis), choque endotóxico, urosepsis, y síndrome de choque tóxico

30 La expresión de citoquinas está mediada por los NNR, y puede inhibirse administrando agonistas o agonistas parciales de estos receptores. Los compuestos aquí descritos que son agonistas o agonistas parciales de estos receptores pueden por tanto, usarse para minimizar la respuesta inflamatoria asociada con infección bacteriana, así como infecciones por virus y hongos. Ejemplos de tales infecciones bacterianas incluyen ántrax, botulismo y sepsis. Algunos de estos compuestos pueden también tener propiedades antimicrobianas.

35 Estos compuestos también pueden usarse como terapia adjunta en combinación con terapias existentes para tratar infecciones bacterianas, virales y fúngicas, tales como antibióticos, antivirales y antifúngicos. Las antitoxinas también pueden usarse para ligar toxinas producidas por los agentes infecciosos y permitir que la toxina ligada pase a través del cuerpo sin generar una respuesta inflamatoria. Ejemplos de antitoxinas se describen, por ejemplo, en la patente de US 6.310.043 de Bundle et al. Otros agentes eficaces contra bacterias y otras toxinas pueden resultar eficaces y su efecto terapéutico puede ser complementado por co-administración con los compuestos aquí descritos.

Dolor

40 Los compuestos pueden administrarse para tratar y/o prevenir el dolor, incluyendo dolor agudo, inflamatorio neurológico, neuropático y crónico. La actividad analgésica de los compuestos aquí descritos puede demostrarse en modelos de dolor inflamatorio persistente y de dolor neuropático, realizados como se describe en la Solicitud de Patente de US Publicada 20010056084 A1 (Allgeier et al.), en la que se demuestra hiperalgesia en el modelo adyuvante de rata completo de Freund del dolor inflamatorio y la hiperalgesia mecánica en el modelo de ligadura parcial del nervio ciático de ratón de dolor neuropático.

45 El efecto analgésico es adecuado para tratar el dolor de génesis o etiología diversa, en particular al tratar dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada, dolor neuropático e hiperalgesia asociada, dolor crónico (por ejemplo, dolor crónico grave, dolor post-operatorio, y dolor asociado con varias enfermedades, como cáncer, angina, cólico renal o insuficiencia biliar, migraña menstrual, y gota). El dolor inflamatorio puede ser de diversos orígenes, incluyendo artritis y enfermedad reumatoide, teno-sinovitis y vasculitis. El dolor neuropático incluye neuralgia del trigémino o herpética, dolor neuropático diabético, causalgia, dolor de espalda baja, y síndromes de desaferenciación como la avulsión del plexo braquial.

Neovascularización

55 El NNR $\alpha 7$ se asocia con la neovascularización. La inhibición de neovascularización, por ejemplo, administrando antagonistas (o en ciertas dosis, agonistas parciales) del NNR $\alpha 7$ puede tratar o prevenir enfermedades

caracterizadas por neovascularización o angiogénesis indeseable. Tales condiciones pueden incluir las caracterizadas por angiogénesis inflamatoria y/o angiogénesis inducida por isquemia. La neovascularización asociada con el crecimiento tumoral también puede inhibirse administrando los compuestos aquí descritos que funcionan como antagonistas o agonistas parciales de $\alpha 7$ NNR.

- 5 El antagonismo específico de actividad específica de $\alpha 7$ NNR reduce la respuesta angiogénica a la inflamación, isquemia y neoplasia. La orientación en cuanto a sistemas de modelos animales adecuados para evaluar los compuestos aquí descritos se puede encontrar, por ejemplo, en Heeschen, C. et al., "A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors" J. Clin. Invest. 110(4):527-36 (2002), relativa a la divulgación de la inhibición de $\alpha 7$ específica de la angiogénesis y el modelado celular (*in vitro*) y animal de la actividad angiogénica relevante para enfermedades humanas, especialmente el modelo Lewis de tumor de pulmón (*in vivo* en ratones-véase en particular, págs 529 y 532 a 533).

Tipos representativos de tumores que se pueden tratar usando los compuestos aquí descritos incluyen NSCLC, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma de mama, carcinoma de colon, carcinoma de recto, carcinoma de pulmón, carcinoma de orofaringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de esófago, carcinoma de estómago, carcinoma de páncreas, carcinoma de hígado, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma del conducto biliar, carcinoma de intestino delgado, carcinoma del tracto urinario, carcinoma de riñón, carcinoma de vejiga, carcinoma de urotelio, carcinoma de tracto genital femenino, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de útero, carcinoma de ovario, coriocarcinoma, la enfermedad trofoblástica gestacional, el carcinoma de tracto genital masculino, el carcinoma de próstata, carcinoma de las vesículas seminales, carcinoma testicular, tumores de células germinales, carcinoma de glándula endocrina, carcinoma de tiroides, carcinoma suprarrenal, carcinoma de la glándula pituitaria, carcinoma de piel, hemangiomas, melanomas, sarcomas, sarcoma del hueso y de tejido blando, sarcoma de Kaposi, tumores del cerebro, tumores de los nervios, tumores de los ojos, tumores de las meninges, astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas, meningiomas, tumores sólidos derivados de neoplasias hematopoyéticas (como leucemias, cloromas, plasmocitomas, y placas y tumores de micosis fungoides y linfoma/leucemia cutáneo de células T), y tumores sólidos que surgen de linfomas.

Los compuestos también se pueden administrar en combinación con otras formas de tratamiento anticáncer, incluyendo coadministración con agentes antitumorales antineoplásicos, tales como cis-platino, adriamicina, daunomicina, y similares, y/o agentes anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), como son conocidos en la técnica.

- 30 Los compuestos pueden administrarse de manera que estén dirigidas al sitio del tumor. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse en microesferas, micropartículas o liposomas conjugados con varios anticuerpos que dirigen las micropartículas al tumor. Además, los compuestos pueden estar presentes en microesferas, micropartículas o liposomas que sean de tamaño adecuado para pasar a través de arterias y venas, pero se alojan en los lechos capilares que rodean tumores y administran los compuestos localmente al tumor. Esos dispositivos de administración de fármacos son conocidos en la técnica.

Otros Trastornos

Además de tratar los trastornos del sistema nervioso central, inflamación, neovascularización, y dolor, los compuestos de la presente invención puede también usarse para prevenir o tratar ciertas otras afecciones, enfermedades y trastornos en los que juegan un papel los NNR. Los ejemplos incluyen trastornos autoinmunes como lupus, trastornos asociados con liberación de citoquinas, caquexia secundaria a infección (por ejemplo, como ocurre en el SIDA, complejo relacionado con el SIDA y neoplasia), trastornos metabólicos, incluyendo diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome metabólico, obesidad, o hiperglucemia, penfritis, incontinencia urinaria, enfermedades retinales, enfermedades infecciosas, miastenia, síndrome de Eaton-Lambert, hipertensión, osteoporosis, vasoconstricción, vasodilatación, arritmias cardíacas, bulimia, anorexia, así como las indicaciones presentadas en la solicitud PCT publicada WO 98/25619 con respecto a tales desórdenes. Los compuestos de esta invención también se pueden administrar para tratar convulsiones como las que son sintomáticas de la epilepsia, y para tratar afecciones como la sífilis y la enfermedad de Creutzfeld-Jakob.

Usos diagnósticos

Los compuestos se pueden usar en composiciones de diagnóstico, tales como sondas, en particular cuando se modifican para incluir las etiquetas apropiadas. Las sondas se pueden utilizar, por ejemplo, para determinar el número relativo y/o función de receptores específicos, en particular receptores del subtipo $\alpha 7$. Para ello, los compuestos de la presente invención se etiquetan más preferiblemente con un resto radiactivo isotópico como ^{11}C , ^{18}F , ^{76}Br , ^{123}I o ^{125}I .

Los compuestos administrados pueden ser detectados usando métodos conocidos de detección apropiados para la etiqueta usada. Ejemplos de métodos de detección incluyen topografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT). Los etiquetadores radiactivos descritos anteriormente son útiles en imágenes PET (por ejemplo, ^{11}C , ^{18}F o ^{76}Br) y SPECT (por ejemplo, ^{123}I), con semi-vida de alrededor de 20,4 minutos para ^{11}C , alrededor de 109 minutos para ^{18}F , alrededor de 13 horas para el ^{123}I , y sobre 16 horas para

⁷⁶Br. Una elevada actividad específica se desea para visualizar los subtipos de receptores seleccionados a concentraciones de no saturación. Las dosis administradas normalmente están por debajo del rango tóxico y proporcionan imágenes de alto contraste. Los compuestos se espera que sean capaces de administrarse a niveles no tóxicos. La determinación de la dosis se lleva a cabo de una manera conocida para un experto en la técnica de formación de imágenes radioetiquetadas. Véase, por ejemplo, la patente US 5.969.144 de London et al con respecto a la administración de tales compuestos.

Los compuestos se pueden administrar usando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, la patente de US 5.969.144 de London et al., como se ha señalado con respecto a tal administración. Los compuestos pueden administrarse en composiciones de formulación que incorporan otros ingredientes, tales como los tipos de ingredientes que son útiles en la formulación de una composición de diagnóstico. Compuestos útiles para la realización de la presente invención se emplean más preferiblemente en forma de alta pureza. Véase la patente US 5.853.696 de Elmalch et al con respecto a tal análisis.

Después de que los compuestos se administran a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), la presencia de dicho compuesto dentro del sujeto puede ser tratada por imagen y cuantificada por técnicas apropiadas para indicar la presencia, cantidad y funcionalidad de los subtipos NNR seleccionados. Además de los humanos, los compuestos también pueden ser administrados a animales, como ratones, ratas, perros y monos. SPECT y PET pueden llevarse a cabo usando cualquier técnica y aparato apropiado. Véase Villemagne et al, en: Arneric et al. (Eds.) Neuronal Nicotinic Receptors: Pharmacology and Therapeutic Opportunities, 235-250 (1998) y la patente de US 5.853.696 de Elmalch et al para una descripción de técnicas de imagen representativas.

Los compuestos radioetiquetados se unen con alta afinidad a subtipos selectivos NNR (por ejemplo, $\alpha 7$) y exhiben preferiblemente uniones no específicas insignificantes a otros subtipos de receptores nicotínicos colinérgicos (por ejemplo, los subtipos de receptores asociados con músculos y ganglios). Por ello, los compuestos pueden usarse como agentes para formación de imágenes no invasivas de un subtipo de receptor nicotínico colinérgico dentro del cuerpo de un sujeto, en particular dentro del cerebro para el diagnóstico asociado con una serie de enfermedades y trastornos del SNC.

En un aspecto, las composiciones de diagnóstico se pueden utilizar en un método para diagnosticar una enfermedad en un sujeto, como un paciente humano. El método comprende administrar a dicho paciente un compuesto etiquetado de manera detectable como se describe aquí, y detectar la unión de dicho compuesto a los subtipos NNR seleccionados (por ejemplo, subtipo de receptor $\alpha 7$). Los expertos en la técnica de utilización de herramientas de diagnóstico, como PET y SPECT, pueden usar los compuestos radioetiquetados aquí descritos para diagnosticar una amplia variedad de afecciones y trastornos, incluyendo las afecciones y trastornos asociados con la disfunción del sistema nervioso central y del sistema nervioso autónomo. Tales trastornos incluyen una amplia variedad de enfermedades y trastornos del SNC, incluyendo Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y esquizofrenia. Estas y otras enfermedades y trastornos representativos que pueden ser evaluados incluyen los expuestos en la Patente de US 5.952.339 de Bencherif et al.

En otro aspecto, las composiciones de diagnóstico se pueden utilizar en un método para supervisar subtipos de receptor nicotínico selectivo de un sujeto, como un paciente humano. El método implica administrar un compuesto etiquetado detectablemente como se describe aquí a ese paciente y detectar la unión de ese compuesto a subtipos de receptor nicotínico seleccionados, concretamente el subtipo de receptor $\alpha 7$.

Unión al receptor

Los compuestos de esta invención se pueden usar como ligandos de referencia en los ensayos de unión para compuestos que se unen a subtipos NNR, en particular el subtipo de receptor $\alpha 7$. Para ello, los compuestos de esta invención son preferiblemente etiquetados con un resto radioactivo isotópico como ^3H o ^{14}C .

V. Ejemplos de Síntesis

Los ejemplos de síntesis siguientes se proporcionan para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma. En estos ejemplos, todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario. Todas las soluciones son acuosas a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1: Síntesis a pequeña escala de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il) benzofuran 2-carboxamida (Compuesto A) y su enantiómero, (2R,3S)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il)benzofuran-2-carboxamida

(No forma parte de la invención)

2-((3-piridinil)metileno)-1-azabicyclo[2.2.2] octan-3-ona

Se disolvió hidróxido de potasio (56 g, 0,54 moles) en metanol (420 ml). Se añadió clorhidrato de 3-quinuclidinona (75 g, 0,49 moles) y la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió 3-piridinacarboxaldehído (58 g, 0,54 moles) y la mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se volvió

amarilla durante este período, con aglutinaciones sólidas en las paredes del matraz. Los sólidos se rasparon de las paredes y se rompieron los pedazos. Con una agitación rápida, se añadió agua (390 ml). Cuando se disolvieron los sólidos, la mezcla se enfrió a 4°C durante la noche. Los cristales se recogieron por filtración, se lavaron con agua y se secaron al aire para obtener 80 g de un sólido amarillo. Una segunda cosecha (8 g) fue obtenida por concentración del filtrado a ~10% de su volumen anterior y enfriamiento a 4°C durante la noche. Ambos cultivos fueron suficientemente puros para su posterior transformación (88 g, 82% de rendimiento).

2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona

Se suspendió 2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2] octan-3-ona (20 g, 93 mmol) en metanol (200 ml) y se trató con 46 ml de ácido clorhídrico 6 M. Se añadió paladio al 10% sobre carbono (1,6 g) y la mezcla fue agitada bajo hidrógeno a 172,37kN/m² (25 psi) durante 16 h. La mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas, y el disolvente fue eliminado del filtrado por evaporación rotatoria. Esto proporcionó clorhidrato de 2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona crudo, como una goma blanca (20 g), que se trató posteriormente con hidróxido de sodio 2 M (50 ml) y cloroformo (50 ml) y se agitó durante una hora. La capa de cloroformo se separó, y la fase acuosa fue tratada con hidróxido de sodio 2 M (~5 ml, suficiente para elevar el pH a 10) y cloruro de sodio acuoso saturado (25 ml). Esta mezcla acuosa se extrajo con cloroformo (3 x 10 ml), y los extractos de cloroformo combinados se secaron (sulfato de magnesio anhidro) y se concentraron por evaporación rotatoria. El residuo (18 g) se disolvió en éter caliente (320 ml) y se enfrió a 4°C. El sólido blanco se separó por filtración, se lavó con una porción pequeña de éter frío y se secó al aire. La concentración del filtrado a ~10% de su volumen anterior y enfriamiento a 4°C produjeron una segunda cosecha. Se obtuvo un rendimiento combinado de 16 g (79%)

3-Amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano

A una solución agitada de 2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona (3,00 g, 13,9 mmol) en metanol seco (20 ml), bajo nitrógeno, se añadió una solución 1 M de cloruro de cinc en éter (2,78 ml, 2,78 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, esta mezcla se trató con formiato de amonio sólido (10,4 g, 167 mmol). Después de agitar otra hora a temperatura ambiente, se añadió cianoborohidruro de sodio sólido (1,75 g, 27,8 mmol) en porciones. La reacción se agitó a continuación a temperatura ambiente durante la noche y se terminó por adición de agua (~5 ml). La reacción apagada se repartió entre hidróxido de sodio 5 M (10 ml) y cloroformo (20 ml). La capa acuosa se extrajo con cloroformo (20 ml), y las capas orgánicas combinadas se secaron (sulfato de sodio), filtraron y concentraron. Esto dejó 2,97 g de goma amarilla. El análisis de GCMS indicó que el producto era una mezcla 1:9 de las aminas *cis* y *trans*, junto con una traza del alcohol correspondiente (98% recuperación total de masa).

(2R,3S) y (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil metilo))-1-azabicyclo[2.2.2]octano

Se añadió ácido di-p-toluoil-D-tartárico (5,33 g, 13,8 mmol) a una solución agitada de 3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (6,00 g, 27,6 mmol de 1:9 *cis/trans*) en metanol (20 ml). Después de la disolución completa, la solución transparente se concentró en una masa sólida mediante evaporación rotatoria. El sólido se disolvió en una mínima cantidad de metanol hirviendo (~5 ml). La solución se enfrió lentamente, primero a temperatura ambiente (1 h), a continuación, durante ~4 h a 5 ° C y, finalmente, a -5 ° C durante la noche. La sal precipitada se recogió mediante filtración por succión y se recristalizó en 5 ml de metanol. El secado al aire dejó 1,4 g de sólido blanco, que se repartió entre cloroformo (5 ml) y 2 M hidróxido de sodio (5 ml). La capa de cloroformo y un extracto de 5 ml de cloroformo de la capa acuosa se combinaron, se secaron (sulfato sódico anhidro) y se concentraron para dar un aceite incoloro (0,434 g). La pureza enantiomérica de esta base libre se determinó por conversión de una porción en su N-(terc-butoxicarbonil)-L-prolinamida, que fue analizada a continuación para determinar la pureza diastereomérica (98%) usando LCMS.

El licor madre de la cristalización inicial se hizo básico (pH ~ 11) con hidróxido de sodio 2 M y se extrajo dos veces con cloroformo (10 ml). Los extractos de cloroformo se secaron (sulfato sódico anhidro) y se concentraron para dar un aceite. Esta amina (3,00 g, 13,8 mmol) se disolvió en metanol (10 ml) y se trató con ácido di-p-toluoil-L-tartárico (2,76 g, 6,90 mmol). La mezcla se calentó para ayudar a la disolución y luego se enfrió lentamente a -5°C, donde se mantuvo durante la noche. El precipitado se recogió mediante filtración por succión, se recristalizó a partir de metanol y se secó. Esto dejó 1,05 g de sólido de color blanco. La sal se convirtió en la base libre (rendimiento = 0,364 g), y la pureza enantiomérica (97%) se evaluó usando el método de prolinamida, como se ha descrito anteriormente para el otro enantiómero.

Trans enantiómero A de N(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Se añadió gota a gota difenilclorofosfato (0,35 ml, 0,46 g, 1,7 mmol) a una solución de ácido benzofuran-2-carboxílico (0,28 g, 1,7 mmol) y trietilamina (0,24 ml, 0,17 g, 1,7 mmol) en diclorometano seco (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, una solución de (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (0,337 g, 1,55 mmol) (derivada de la sal de ácido di-p-toluoil-D-tartárico) y se añadió trietilamina (0,24 ml, 0,17 g, 1,7 mmol) en diclorometano seco (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente, y luego se trató con hidróxido de sodio al 10% (1 ml). La mezcla bifásica se separó, y la capa orgánica se concentró en un evaporador centrífugo Genevac. El residuo se disolvió en metanol (6 ml) y se

purificó por HPLC en una columna de gel de sílice C18, usando un gradiente de acetonitrilo/agua conteniendo 0,05% de ácido trifluoroacético como eluyente. La concentración de fracciones seleccionadas, reparto del residuo resultante entre cloroformo y bicarbonato sódico acuoso saturado, y evaporación del cloroformo dio 0,310 g (42% de rendimiento) de polvo blanco (95% de pureza por GCMS). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,51 (d, 1H), 8,34 (dd, 1H), 7,66 (d, 1H), 7,58 (dt, 1H), 7,49 (d, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,40 (dd, 1H), 7,29 (t, 1H), 7,13 (dd, 1H), 6,63 (d, 1H), 3,95 (t, 1H), 3,08 (m, 1H), 2,95 (m, 4H), 2,78 (m, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,72 (M, 3H), 1,52 (m, 1H),

Este material (trans enantiómero A) se determinó más tarde que era idéntico, por análisis quiral cromatográfico, al material cuya configuración absoluta es 2S,3R (determinado por análisis cristalográfico de rayos X).

Trans enantiómero B de N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il) benzofuran-2-carboxamida

- 10 Se añadió gota a gota difenilclorofosfato (96 µl, 124 mg, 0,46 mmol) a una solución del ácidobenzofuran-2-carboxílico (75 mg, 0,46 mmol) y trietilamina (64 µl, 46 mg, 0,46 mmol) en diclorometano seco (1 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 45 min, se añadió una solución de (2R,3S)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (0,10 g, 0,46 mmol) (derivada de la sal de ácido di-p-toluoil-L-tartárico) y trietilamina (64 µl, 46 mg, 0,46 mmol) en diclorometano seco (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente, y luego se trató con hidróxido de sodio al 10% (1 ml). La mezcla bifásica se separó, y la capa orgánica y el extracto de cloroformo (2 ml) de la capa acuosa se concentraron por evaporación rotatoria. El residuo se disolvió en metanol y se purificó por HPLC en una columna de gel de sílice C18, usando un gradiente de acetonitrilo/agua, que contiene 0,05% ácido trifluoroacético, como eluyente. La concentración de las fracciones seleccionadas, reparto del residuo resultante entre cloroformo y bicarbonato de sodio acuoso saturado, y evaporación del cloroformo dio 82,5 mg (50% de rendimiento) de un polvo blanco. El espectro de RMN fue idéntico al obtenido para los isómeros 2S, 3R. Dado que el precursor inmediato de esta material (trans enantiómero B) es enantiomérico para el precursor inmediato del ácido compuesto 2S,3R (trans enantiómero A), la configuración absoluta de trans enantiómero B se presume que es 2R,3S.

Ejemplo 2: síntesis a gran escala de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il)benzofuran-2-carboxamida y sal p-toluenosulfonato (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-1-benzofuran-2-carboxamida

2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona

- 30 Se añadieron clorhidrato de 3-quinuclidinona (8,25 kg, 51,0 mol) y metanol (49,5 l) a un matraz de cristal de reacción de 100 l, bajo atmósfera de nitrógeno, equipado con un agitador mecánico, sonda de temperatura, y condensador. Se añadió hidróxido de potasio (5,55 kg, 99,0 mol) a través de un embudo de polvo durante un periodo de unos 30 min, resultando un aumento de la temperatura de reacción de 50°C a 56°C. Durante un periodo de unas 2 h, se añadió 3-piridincarboxaldehído (4,80 kg, 44,9 mol) a la mezcla de reacción. La mezcla resultante se agitó a 20°C +/- 5°C durante al menos 12 h, y la reacción se controló por cromatografía de capa fina (TLC). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado y la torta de filtrado se lavó con metanol (74,2 l). El filtrado se concentró, se transfirió a un matraz de reacción, y se añadió agua (66,0 l). La suspensión se agitó durante al menos 30 min, se filtró, y la torta del filtro se lavó con agua (90,0 l) hasta que el pH del enjuagado era 7-9. El sólido se secó al vacío a 50°C +/-5°C durante al menos 12 h para dar 8,58 kg (89,3%) de 2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona.

Sal (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona di-p-toluoil-D-tartrato

- 40 Se añadió 2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona (5,40 kg, 25,2 mol) y metanol (40,5 l) a un recipiente de reacción de 72 l en atmósfera inerte equipado con un agitador mecánico, sonda de temperatura, sistema de regulación de gas a baja presión y manómetro. El espacio superior se llenó con nitrógeno, y la mezcla se agitó para obtener una solución de color amarillo claro. Al matraz se le añadió 10% de paladio sobre carbono (50% húmedo) (270 g). La atmósfera del reactor se evacuó usando una bomba de vacío, y el espacio superior fue reemplazado con hidrógeno a 2,49kPa a 4,98kPa (10-20 pulgadas de presión de agua). La evacuación y presurización con hidrógeno se repitió 2 veces más, dejando el reactor bajo 4,98kPa (20 pulgadas de presión hidrostática de gas hidrógeno) después de la tercera presurización. La mezcla de reacción se agitó a 20°C +/- 5°C durante al menos 12 h, y la reacción se monitorizó mediante TLC. Una vez completada la reacción, la suspensión se filtró a través de un lecho de Celite ® 545 (1,9 kg) en un embudo de vidrio sinterizado, y la torta de filtrado se lavó con metanol (10,1 l). El filtrado se concentró para obtener un semi-sólido que se transfirió, bajo atmósfera de nitrógeno, a un matraz de reacción de 200 L equipado con un agitador mecánico, condensador y sonda de temperatura. El residuo semi-sólido se disolvió en ácido etanol (57,2 l), y se añadió ácido di-p-toluoil-D tartárico-(DTTA) (9,74 kg, 25,2 mol). La mezcla de reacción agitada se calentó a reflujo durante al menos 1 h, y para un mínimo adicional de 12 h, mientras la reacción se enfrió a entre 15°C y 30°C. La suspensión se filtró usando un filtro de mesa, y la torta de filtrado se lavó con etanol (11,4 l). El producto se secó al vacío a temperatura ambiente para obtener 11,6 kg (76,2% de rendimiento, 59,5% ponderado para pureza) de sal (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona di-p-toluoil-D-tartrato.

Sal (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano di-p-toluoil-D-tartrato

Se añadieron agua (46,25 l) y bicarbonato sodico (4,35 kg, 51,8 mol) a un matraz de 200 l. Una vez completa la disolución, se añadió diclorometano (69,4 l). Se añadió sal (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona-di-p-toluoil-D-tartrato (11,56 kg, 19,19 mol), y la mezcla de reacción se agitó entre 2 min y 10 min. Las capas se dejaron separar durante al menos 2 min (se añadió agua adicional (20 l) cuando fue necesaria para dividir las capas). La fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. A la fase acuosa restante se añadió diclorometano (34,7 l), y la suspensión se agitó durante entre 2 min y 10 min. Las capas se dejaron separar entre 2 min y 10 min. Una vez más, la fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato de anhidro de sodio. La extracción de la fase acuosa con diclorometano (34,7 l) se repitió una vez más, como antes. Las muestras de cada extracción se sometieron a análisis HPLC quiral. El sulfato sódico se eliminó por filtración, y los filtrados se concentraron para dar (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona (4,0 kg) como un sólido

La (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona (3,8 kg) se transfirió a un matraz de vidrio limpio de reacción de 100 l, bajo atmósfera de nitrógeno, equipado con un agitador mecánico y sonda de temperatura. Se añadieron tetrahidrofurano anhidro (7,24 l) y (+)-(R)- α -metilbencilamina (2,55 l, 20,1 moles). Isopropóxido de titanio (IV) (6,47 l, 21,8 mol) se añadió a la mezcla de reacción agitada durante un período de 1 h. La reacción se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante al menos 12 h. Se añadió etanol (36,17 l) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se enfrió por debajo -5°C, y borohidruro de sodio (1,53 kg, 40,5 mol) se añadió en porciones, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 15°C (esta adición tardó varias horas). La mezcla de reacción se agitó entonces a 15°C +/-10°C durante al menos 1 h. La reacción se controló por HPLC, y tras finalizar la reacción (como se indica por menos de 0,5% restante de (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona), hidróxido sódico 2 M (15,99 l) se añadieron y la mezcla se agitó durante al menos 10 min. La mezcla de reacción se filtró por un lecho de Celite® 545 en un embudo de mesa. La torta de filtrado se lavó con etanol (15,23 l), y el filtrado se concentró para obtener un aceite.

El concentrado se transfirió a un matraz de vidrio de reacción limpio de 100 l equipado con un agitador mecánico y una sonda de temperatura en atmósfera inerte. Se añadió agua (1 l), y la mezcla se enfrió a 0°C +/-5°C. Se añadió ácido clorhídrico 2 M (24 l) a la mezcla para ajustar el pH de la mezcla a pH 1. La mezcla se agitó luego durante al menos 10 min, y se añadió hidróxido sódico 2 M (24 l) lentamente para ajustar el pH de la mezcla a pH 14. La mezcla se agitó durante un mínimo de 10 min, y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 15,23 l). Las fases orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (2,0 kg), se filtraron, y concentraron para dar (2S,3R)-N-((1R)-feniletilel)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (4,80 kg, 84,7% de rendimiento).

El (2S,3R)-N-((1R)-feniletilel)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano se transfirió a un matraz de 22 l de vidrio provisto de agitador mecánico y sonda de temperatura en atmósfera inerte. Se añadió agua (4,8 l), y la mezcla agitada se enfrió a 5°C +/- 5°C. Se añadió lentamente al matraz ácido clorhídrico concentrado (2,97 l) de reacción, manteniendo la temperatura de la mezcla a menos de 25°C. La solución resultante se transfirió a un matraz de reacción de 72 l con etanol (18 l), equipado con agitador mecánico, sonda de temperatura, y condensador en atmósfera inerte. Al matraz se añadió 10% de paladio sobre carbono (50% húmedo) (311,1 g) y ciclohexeno (14,36 l). La mezcla de reacción se calentó hasta casi reflujo durante al menos 12 h, y la reacción se controló por TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió por debajo de 45°C, y se filtró por un lecho de Celite® 545 (1,2 kg) sobre un embudo de vidrio sinterizado. La composición filtrada se lavó con etanol (3 l) y el filtrado se concentró para obtener una fase acuosa. Se añadió agua (500 ml) a la concentración filtrada, y esta capa acuosa combinada se lavó con metil terc-butil éter (MTBE) (2 x 4,79 l). Se añadió hidróxido sódico 2 M (19,5 l) a la fase acuosa para ajustar el pH de la mezcla a pH 14. La mezcla se agitó después durante al menos 10 min. La fase acuosa se extrajo con cloroformo (4 x 11,96 l), y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro (2,34 kg). El filtrado se filtró y se concentró para obtener (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (3,49 kg, > rendimiento cuantitativo) como un aceite.

El (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano se transfirió a un matraz limpio de reacción de 100 l equipado con agitador mecánico, condensador y sonda de temperatura en atmósfera inerte. Se añadieron etanol (38,4 l) y ácido di-p-toluoil-D-tartárico (3,58 kg, 9,27 mol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo suave durante al menos 1 h. La mezcla de reacción se agitó después durante al menos 12 h mientras se enfriaba a entre 15°C y 30°C. La suspensión resultante se filtró, y la mezcla resultante se lavó con etanol (5,76 l). La mezcla filtrada se transfirió a un matraz de vidrio de reacción limpio de 100 l equipado con agitador mecánico, sonda térmica, y condensador bajo atmósfera inerte. Se añadió una mezcla 9:1 de etanol/agua (30,7 l), y la suspensión resultante se calentó a reflujo suave al menos 1 h. La mezcla de reacción se agitó después por al menos 12 h mientras se enfrió entre 15°C y 30°C. La mezcla se filtró y la masa filtrada se lavó con etanol (5,76 l). El producto se recogió y se secó a vacío a 50°C \pm 5°C durante al menos 12 h para dar 5,63 kg (rendimiento 58,1%) de sal (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano di-p-toluoil-D-tartrato.

(2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Se añadieron sal (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano di-p-toluoil-D-tartrato (3,64 kg, 5,96 mol) y solución acuosa al 10% de cloruro sódico (14,4 l, 46,4 mol) a un matraz de reacción de vidrio de 72 l equipado con agitador mecánico bajo atmósfera inerte. Se añadió hidróxido sódico 5 M (5,09 l) a la mezcla agitada para ajustar el pH de la mezcla a pH 14. La mezcla se agitó después durante al menos 10 min. La solución acuosa se

extrajo con cloroformo (4 x 12,0 l), y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro (1,72 kg). Las capas orgánicas combinadas se filtraron, y el filtrado se concentró para obtener (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (1,27 kg) como un aceite.

5 El (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano se transfirió a un matraz de vidrio de reacción de 50 l equipado con agitador mecánico bajo atmósfera inerte. Se añadieron a la mezcla de reacción diclorometano (16,5 l), trietilamina (847 ml, 6,08 mol), ácidobenzofuran-2-carboxílico (948 g, 5,85 mol) y O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N,1-hexafluorofosfato de tetrametiluronio (HBTU) (2,17 kg, 5,85 mol). La mezcla se agitó durante al menos 4 horas a temperatura ambiente, y la reacción se siguió por HPLC. Una vez completa la reacción, se añadió carbonato de potasio acuoso al 10% (12,7 l, 17,1 mol) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante al menos 5 min. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera al 10% (12,7 l). Las capas se separaron y la fase orgánica se enfrió a 15°C ±10°C. Se añadió ácido clorhídrico 3M (8,0 l) lentamente a la mezcla de reacción para ajustar el pH de la mezcla a pH 1. La mezcla se agitó después al menos 5 min, y las capas se dejaron partir al menos 5 min. Los sólidos se filtraron con un filtro de mesa. Las capas de filtrado se separaron y la fase acuosa y los sólidos del embudo se transfirieron al matraz de reacción. Se añadió lentamente hidróxido de sodio 3M (9,0 l) al matraz en porciones para ajustar el pH de la mezcla a pH 14. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 16,5 l). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro (1,71 kg). La mezcla se filtró, y el filtrado se concentró para dar (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il)benzofuran-2-carboxamida (1,63 kg, 77,0% de rendimiento) como un sólido amarillo.

P-toluenosulfonato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

20 Se añadieron en una garrafa (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-il)benzofuran-2-carboxamida (1,62 kg, 4,48 mol) y diclorometano (8,60 kg). El porcentaje peso/peso del material en solución se determinó por análisis HPLC. La solución se concentró a un aceite, se añadió acetona (4 l), y la mezcla se concentró a un sólido aceitoso. Se añadió más acetona (12 l) al sólido aceitoso en el bulbo evaporador rotatorio, y la suspensión resultante se transfirió a un matraz de vidrio de reacción de 50 l con agitador mecánico, sonda de temperatura, y condensador bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se calentó a 50°C ± 5°C. Se añadió a la solución agua (80,7 g), y se agitó por al menos 10 min. Se añadió a la mezcla de reacción ácido p-toluenosulfónico (853 g, 4,44 mol) en porciones durante unos 15 min. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se mantuvo a esa temperatura durante al menos 30 minutos para obtener una solución. La reacción se enfrió a 40°C ± 5°C durante unas 2 h. Se añadió acetato de isopropilo (14,1 l) durante unas 1,5 h. La mezcla de reacción se enfrió lentamente a temperatura ambiente durante al menos 10 h. La mezcla se filtró y la torta filtrada se lavó con acetato de isopropilo (3,5 l). El producto aislado se secó a vacío a 105°C±5°C durante entre 2 h y 9h para dar 2,19 kg (88,5% rendimiento) de p-toluenosulfonato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, *mp* 226-228°C. ¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ 8,29 (s, 1H), 7,78 (m, J = 5,1, 1H), 7,63 (d, J = 7,9, 1H), 7,54 (d, J = 7,8, 1H), 7,49 (d, J = 8,1, 2H), 7,37 (m, J = 8,3, 1H), 7,33 (m, J = 8,3, 6,9, 1,0, 1H), 7,18 (m, J = 7,8, 6,9, 1,0, 1H), 7,14 (d, J = 8,1, 2H), 7,09 (s, 1H), 6,99 (dd, J = 7,9, 5,1, 1H), 4,05 (m, J = 7,7, 1H), 3,74 (m, 1H), 3,47 (m, 2H), 3,28 (m, 1H), 3,22 (m, 1H), 3,15 (dd, J = 13,2, 4,7, 1H), 3,02 (dd, J = 13,2, 11,5, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,02 (m, 2H), 1,93 (m, 2H), 1,79 (m, 1H), ¹³C RMN (126 MHz, D₂O) δ 157,2, 154,1, 150,1, 148,2, 146,4, 145,2, 138,0, 137,0, 130,9, 128,2 (2), 126,9, 126,8, 125,5 (2), 123,7, 123,3, 122,7, 111,7, 100,7, 61,3, 50,2, 48,0, 40,9, 33,1, 26,9, 21,5, 20,8, 17,0.

40 Muestras de este material se convirtieron en base libre de Compuesto A (para uso en estudios de selección de sal) por tratamiento con hidróxido sódico acuoso y extracción con cloroformo. La evaporación completa del cloroformo dejó un polvo blanco, *mp* 167-170°C, con las siguientes características espectrales: Electropulverización iones positivos MS [M + H]⁺ iones m/z = 362. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,53 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 8,43 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 8,28 (dd, J = 1,6, 4,7 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,66 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,63 (dt, J = 1,7, 7,7 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,46 (m, J = 8,5, 7,5 Hz, 1H), 7,33 (m, J = 7,7, 7,5 Hz, 1H), 7,21 (dd, J = 4,7, 7,7 Hz, 1H), 3,71 (m, J = 7,6 Hz, 1H), 3,11 (m, 1H), 3,02 (m, 1H), 2,80 (m, 2H), 2,69 (m, 2H), 2,55 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 1,56 (m, 1H), 1,26 (m, 1H), ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-d₆) δ 158,1, 154,1, 150,1, 149,1, 146,8, 136,4, 135,4, 127,1, 126,7, 123,6, 122,9, 122,6, 111,8, 109,3, 61,9, 53,4, 49,9, 40,3, 35,0, 28,1, 26,1, 19,6.

50 La sal monoclóhidrato del compuesto A (Véase Ejemplo 5) se sometió a análisis cristalográfico de rayos X. La estructura cristalina resultante (mostrada en las Figuras 10A y 10B, respectivamente) estableció la configuración absoluta 2S,3R del Compuesto A.

Ejemplo 3: Síntesis de sal fosfato (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil) metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

55 A un matraz de fondo redondo se añadió (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (8,18 g, 22,6 mmol) y 2-propanol (180 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 65-70°C hasta que todo sólidos se hubieron disuelto. La solución se agitó vigorosamente a 65-70°C, y se añadió ácido fosfórico (1,65 ml, 24,3 mmol) a gotas con una pipeta. Inmediatamente se formó un sólido blanco granulado. La mezcla se agitó a 65-70°C durante 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente (23°C) y se agitó durante otras 24 h. Los sólidos blancos se recogieron por filtración con succión, la torta filtrada se lavó con 2-propanol (20 ml) y el sólido se secó al aire durante al menos 1 h. La sólido se secó más en un horno de vacío a 75°C durante la noche (16 h) para dar 10,7 g

del producto (>rendimiento cuantitativo), pf 265-273°C con descomposición, con cambios de cristalinidad observados a ~180°C. ¹H-RMN (DMSO-d₆) indicó la presencia de 2-propanol (solvato fuerte), lo que puede explicar el rendimiento mayor que cuantitativo. El análisis quiral LC dio una pureza de 97,1% (270 nm).

5 **Ejemplo 4: Síntesis de sal maleato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida**

Se añadió ácido maleico (0,067 g, 0,630 mmol) a una suspensión caliente de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (0,203 g, 0,560 mmol) en acetato de isopropilo (2 ml), depositando sólidos finos de color blanco, junto con un residuo gomoso. Se añadieron más acetato de isopropilo (3 ml) y ácido maleico (0,006 g) y la mezcla se calentó a reflujo. Se añadió isopropanol (5 ml) a reflujo. La mezcla
10 resultante de sólidos blancos se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, y los sólidos se lavaron con acetato de isopropilo (2 ml). El producto se secó al vacío a 60°C durante 18 h para dar 0,228 g de un sólido blanquecino escamoso (84,7% rendimiento), pf 180-182 ° C. ¹H RMN (DMSO-d₆) indicó una estequiometría mono-sal. Calc. para C₂₂H₂₃N₃O₂ · C₄H₄O₄: C, 65,40, H, 5,70, N, 8,80 Encontrado: C, 65,35, 65,29, H, 5,86, 5,68, N, 8,69, 8,78.

15 **Ejemplo 5: Síntesis de sales de clorhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida**

Monoclorhidrato: Se preparó una solución ácido clorhídrico/THF añadiendo ácido clorhídrico concentrado (1,93 ml de 12 M, 23,2 mmol) en gotas a 8,5 ml de THF enfriado. La solución se calentó a temperatura ambiente. A un matraz de fondo redondo se añadió (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (8,49 g, 23,5 mmol) y acetona (85 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 45-50°C hasta que se obtuvo una solución
20 completa. La mezcla ácido clorhídrico/THF preparada anteriormente se añadió gota a gota durante un período de 5 min, con más THF (1,5 ml) usado en la transferencia. Se empezaron a formar sólidos granulados blancos durante la adición de la solución ácida. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y se agitó durante la noche (16 h). Los sólidos se recogieron por filtración con succión, la torta del filtro se lavó con acetona (10 ml), y el sólido se secó al aire con succión durante 30 minutos. El sólido se secó adicionalmente en un horno de vacío a 75°C durante 2 h para dar 8,79 g de cristales blancos finos (94% de rendimiento), pf 255-262°C. El análisis quiral LC dio una pureza de 98,8% (270 nm). ¹H-RMN (DMSO-d₆) no muestra disolventes residuales y confirma estequiometría mono. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10,7 (s ancho, 1H-amonio cuaternario), 8,80 (s ancho, 1H-amida H), 8,54 (s, 1H), 8,23 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,60 (d, 1H), 7,47 (m, 2H), 7,33 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,05-3,55 (m, 6H), 2,00 a 2,10 (m, 3H), 1,90 (m, 1H), 1,70 (m, 1H). Un análisis cristalografico de rayos x de esta sal estableció la distribución estereoquímica y la estequiometría (véanse figuras 10A y 10B).
30

Diclorhidrato: se burbujeó cloruro de hidrógeno gaseoso lentamente en una solución enfriada con hielo de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (1,9 g, 5,3 mmol) en éter anhidro (25 ml). Los volátiles se eliminaron, primero en una corriente de nitrógeno y después con alto vacío (lavador de hidróxido de sodio en línea de alto vacío). El residuo se trituró varias veces con pequeños volúmenes de éter anhidro
35 (desechado), y el sólido restante se secó a alto vacío. Esto dio 2,17 g (94% de rendimiento) de un polvo blanquecino, pf 210-212°C (higroscópico). El análisis quiral LC dio una pureza de 93,7% (270 nm). Electropulverización de iones positivos ion MS [M + H]⁺ m/z = 362. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 9,15 (s, 1H), 8,84 (d, 1H), 8,63 (d, 1H), 7,97 (t, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,52 (m, 2H), 7,35 (t, 1H), 4,50 (m, 1H), 4,32 (m, 1H), 3,40-3,85 (m, 6H), 1,95-2,40 (m, 5H).

40 **Ejemplo 6: Síntesis de sal hemigalactarato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida**

Se añadió ácido galactárico (múxico) (36,3 mg, 0,173 mmol) a una solución de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (125 mg, 0,346 mmol) en etanol caliente (1 ml). La mezcla se sometió a reflujo mientras se añadía agua (8 gotas), luego, la mezcla caliente se filtró a través de un tapón de algodón que después se enjuagó con etanol (1 ml). El enfriamiento no dio un precipitado. Los volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria, y el residuo (espuma blanca) se trituró con isopropanol (desechado), y el sólido restante se disolvió en un reflujo de acetona/agua (4 ml de 7:1). El enfriamiento lento a 5°C produjo un sólido blanco, que se filtró, se lavó con isopropanol (3 x 1 ml), y se secó a alto vacío. Esto dejó 118 mg (73% de rendimiento) de finas placas de color blanco, pf 134-139°C. ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8,29 (s, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,62 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,35 (m, 2H), 7,18 (t, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,98 (m, 1H), 4,08 (s, 1H, ácido galactárico), 3,98 (d, 1H), 3,77 (s, 1H, galactárico), 3,66 (m, 1H), 3,35 (m, 1H), 2,95-3,30 (m, 4H), 1,65-2,05 (m, 5H).
50

Ejemplo 7: Síntesis de sal D-tartrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Se añadió ácido tartárico (25,6 mg, 0,173 mmol) a una solución de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (125 mg, 0,346 mmol) en etanol caliente (1 ml). La solución resultante fue lentamente enfriada a temperatura ambiente. No se precipitaron sólidos, por lo que la solución se concentró para dar una espuma blanca. Los intentos de cristalizar en isopropanol fallaron. La espuma se disolvió en metanol y se añadió otro semi-equivalente de ácido tartárico (25,6 mg, 0,173 mmol). La mezcla se concentró para
55

dar una espuma blanca, que no cristalizó a partir de mezclas de metanol e isopropanol. El material concentrado (mezcla de líquido y sólido gomoso) fue después suspendido en acetato de etilo (1 ml), produciendo un sólido blanco. Este se aisló por filtración (lavado de acetato de etilo) y secó en horno de vacío (18 h a 40°C), para dar 141 mg (79,7% de rendimiento) de la sal de mono estequiometría (RMN), pf 136-140°C. El análisis quiral LC dio una pureza de 98,1% (270 nm). ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8,50 (s, 1H), 8,01 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,38 (t, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,21 (t, 1H), 4,34 (s, 2H, ácido tartárico), 4,26 (d, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,64 (m, 2H), 3,15-3,55 (m, 4H), 1,90-2,30 (m, 5H).

Ejemplo 8: Síntesis de sal metanosulfonato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Se añadió ácido metanosulfónico (33,2 mg, 0,346 mmol) a una solución de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (125 mg, 0,346 mmol) en etanol caliente (1 ml). El enfriamiento no logró producir un precipitado. La mezcla se calentó a reflujo, y la mezcla caliente se filtró a través de un tapón de algodón, que posteriormente se aclaró con metanol (1 ml). Los volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria y el residuo (espuma amarilla clara) se disolvió en isopropanol caliente (1 ml). De nuevo, el enfriamiento no dio un precipitado. El isopropanol se evaporó, y el residuo se suspendió en acetona (1 ml). La filtración y secado en horno de vacío (18 h a 50°C) dieron 146 mg (92,5% de rendimiento) de un sólido de color beige claro, pf 240-243°C. ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8,32 (s, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,66 (d, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,38 (m, 2H), 7,20 (m, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,01 (m, 1H), 4,09 (d, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,47 (m, 2H), 3,00-3,40 (m, 4H), 2,67 (s, 3H, ácido metanosulfónico), 1,75-2,15 (m, 5H).

Ejemplo 9: Síntesis de sal D-mandelato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Se añadió ácido D-mandélico (52,6 mg, 0,346 mmol) a una solución de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (125 mg, 0,346 mmol) en etanol caliente (1 ml). La dilución con acetato de etilo (4 ml) y la refrigeración no produjo un precipitado. Los volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria y el residuo (espuma blanca) se disolvió en isopropanol caliente (0,5 ml). El enfriamiento a 5°C produjo cristales blancos que se recogieron mediante filtración por succión. El secado en horno de vacío (18 h a 45°C) dio 111 mg (62,4% de rendimiento) de un sólido beige claro, pf 188,5-193°C. ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8,33 (s, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,67 (d, 1H), 7,60 (d, 1H), 7,27 (m, 8H, incluye ácido mandélico), 7,12 (s, 1H), 7,01 (m, 1H), 4,85 (s, 1H, ácido mandélico), 4,10 (d, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,48 (m, 2H); 3,00-3,40 (m, 4H), 1,75-2,15 (m, 5H).

Ejemplo 10: Síntesis de sal de R-canforsulfonato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Se añadió ácido R-10-canforsulfónico (80,3 mg, 0,346 mmol) a una solución de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (125 mg, 0,346 mmol) en etanol caliente (1 ml). La refrigeración falló en depositar cualquier precipitado. Los volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria y el residuo (espuma blanca) se disolvió en isopropanol caliente (0,5 ml). El enfriamiento a 5°C produjo unos cristales blancos y una suspensión lechosa. Rascado de los lados del matraz con una espátula finalmente transformó la mezcla en una masa espesa de cristales blancos finos. Se añadió otros 0,5 ml de isopropanol, y los cristales se recogieron mediante filtración por succión. El secado en horno de vacío (5 horas a 70°C, seguido por 2 horas a 110°C) dio 193 mg (93,8% de rendimiento) de un sólido blanco, pf 149,5-156°C. ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8,30 (s, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,64 (d, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,36 (m, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,11 (s, 1H), 6,99 (m, 1H), 4,07 (d, 1H), 3,73 (m, 1H), 3,45 (m, 2H), 3,95-3,35 (m, 5H, incluye ácido canforsulfónico), 2,64 (d, 1H, ácido canforsulfónico), 2,22 (m, 2H), 1,70-2,10 (m, 8H, incluye ácido canforsulfónico), 1,45 (m, 1H, ácido canforsulfónico), 1,25 (m, 1H, canforsulfónico ácido), 0,85 (s, 3H, ácido canforsulfónico), 0,68 (s, 3H, ácido canforsulfónico).

Ejemplo 11 Síntesis de sal S-canforsulfonato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

Se añadió ácido S-10-canforsulfónico (80,3 mg, 0,346 mmol) a una solución de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (125 mg, 0,346 mmol) en etanol caliente (1 ml). La dilución con acetato de etilo (4 ml) y la refrigeración no depositan ningún precipitado. Los volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria, y el residuo (espuma blanca) se disolvió en isopropanol caliente (1,5 ml). El enfriamiento a 5°C produjo cristales blancos. La mezcla se concentró hasta ~0,5 ml y se enfrió de nuevo a 5°C. El sólido se recogió por filtración con succión y se secó al vacío, inicialmente 18 h a 45°C, pero luego a temperaturas sucesivamente más altas (por fin a 110°C) para eliminar el isopropanol residual. Esto proporcionó 143 mg (69,7% de rendimiento) de un sólido blanco, pf 153,5-157°C. ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8,29 (s, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,34 (m, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,99 (m, 1H), 4,05 (d, 1H), 3,73 (m, 1H), 3,44 (m, 2H), 3,95-3,35 (m, 5H, incluye ácido canforsulfónico), 2,67 (d, 1H, ácido canforsulfónico), 2,23 (m, 2H), 1,70-2,10 (m, 8H, incluye ácido canforsulfónico), 1,46 (m, 1H, ácido canforsulfónico), 1,25 (m, 1H, ácido canforsulfónico), 0,84 (s, 3H, ácido canforsulfónico), 0,64 (s, 3H, ácido canforsulfónico).

Usando procedimientos similares a los antes descritos (ejemplos 3-11), otras formas salinas se caracterizaron. Los resultados de estos preparados se muestran en ejemplos 12-14.

Ejemplo 12: Síntesis de sal sulfato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

- 5 Se precipitó una sal sulfato en una mezcla de acetato de isopropilo y agua. Pf 278°C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,28 (s ancho, 1H, amida), 8,56 (dd, 1H), 8,24 (t, 1H), 7,77 (d, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,40 (m, 2H), 7,35 (s, 1H), 7,21 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,10-3,60 (m, 5H), 2,05 (m, 3H), 1,92 (m, 1H), 1,73 (m, 1H).

Ejemplo 13: Síntesis de sal cetoglutarato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

- 10 Se precipitó una sal α-cetoglutarato a partir de acetato de isopropilo. Pf 177°C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,64 (s, 1H, amida), 8,50 (d, 1H), 8,20 (d, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,70 (d, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,32 (m, 2H), 7,18 (m, 1H), 4,10 (m, 1H), 3,78 (m, 2H), 3,00-3,45 (m, 5H), 2,81 (m, 2H, ácido cetoglutarico), 2,41 (m, 2H, ácido cetoglutarico), 1,96 (m, 3H), 1,83 (m, 1H), 1,60 (m, 1H).

Ejemplo 14: Síntesis de sal hipurato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

- 15 Se precipitó una sal hipurato a partir de acetona (demasiado higroscópica para obtener punto de fusión). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,79 (s, 1H, amida), 8,56 (d, 1H), 8,44 (s, 1H, ácido hipúrico), 8,29 (m, 1H), 7,87 (m, 2H, ácido hipúrico), 7,76 (d, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,54 (m, 1H), 7,49 (m, 4H, incluye ácido hipúrico), 7,34 (m, 2H), 7,21 (m, 1H), 3,91 (m, 1H), 3,74 (m, 2H), 3,00 a 3,50 (m, 5H), 2,80 (m, 2H, ácido hipúrico), 1,79 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,30 (m, 1H).
- 20

Ejemplo 15: Aislamiento de (2R,3R)- y (2S,3S)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y conversión en sales de ácido galactárico

- Una muestra del sobrenadante del aislamiento del *p*-toluenosulfato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida (Ejemplo 2) se concentró por evaporación rotatoria, se ajustó el pH 10 con hidróxido de sodio acuoso al 10% y se extrajo con diclorometano. El extracto de diclorometano se evaporó, y el residuo (1,8 g) se disolvió en etanol absoluto (55 ml) que contiene 0,5% de di-*n*-butilamina. Esta solución fue inyectada, en porciones de 0,25 ml, en una columna HPLC quiral Chiralpak® AD de 25 cm x 2,1, eluyendo con 60:40:0,2 hexano/etanol/di-*n*-butilamina (caudal = 30 ml/min), controlado a 270 nm. El aislamiento del efuyente eluyendo a ~7,5 min y el que eluye a ~13,5 min dió, después de la evaporación del disolvente, 0,48 g (98% de pureza quiral) y 0,47 g (pureza 99% quiral) respectivamente de aceite incoloro. Los dos espectros de RMN eran idénticos. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,49 (s, 1H), 8,45 (d, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,52 (m, 4H), 7,35 (t, 1H), 7,20 (dd, 1H), 7,05 (d, 1H), 4,55 (dt, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,22 (m, 1H), 2,90 (m, 5H), 2,09 (m, 1H), 1,88 (m, 4H).
- 25
- 30

- Una solución caliente de cada muestra de base libre en etanol absoluto (10 ml) se trató con un equivalente de ácido galactárico. Las mezclas resultantes se calentaron a 75°C durante 5 min y se enfriaron, con agitación, a temperatura ambiente. Los sólidos resultantes se recogieron mediante filtración por succión y se secaron al vacío, dando 0,65 g (87% de rendimiento) y 0,62 g (85% rendimiento), respectivamente, de un sólido granular blanco (pf 200-205°C en cada caso). ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8,38 (s, 1H), 8,28 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 7,70 (d, 1H), 7,59 (d, 1H), 7,48 (t, 1H), 7,40 (m, 1H), 7,32 (m, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,21 (s, 2H), 3,87 (s, 2H), 3,68 (m, 1H), 3,35 (m, 6H), 2,25 (m, 2H), 2,02 (m, 3H).
- 35

Ejemplo 16: Síntesis de sal *p*-clorobenzoato de (2R,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo [2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida

- Se añadió ácido *p*-cloro-benzoico sólido (46,8 mg, 0,299 mmol) en una porción a una solución del isómero que antes eluye de N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida del Ejemplo 15 (108 mg, 0,299 mmol) en acetona (10 ml). Esta mezcla se calentó casi a reflujo durante 30 min y se enfrió a temperatura ambiente. No se forma precipitado, por lo que la solución se concentró a un 20% de su volumen anterior (placa caliente), en cuyo punto comenzaron a formarse cristales. La mezcla se enfrió y se diluyó con isopropanol (2 ml). Esta mezcla se concentró por evaporación lenta a temperatura ambiente del disolvente, y los sólidos resultantes se recogieron y secaron. Esto produjo 145 mg (94% de rendimiento) de cristales amarillo claro, pf 150-152°C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,49 (s, 1H), 8,38 (d, 1H), 7,93 (d, 2H, ácido *p*-cloro-benzoico), 7,67 (m, 2H), 7,57 (d, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,36 (d, 2H, ácido *p*-cloro-benzoico), 7,30 (m, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,16 (m, 1H), 7,00 (d, 1H, amida), 6,90 (s ancho, amonio cuaternario), 4,62 (m, 1H), 3,85 (dd, 1H), 3,36 (m, 1H), 2,95-3,25 (m, 5H), 2,16 (s, 1H), 1,70-2,10 (m, 4H).
- 45
- 50

El análisis cristalografico de rayos X de esta muestra reveló que su estereoquímica absoluta era 2R,3R (véanse Figuras 11A y 11B). El isómero eluyente tardío del Ejemplo 15, tiene así por eliminación, una configuración absoluta 2S,3S

- 55 **Ejemplo 17: Método cromatográfico quiral para análisis de los estereoisómeros**

La generación de un método cromatográfico quiral para separar los cuatro estereómeros entre sí, resultó muy difícil. Los intentos iniciales (usando fase móvil hexano / isopropanol/trietilamina) dio lugar a solapamiento de picos y formas de picos menos que óptimas. El cambio de isopropanol a etanol y de trietilamina a di-*n*-butilamina mejoró la resolución y formas de pico y acortó el tiempo de ejecución. Los detalles del método son las siguientes:

5 Columna analítica: Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 5 µm)

Fase móvil: 60:40:0,2 hexanos/etanol/di-*n*-butilamina

Volumen de inyección: 10 µl

Caudal: 1,0 ml por minuto

Temperatura: 20°C

10 Detección: UV a 270 nm

Tiempo de ejecución total: ~ 25 minutos

Orden de elución (RT): 2S,3R (5,3 min); 2R,3S (7,3 min); 2R,3R (8,3 min); 2S,3S (12,1 min)

Un cromatograma representativo de los análogos de estereoisómeros se muestra en Figura 12.

15 **Ejemplo 18: XRPD** El análisis de XRPD se realizó para varias muestras de sales aquí descritas. Se proporcionan patrones de difracción para las sales clorhidrato (Figura 13) y tosilato (Figura 14).

Difracción de Rayos-X de Polvo (XRPD)

20 Patrones de difracción de Rayos X de polvo fueron recogidos en uno o ambos de dos instrumentos. Algunos se recogieron en un Difractómetro Siemens D5000 con radiación CuKα (40 kV, 40 mA), goniómetro θ-θ, divergencia V20 y ranuras receptoras, un monocromador de grafito secundario y un contador de centelleo. El instrumento se comprueba mediante un Corundum estándar certificado (NIST, 1976). Las muestras ejecutadas en condiciones ambientales se prepararon como muestras de placa plana usando polvo tal como se recibió. Aproximadamente 35 mg de la muestra se llena cuidadosamente en un corte de cavidad en oblea de silicio pulido de fondo cero (510). La muestra se hizo girar en su propio plano durante el análisis, explorando desde 2° a 42° en pasos de 0,05° a 4 segundos por paso, usando CuKα1 (λ = 1,5406Å).

25 Algunos de los patrones de difracción de rayos X de polvo se recogieron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación CuKα (40 kV, 40 mA), etapa automatizada XYZ, microscopio láser de vídeo para posicionamiento automático de la muestra y un detector de área bidimensional HISTAR. La óptica de rayos X consiste en un único espejo multicapa Göbel acoplado con un colimador de orificio de 0,3 mm. La divergencia del haz (es decir, el tamaño efectivo del haz de rayos X en la muestra) fue de aproximadamente 4 mm. Un modo de escaneo continuo θ-θ fue empleado con una distancia muestra-detector de 20 cm que da un rango 2θ eficaz de 3,2°-30,0°. Normalmente, la muestra se expone al haz de rayos X durante 120 segundos. Las muestras ejecutadas bajo condiciones ambientales se prepararon como muestras de placa plana usando polvo como recibido sin moler. Unos 1-2 mg de la muestra se presionan ligeramente sobre una oblea de silicio para obtener una superficie plana. Las muestras ejecutadas bajo condiciones no-ambientales se montaron sobre una oblea de silicio con compuesto conductor de calor. La muestra se calentó luego a la temperatura apropiada a ca. 10 ° C/min y después se mantuvo isotérmicamente durante unos 5 min antes de que se iniciara la recogida de datos.

Calorimetría de Escaneo Diferencial (DSC)

40 Se recogieron datos DSC en un instrumento TA Q1000 equipado con un auto- muestreador de 50 posiciones. El instrumento fue calibrado para calibración de energía y temperatura usando indio certificado. Normalmente 0,5-1,5 mg de cada muestra, en una taza de aluminio agujereada, se calentaron a 10°C/min desde 25°C a 175-200°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 30 ml/min por la muestra.

Análisis termogravimétrico (TGA)

45 Los datos de TGA se recogieron en un instrumento TA TGA Q500, equipada con auto-muestreador de 16 posiciones. El instrumento fue calibrado a temperatura con Alumel certificado. Normalmente 5-10 mg de cada muestra se cargó en un crisol pretarado de platino y taza DSC de aluminio, y se calentó a 10°C/min desde temperatura ambiente hasta 350°C. Una purga de nitrógeno a 60 ml/min se mantuvo sobre la muestra.

Microscopía de luz polarizada (PLM)

50 Las muestras fueron estudiadas en un microscopio de luz polarizada Leica LM/DM con una cámara de vídeo digital para capturar imágenes. Una pequeña cantidad de cada muestra se colocó en un portaobjetos de vidrio, montado en aceite de inmersión y cubierto con un cubreobjetos de cristal, las partículas individuales separándose de la mejor

manera posible. La muestra se observó con el aumento adecuado y luz parcialmente polarizada, acoplada a un filtro λ de color falso.

Microscopía de platina caliente (HSM)

5 La microscopía de platina caliente se llevó a cabo usando un microscopio de luz polarizada Leica LM/DM combinado con un Mettler-Toledo MTFP82HT de platina caliente y una cámara de vídeo digital para captura de imágenes. Una pequeña cantidad de cada muestra se colocó en un portaobjetos de vidrio con las partículas individuales separadas tanto como era posible. La muestra fue vista con aumento adecuado y luz parcialmente polarizada, acoplada a un filtro λ de color falso, mientras siendo calentado desde la temperatura ambiente a 10°C/min normalmente.

Sorción gravimétrica de Vapor (GVS)

10 Se determinaron isotermas de sorción en uno o ambos de los dos instrumentos. Algunos experimentos se llevaron a cabo usando un analizador de sorción de humedad VTI Corporation SGA-100, controlado por software VTI FlowSystem 4. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25°C con la ayuda de un baño de temperatura constante Polyscience. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo. El cambio de peso como función del % de HR se controló usando una Cahn Digital Recording Balance D-200 con una precisión de +/-0,0001 g.

15 Normalmente, se colocó una muestra de 10-20 mg en el platillo de la balanza calibrada en condiciones ambientales. La muestra se secó a 50°C durante 1 h. La isoterma estándar de adsorción se realizó a 25°C en intervalos de 5% RH sobre un rango de HR 5-95%, y la isoterma de desorción se realiza de manera similar a 25°C en intervalos de 5% de HR en un rango de HR 95-5%. Los criterios de equilibrio de la muestra incluyen 0,0100% en peso en 5 min o un tiempo de equilibrio máximo de 180 min para cada punto de datos de % de HR.

20 Algunas isotermas de sorción se obtuvieron usando un analizador de sorción de humedad Hiden IGASorp, controlado por un software CFRSorp. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25°C por un baño de agua recirculante Huber. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un caudal total de 250 ml/min. La HR se midió mediante una sonda calibrado Vaisala RH (rango dinámico 0-95% de HR), situada cerca de la muestra. El cambio de peso, (relajación de masa) de la muestra en función del % de HR se monitorizó constantemente por la microbalanza (precisión $\pm 0,001$ mg). Se colocaron 10-20 mg de muestra en una cesta de malla de acero inoxidable calibrada en condiciones ambientales. La muestra se cargó y descargó a 40% de HR y 25°C (condiciones ambientales típicas). Se realizó una isoterma de absorción de humedad como se indica a continuación (2 exploraciones dando un ciclo completo). La isoterma estándar se realizó a 25°C en intervalos del 10% de HR en un rango de 0-90% de humedad relativa.

Parámetros genéricos de método GVS

[149]

Parámetros	Valores
Adsorción – Exploración 1	40-90
Desorción/adsorción-exploración 2	85-secado, secado-40
Intervalos (% RH)	10
Número de exploraciones	2
Caudal (ml/min)	250
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C/min)	0,05
Tiempo mínimo de sorción (horas)	1
Máximo tiempo de sorción (horas)	4
Modo	AF2
Precisión (%)	98

5 El software utiliza un procedimiento de minimización de mínimos cuadrados junto con un modelo de relajación de masa, para predecir un valor asintótico. El valor medido de relajación de masa debe estar dentro del 5% de lo predicho por el software, antes de que el siguiente valor de % RH sea seleccionado. El tiempo de equilibrado mínimo se establece en 1 h y el máximo en 4 h. Normalmente, las muestras se recuperaron después de la finalización de la isoterma y re-analizaron mediante XRPD.

Determinación de agua por Karl Fischer (KF)

10 El contenido de agua de cada muestra se midió en un coulombímetro Mettler Toledo DL39 usando un reactivo Coulomat HydranalAG y una purga de argón. Muestras sólidas pesadas se introdujeron en el recipiente sobre una bandeja de platino TGA que estaba conectada a un subsello para evitar entrada de agua. Unos 10 mg de muestra se utilizaron para valoración y se hizo una determinación duplicada.

Solubilidad Termodinámica acuosa mediante HPLC

15 La solubilidad acuosa se determinó mediante suspendiendo suficiente compuesto en 0,25 ml de agua para dar una concentración máxima final ≥ 10 mg/ml de la forma libre parental del compuesto. La suspensión se equilibró a 25°C durante 24 h, y luego se midió el pH. La suspensión se filtró luego a través de un filtro de fibra de vidrio C en una placa de 96 pocillos. El filtrado se diluyó a continuación por un factor de 101. La cuantificación se realizó por HPLC con referencia a una solución estándar de, unos 0,1 mg/ml en DMSO. Se inyectaron diferentes volúmenes de las soluciones de muestras estándar, diluidas y sin diluir. La solubilidad se calculó usando las áreas de pico determinadas por integración del pico encontrado en el mismo tiempo de retención que el pico principal en la inyección estándar. Si no había suficiente sólido en la placa de filtro, el XRPD fue recogido.

20 **Detalles del método genérico para el método termodinámico de solubilidad acuosa**

Tipo de método	Fase inversa con elución en gradiente		
Columna:	Phenomenex Luna C18 (2) 5 μ m 50x 4,6 mm		
Temperatura de columna (°C):	25		
Inyección	5, 8 y 50		
Detección:	260,80		
Longitud de onda, amplitud de banda (nm)			
Caudal (ml/min)	2		
Fase A	0,1% TFA en agua		
Fase B	0,085% TFA en acetonitrilo		
Horario	Tiempo(min)	% Fase A	% Fase B
	0,0	95	5
	1,0	80	20
	2,3	5	95
	3,3	5	95
	3,5	95	5
	4,4	95	5

Pureza química por HPLC

El análisis de pureza se realizó por un sistema Agilent serie HP1100 equipado con un detector de matriz de diodos y usando software ChemStation v9. Se usó uno de los dos métodos que se describen a continuación.

ES 2 606 752 T3

Método 1

Tipo de método:	Fase inversa con elución en gradiente		
Columna	Kromasil 5µm C18, 150 x 4,6 mm		
Temperatura de columna (°C)	26		
Inyección (ml)	10		
Detección: Longitud de onda, amplitud de banda(nm)	302,8		
Caudal (ml/min)	1,0		
Fase A:	0,0256 M KH ₂ P0 ₄ + sal de Na ácido 1-hexano sulfónico 0,02M		
Fase B:	Acetonitrilo		
Horario:	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
	0	90	10
	8	90	10
	40	10	90
	41	90	10
	49	90	10
	50	90	10

Método 2

Tipo de método	Fase inversa con elución en gradiente		
Columna:	Phenomenex Luna C18 (2) 5 nm 150x 4,6 mm, 5µM		
Temperatura de columna (°C):	25		
Inyección	5		
Detección: Longitud de onda, amplitud de banda(nm)	255,90		
Caudal (ml/min)	1		
Fase A	0,1% TFA en agua		
Fase B	0,085% TFA en acetonitrilo		
Horario	Tiempo(min)	% Fase A	% Fase B
	0	95	5
	25	5	95

Tipo de método	Fase inversa con elución en gradiente		
	25,2	95	5
	30	95	5

Cromatografía Iónica

- 5 Los datos se recogieron en un Advanced Compact IC Metrohm 861 usando el software IC Net v2.3. Las muestras se prepararon como soluciones madre de 1000 ppm en agua. Donde la solubilidad de la muestra fue baja, se utilizó un codisolvente adecuado como DMSO. Las muestras se diluyeron a 50 ppm o 100 ppm con un disolvente apropiado antes del ensayo. La cuantificación se logra por comparación con soluciones estándar de concentración conocida del ion analizado.

Método de Cromatografía Iónica para aniones

Tipo de método	Intercambio de aniones
Columna:	Metrosep A Supp 5-250 (4,0x 250 mm)
Temperatura de columna (°C)	Ambiente
Inyección (µl)	20
Detección:	Detector de conductividad
Caudal (mUmin)	0,7
Eluyente	carbonato sódico 3,2 mM carbonato hidrógeno de sodio en agua 1,0 mM

10 Método de Cromatografía Iónica para cationes

Tipo de método	Intercambio de cationes
Columna:	Metrosep C 2-250 (4,0x 250 mm)
Temperatura de columna (°C)	Ambiente
Inyección (µl)	20
Detección:	Detector de conductividad
Caudal (mUmin)	1,0
Eluyente	ácido tartárico 4,0 mM ácido dipicolínico en agua 0,75 mM

- 15 Aproximadamente 50 mg de clorhidrato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida se pesaron en un vial de vidrio y se calentaron a 50°C. Se añadieron porciones de 100 µl de 1-butanmol/agua (5% del volumen de agua) al sólido hasta que se formó una solución clara (500 µl en total). La muestra se agitó a 50°C durante 1 hora y se hicieron observaciones. Después de calentar a 50°C durante una hora la muestra seguía siendo una solución clara y se enfrió desde 50°C a 25°C a una velocidad de 1,4°C por hora. La muestra se mantuvo como una solución al enfriar y se cubrió con parafilm agujereado un alfiler, y dejó para que evaporara a temperatura ambiente. Tras 2 semanas, se observaron cristales grandes en la muestra parcialmente evaporada. La Figura 13 es un XRPD de monoclóridato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il) bezofuran-2-carboxamida ilustrando ambos modelos, el observado (más ligero) y el calculado (más oscuro).
- 20 El modelo experimental proviene de la muestra de monoclóridato de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida mientras que el modelo calculado proviene de la estructura cristalina única de rayos X como aquí se describe y representa en figuras 10A y 10B. Ambos patrones están de

acuerdo respecto a los valores de 2θ y la pequeña diferencia en intensidades y anchos de pico puede ser atribuida a la resolución del instrumento y efectos de orientación preferida. Además, pequeñas diferencias se pueden atribuir a un cambio de temperatura debido a que los datos observados se recopilaron a temperatura ambiente y los datos calculados se tomaron de una estructura a 120K.

- 5 La sal tosilato, específicamente la mono sal cristalina, fue confirmada y el patrón de difracción se muestra en la Figura 14 usando radiación $\text{CuK}\alpha$ (40 kV, 40 mA), goniómetro θ - θ , divergencia V20 y ranuras de recepción, un monocromador secundario de grafito, y un contador de centelleo. Un difractograma XRPD de la sal de tosilato después de 1 semana a $40^\circ\text{C}/75\%$ de HR revela un cambio pero la muestra es todavía la forma 1. Probablemente, el cambio se debe a una forma más hidratada.

10 VII. Ensayos Biológicos

La capacidad del Compuesto A y sus estereoisómeros de unirse y modular la función de los diversos subtipos NNR se evaluó como se describe en la patente US 6.953.855 de Mazurov et al. Los perfiles de selectividad de receptor para el compuesto A (incluyendo 5HT_3 y muscarínico) se llevó a cabo por NovaScreen® Biosciences Corporation.

- 15 La medición electrofisiológica de la respuesta de los $\alpha 7$ NNR fueron tomadas en dos sistemas de expresión: $\alpha 7$ NNR de rata en células de mamíferos GH4C1 y $\alpha 7$ NNR humanos en ovocitos de *Xenopus*.

Las células GH4C1 que expresan $\alpha 7$ NNR de rata se prepararon como describe Placzek et al., Mol. Pharm. 68(6): 1863-1876 (2005). Las mediciones electrofisiológicas de actividad agonista se lograron usando el sistema de perfusión rápida y sujeción de parche Dynaflo usando este sistema de expresión de células GH4C1. Tanto la acetilcolina como la nicotina produjeron activación dependiente de concentración de la corriente mediada por $\alpha 7$. Los valores EC_{50} de agonista de la literatura fueron comparables a los obtenidos usando este método (véanse Dunlop et al. Biochem Pharmacol en prensa (2007) y materiales Dynaflo en línea (www.cellectricon.com) con respecto a tal método).

Corrientes de células completas registradas con un amplificador Axopatch 700A se filtraron a 1 kHz y muestrearon a 5 kHz por una tarjeta PCI (National Instrument). Comparadas con estudios previos las soluciones salinas se modificaron como se indica para aumentar la estabilidad de corriente. Las células se registraron a temperatura ambiente en el siguiente medio extracelular: NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 2 mM, HEPES 10 mM ajustado a pH 7,4 con NaOH acuoso. Se llenaron electrodos de borosilicato (3-5 m Ω) con el siguiente medio: fosfato TRIS130 mM, NaCl 5 mM, MgCl_2 2 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, ajustado a pH 7,4 con KOH acuoso (véase Wu et al., J. Physiol. 576:103-118 (2006) incorporada por referencia con respecto a tal enseñanza). En estas condiciones, la actividad macro-corriente obtenida con registro de células NNR completas dura hasta 60 min cuando se provoca con una concentración de 1000 μM de acetilcolina (ACh).

Los procedimientos de manipulación celular se adoptaron de notas de aplicación Cellectricon para Dynaflo. Brevemente, después de retirar de la incubadora, las células se lavaron cuidadosamente tres veces con medio de registro y se colocaron en la plataforma de un microscopio invertido Zeiss. Fue necesaria una media de 5 min antes de que se estableciera la configuración de registro de células enteras. Para evitar la modificación de las condiciones celulares, se registró una única célula por carga de células única en un chip de silicio Dynaflo. No pudieron detectarse diferencias en la fracción de células sensibles entre condiciones experimentales. Más del 95% de las células respondieron a ACh, y cada célula que presente una corriente mensurable fue tenida en cuenta. Las células se mantuvieron a -60 mV durante todo el experimento. Todas las soluciones de artículos de ensayo se prepararon diariamente a partir de soluciones madre. Se realizaron a diario soluciones madre nuevas de acetilcolina (ACh) en solución de Ringer y se diluyeron. Las curvas de dosis de respuesta se describen por ecuaciones simples de Hill usando software Prism 5.0.

Los oocitos de *Xenopus* que expresan NNR $\alpha 7$ humano se prepararon como se describe por Papke y Papke, Brit. J. Pharmacol. 137: 49-61 (2002) incorporada por referencia. Se usaron hembras maduras (> 9 cm) de sapo Africano *Xenopus laevis* (Nasco, Ft. Atkinson, WI) como fuente de ovocitos. Antes de la cirugía, los sapos fueron anestesiados colocando el animal en una solución de 1,5 g/l de éster etílico de ácido 3-aminobenzoico durante 30 min. Los oocitos fueron retirados de una incisión en el abdomen.

Con el fin de retirar la capa de células foliculares, los ovocitos recolectados fueron tratados con 1,25 mg/ml de colagenasa de Worthington Biochemical Corporation (Freehold, NJ) durante 2 horas a temperatura ambiente en solución de Barth libre de calcio (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, HEPES 15 mM, pH 7,6, MgSO_4 0,81 mM, NaHCO_3 2,38 mM, 0,1 mg/ml sulfato de gentamicina). Posteriormente, capas de 5 ovocitos se aislaron e inyectaron con 50 nl (5-20 ng) cada uno de los ARNc de $\alpha 7$ humanos. Se hicieron registros 2 a 7 días tras la inyección. Se hicieron cada día soluciones madre nuevas de acetilcolina (ACh) en solución de Ringer.

Se realizaron experimentos usando OpusXpress 6000A (Axon Instruments, Union City CA). OpusXpress es un sistema integrado que proporciona empalamiento y fijación de voltaje automatizado de hasta ocho ovocitos en paralelo. Ambos electrodos de tensión y corriente se rellenaron con KCl 3M. Las células se sometieron a fijación de voltaje a un potencial de mantenimiento de -60mV. Se recogieron datos a 50 Hz y se filtraron a 20 Hz. Las células se

sometieron a perfusión en baño con solución Ringer, y se entregaron soluciones agonistas de una placa de 96 pocillos a través de puntas desechables, lo que eliminó cualquier posibilidad de contaminación cruzada. Los caudales se fijaron en 2 ml/min. Las aplicaciones de fármacos se alternaron entre controles de ACh y agonistas experimentales. Las aplicaciones tuvieron 12 segundos de duración seguidas por periodos de lavado de 181 segundos.

Las respuestas se calcularon como carga neta (véase Papke y Papke, Brit. J. Pharmacol 137: 49-61 (2002), antes citada) para receptores $\alpha 7$. Cada ovocito recibió una aplicación inicial de ACh de control, luego una aplicación de un fármaco experimental y, después una aplicación de ACh (300 μ M) de control de seguimiento. Las respuestas a las aplicaciones de fármacos experimentales se calcularon respecto a las anteriores respuestas de control de ACh con el fin de normalizar los datos, compensando los diferentes niveles de expresión de canales entre ovocitos. Nótese que ACh 300 μ M evocaron respuestas máximas de carga neta de receptores $\alpha 7$ por lo que la normalización para los controles de ACh normalizaron efectivamente los datos a respuestas máximas de ACh. Medias y errores estándar (SEM) se calcularon a partir de las respuestas normalizadas de al menos cuatro ovocitos para cada concentración experimental. Para relaciones concentración-respuesta, los datos derivados de análisis de carga neta se trazaron usando Kaleidagraph 3.0.2 (software Abelbeck, Reading, PA), y se generaron curvas a partir de la ecuación de Hill.

La caracterización del comportamiento del Compuesto A se llevó a cabo según los siguientes protocolos. La tarea de reconocimiento del objeto (O) se llevó a cabo de acuerdo con la descripción de Ennaceur y Delacour Behav. Brain Res. 100: 85-92 (1988). El paradigma de laberinto de brazos radiales (RAM) se realizó de acuerdo con la descripción de Levin et al., Behav. Pharm. 10: 675-680 (1999). El ensayo de inhibición pre-pulso (PPI) se realizó según la descripción de Suemaru et al., Brit. J. Pharmacol. 142 (5): 843-850 (2004). La reversión del ensayo de actividad locomotora inducida por apomorfina (APO LOCO) se realizó de acuerdo con la descripción de Roux et al., Curr. Protocols in Pharmacol. Unidad 5.17 (1999).

Resumen de la Actividad biológica *in Vitro*

El compuesto A inhibe de forma competitiva la unión del MLA radioetiquetado al $\alpha 7$ NNR de hipocampo de cerebro de rata con valores de constante de equilibrio (K_i) de -1 nM, lo que indica que tiene una afinidad muy alta para el subtipo NNR $\alpha 7$. Los estereoisómeros del compuesto A tiene los siguientes valores de K_i en $\alpha 7$ NNR de rata: 2R,3S (42 nM) [28 nM como se informó anteriormente]; 2R,3R (1 nM); 2S,3S (25 μ M) (véase Figura 1A). Como se ilustra en la Figura 1A2, Compuesto A, el enantiómero 2S,3R, muestra una actividad en el subtipo $\alpha 7$ en contraste con sus tres análogos enantioméricos, que se representan como puntos solapados con actividad débil. El compuesto A no se une a NNRs $\alpha 4\beta 2$ con ninguna afinidad significativa (valores de $K_i > 2 \mu$ M).

La actividad funcional de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables (compuesto A) y sus estereoisómeros se examinó usando técnicas electrofisiológicas de sujeción de parche con $\alpha 7$ NNR de rata establemente expresado en células GH4C1 (mamíferos). En estos experimentos, el Compuesto A produjo un perfil funcional notablemente diferente comparado con los otros isómeros individuales y con la mezcla racémica de los cuatro isómeros. Como puede verse en las figuras 1A y 1B, el Compuesto A es mucho más potente y eficaz para inducir respuesta funcional ($E_{max} = 93\%$ en relación a acetilcolina (ACh); $CE_{50} = 14$ nM) que cualquiera de los otros isómeros o la mezcla de cuatro isómeros. En efecto, el compuesto A (isómero 2S,3R) es el único isómero de N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida que es capaz de proporcionar agonismo potente en todo el intervalo de concentración de 1-50 nM, asociándose 10 nM con actividad *in vivo* como se describe aquí, como se muestra en la Figura 1B.

La actividad funcional del Compuesto A se evaluó también electrofisiológicamente en oocitos *Xenopus* que expresan transitoriamente $\alpha 7$ NNR humanos. En este sistema, el Compuesto A tiene un valor de CE_{50} de 33 nM y un E_{max} de 100% de respuesta ACh. Hubo reducciones en posteriores respuestas a ACh de control después de la aplicación de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida a concentraciones mayores que 100 nM ($IC_{50} = 200$ nM). A diferencia de los agonistas totales antes descritos $\alpha 7$ (véase Astles et al., Current Drug Targets CNS Neurological Disorders 1 (4): 337-348 (2002) con respecto a tal informe), la separación entre los valores EC_{50} y CI_{50} para (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida indican que las concentraciones que producen la respuesta funcional semimáxima de $\alpha 7$ reducen a un mínimo, más que completamente, la inhibición residual. No hubo activación detectable cuando (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida se aplicó a los oocitos que expresan el subtipo humano $\alpha 4\beta 2$ y no hay una disminución significativa en las respuestas a ACh posteriores de control, lo que indica que (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida no es ni un agonista ni antagonista a $\alpha 4\beta 2$.

Los compuestos mostraron poca o ninguna actividad agonista en modelos funcionales que llevan receptores de tipo muscular (subtipo $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ en células clonales humanas TE671/RD) o receptores tipo ganglio (subtipo $\alpha 3\beta 4$ en el subclón Shooter de células PC12 feocromocitomas de rata y en células clonales SHSY-5Y humanas), generando $\leq 10\%$ (músculo humano), $\leq 20\%$ (ganglio de rata) y $\leq 10\%$ (ganglio humano) de respuesta de nicotina en estos subtipos. Estos datos indican selectividad para subtipos SNC sobre subtipos SNP.

Debido a la cercana secuencia homología de cierre y estructural entre receptores $\alpha 7$ y 5 hidroxitriptamina-(5HT3) y la reactividad cruzada a estos 2 receptores observada con otros ligandos nicotínicos, la afinidad del compuesto A a

los receptores 5HT3 fue investigada. El compuesto A (10 μ M) mostro 59% de inhibición de la unión del radioligando en el receptor 5HT3 de ratón y 25% de inhibición en el receptor humano. La investigación de la activación funcional en el receptor 5HT3 humano sugiere mínima a ninguna activación (es decir, una respuesta máxima del 15% de activación se obtuvo a 100 μ M).

5 Los receptores muscarínicos son otro área de preocupación debido a las interacciones que se han observado con otros ligandos nicotínicos. El compuesto A muestra una mínima o ninguna interacción cuando se examinó en ensayos competitivos de inhibición de la unión para M1, M2, receptores muscarínicos no selectivos centrales y periféricos.

10 Los datos muestran que el Compuesto A es selectivo para ligandos $\alpha 7$ NNR. El compuesto A no se une bien a los subtipos del receptor nicotínico que son característicos del sistema nervioso periférico o a los receptores muscarínicos o serotoninérgicos 5HT3. Así, el compuesto A posee un potencial terapéutico para tratar trastornos del sistema nervioso central sin producir efectos secundarios asociados con interacción con el sistema nervioso periférico.

Resumen de la actividad biológica *in vivo*

15 El Compuesto A, (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo [2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, muestran una eficacia significativa en dos modelos de comportamiento de cognición. El compuesto A demuestra una potente actividad en el paradigma de reconocimiento de objetos en ratas, tras ambas administraciones i.p. (intraperitoneal, Figura 3) y p.o (oral, Figura 4), y también demostró actividad en un amplio rango de dosis tras administración oral (Figura 4). Administrado por vía intraperitoneal a las mismas dosis
20 bajas (0,3 y 1 mg/kg) el Compuesto A tiende a revertir déficits inducidos por MK-801 en quirófano (Figura 5), y si se administra por vía oral a 0,3 mg/kg los efectos cognitivos del compuesto A duran por lo menos 18 horas (Figura 6). En la memoria a corto plazo de examen del paradigma del laberinto de brazos radiales (RAM) (Figura 7), el Compuesto A aumentó significativamente el número de elecciones correctas antes de dar error. Estos resultados muestran el potencial de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida para
25 tratar déficits cognitivos y disfunciones asociadas con esquizofrenia, incluidos los de la memoria a corto plazo.

Para que un compuesto sea útil para tratar la disfunción cognitiva en la esquizofrenia, no debe disminuir los efectos de los antipsicóticos clásicos o atípicos contra los síntomas positivos de esquizofrenia. Por tanto, es apremiante que, además de sus propiedades de mejora cognitiva, el Compuesto A también muestre eficacia en la reversión de la inhibición de la actividad locomotora inducida por apomorfina (APO LOCO) (Figura 8) y modelos de inhibición de pre-pulso (PPI) (Figura 9) de síntomas positivos de esquizofrenia. Por ello, debe esperarse que (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida proporcione un beneficio adicional contra los
30 síntomas positivos, así como también, los cognitivos, asociados con esquizofrenia.

Las respuestas farmacológicas específicas observadas pueden variar de acuerdo con y dependiendo del compuesto activo particular seleccionado o si están presentes vehículos farmacéuticos, así como del tipo de formulación y modo
35 de administración empleado, y se contemplan tales variaciones o diferencias esperadas en los resultados.

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, método que comprende la resolución dinámica de (2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ona, seguida de aminación reductora estereoselectiva de la cetona resuelta.
- 5 2. Un método para fabricar (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende el intermedio de la sal (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona di-p-toluoil-D-tartrato.
3. El método para fabricar (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el método no
10 implica el uso de purificación cromatográfica.
4. Sal (2S)-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-ona di-p-toluoil-D-tartrato.

**Afinidades de Unión
Hipocampo de ratas**

Mezcla :	2 nM
2S,3R (Cpd A):	1 nM
2R,3S:	28nM
2R,3R:	25000nM
2S,3S:	1nM

Figura 1A.1

Registros de células completas alfa 7 de rata en células de mamífero

Compuesto A vs. sus estereoisómeros

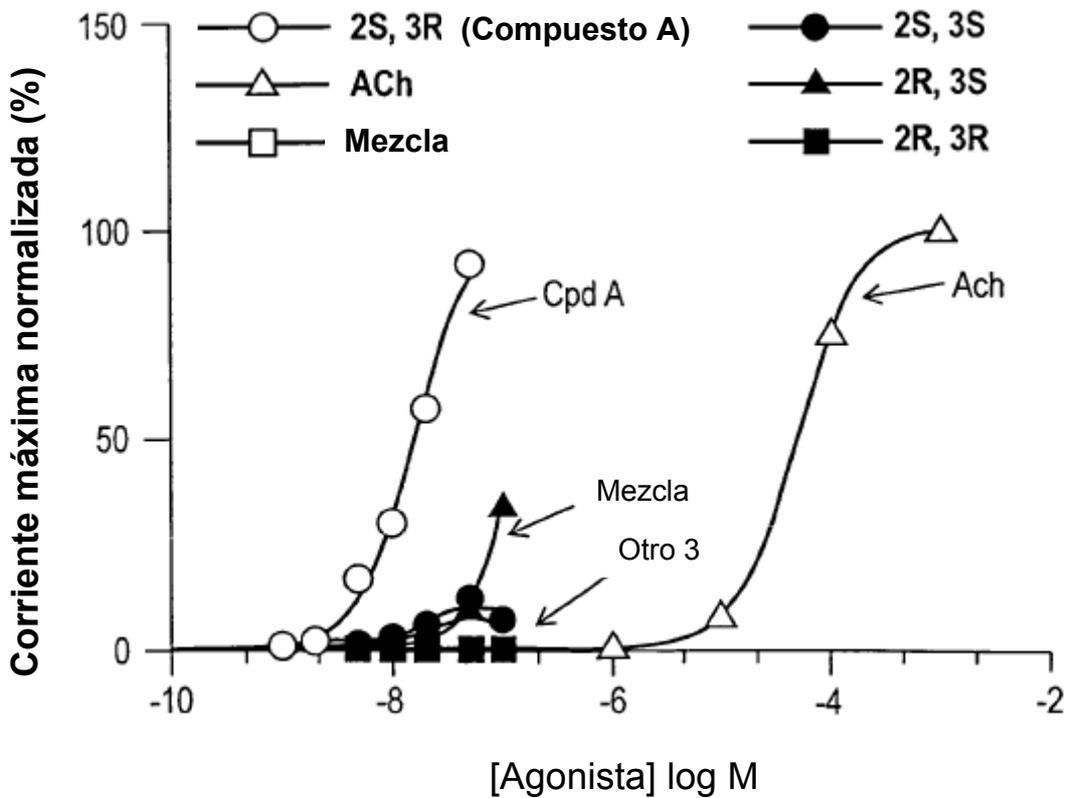


Figura 1A.2

Compuesto A en línea celular $\alpha 7$ de rata GH4C1

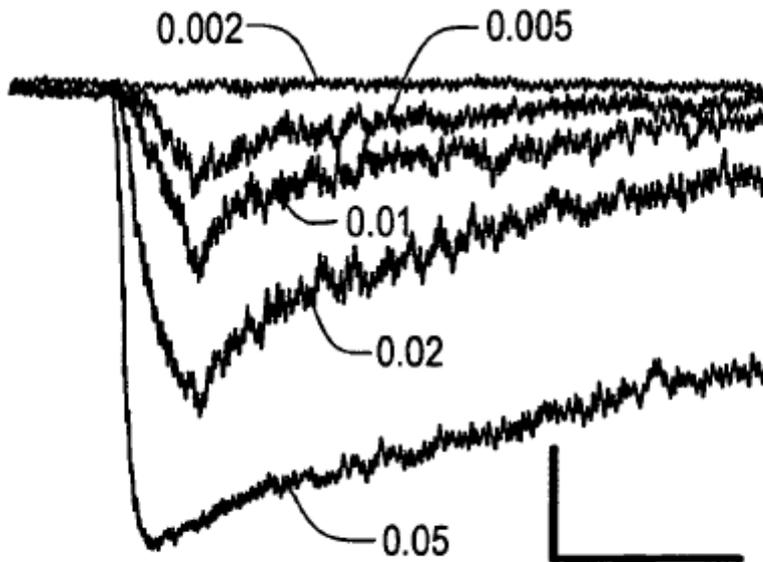


FIGURA 1A.3

ACh en línea celular $\alpha 7$ de rata GH4C1

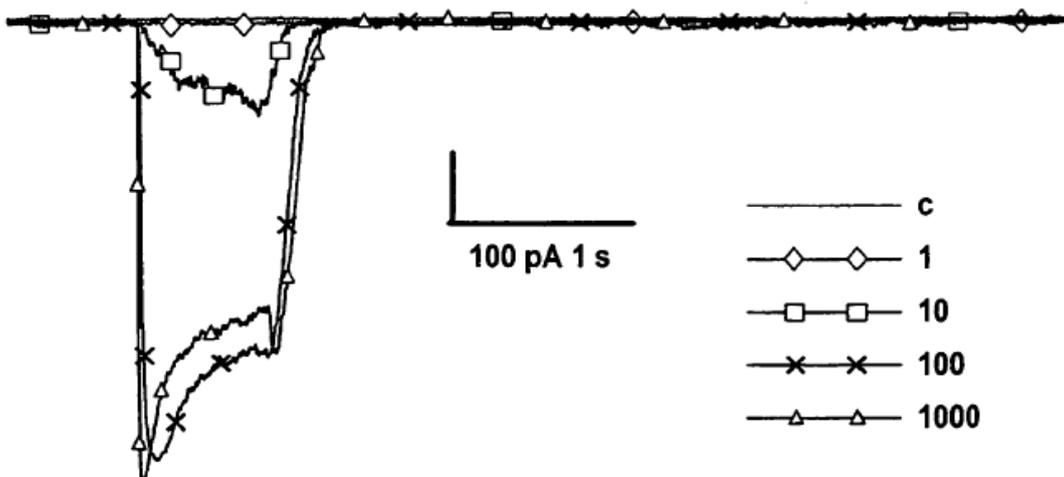


Figura 1A.4

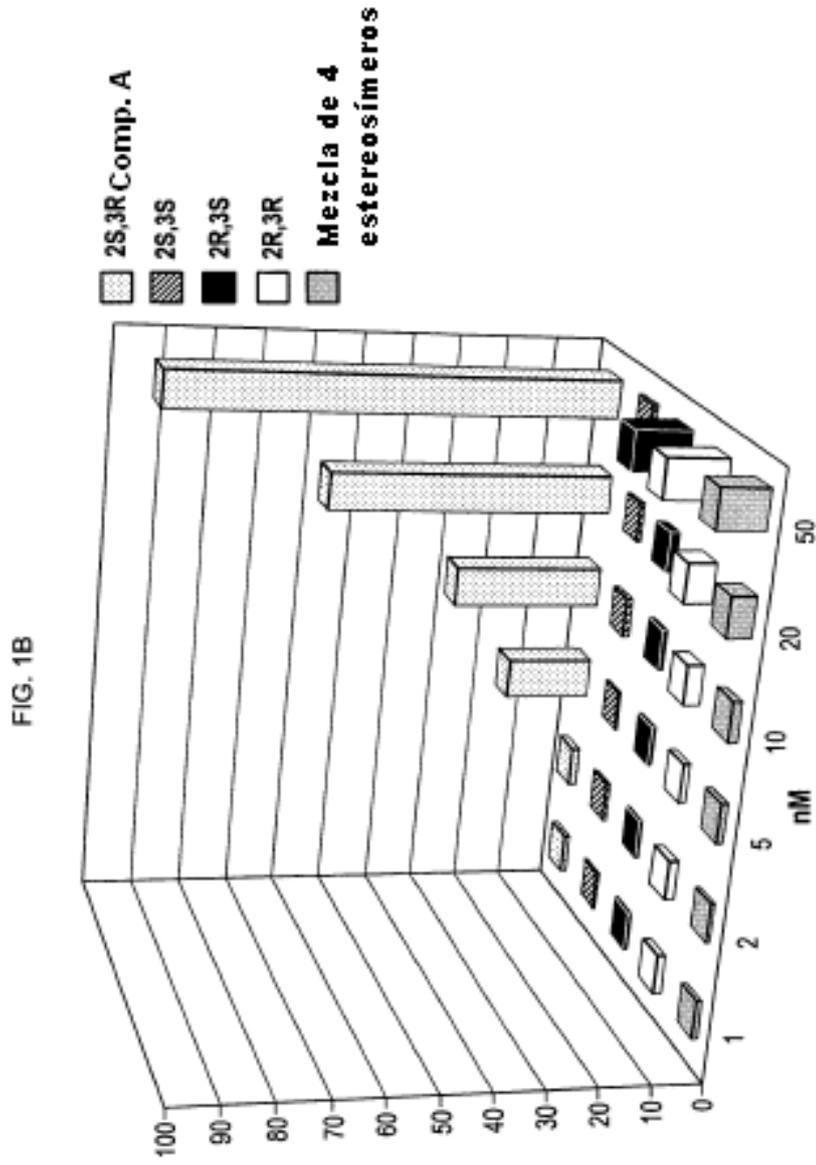


FIG. 2A

Activación $\alpha 7$

A

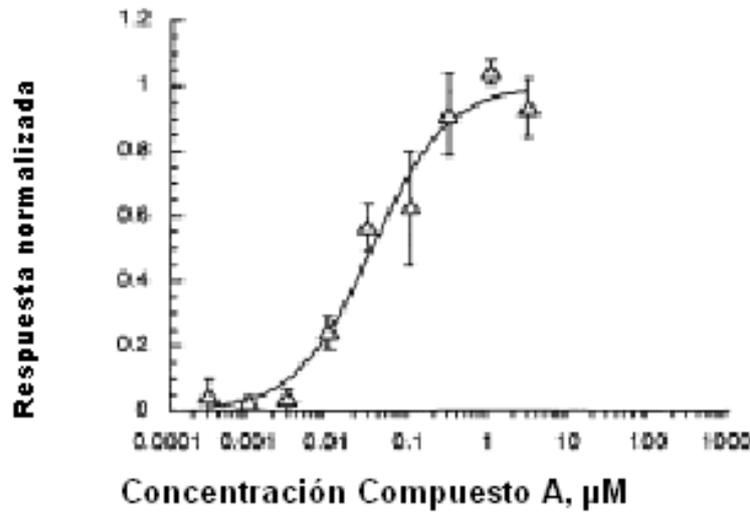


FIG. 2B

Controles Ach despues de la aplicación del Compuesto A

B

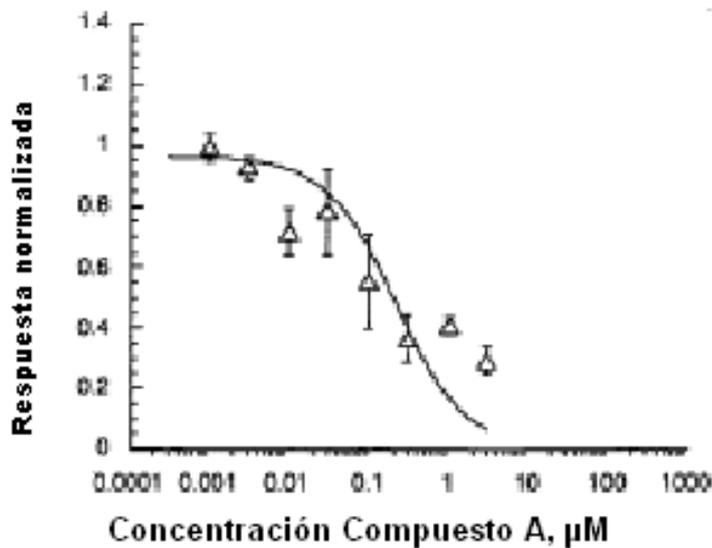


FIG. 3

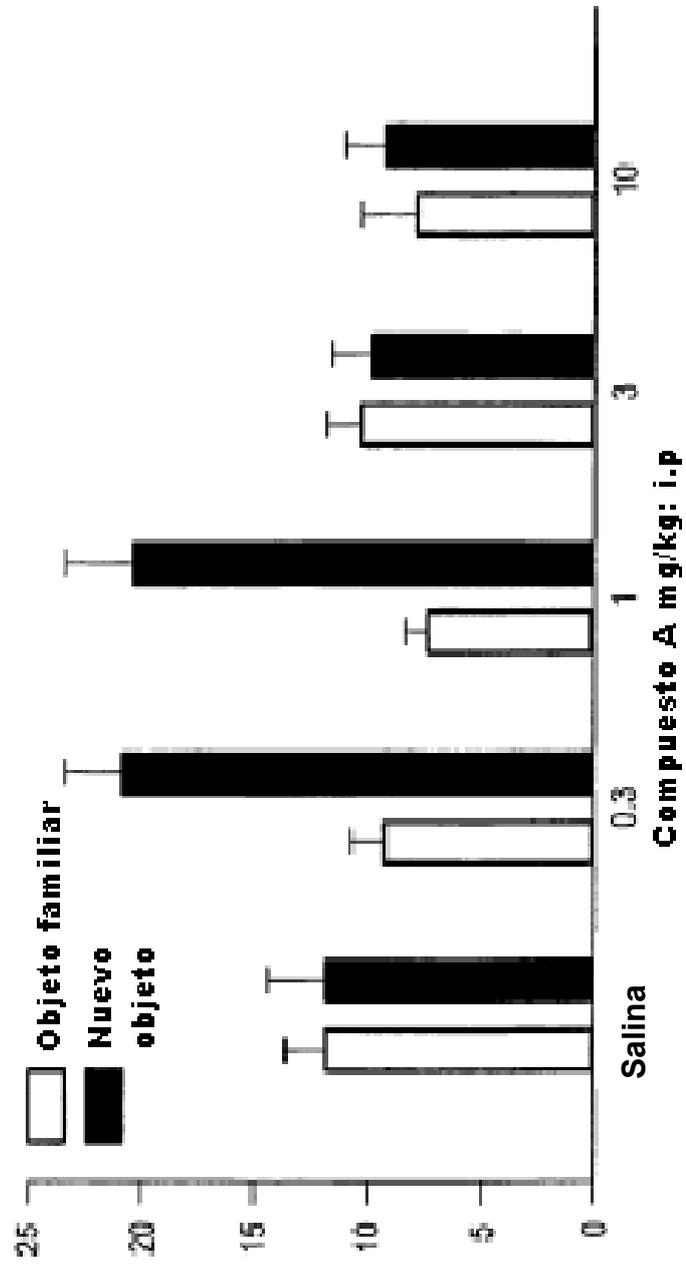


FIG. 4

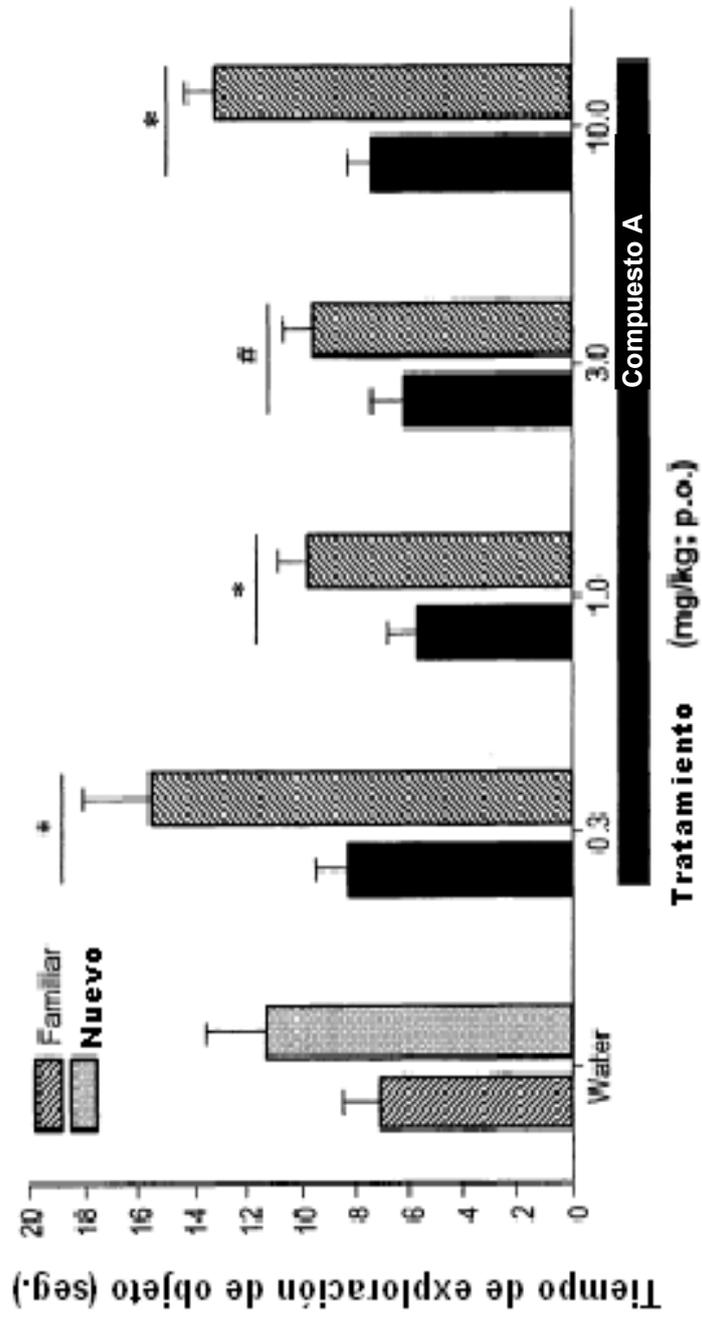
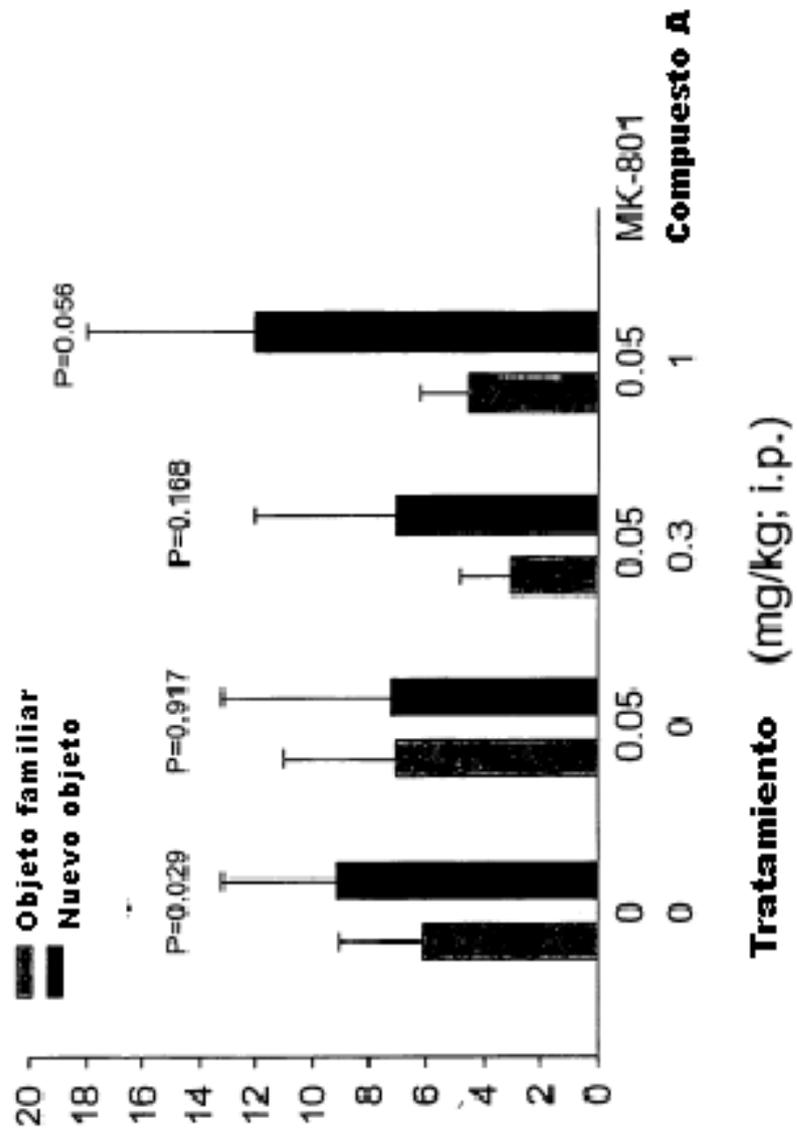


FIG. 5A



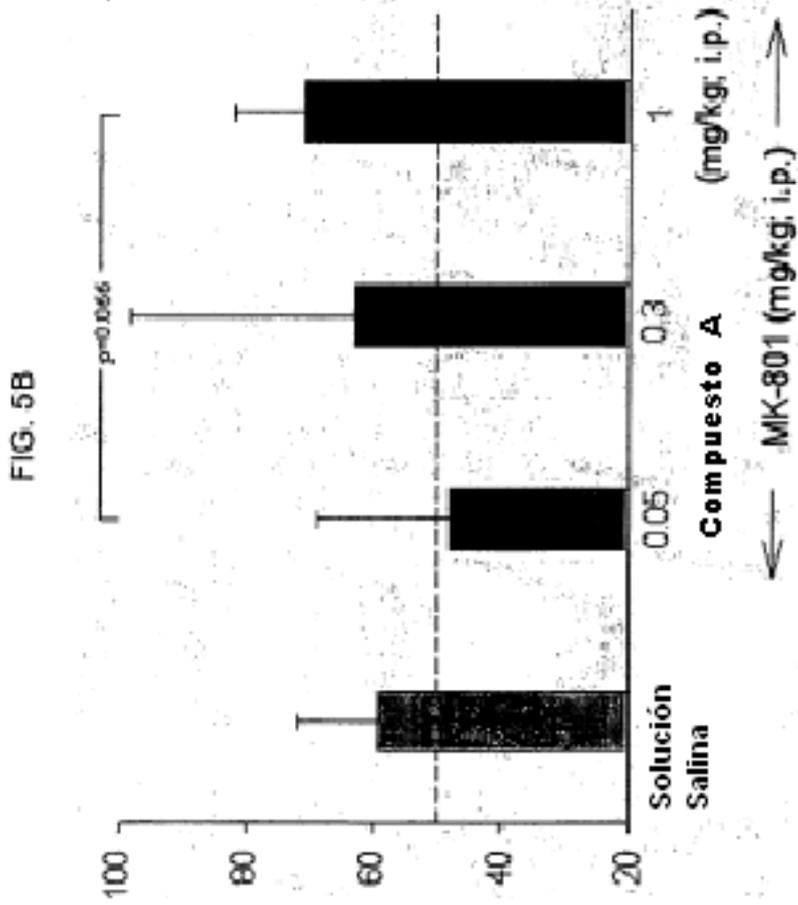


FIG. 6

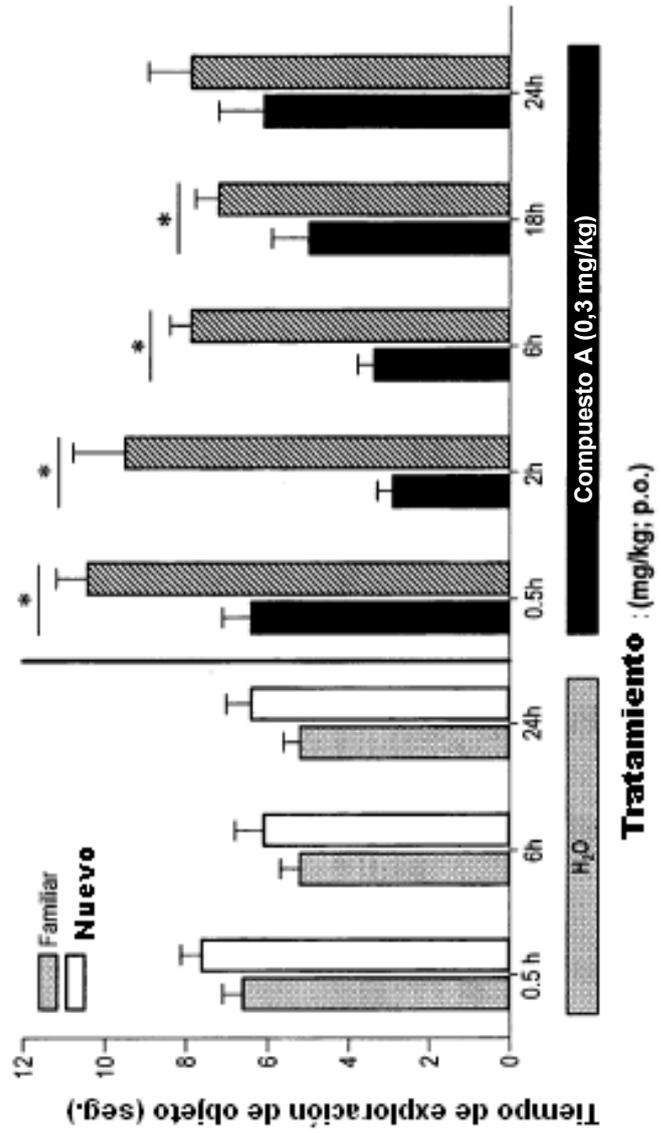


FIG. 7

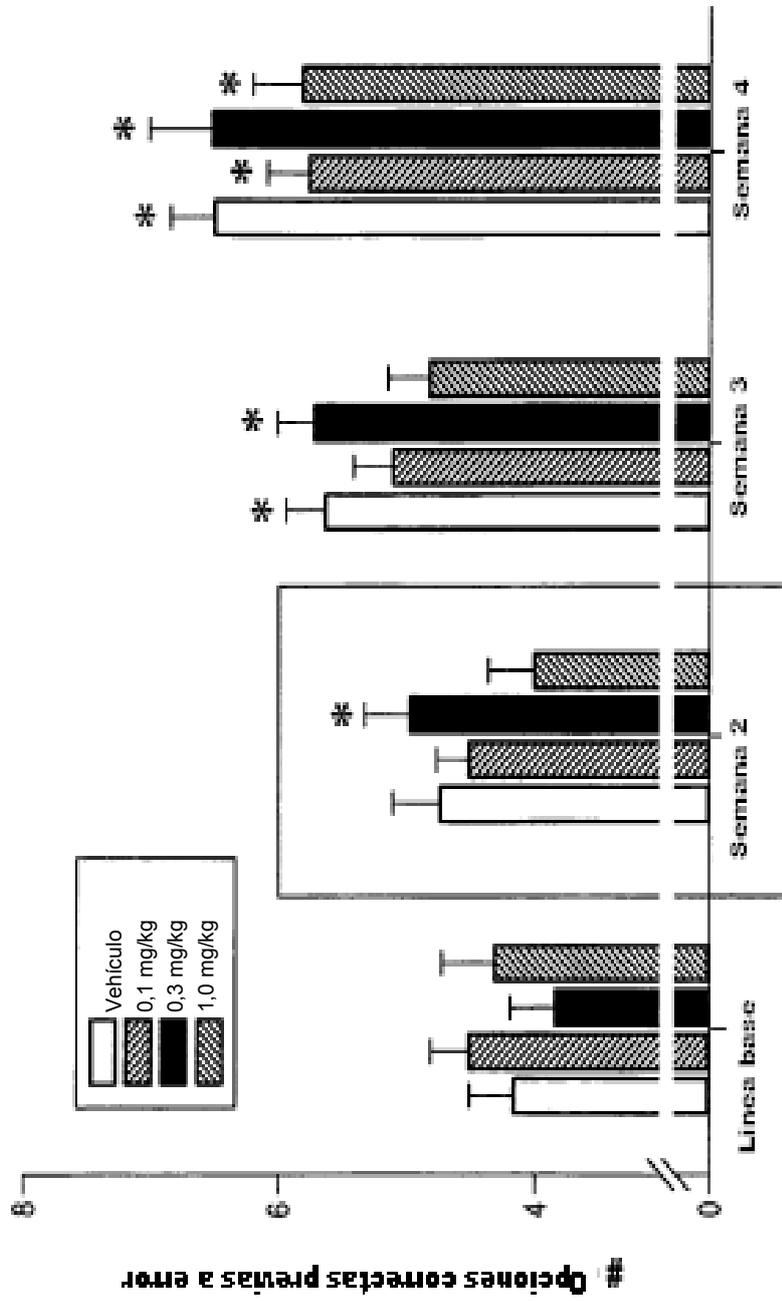


FIG. 8

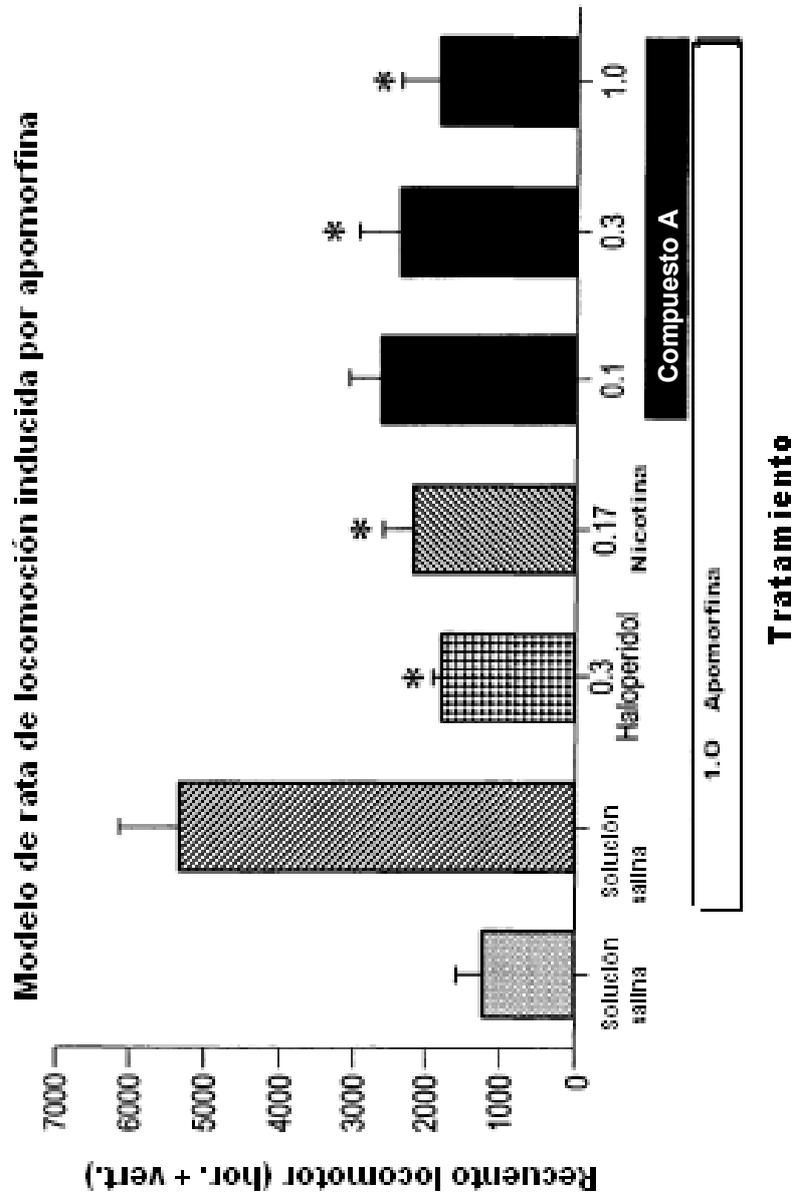
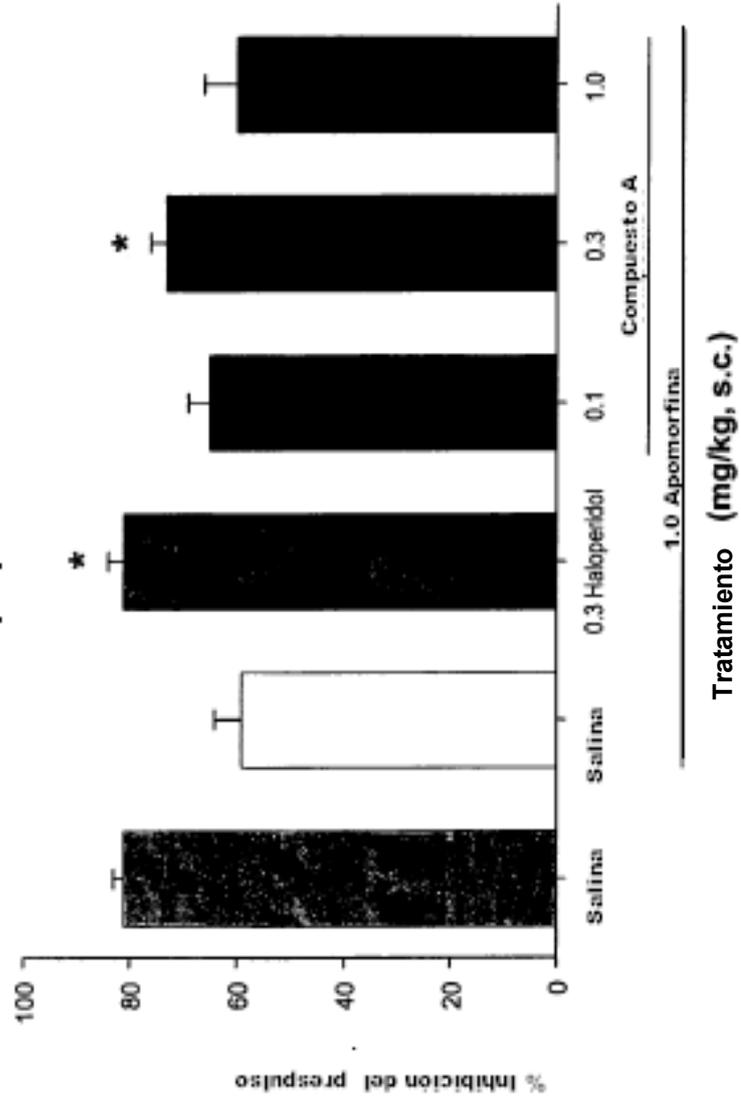


FIG. 9
Inhibición del prepulso en modelo de rata



Significativamente diferente de solución salina 1.0 mg/kg. Apomorfina P 0.05

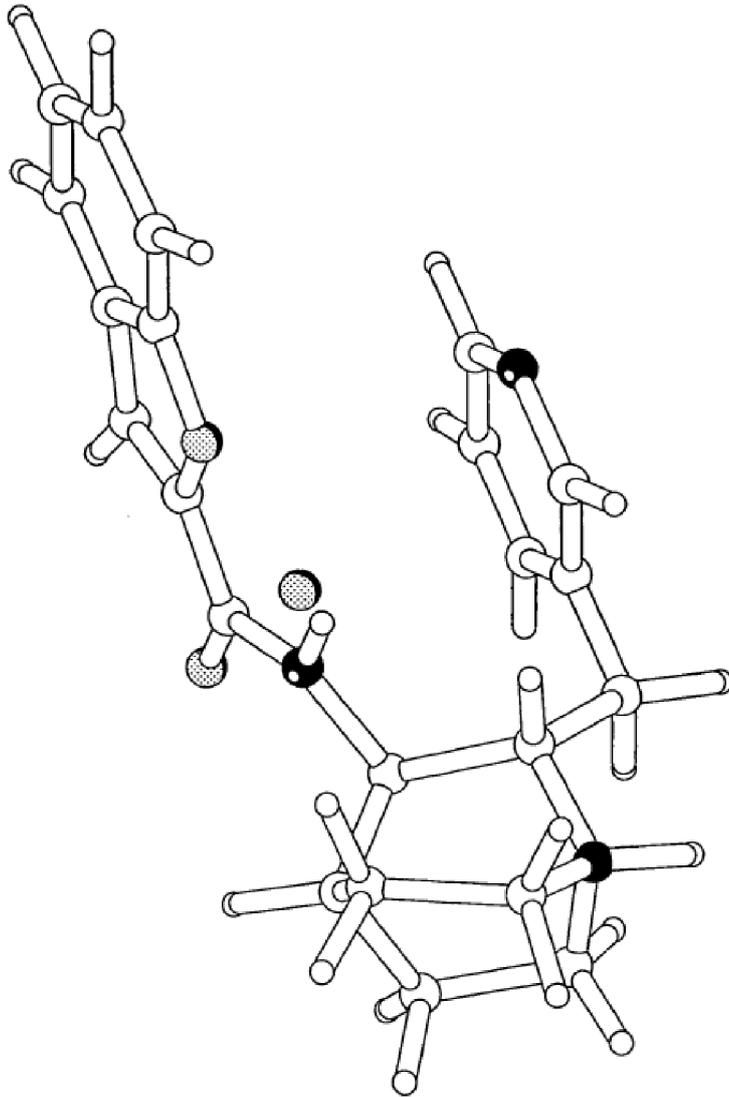


FIG. 10A



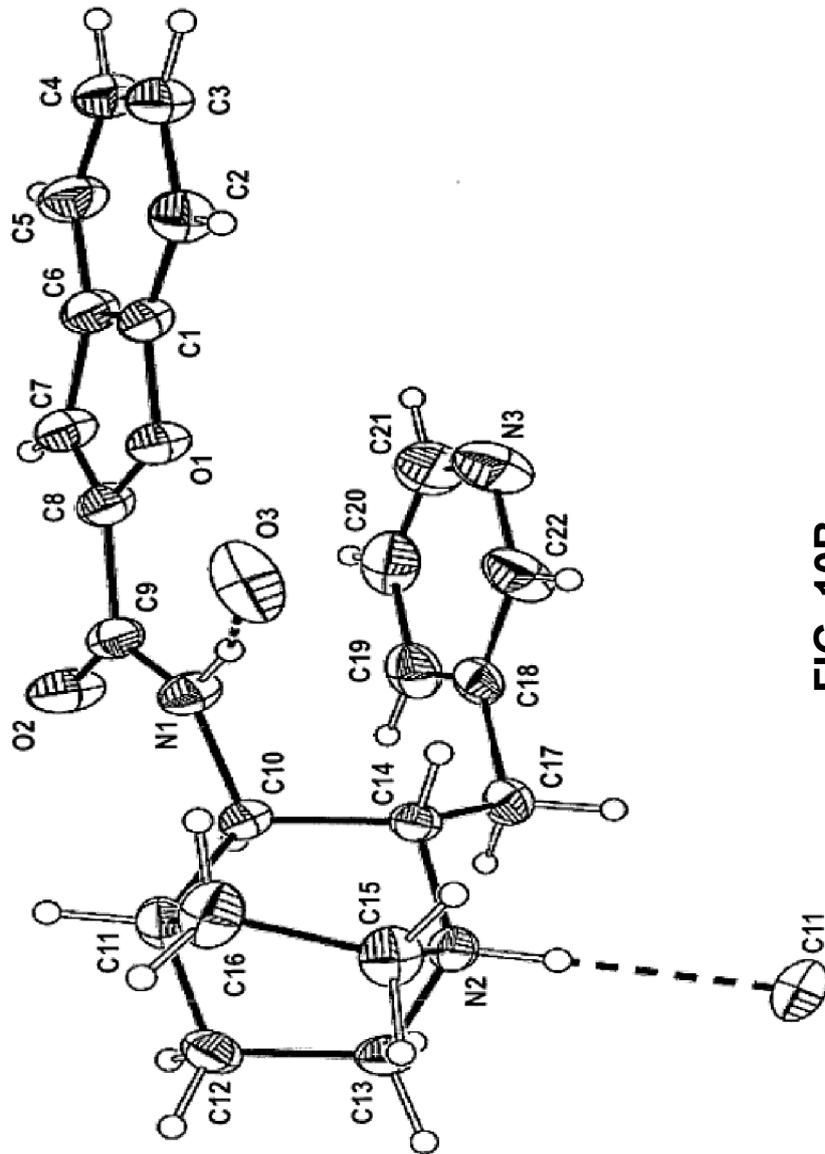


FIG. 10B

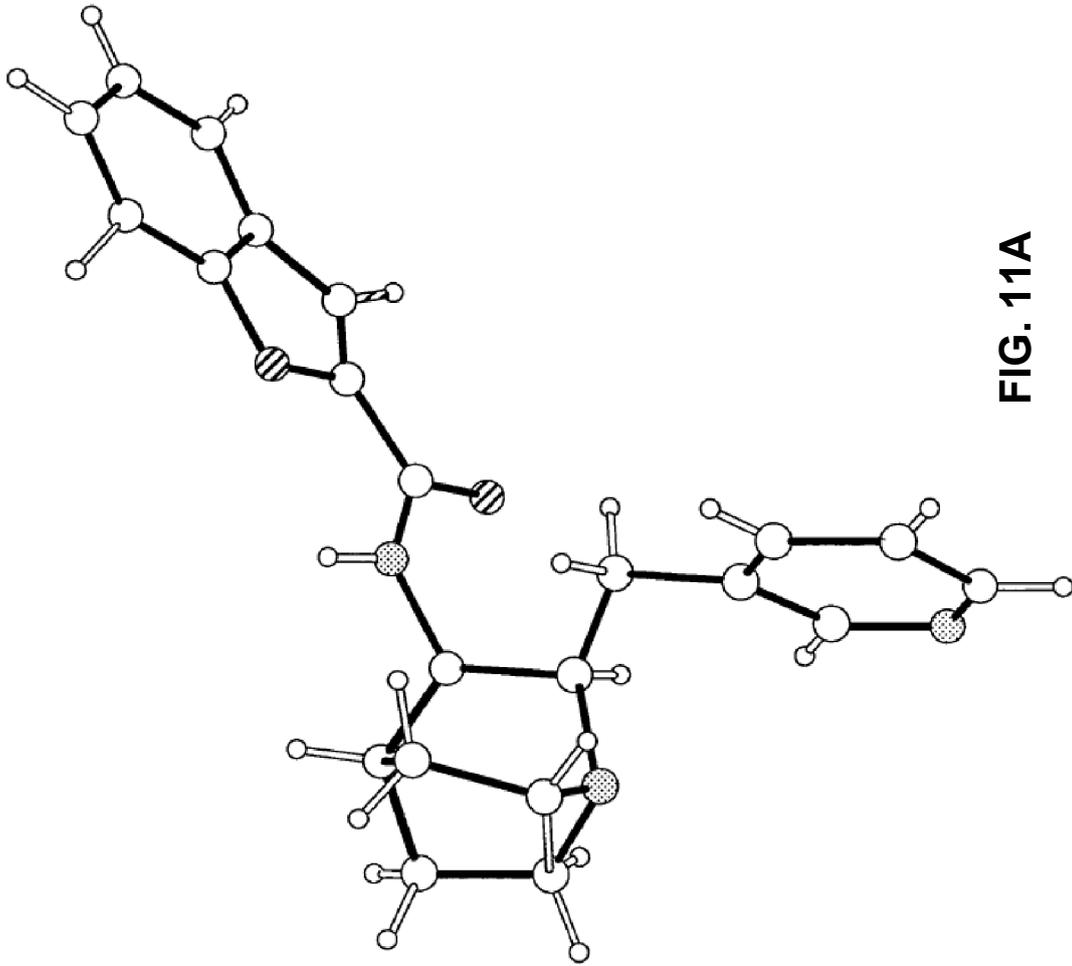


FIG. 11A

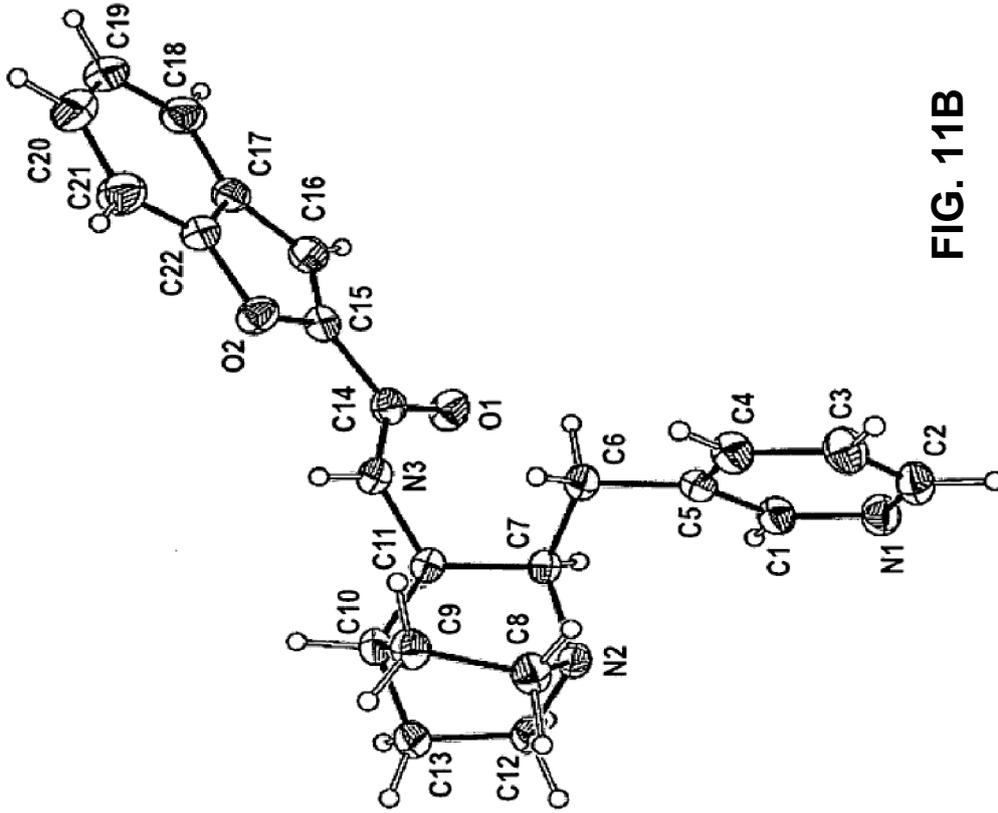


FIG. 11B

DAD: Señal A, 1,0 mg/mL amida quiral para LOQ#1.5210 LOQ 082406 ACD

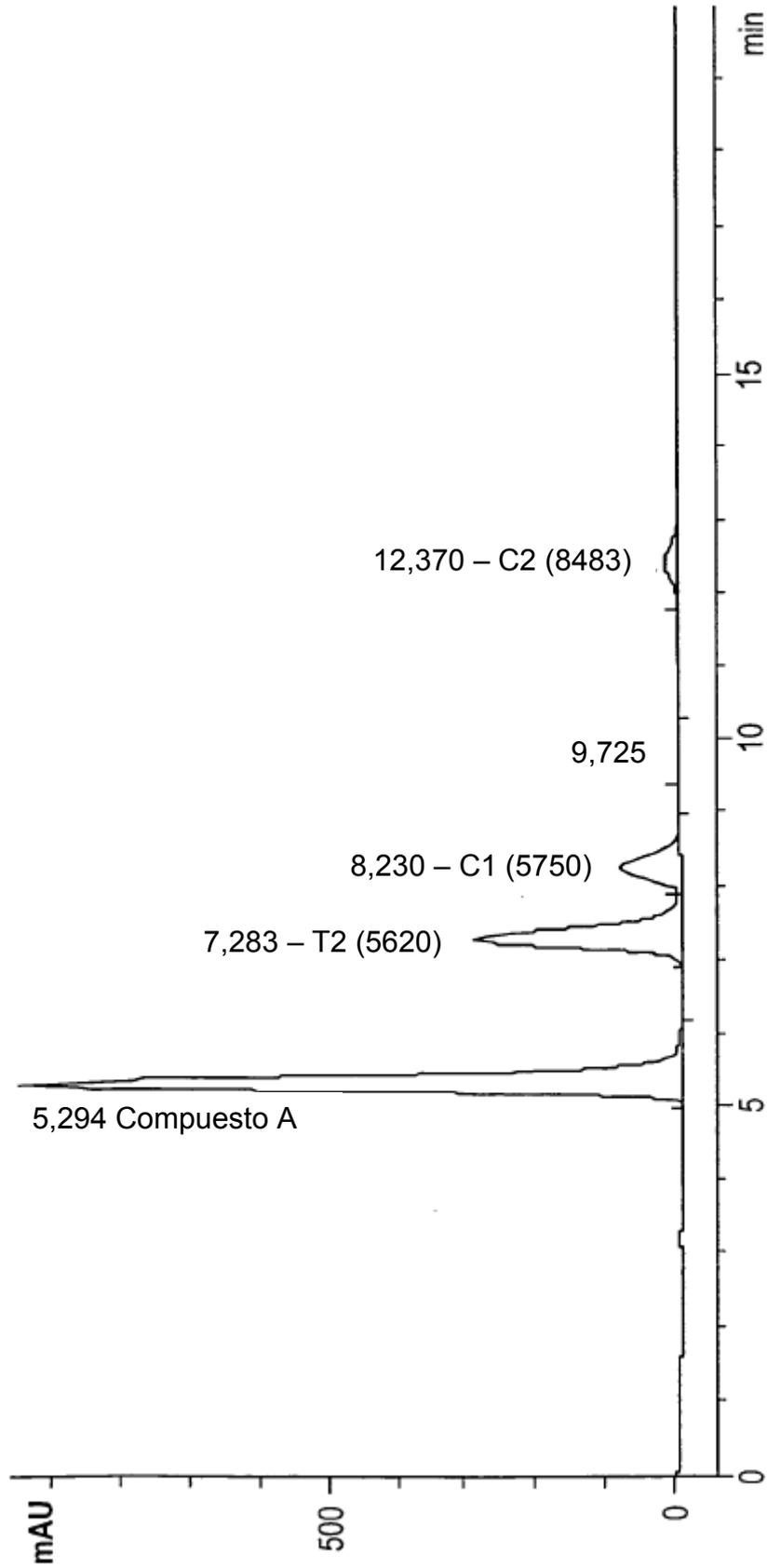
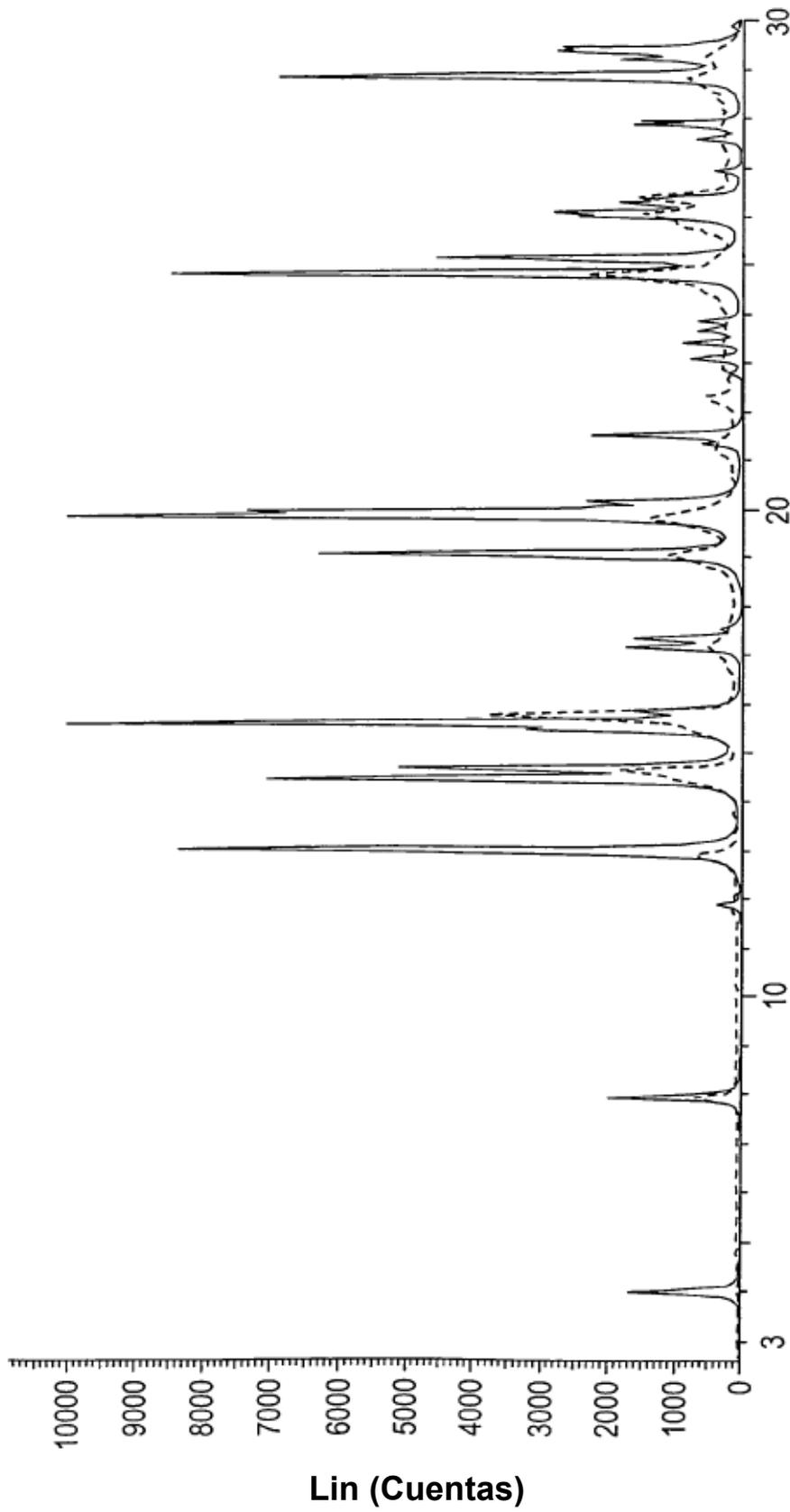
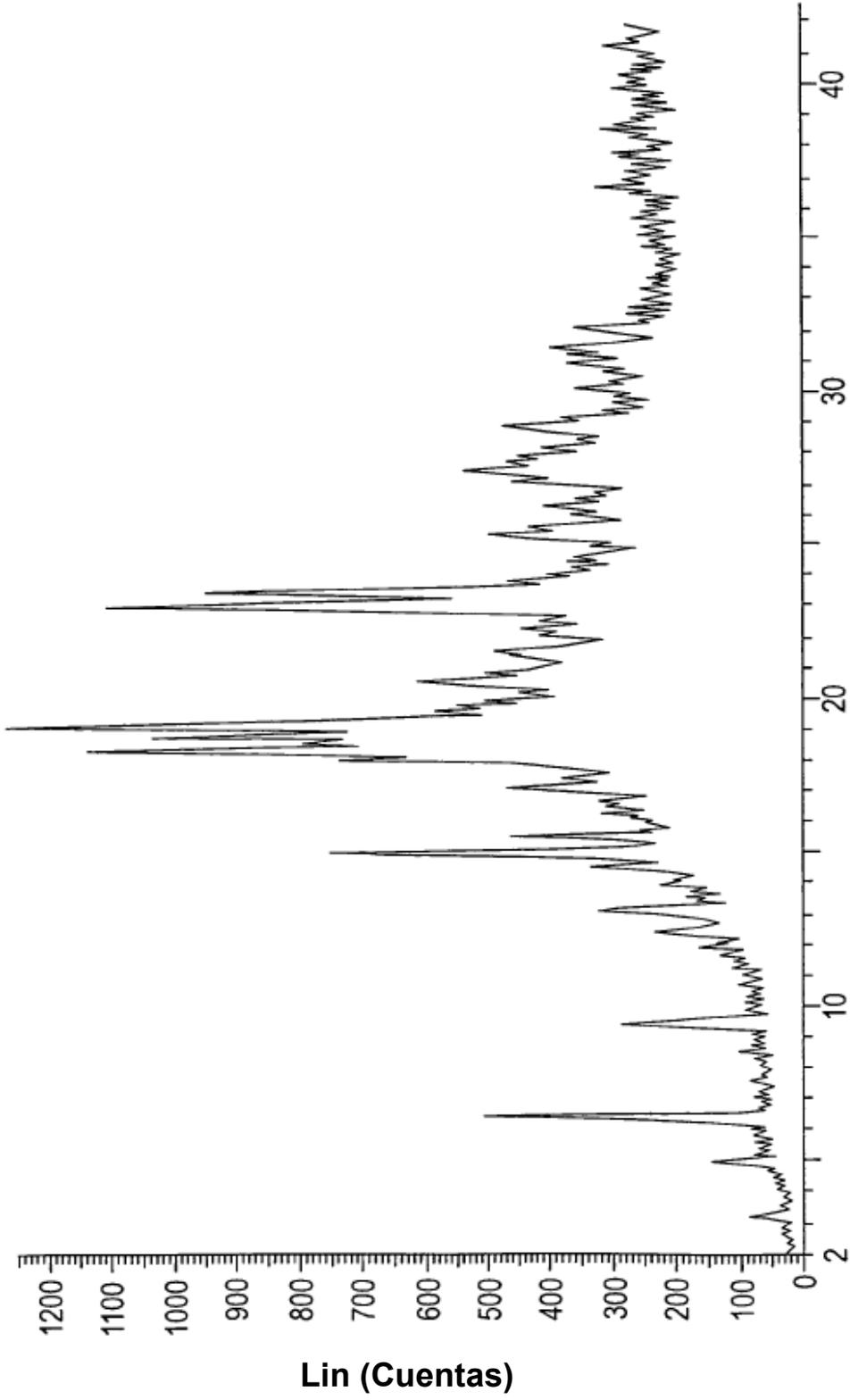


Figura 12



Escala-2-Theta

Figura 13



Escala-2-Theta

Figura 14