

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 848**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/443** (2006.01)  
**A61P 11/12** (2006.01)  
**A61K 31/44** (2006.01)  
**A61K 31/4439** (2006.01)  
**A61K 31/444** (2006.01)  
**A61K 31/4545** (2006.01)  
**A61K 31/497** (2006.01)  
**A61K 31/5377** (2006.01)  
**A61K 31/4965** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 14191369 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2845593**

54 Título: **Derivado de piridina y pirazina para el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

30 Prioridad:

**19.03.2010 US 315509 P**  
**11.02.2011 US 201161441853 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.07.2017**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BAETTIG, URS;**  
**BALA, KAMLESH JAGDIS;**  
**BUDD, EMMA;**  
**EDWARD, LEE;**  
**HOWSHAM, CATHERINE;**  
**HUGHES, GLYN;**  
**LEGRAND, DARREN MARK y**  
**SPIEGEL, KATRIN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 623 848 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**

Derivado de piridina y pirazina para el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Esta invención se refiere a compuestos de piridina, a su preparación, y a su uso como productos farmacéuticos.

5 La fibrosis quística (CF) es una enfermedad genética mortal causada por mutaciones en el gen que codifica para el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), un canal de aniones epiteliales activado por la cinasa de proteína A (PKA) involucrado en el transporte de sales y fluidos en múltiples órganos, incluyendo el pulmón. La mayoría de las mutaciones de fibrosis quística (CF) reducen el número de canales reguladores de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) en la superficie celular (por ejemplo, mutaciones de síntesis o de procesamiento), o bien deterioran la función del canal (por ejemplo, mutaciones de compuerta o de conductancia), o ambas. Actualmente no existen terapias aprobadas que se dirijan al regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) directamente. La presente invención da a conocer compuestos que restablecen o mejoran la función del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) mutante y/o de tipo silvestre para enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

15 En un aspecto, la invención proporciona compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como se define en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En la presente se describen diferentes realizaciones de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales.

20 Otra realización de la invención, como se define anteriormente, proporciona los compuestos para su uso con enantiómeros sustancialmente puros con la configuración R.

Otra realización de la invención, como se define anteriormente, proporciona los compuestos para su uso con enantiómeros sustancialmente puros con la configuración S.

25 Otra realización de la invención, como se define anteriormente, proporciona los compuestos para su uso, representados por: ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico; o ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico. Se entiende que cualquiera y todas las realizaciones de la presente invención pueden tomarse en conjunto con cualquier otra realización para describir realizaciones adicionales de la presente invención. Adicionalmente, se pretende que cualquier elemento de una realización se combine con cualquiera y todos los demás elementos de cualquiera de las realizaciones, para describir realizaciones adicionales. Es entendido por los expertos en este campo que las combinaciones de sustituyentes en donde no sean posibles, no son un aspecto de la presente invención.

30 Un segundo aspecto de la invención proporciona un compuesto, como se define en la presente, para su uso en una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

35 Un aspecto adicional de la invención proporciona un compuesto, como se define en la presente, para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Una realización de la presente invención proporciona el uso de un compuesto, como se define en la presente, en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

40 A través de toda esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprender", o las variaciones, tales como "comprende" o "comprendiendo", se deben entender como que implican la inclusión de un entero o paso o grupo de enteros o pasos mencionado, pero no la exclusión de cualquier otro entero o paso o grupo de enteros o pasos.

45 Como se utiliza en la presente, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención, y que típicamente no sean indeseables biológicamente o de otra manera. En muchos casos, los compuestos para su uso en la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o de base en virtud de la presencia de los grupos amino y/o carboxilo, o grupos similares a los mismos.

50 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, por ejemplo, las sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfonato, cloruro/clorhidrato, clorteofilonato, citrato, etandisulfonato,

fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, lauril-sulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metil-sulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato / fosfato ácido / fosfato diácido, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato, y trifluoro-acetato.

- 5 Los ácidos inorgánicos a partir de los cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

10 Los ácidos orgánicos a partir de los cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metan-sulfónico, ácido etan-sulfónico, ácido p-toluen-sulfónico y ácido sulfosalicílico.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas.

15 Las bases inorgánicas a partir de las cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, las sales de amonio y de los metales a partir de las columnas I a XII de la tabla periódica. En ciertas realizaciones, las sales se derivan a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc, y cobre; las sales particularmente adecuadas incluyen las sales de amonio, potasio, sodio, calcio, y magnesio.

Las bases orgánicas a partir de las cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo las aminas sustituidas que se presentan naturalmente, aminas cíclicas, resinas básicas de intercambio de iones, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen isopropil-amina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietil-amina, lisina, meglumina, piperazina, y trometamina.

20 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir de un compuesto progenitor, una fracción básica o ácida, mediante métodos químicos convencionales. En términos generales, estas sales pueden prepararse mediante la reacción de las formas del ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tales como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K, o similares), o mediante la reacción de las formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Estas reacciones típicamente se llevan a cabo en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En términos generales, es deseable el uso de medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo, en donde sea practicable. Pueden encontrarse listas de sales adecuadas adicionales, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20<sup>a</sup> Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Adicionalmente, los compuestos para su uso en la presente invención, incluyendo sus sales, también pueden obtenerse en la forma de sus hidratos, o pueden incluir otros solventes utilizados para su cristalización.

35 Los compuestos para su uso en la invención que contienen grupos capaces de actuar como donadores y/o aceptores para los enlaces de hidrógeno, pueden ser capaces de formar co-cristales con formadores de co-cristales adecuados. Estos co-cristales pueden prepararse a partir de dichos compuestos mediante los procedimientos de formación de co-cristales conocidos. Estos procedimientos incluyen molienda, calentamiento, co-sublimación, co-fusión, o contacto en solución de dichos compuestos con el formador de co-cristales bajo condiciones de cristalización, y el aislamiento de los co-cristales formados de esta manera. Los formadores de co-cristales adecuados incluyen aquéllos descritos en la Publicación Internacional Número WO 2004/078163.

40 Como se utiliza en la presente, el término "isómeros" se refiere a diferentes compuestos que tienen la misma fórmula molecular, pero que difieren en la disposición y configuración de los átomos. También como se utiliza en la presente, el término "un isómero óptico" o "un estereoisómero" se refiere a cualquiera de las diferentes configuraciones estereoisoméricas que pueden existir para un compuesto dado para su uso en la presente invención, e incluye a los isómeros geométricos. Se entiende que un sustituyente puede unirse en un centro quiral de un átomo de carbono. Por consiguiente, la invención incluye enantiómeros, diastereómeros o racematos del compuesto. "Enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes de espejo que no pueden superponerse una en la otra. Una mezcla de 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término se utiliza para designar una mezcla racémica donde sea apropiado. "Diastereoisómeros" son estereoisómeros que tienen cuando menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes de espejo uno del otro. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema de Cahn-Ingold-Prelog R-S. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada átomo de carbono quiral puede especificarse mediante cualquiera de R o S. Los compuestos resueltos cuya configuración absoluta se desconoce, pueden designarse como (+) o (-) dependiendo del sentido (dextrógiro o levógiro) en que roten la luz polarizada en el plano a la longitud de onda de la línea de sodio D. Algunos de los compuestos descritos en la presente contienen uno o más ejes o centros asimétricos y, por consiguiente, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros, y otras formas estereoisoméricas que puedan definirse, en términos de

estereoquímica absoluta, como (*R*) o (*S*). La presente invención pretende incluir todos los posibles isómeros, incluyendo las mezclas racémicas, las formas ópticamente puras, y las mezclas intermedias. Los isómeros (*R*) y (*S*) ópticamente activos pueden prepararse utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o pueden resolverse empleando técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un doble enlace, el sustituyente puede estar en la configuración *E* o *Z*. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente de cicloalquilo puede tener una configuración *cis* o *trans*. También se pretende incluir a todas las formas tautoméricas.

Cualquier átomo asimétrico (por ejemplo, de carbono, o similares) del (de los) compuesto(s) para su uso en la presente invención puede estar presente en una configuración racémica o enantioméricamente enriquecida, por ejemplo en la configuración (*R*), (*S*) o (*R,S*). En ciertas realizaciones, cada átomo asimétrico tiene cuando menos un exceso enantiomérico del 50%, cuando menos un exceso enantiomérico del 60%, cuando menos un exceso enantiomérico del 70%, cuando menos un exceso enantiomérico del 80%, cuando menos un exceso enantiomérico del 90%, cuando menos un exceso enantiomérico del 95%, o cuando menos un exceso enantiomérico del 99% en la configuración (*R*) o (*S*). Los sustituyentes en los átomos con enlaces insaturados, si es posible, pueden estar presentes en la forma *cis* (*Z*) o *trans* (*E*).

De conformidad con lo anterior, como se utiliza en la presente, un compuesto para su uso en la presente invención puede estar en la forma de uno de los posibles isómeros, rotámeros, atropisómeros, tautómeros o mezclas de los mismos, por ejemplo, como isómeros geométricos (*cis* o *trans*) sustancialmente puros, diastereómeros, isómeros ópticos (antípodos), racematos, o mezclas de los mismos.

Cualquier mezcla de isómeros resultante puede separarse basándose en las diferencias fisicoquímicas de los constituyentes, para dar los isómeros geométricos u ópticos puros o sustancialmente puros, diastereómeros, racematos, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccionaria.

Cualquier racemato resultante de los productos finales o de los productos intermedios puede resolverse para dar los antípodos ópticos mediante métodos conocidos, por ejemplo, mediante la separación de las sales diastereoméricas de los mismos, obtenidas con un ácido o base ópticamente activos, y liberando el compuesto ácido o básico ópticamente activo. En particular, por consiguiente, una fracción básica puede emplearse para resolver los compuestos de la presente invención para dar sus antípodos ópticos, por ejemplo, mediante la cristalización fraccionaria de una sal formada con un ácido ópticamente activo, por ejemplo ácido tartárico, ácido dibenzoil-tartárico, ácido diacetil-tartárico, ácido di-*O*,*O*'-*p*-toluolil-tartárico, ácido mandélico, ácido málico, o ácido canfor-10-sulfónico. Los productos racémicos también pueden resolverse mediante cromatografía quiral, por ejemplo, cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC), utilizando un adsorbente quiral.

Debido a que los compuestos para su uso en la invención están previstos para utilizarse en composiciones farmacéuticas, será fácilmente entendido que cada uno se proporciona de preferencia en una forma sustancialmente pura, por ejemplo cuando menos pura al 60%, de una manera más adecuada cuando menos pura al 75%, y de preferencia cuando menos pura al 85 por, en especial cuando menos pura al 98% (los porcentajes son sobre una base de peso por peso). Pueden utilizarse preparaciones impuras de los compuestos para la preparación de las formas más puras utilizadas en las composiciones farmacéuticas; estas preparaciones menos puras de los compuestos deben contener cuando menos el 1%, de una manera más adecuada cuando menos el 5%, y de preferencia del 10 al 59% de un compuesto.

Los compuestos para su uso en la presente invención se obtienen ya sea en la forma libre, como una sal de los mismos, o como derivados de pro-fármaco de los mismos.

Cuando están presentes tanto un grupo básico como un grupo ácido en la misma molécula, los compuestos para su uso en la presente invención también pueden formar sales internas, por ejemplo, moléculas zwitteriónicas.

Cualquier fórmula dada en la presente también pretende representar las formas no marcadas así como las formas isotópicamente marcadas de los compuestos. Los compuestos isotópicamente marcados tienen las estructuras ilustradas por las fórmulas dadas en la presente, excepto porque uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa seleccionados. Los ejemplos de los isótopos que pueden incorporarse en los compuestos incluyen los isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{125}\text{I}$  respectivamente. Están incluidos diferentes compuestos isotópicamente marcados como se definen en la presente, por ejemplo aquéllos en donde hay isótopos radioactivos presentes, tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , y  $^{14}\text{C}$ . Estos compuestos isotópicamente marcados son útiles en los estudios metabólicos (con  $^{14}\text{C}$ ), en los estudios de cinética de reacción (con, por ejemplo  $^2\text{H}$  o  $^3\text{H}$ ), en las técnicas de detección o de formación de imágenes, tales como tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada con emisión de un solo fotón (SPECT), incluyendo los ensayos de distribución del fármaco o del sustrato en el tejido, o en el tratamiento radioactivo de los pacientes. En particular, un compuesto marcado o de  $^{18}\text{F}$  puede ser en particular deseable para los estudios de PET o SPECT. Los compuestos isotópicamente marcados de esta invención pueden prepararse en términos generales llevando a cabo los procedimientos que se dan a conocer en los esquemas o en los ejemplos y en las preparaciones que se describen más adelante, mediante la utilización de

un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible para sustituir a un reactivo no isotópicamente marcado.

5 Además, la sustitución con isótopos más pesados, en particular deuterio (es decir,  $^2\text{H}$  o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo un aumento de la vida media *in vivo* o requerimientos de dosificación reducida o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera como un sustituyente de un compuesto. La concentración de este isótopo más pesado, específicamente deuterio, puede definirse por el factor de enriquecimiento isotópico. El término "factor de enriquecimiento isotópico", como se utiliza en la presente, significa la proporción entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo especificado. Si un sustituyente en un compuesto de esta invención es denotado como deuterio, este compuesto tiene un factor de enriquecimiento isotópico para cada átomo de deuterio designado de cuando menos 3.500 (52,5% de incorporación de deuterio en cada átomo de deuterio designado), de cuando menos 4000 (60% de incorporación de deuterio), de cuando menos 4500 (67,5% de incorporación de deuterio), de cuando menos 5000 (75% de incorporación de deuterio), de cuando menos 5500 (82,5% de incorporación de deuterio), de cuando menos 6000 (90% de incorporación de deuterio), de cuando menos 6333,3 (95% de incorporación de deuterio), de cuando menos 6466,7 (97% de incorporación de deuterio), de cuando menos 6600 (99% de incorporación de deuterio), o de cuando menos 6633,3 (99,5% de incorporación de deuterio).

Los compuestos isotópicamente marcados pueden prepararse en términos generales mediante técnicas convencionales conocidas para los expertos en este campo o mediante procesos análogos a aquéllos descritos en los ejemplos y preparaciones acompañantes, utilizando reactivos isotópicamente marcados apropiados en lugar del reactivo no marcado previamente empleado.

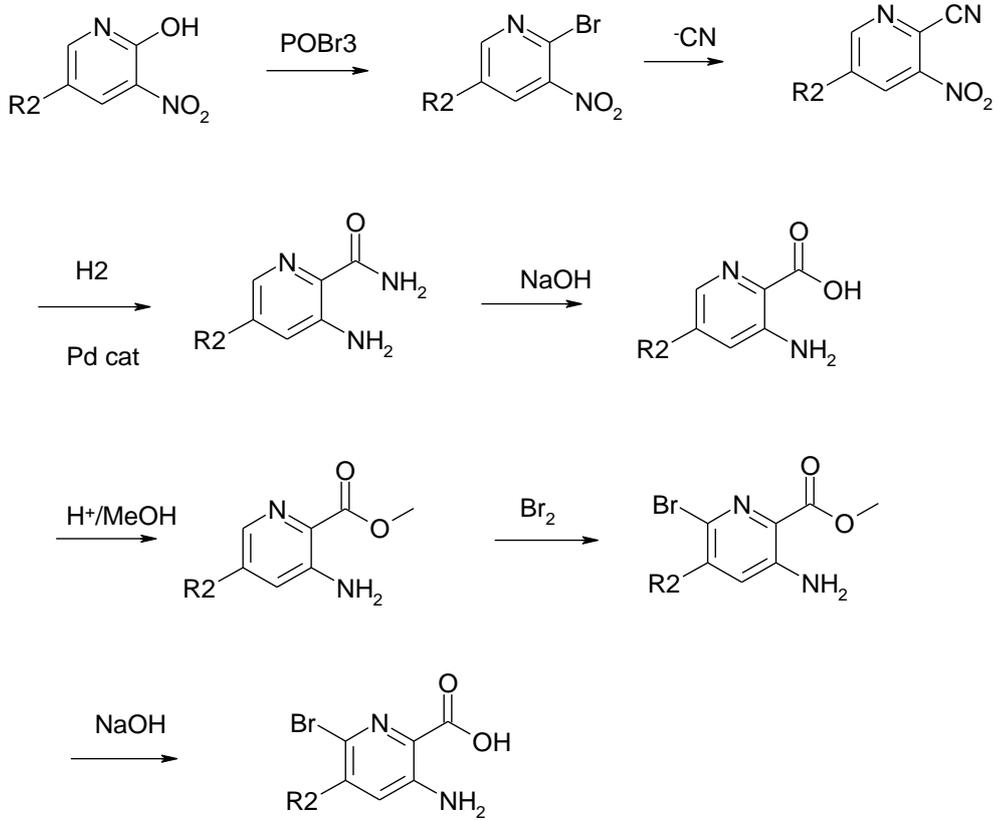
20 Los solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquéllos en donde el solvente de cristalización puede estar isotópicamente sustituido, por ejemplo,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{d}_6$ -acetona,  $\text{d}_6$ -DMSO.

#### Síntesis

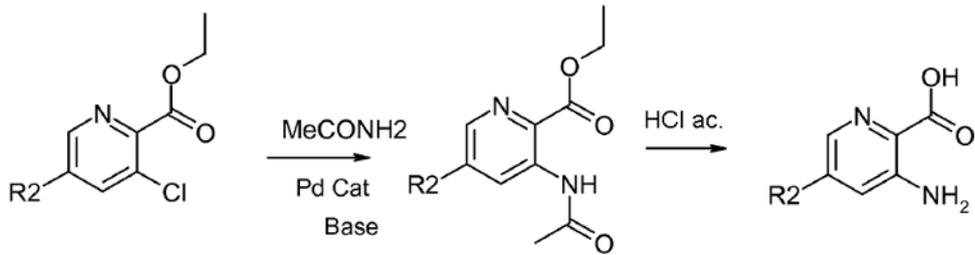
25 En términos generales, pueden sintetizarse los compuestos mediante las rutas descritas en los esquemas 1, 2 y 3 y en los ejemplos. Los esquemas 2 y 5 se proporcionan para fines de referencia y los grupos A,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  y  $\text{R}^6$ , se definen como corresponde con los compuestos para su uso en la invención en la presente.

La fracción de piridinilo puede sintetizarse de acuerdo con el esquema general 1 mostrado a continuación.

Esquema 1

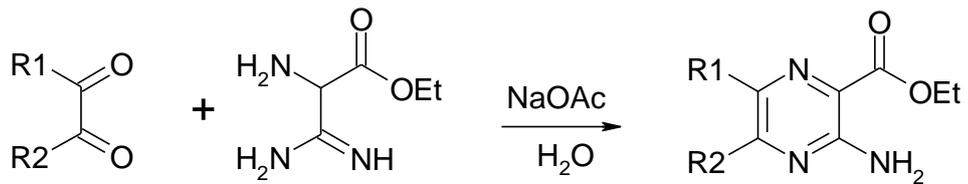


o

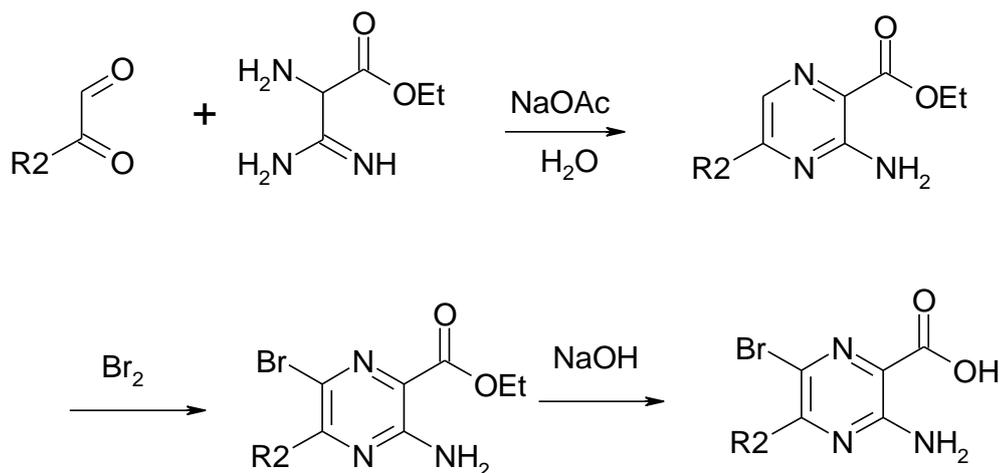


5 La fracción de pirazina puede sintetizarse de acuerdo con el esquema general 2 mostrado a continuación.

Esquema 2



o



El lado derecho de la fracción típicamente se agrega por medio de una reacción de formación de amida como se muestra a continuación en el esquema general 3.

Esquema 3

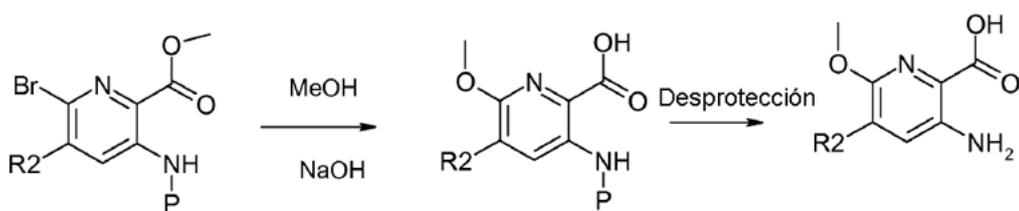


5

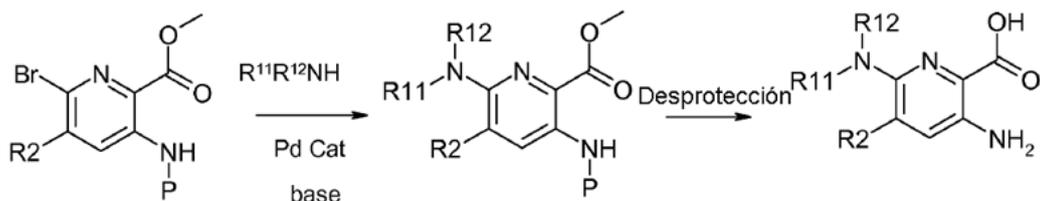
El HATU (hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio/metanamino) es un agente de acoplamiento de péptidos. Un experto entendería que posiblemente otros agentes de acoplamiento podrían funcionar. El grupo halógeno en los esquemas anteriores puede ser reemplazado por otros grupos mediante la selección del nucleófilo y el catalizador apropiados. Puede requerirse la protección del grupo NH<sub>2</sub> de arilo, y está representado por P. Los siguientes esquemas 4 a 7 son algunos ejemplos representativos.

10

Esquema 4

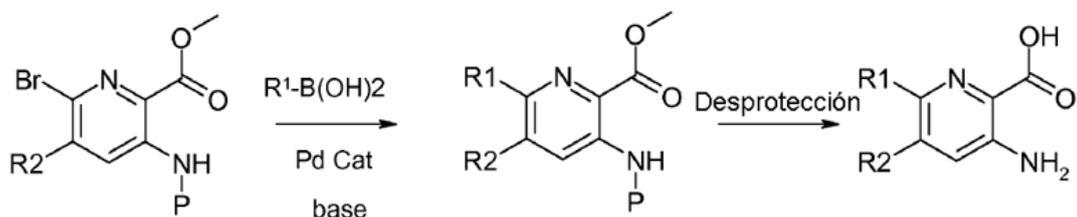


Esquema 5

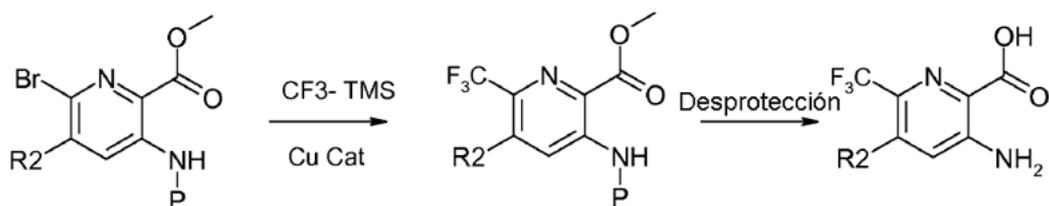


15

Esquema 6



Esquema 7



5 La persona experta apreciará que las rutas sintéticas generales detalladas anteriormente muestran las reacciones comunes para transformar los materiales de partida como se requiera. No se proporcionan las condiciones de reacción específicas, pero éstas son bien conocidas por los expertos en este campo, y las condiciones apropiadas se consideran dentro del conocimiento general común de la persona experta.

10 Los materiales de partida son ya sea compuestos comercialmente disponibles, o bien son los compuestos conocidos y pueden prepararse a partir de los procedimientos descritos en la técnica de la química orgánica.

15 Los compuestos en forma libre, pueden convertirse en la forma de sal, y *viceversa*, de una manera convencional entendida por los expertos en la materia. Los compuestos en forma libre o de sal pueden obtenerse en la forma de hidratos o solvatos que contienen un solvente utilizado para la cristalización. Los compuestos pueden recuperarse a partir de las mezclas de reacción, y se purifican de una manera convencional. Pueden obtenerse isómeros, tales como estereoisómeros, de una manera convencional, por ejemplo, mediante cristalización fraccionaria o síntesis asimétrica a partir de los materiales de partida correspondientemente sustituidos asimétricamente, por ejemplo, ópticamente activos.

20 Los compuestos pueden prepararse, por ejemplo, empleando las reacciones y técnicas descritas más adelante y en los ejemplos. Las reacciones pueden llevarse a cabo en un solvente apropiado para los reactivos y materiales empleados, y adecuados para las transformaciones que se estén efectuando. Será entendido por los expertos en la técnica de la síntesis orgánica que la funcionalidad presente sobre la molécula debe ser consistente con las transformaciones propuestas. Esto algunas veces requerirá de un juicio para modificar el orden de los pasos sintéticos o para seleccionar un esquema de proceso particular sobre otro, con el objeto de obtener un compuesto deseado de la invención.

25 Los diferentes sustituyentes sobre los productos intermedios sintéticos y los productos finales mostrados en los siguientes esquemas de reacción, pueden estar presentes en sus formas completamente elaboradas, con grupos protectores adecuados en donde se requieran, como será entendido por un experto en este campo, o en formas precursoras que posteriormente puedan elaborarse para dar sus formas finales mediante métodos familiares para un experto en la materia. También pueden agregarse sustituyentes en diferentes etapas a través de toda la secuencia sintética o después de completar la secuencia sintética. En muchos casos, pueden emplearse manipulaciones de grupos funcionales comúnmente empleadas para transformar un producto intermedio en otro producto intermedio, o un compuesto para su uso en la presente en otro compuesto para su uso en la presente. Los ejemplos de estas manipulaciones son la conversión de un éster o de una cetona en un alcohol; la conversión de un éster en una cetona; interconversiones de ésteres, ácidos y amidas; alquilación, acilación y sulfonilación de alcoholes y aminas; y muchas otras. También pueden agregarse sustituyentes empleando reacciones comunes, tales como alquilación, acilación, halogenación u oxidación. Estas manipulaciones son bien conocidas en este campo, y muchos trabajos de referencia resumen los procedimientos y métodos para estas manipulaciones. Algunos trabajos de referencia que dan ejemplos y referencias a la literatura primaria de la síntesis orgánica para muchas manipulaciones de grupos funcionales, así como otras transformaciones comúnmente empleadas en la técnica de la síntesis orgánica son

40 *March's Organic Chemistry*, 5a. Edición, Wiley y Chichester, Editores (2001); *Comprehensive Organic Transformations*, Larock, Editor, VCH (1989); *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*, Katritzky y

colaboradores, (editores de series), Pergamon (1995); y *Comprehensive Organic Synthesis*, Trost y Fleming (editores de series), Pergamon (1991). También se reconocerá que otra consideración importante en la planificación de cualquier ruta sintética en este campo, es la elección juiciosa del grupo protector utilizado para la protección de los grupos funcionales reactivos presentes en los compuestos descritos en esta invención. Pueden seleccionarse múltiples grupos protectores dentro de la misma molécula, de tal manera que cada uno de estos grupos protectores pueda ser retirado sin la retirada de otros grupos protectores en la misma molécula, o que puedan retirarse varios grupos protectores empleando el mismo paso de reacción, dependiendo del resultado deseado. Un informe con autoridad que describe muchas alternativas para el profesional capacitado es Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley and Sons (1999).

#### 10 Actividad farmacológica

Teniendo consideración de su modulación de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), los compuestos descritos en la presente, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, denominados posteriormente en la presente de una manera alternativa "agentes de la invención", son útiles en el tratamiento de las condiciones que responden a la modulación de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), en particular las condiciones que se benefician de la hidratación de las mucosas, tales como fibrosis quística.

Las enfermedades mediadas por la modulación de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) incluyen las enfermedades asociadas con la regulación de los volúmenes de fluido a través de las membranas epiteliales. Por ejemplo, el volumen del líquido superficial de las vías respiratorias es un regulador clave de la limpieza mucociliar y del mantenimiento de la salud pulmonar. La modulación de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) promoverá la acumulación de fluido sobre el lado mucoso del epitelio de las vías respiratorias, promoviendo de esta manera la eliminación del moco, y previniendo la acumulación de moco y esputo en los tejidos respiratorios (incluyendo las vías respiratorias pulmonares). Estas enfermedades incluyen las enfermedades respiratorias, tales como fibrosis quística, discinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, infecciones del tracto respiratorio (agudas y crónicas; virales y bacterianas), y carcinoma pulmonar. Las enfermedades mediadas por la modulación de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) también incluyen enfermedades diferentes de las enfermedades respiratorias que están asociadas con una regulación de fluido anormal a través de un epitelio, tal vez involucrando una fisiología anormal de los líquidos superficiales protectores sobre su superficie, por ejemplo, síndrome de Sjögren, xerostomía (boca seca) o queratoconjuntivitis sicca (ojo seco). Adicionalmente, se podría utilizar la modulación de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) en el riñón para promover la diuresis e inducir de esta manera un efecto hipotensivo.

El tratamiento de acuerdo con la invención puede ser sintomático o profiláctico.

El asma incluye asma intrínseco (no alérgico) y asma extrínseco (alérgico), asma leve, asma moderado, asma severo, asma bronquítico, asma inducido por ejercicio, asma ocupacional, y asma inducido tras infección bacteriana. También se debe entender que el tratamiento de asma abarca el tratamiento de sujetos, por ejemplo, de menos de 4 ó 5 años de edad, que exhiban síntomas de jadeo y sean diagnosticados o diagnosticables como "bebés jadeantes", una categoría de paciente establecida de importante preocupación médica y ahora identificada con frecuencia como asmáticos incipientes o en fase temprana. (Para mayor conveniencia, esta condición asmática particular se denomina "síndrome de bebé jadeante").

La eficacia profiláctica en el tratamiento de asma será evidenciada por una frecuencia o severidad reducida del ataque sintomático, por ejemplo, del ataque asmático agudo o broncoconstrictor, mejoras en la función pulmonar, o mejor hiper-reatividad de las vías respiratorias. Además puede ser evidenciada por un requerimiento reducido de otra terapia sintomática, es decir, terapia para, o pretendida para, restringir o abortar el ataque sintomático cuando se presente, por ejemplo, anti-inflamatoria (por ejemplo, corticosteroide) o broncodilatadora. El beneficio profiláctico en asma puede ser evidente, en particular, en los sujetos propensos al "ahogamiento matutino". El "ahogamiento matutino" es un síndrome asmático reconocido, común para un porcentaje sustancial de asmáticos, y caracterizado por ataque de asma, por ejemplo, entre las horas de aproximadamente las 4 a las 6 am, es decir, en un tiempo normalmente distante sustancialmente de cualquier terapia sintomática de asma previamente administrada.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica incluye bronquitis crónica o disnea asociada con la misma, enfisema, así como exacerbación de hiper-reatividad de las vías respiratorias a consecuencia de otra terapia con fármacos, en particular, otra terapia con fármacos inhalados. La invención también es aplicable al tratamiento de bronquitis de cualquier tipo o génesis, incluyendo, por ejemplo, bronquitis aguda, araquídica, catarral, cruposa, crónica, o finoide.

La enfermedad de ojo seco se caracteriza por una disminución en la producción lagrimal acuosa y por perfiles anormales de lípidos, proteínas y mucinas de la película lagrimal. Existen muchas causas para el ojo seco, algunas de las cuales incluyen la edad, cirugía por láser del ojo, artritis, medicamentos, quemaduras químicas/térmicas,

alergias, y enfermedades, tales como fibrosis quística y síndrome de Sjögren. La secreción creciente de aniones por medio del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) mejoraría el transporte de fluidos desde las células endoteliales de la córnea y desde las glándulas secretoras que rodean al ojo para aumentar la hidratación de la córnea. Esto ayudaría a aliviar los síntomas asociados con la enfermedad de ojo seco.

5 El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune en donde el sistema inmunológico ataca a las glándulas productoras de humedad a través de todo el cuerpo, incluyendo ojos, boca, piel, tejido respiratorio, hígado, vagina, e intestino. Los síntomas incluyen ojo seco, boca seca, y vagina seca, así como enfermedad pulmonar. La enfermedad también está asociada con artritis reumatoide, lupus sistémico, esclerosis sistémica, y polimiositis/dermatomiositis. Se cree que el tráfico defectuoso de proteína provoca la enfermedad, para cuyo tratamiento las opciones son limitadas. Los moduladores de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) pueden hidratar los diferentes órganos afectados por la enfermedad, y pueden ayudar a aliviar los síntomas asociados.

15 La idoneidad de los moduladores de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) como el tratamiento de una enfermedad que se beneficie de la hidratación de las mucosas, puede probarse mediante la determinación del movimiento de los iones de cloruro en un ensayo basado en células adecuado. Por ejemplo, pueden utilizarse células individuales o epitelios confluentes, que expresen endógenamente, o que se diseñen para sobre-exresar el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), con el fin de evaluar la función del canal, empleando técnicas electrofisiológicas o estudios de flujo de iones. Véanse los métodos descritos en: Hirsh y colaboradores, *J Pharm Exp Ther* (2004); Moody y colaboradores, *Am J Physiol Cell Physiol* (2005).

20 Los moduladores de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), incluyendo los compuestos descritos en la presente, también son útiles como co-agentes terapéuticos para utilizarse en combinación con otras sustancias de fármaco, tales como sustancias de fármaco anti-inflamatorias, broncodilatadoras, anti-histamínicas, o anti-tusivas, en particular en el tratamiento de fibrosis quística o enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias, tales como aquéllas mencionadas anteriormente en la presente, por ejemplo, como potenciadores de la actividad terapéutica de tales fármacos, o como un medio para reducir la dosificación requerida o los efectos secundarios potenciales de estos fármacos.

25 Los compuestos descritos en la presente pueden mezclarse con la otra sustancia de fármaco en una composición farmacéutica fija, o pueden administrarse por separado, antes, de una manera simultánea con, o después de, la otra sustancia de fármaco.

30 De conformidad con lo anterior, la invención se refiere a una combinación de un compuesto modulador de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) descrito en la presente con agentes osmóticos (solución salina hipertónica, dextrano, manitol, xilitol), bloqueadores de ENaC, una sustancia de fármaco anti-inflamatoria, broncodilatadora, anti-histamínica, anti-tusiva, antibiótica y/o de ADNasa, en donde el modulador de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y la sustancia de fármaco adicional pueden estar en la misma o diferente composición farmacéutica.

35 Los antibióticos adecuados incluyen antibióticos macrólidos, por ejemplo, tobramicina (TOBI<sup>MR</sup>).

40 Las sustancias de fármaco de ADNasa adecuadas incluyen dornasa-alfa (Pulmozyme<sup>MR</sup>), una solución altamente purificada de desoxirribonucleasa humana recombinante I (rhADNasa), la cual disocia selectivamente el ADN. La Dornasa-alfa se utiliza para tratar fibrosis quística.

45 Otras combinaciones útiles de los moduladores de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) con fármacos anti-inflamatorios son aquéllas con antagonistas de los receptores de quimiocina, por ejemplo, CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9 y CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, en particular los antagonistas de CCR-5, tales como los antagonistas de Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; los antagonistas de Takeda, tales como cloruro de N-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metil-fenil)-5H-benzo-ciclohepten-8-il]-carbonil]-amino]-fenil]-metil]-tetrahydro-N,N-dimetil-2H-piran-4-aminio (TAK-770); y los antagonistas de CCR-5 descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número USP 6.166.037 (en particular en las reivindicaciones 18 y 19), y en las Publicaciones Internacionales Números WO 00/66558 (en particular en la reivindicación 8), WO 00/66559 (en particular en la reivindicación 9), WO 04/018425 y WO 04/026873.

50 Los fármacos anti-inflamatorios adecuados incluyen esteroides, en particular, glucocorticosteroides, tales como budesonida, dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, ciclesonida o furoato de mometasona, o los esteroides descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (en especial aquéllos de los Ejemplos 3, 11, 14, 17, 19, 26, 34, 37, 39, 51, 60, 67, 72, 73, 90, 99 y 101), WO 03/35668, WO 03/48181, WO 03/62259, WO 03/64445, WO 03/72592, WO 04/39827 y WO 04/66920;

agonistas de receptores de glucocorticoides no esteroideos, tales como aquéllos descritos en las Patentes Números DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143, WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 04/18429, WO 04/19935 y WO 04/26248; antagonistas de LTD<sub>4</sub>, tales como montelukast y zafirlukast; inhibidores de PDE<sub>4</sub>, tales como cilomilast (Ariflo<sup>®</sup> GlaxoSmithKline), Roflumilast (Byk Gulden), V-11294A (Napp), BAY19-8004 (Bayer), SCH-351591 (Schering-Plough), Arofilina (Almirall Prodesfarma), PD189659/PD168787 (Parke-Davis), AWD-12-281 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SelCID(TM) CC-10004 (Celgene), VM554/UM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo), y los que se dan a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO 99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO 03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO 04/045607 y WO 04/037805; antagonistas del receptor de adenosina A<sub>2B</sub>, tales como aquéllos descritos en la Publicación Internacional Número WO 02/42298; y agonistas del adreno-receptor beta-2, tales como albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutalina, salmeterol, fenoterol, procaterol, y en especial, formoterol, carmoterol y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y los compuestos (en forma libre o de sal o de solvato) de la fórmula (I) de la Publicación Internacional Número WO 0075114, de preferencia los compuestos de los ejemplos del mismo, en especial indacaterol y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, así como los compuestos (en forma libre o de sal o de solvato) de la fórmula (I) de la Publicación Internacional Número WO 04/16601, y también los compuestos de las Patentes Números EP 1440966, JP 05025045, WO 93/18007, WO 99/64035, USP 2002/0055651, WO 01/42193, WO 01/83462, WO 02/66422, WO 02/70490, WO 02/76933, WO 03/24439, WO 03/42160, WO 03/42164, WO 03/72539, WO 03/91204, WO 03/99764, WO 04/16578, WO 04/22547, WO 04/32921, WO 04/33412, WO 04/37768, WO 04/37773, WO 04/37807, WO 04/39762, WO 04/39766, WO 04/45618, WO 04/46083, WO 04/80964, WO 04/108765 y WO 04/108676.

Los fármacos broncodilatadores adecuados incluyen a los agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular, bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, sales de tiotropio y CHF 4226 (Chiesi), y glicopirrolato, pero también aquéllos descritos en las Patentes Números EP 424021, USP 3.714.357, USP 5.171.744, WO 01/04118, WO 02/00652, WO 02/51841, WO 02/53564, WO 03/00840, WO 03/33495, WO 03/53966, WO 03/87094, WO 04/018422 y WO 04/05285.

Los fármacos anti-inflamatorios y broncodilatadores dobles adecuados incluyen los agonistas del adreno-receptor beta-2 / antagonistas muscarínicos dobles, tales como aquéllos que se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número USP 2004/0167167, y en las Publicaciones Internacionales Números WO 04/74246 y WO 04/74812.

Las sustancias de fármaco anti-histamínicas adecuadas incluyen clorhidrato de cetirizina, acetaminofeno, fumarato de clemastina, prometazina, loratidina, desloratidina, difenhidramina y clorhidrato de fexofenadina, activastina, astemizol, azelastina, ebastina, epinastina, mizolastina y tefenadina, así como aquéllas que se dan a conocer en la Patente Japonesa Número JP 2004107299, y en las Publicaciones Internacionales Números WO 03/099807 y WO 04/026841.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto descrito en la presente, en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, para su uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Los agentes de la invención pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, oralmente, por ejemplo, en la forma de una tableta o cápsula; parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente; mediante inhalación, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias; intranasalmente, por ejemplo, en el tratamiento de rinitis alérgica; tópicamente a la piel; o rectalmente. Los compuestos descritos en la presente pueden proporcionarse como composición farmacéutica, la cual comprende el compuesto, en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo. La composición puede contener un co-agente terapéutico, tal como un fármaco anti-inflamatorio, broncodilatador, anti-histamínico, o anti-tusivo como se describe anteriormente en la presente. Estas composiciones pueden prepararse utilizando diluyentes o excipientes convencionales y técnicas conocidas en el campo galénico. Por consiguiente, las formas de dosificación oral pueden incluir tabletas y cápsulas. Las formulaciones para administración tópica pueden tomar la forma de cremas, ungüentos, geles, o sistemas de suministro transdérmico, por ejemplo, parches. Las composiciones para inhalación pueden comprender formulaciones en aerosol u otras formulaciones atomizables, o formulaciones en polvo seco.

Cuando la composición comprende una formulación en aerosol, de preferencia contiene, por ejemplo, un propelente de hidro-fluoro-alcano (HFA), tal como HFA134a o HFA227 o una mezcla de los mismos, y puede contener uno o más co-solventes conocidos en la técnica, tales como etanol (hasta el 20% en peso), y/o uno o más tensioactivos, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitán, y/o uno o más agentes de volumen, tales como lactosa. Cuando la composición comprende una formulación en polvo seco, de preferencia contiene, por ejemplo, el compuesto con un diámetro de partículas de hasta 10 micras, opcionalmente, junto con un diluyente o vehículo, tal como lactosa, de la

distribución de tamaños de partículas deseada, y un compuesto que ayude a proteger contra el deterioro del rendimiento del producto debido a la humedad, por ejemplo, estearato de magnesio. Cuando la composición comprende una formulación nebulizada, de preferencia contiene, por ejemplo, el compuesto, ya sea disuelto o suspendido en un vehículo que contenga agua, un co-solvente, tal como etanol o propilenglicol, y un estabilizante, el cual puede ser un tensioactivo.

Los compuestos para su uso en la invención pueden incluir:

- (a) un compuesto en una forma inhalable, por ejemplo, en una composición en aerosol u otra atomizable, o en un particulado inhalable, por ejemplo, en una forma micronizada;
- (b) un medicamento inhalable que comprende un compuesto en una forma inhalable;
- (c) un producto farmacéutico que comprende un compuesto en una forma inhalable en asociación con un dispositivo para inhalación; y
- (d) un dispositivo para inhalación que contiene un compuesto en una forma inhalable.

Las dosificaciones de los compuestos empleadas en la práctica de la presente invención, por supuesto, variarán dependiendo, por ejemplo, de la condición particular que se vaya a tratar, del efecto deseado, y del modo de administración. En general, las dosificaciones diarias adecuadas para la administración mediante inhalación son del orden de 0,005 a 10 mg, mientras que para administración oral, las dosis diarias adecuadas son del orden de 0,05 a 100 mg.

#### Uso farmacéutico y ensayo

Los compuestos para su uso descritos en la presente, y sus sales farmacéuticamente aceptables, denominados posteriormente en la presente de una manera alternativa "agentes de la invención", son útiles como productos farmacéuticos. En particular, los compuestos son moduladores de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) adecuados, y pueden probarse en los siguientes ensayos.

#### Ensayo de potencial de membrana

La actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) puede cuantificarse mediante la medición del potencial transmembrana. Los medios para medir el potencial transmembrana en un sistema biológico pueden emplear varios métodos, incluyendo ensayos de potencial de membrana electrofisiológicos y basados en la fluorescencia óptica.

El ensayo de potencial de membrana óptica utiliza un tinte potenciométrico negativamente cargado, tal como el tinte de potencial de membrana de FLIPR (FMP) (véase Baxter DF, Kirk M, Garcia AF, Raimondi A, Holmqvist MH, Flint KK, Bojanic D, Distefano PS, Curtis R, Xie Y. 'A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels'. J Biomol Screen. Febrero de 2002; 7(1): 79-85), el cual, cuando es extracelular, se enlaza a un agente de extinción. Después de la despolarización celular, el tinte negativamente cargado se redistribuye hacia el compartimiento intracelular, separándose del agente extinción que no atraviesa la membrana, proporcionando un aumento en la fluorescencia. Este cambio en la fluorescencia es proporcional al cambio en el potencial transmembrana que puede resultar de la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR). Los cambios en la fluorescencia pueden monitorearse en tiempo real mediante un detector de fluorescencia apropiadamente equipado, tal como el FLIPR (lector de placas de formación de imágenes fluorométricas) en placas de microtitulación de 96 ó 384 pozos.

#### Cultivo celular:

Se utilizaron células de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban establemente el canal de  $\Delta F508$ -CFTR para los experimentos del potencial de membrana. Las células se mantuvieron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% v/v, con el 100% de humedad, en medio de Eagle modificado (MEM) complementado con suero fetal de becerro al 8% v/v, 100 µg/ml de metotrexato, y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejido de 225 cm<sup>2</sup>. Para los ensayos de potencial de membrana, las células se sembraron en placas de 96 pozos a 40.000 células por pozo, se les permitió adherirse, y entonces se mantuvieron a 26°C durante 48 horas con el objeto de facilitar la inserción del canal.

#### Ensayo de potenciador:

El ensayo de rastreo de potencial de membrana utilizó una solución extracelular con bajo contenido en ion de cloruro

(aproximadamente 5 mM) combinado con un protocolo de doble adición. La primera adición fue del tampón con o sin el compuesto de prueba, seguida, 5 minutos después, por una adición de forskolina (de 1 a 20  $\mu$ M) - este protocolo favorece el máximo eflujo de cloruro en respuesta a la activación del  $\Delta$ F508-CFTR. El eflujo de ion de cloruro mediado por  $\Delta$ F508-CFTR conduce a una despolarización de la membrana, la cual se monitorea ópticamente mediante el tinte FMP.

Soluciones:

Extracelular de bajo contenido en cloruro (mM): gluconato de sodio 120,  $\text{CaCl}_2$  1,2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,8,  $\text{MgCl}_2$  1,2, D-glucosa 10,0, HEPES 20,0, pH de 7,4 con NaOH.

Tinte FMP: hecho de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes en la solución extracelular de bajo contenido en cloruro detallada anteriormente, a una concentración final 10x, y almacenado como alícuotas de 1 ml a  $-20^\circ\text{C}$ .

Ensayo IonWorks Quattro:

La actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) también puede cuantificarse electro-fisiológicamente utilizando la configuración de célula entera de la técnica de fijación de voltaje (Hamill y colaboradores, Pflugers Archive 1981). Este ensayo mide directamente las corrientes asociadas con el flujo de cloruro a través de los canales reguladores de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), mientras que mantiene o ajusta el voltaje transmembrana. Este ensayo puede utilizar ya sea micropipetas de vidrio individuales, o bien disposiciones planas paralelas para medir la actividad del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) a partir de los sistemas celulares nativos o recombinantes. Las corrientes medidas utilizando disposiciones planas paralelas pueden cuantificarse utilizando un instrumento apropiadamente equipado, tal como el IonWorks Quattro (Molecular Devices) o el Qpatch (Sophion). El sistema Quattro puede medir las corrientes del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) ya sea a partir de una sola célula por pozo de registro (configuración HT), o de una manera alternativa, a partir de una población de 64 células por pozo (Population Patch Clamp [fijación de voltaje de población] PPC) (Finkel A, Wittel A, Yang N, Handran S, Hughes J, Costantin J. 'Population patch clamp improves data consistency and success rates in the measurement of ionic currents'. J Biomol Screen. Agosto de 2006; 11(5): 488-96).

Cultivo celular:

Se utilizaron células de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban establemente el canal de  $\Delta$ F508-CFTR para los experimentos con IonWorks Quattro. Las células se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  en  $\text{CO}_2$  al 5% v/v, con el 100% de humedad, en D-MEM complementado con suero fetal de becerro (FCS) al 10% (v/v), 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, NEAA al 1% (v/v), 1 mg/ml de zeocina, y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de higromicina B. Para los experimentos, las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejido de  $225\text{ cm}^2$  hasta casi la confluencia, y entonces se cultivaron a  $26^\circ\text{C}$  durante 48 a 72 horas con el objeto de facilitar la inserción del canal. Las células se retiraron del matraz, y se volvieron a suspender ya sea en la solución de registro extracelular para su experimentación inmediata, o de una manera alternativa, en el medio de crecimiento complementado con sulfóxido de dimetilo al 10% v/v, y se congelaron hasta  $-80^\circ\text{C}$  como alícuotas de 1 a 2 ml para utilizarse en una fecha posterior.

Ensayo de potenciador:

Las células, en una densidad de 1,5 a 3 millones por ml, se colocaron en el sistema Quattro, se agregaron a la disposición de parche plano, y se dejaron establecer los sellos durante 5 a 10 min. Después de evaluar las resistencias de los sellos (comúnmente  $>50\text{ M}\Omega$ ), se obtuvo el acceso a la célula entera mediante una perforación con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina B. Las corrientes de la línea base se midieron mediante una exploración previa del compuesto obtenida mediante la aplicación de una rampa de voltaje desde  $-100$  hasta  $+100\text{ mV}$ . Esto fue seguido por la adición ya sea del tampón o bien del compuesto de prueba diluido en la solución extracelular complementada con forskolina 20  $\mu\text{M}$ , a cada uno de los 384 pozos de la disposición de parche plano. Después del paso de incubación (de 5 a 20 minutos), se midieron nuevamente las corrientes posteriores al compuesto, mediante la aplicación de una rampa de voltaje desde  $-100$  hasta  $+100\text{ mV}$ . La diferencia en las corrientes entre las exploraciones antes y después del compuesto, definió la eficacia de la potenciación del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR).

Soluciones:

Solución extracelular (ECS): NaCl 145 mM, CsCl 4 mM, D-glucosa 5 mM, TES 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH de 7,4, NaOH.

Tampón intracelular (ICS): ácido L-aspártico 113 mM, CsOH 113 mM, CsCl 27 mM, NaCl 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, EGTA

1 mM, TES 10 mM. pH de 7,2, con CsOH. Se esterilizó en filtro antes de usarse.

Ensayo de transporte de iones:

Otro método para medir la función del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) es la medición de la corriente de corto circuito de la cámara de Ussing. Las células epiteliales diseñadas o nativas se cultivan hasta obtener una monocapa confluyente sobre un filtro semi-permeable, y se intercalan entre dos bloques de Perspex. El flujo de los iones de cloruro por medio del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) desde un lado del epitelio hasta el otro, puede cuantificarse mediante la medición del flujo de corriente, mientras que se mantiene el potencial transepitelial en 0 mV. Esto se logra utilizando electrodos basados en agar rellenos de KCl tanto para sujetar la monocapa celular como para medir el flujo de las corrientes.

10 Cultivo celular:

Las células FRT que expresaban establemente  $\Delta F508$ -CFTR se cultivaron sobre plástico en el medio F-12 modificado por Coon complementado con  $\text{NaHCO}_3$  32 mM, suero bovino fetal al 10% v/v, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycin, y 30  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina B como el medio de crecimiento. Para los experimentos de la cámara de Ussing, las células se cultivaron como epitelios polarizados sobre los insertos de soporte permeables Snapwell (500.000 células/inserto en el medio de crecimiento), y se cultivaron durante 7 a 9 días. Los insertos se alimentaron con el medio de crecimiento F-12 modificado por Coon fresco cada 48 horas, y 24 horas antes del experimento en la cámara de Ussing. Para aumentar la expresión de proteína de  $\Delta F508$ -CFTR en la superficie celular, las placas se incubaron a 27°C durante 48 horas antes de llevar a cabo un experimento de la cámara de Ussing.

20 Ensayo de potenciador:

Se utilizaron células epiteliales de tiroides de rata de Fischer (FRT), que expresaban establemente el  $\Delta F508$ -CFTR humano, como cultivos de monocapa sobre soportes permeables. La corriente de  $\text{Cl}^-$  se midió utilizando la técnica de corriente de corto circuito, bajo un gradiente de  $\text{Cl}^-$  basolateral a apical impuesto en las cámaras de Ussing. Para medir las corrientes de  $\text{Cl}^-$  estables, las células epiteliales de tiroides de rata de Fischer (FRT) se cultivaron durante 48 horas a 27°C para facilitar la inserción del  $\Delta F508$ -CFTR en la membrana plasmática. Los estudios de la cámara de Ussing se condujeron de la misma manera a 27°C. Bajo estas condiciones, pudieron cuantificarse los efectos de las adiciones acumulativas de los compuestos de prueba sobre las corrientes de  $\Delta F508$ -CFTR, con los criterios de valoración tanto de potencia como de eficacia. Los compuestos se agregaron a los lados tanto apical como basolateral después de la adición de forskolina 10  $\mu\text{M}$ . La eficacia de los compuestos se comparó con la de un potenciador conocido, tal como gensiteína.

Soluciones:

Solución de Ringer basolateral (mM): NaCl 126,  $\text{NaHCO}_3$  24,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,38,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,13,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{CaCl}_2$  1, y glucosa 10.

Solución de Ringer apical (mM): gluconato de sodio 140,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{CaCl}_2$  2, HCl 1, glucosa 10, y  $\text{NaHCO}_3$  24.

35 Los compuestos también pueden probarse para determinar su capacidad para estimular la inserción del  $\Delta F508$ -CFTR hacia dentro de la membrana celular utilizando los ensayos anteriores. Para estos ensayos, los protocolos fueron idénticos excepto porque las células no se cultivaron a una baja temperatura (26°C o 27°C), sino que en su lugar se incubaron con los compuestos de prueba durante 12 a 24 horas antes del ensayo.

40 Los compuestos de los ejemplos que se encuentran más adelante en la presente, en términos generales, tienen valores  $\text{EC}_{50}$  en las mediciones de datos descritas anteriormente por debajo de 10  $\mu\text{M}$ . La tabla 1 proporciona una lista de compuestos representativos con su valor  $\text{EC}_{50}$ .

Tabla 1

Ejemplo n.º	$\text{EC}_{50}$ $\mu\text{M}$
2 (referencia)	0,015
3 (referencia)	0,055
4	0,076
5	0,05
6	0,426
7	0,040
8	0,060

16	0,008
17	0,010

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Condiciones generales:

5 Los espectros de masas se ejecutaron en sistemas de LC-MS utilizando ionización por electropulverización. Éstos fueron cualquiera de combinaciones de Agilent 1100 HPLC/Espectrómetro de masas Micromass Platform o Waters Acquity UPLC con Espectrómetro de Masas SQD.  $[M+H]^+$  se refieren a los pesos moleculares mono-isotópicos.

Los espectros de RMN se ejecutaron en espectrómetros Bruker AVANCE 400 NMR de acceso abierto utilizando ICON-RMN. Los espectros se midieron a 298K y se referenciaron utilizando el pico del solvente.

10 Las rotaciones ópticas se midieron a 589 nm y a 546 nm utilizando un polarímetro de actividad óptica AA-1000 a 21°C.

15 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitaciones sobre la misma. Las temperaturas se dan en grados centígrados. Si no se menciona de otra manera, todas las evaporaciones se llevan a cabo bajo presión reducida, de preferencia entre aproximadamente 15 mm Hg y 100 mm Hg (= de 20 a 133 mbar). La estructura de los productos finales, productos intermedios y materiales de partida, se confirma mediante los métodos analíticos convencionales, por ejemplo, microanálisis y características espectroscópicas, por ejemplo, MS, IR, y RMN. Las abreviaturas empleadas son las convencionales en la materia. Si no se definen, los términos tienen sus significados generalmente aceptados.

#### **Abreviaturas:**

Ap aparente

20 ATP 5'-trifosfato de adenosina

BINAP 2,2'-bis-(difenil-fosfino)-1,1'-binaftilo racémico

BOC terbutil-carboxilo

a ancho

d doblete

25 dd doblete de dobletes

DCM dicloro-metano

DIEA dietil-isopropil-amina

DIPEA di-isopropil-etil-amina

DMF N,N-dimetil-formamida

30 DMSO sulfóxido de dimetilo

DTT ditioeritrol

ESI ionización por electropulverización

EtOAc acetato de etilo

eq. equivalente

35 h hora(s)

HATU hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio

HPLC cromatografía de líquidos a alta presión

IR espectroscopía infrarroja

LCMS cromatografía de líquidos y espectrometría de masas

5 MeOH metanol

MS espectrometría de masas

MW microondas

m multiplete

min minutos

10 ml mililitro(s)

m/z proporción de la masa a la carga

RMN resonancia magnética nuclear

ppm partes por millón

PS soportado por polímero

15 rac racémico

RT temperatura ambiente

Rt tiempo de retención

s singlete

SCX-2 intercambio de catión fuerte (por ejemplo, columnas Isolute® SCX-2 de Biotage)

20 t triplete

TEA trietil-amina

TFA ácido trifluoro-acético

THF tetrahidrofurano

25 Haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, los compuestos de las realizaciones preferidas se sintetizaron empleando los métodos descritos en la presente, u otros métodos que son conocidos en la materia.

30 Los diferentes materiales de partida, productos intermedios, y los compuestos de las realizaciones preferidas, pueden aislarse y purificarse, donde sea apropiado, utilizando técnicas convencionales, tales como precipitación, filtración, cristalización, evaporación, destilación, y cromatografía. A menos que se informe de otra manera, todos los materiales de partida se obtienen con los proveedores comerciales, y se utilizan sin purificación adicional. Las sales pueden prepararse a partir de los compuestos mediante los procedimientos de formación de sales conocidos.

Debe entenderse que los compuestos orgánicos de acuerdo con las realizaciones preferidas pueden exhibir el fenómeno de tautomerismo. Debido a que las estructuras químicas dentro de esta memoria descriptiva solamente pueden representar una de las posibles formas tautoméricas, se debe entender que las realizaciones preferidas abarcan cualquier forma tautomérica de la estructura trazada.

35 Si no se indica de otra manera, las condiciones de la HPLC analítica son como sigue:

Método 10minLC\_v002

Columna: Waters BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm.

Temperatura de la columna: 50°C

Eluyentes: A: H<sub>2</sub>O, B: metanol, ambos conteniendo TFA al 0,1%.

5 Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Gradiente: 0,20 min con el 5% de B; del 5% al 95% de B en 7,80 min, 1,00 min con el 95% de B.

Método 10minLC\_v003

Columna: Waters BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm.

Temperatura de la columna: 50°C

10 Eluyentes: A: H<sub>2</sub>O, B: acetonitrilo, ambos conteniendo TFA al 0,1%.

Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Gradiente: 0,20 min con el 5% de B; del 5% al 95% de B en 7,80 min, 1,00 min con el 95% de B.

Método 2minLC\_v002

Columna: Waters BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm.

15 Temperatura de la columna: 50°C

Eluyentes: A: H<sub>2</sub>O, B: metanol, ambos conteniendo TFA al 0,1%.

Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Gradiente: 0,20 min con el 5% de B; del 5% al 95% de B en 1,30 min, 0,25 min con el 95% de B.

Método 2minLC\_v003

20 Columna: Waters BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm.

Temperatura de la columna: 50°C

Eluyentes: A: H<sub>2</sub>O, B: acetonitrilo, ambos conteniendo TFA al 0,1%.

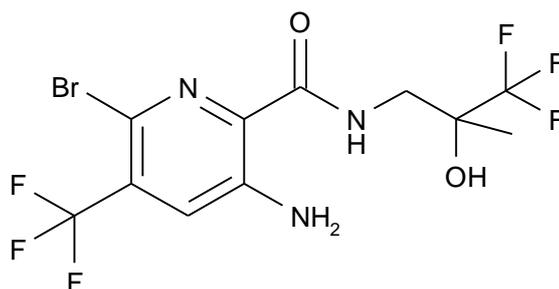
Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Gradiente: 0,20 min con el 5% de B; del 5% al 95% de B en 1,30 min, 0,25 min con el 95% de B.

25 Preparación de los compuestos finales

**Ejemplo de referencia 1.0**

(3,3,3-Trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico



5 El ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (producto intermedio A) (397 mg, 1,392 mmol), clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol (250 mg, 1,392 mmol), y HATU (529 mg, 1,392 mmol), se disolvieron en DMF (10 ml), y se agitaron a RT durante 2 min. Se agregó 4-metil-morfolina (0,413 ml, 4,18 mmol), y se continuó la agitación a RT durante 3 horas. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo/agua (100 ml), y se extrajo con EtOAc (250 ml). El extracto orgánico se lavó con una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (aproximadamente 50 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentró al vacío, para dar un aceite de color café pálido. El aceite se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (aproximadamente 3 ml), y se cargó sobre una columna ISCO 24g (sílice) eluyendo con iso-hexano:EtOAc, para proporcionar el producto del título; LC-MS Rt = 1,46 min; [M+H]<sup>+</sup> 410,1, Método 2minLC\_v002. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,30 (NH, t), 7,72 (1H, s), 7,29 (NH<sub>2</sub>, s a), 6,28 (OH, s), 3,68 (1H, dd), 3,47 (1H, dd), 1,24 (3H, s). <sup>19</sup>F RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -62,71 (CF<sub>3</sub>, s), -80,48 (CF<sub>3</sub>, s).

15 El compuesto de la siguiente tabla 2, se preparó mediante un método similar a aquél del ejemplo 1 a partir del compuesto de partida y la amina apropiados. En la presente, se prepararon los enantiómeros individuales utilizando aminas quirales o por medio de la separación del producto mediante cromatografía de fluidos supercríticos. Las preparaciones de los compuestos de partida y de las aminas se describen en la sección de productos intermedios, a menos que estén disponibles comercialmente. Pueden haberse usado DIPEA o TEA en lugar de 4-metil-morfolina en algunas reacciones.

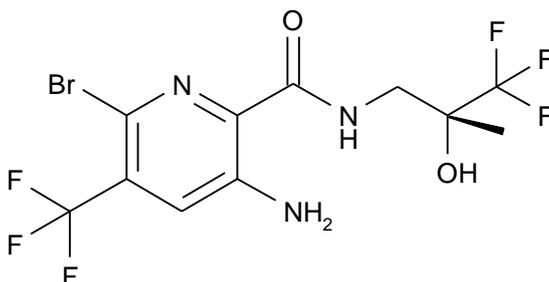
Tabla 2

Ej.	Estructura	Nombre	Tiempo de retención, [M+H] <sup>+</sup> , <sup>1</sup> H RMN
1.25		(3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico	Rt 5,41 min; [M+H] <sup>+</sup> 426; Método 10minLC_v002. <sup>1</sup> H RMN δ 8,42 (1H, m), 7,72 (1H, s), 7,5 (2H, m), 7,3 (2H, t), 7,22 (2H, s a), 6,24 (1H, s), 3,68 (1H, m), 3,46 (1H, m), 1,24 (3H, s)

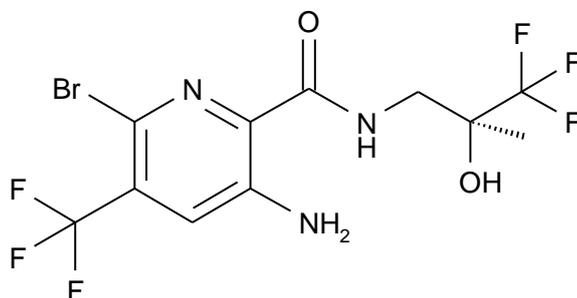
## Ejemplos de referencia 2 y 3

20 Estos compuestos, es decir,

La ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, (Ejemplo 2),



y la ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, (Ejemplo 3),



5 se preparan mediante la separación quiral de la (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, (Ejemplo 1), utilizando Cromatografía de Fluidos Supercríticos bajo las siguientes condiciones:

Fase móvil: 12% de isopropanol + DEA al 0,1% / 88% de CO<sub>2</sub>.

Columna: Chiralpak OJ-H, 250 x 10 mm de diámetro interno, 5 µm.

Detección: UV a 220 nm.

10 Velocidad de flujo: 10 ml/min

Concentración de la muestra: 347 mg en 5 ml de EtOH.

Volumen de inyección: 50 µl.

**Ejemplo 2:** Primer pico eluido: ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

15 LC-MS: Rt = 4,97 min [M+H]<sup>+</sup> 410,1/412,2 (Método 10minLC\_v002).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,30 (NH, t), 7,72 (1H, s), 7,29 (NH<sub>2</sub>, s a), 6,28 (OH, s), 3,68 (1H, dd), 3,47 (1H, dd), 1,24 (3H, s).

<sup>19</sup>F RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) d -62,70 (CF<sub>3</sub>, s), -80,47 (CF<sub>3</sub>, s).

Rotación óptica [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> a 589 nm +14,4° (c= 0,522, MeOH).

20 **Ejemplo 3:** Segundo pico eluido: ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

LC-MS Rt = 4,94 min [M+H]<sup>+</sup> 412,1 (Método 10minLC\_v002).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,30 (NH, t), 7,72 (1H, s), 7,29 (NH<sub>2</sub>, s a), 6,28 (OH, s), 3,68 (1H, dd), 3,47 (1H, dd), 1,24 (3H, s).

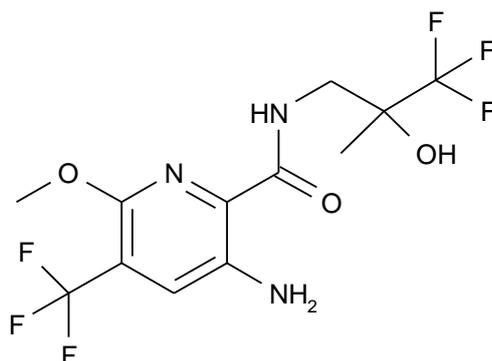
25 <sup>19</sup>F RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) d -62,70 (CF<sub>3</sub>, s), -80,48 (CF<sub>3</sub>, s).

La estereoquímica de este compuesto se confirmó mediante cristalografía de rayos-X.

#### Ejemplos 4, 5 y 6

Este compuesto, es decir,

30 (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, (Ejemplo 4),



se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Una solución que comprendía ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (producto intermedio D) (4 g, 16,94 mmol), y clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol (producto intermedio R) (3,04 g, 16,94 mmol) en NMP (188 ml), se trató con HATU (7,73 g, 20,33 mmol), seguido por la adición por goteo (porciones de 2 ml) de DIPEA (8,88 ml, 50,8 mmol) durante 1 hora. Después de agitar durante una hora adicional, la mezcla de reacción se vertió en agua (450 ml) y EtOAc (450 ml). La fase acuosa se acidificó con HCl 5M (50 ml), y las capas se separaron. La porción orgánica se lavó con NaOH 2M (200 ml), agua (200 ml, 4 veces), salmuera (100 ml, 2 veces), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y se concentró al vacío, para proporcionar un sólido de color café. La purificación del sólido mediante cromatografía sobre sílice (cartucho de sílice previamente empacado de 220 g) eluyendo con el 0 al 50% de EtOAc en isohexano, proporcionó el racemato, (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (Ejemplo 4), como un sólido de color amarillo;

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,3 (1H, t), 7,7 (1H, s), 6,7 (2H, s), 6,2 (1H, s), 3,9 (3H, s), 3,7 (1H, m), 3,5 (1H, m), 1,2 (3H, s).

15 LC-MS: Rt 1,24 min; MS m/z 362,4 [M+H]<sup>+</sup>; Método 2minLC\_v003.

La separación quiral del racemato mediante cromatografía de fluidos supercríticos se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones, para proporcionar los compuestos indicados posteriormente en la presente:

Fase móvil: 12% de 2-propanol + DEA al 0,1% / 50% de CO<sub>2</sub>.

Columna: Chiralcel OD-H, 250 x 10 mm de diámetro interno, 5 μm (2 columnas enlazadas en serie).

20 Detección: UV a 220 nm.

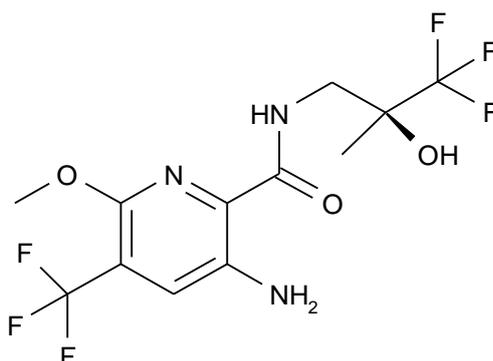
Velocidad de flujo: 10 ml/min

Concentración de la muestra: 3,5 g en 30 ml de EtOH.

Volumen de inyección: 100 μl.

Los Ejemplos 5 y 6 son enantiómeros.

25 **Ejemplo 5:** Primer pico eluido Rt = 7,30 min. ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico:



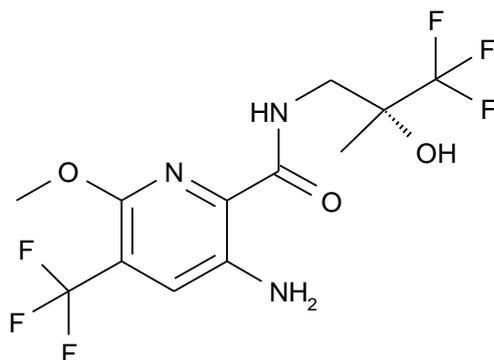
$^1\text{H}$  RMN (400MHz, DMSO -  $d_6$ )  $\delta$  8,3 (1H, t), 7,6 (1H, s), 6,6 (2H, ancho), 6,2 (1H, s), 3,9 (3H, s), 3,6 (1H, m), 3,5 (1H, m), 1,3 (3H, s);

LC-MS Rt = 1,15 min,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  362,4 (Método 2minLC\_v003).

5 Rotación óptica  $[\alpha]_D^{21}$  a 589 nm -20,83°(c= 0,513, MeOH).

La estereoquímica de este compuesto se confirmó mediante cristalografía de rayos-X.

**Ejemplo 6:** Segundo pico eluido Rt = 8,29 min. ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.



10  $^1\text{H}$  RMN (400MHz, DMSO -  $d_6$ )  $\delta$  8,3 (1H, t), 7,6 (1H, s), 6,6 (2H, ancho), 6,2 (1H, s), 3,9 (3H, s), 3,6 (1H, m), 3,5 (1H, m), 1,3 (3H, s);

LC-MS Rt = 1,15 min  $[\text{M}+\text{H}]^+$  362,4 (Método 2minLC\_v003).

De una manera alternativa, el ejemplo 5 puede prepararse de acuerdo con el siguiente método:

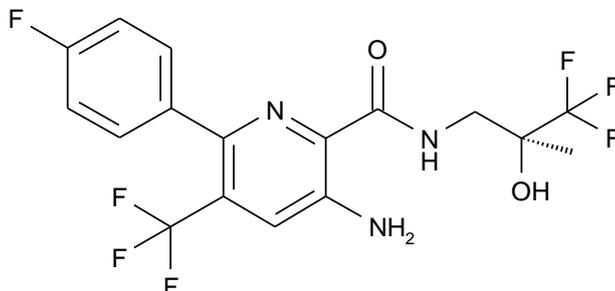
15 A una solución de ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (producto intermedio D) (10 g, 42,3 mmol), y (S)-clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol (producto intermedio RA) (7,60 g, 42,3 mmol) en NMP (400 ml), se le agregó HATU (19,3 g, 50,8 mmol), seguido por la adición por goteo de DIPEA (22,19 ml, 127 mmol) durante aproximadamente 1 hora. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, la mezcla se agregó a EtOAc (2 l), se lavó con NaOH 1M (1 l, 2 veces), agua (1 l), salmuera (1 l), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), y se evaporó bajo presión reducida, para dar el producto crudo como un aceite de color café oscuro. La purificación mediante cromatografía sobre sílice, eluyendo con un gradiente del 1 al 25% de EtOAc en isohexano, proporcionó un aceite de color amarillo. La recrystalización del aceite a partir de iso-hexano/DCM, proporcionó la ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico como un sólido cristalino;

25  $^1\text{H}$  RMN (400MHz, DMSO -  $d_6$ )  $\delta$  8,28 (1H, t), 7,66 (1H, s), 6,67 (2H, s), 6,27 (1H, s), 3,91 (3H, s), 3,65 (1H, m), 3,45 (1H, m), 1,24 (3H, s).

$^{19}\text{F}$  RMN (376MHz, DMSO -  $d_6$ ) -62,58 ppm (s), -80,43 ppm (s).

**Ejemplo 7**

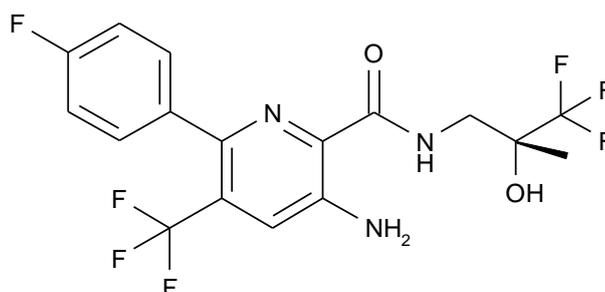
((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.



- 5 Una mezcla que comprendía la ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (Ejemplo 3) (100 mg, 0,244 mmol), ácido 4-fluoro-fenil-borónico (37,5 mg, 0,268 mmol), y dicloruro de 1,1'-bis-(difeníl-fosfonio)-ferroceno-paladio (19,90 mg, 0,024 mmol), se suspendió en THF (2 ml), y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (0,667 ml). El vial se purgó con N<sub>2</sub>, se selló y se calentó a 160°C utilizando radiación de microondas durante 15 min. La mezcla se repartió entre EtOAc (50 ml), y agua (50 ml). La porción orgánica se separó y se lavó con salmuera (30 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró a través de Celite® (material de filtro), y se concentró al vacío. El residuo crudo se disolvió en DMSO (2 ml), y se purificó mediante LC-MS dirigida a la masa, utilizando MeCN/agua/TFA al 0,1% como eluyente, para proporcionar el producto limpio. La fracción del producto obtenido como una solución de MeCN/agua/TFA al 0,1%, se vertió en EtOAc (50 ml), y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (50 ml) para dar la base libre del producto. La porción orgánica se combinó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), y se concentró al vacío, para proporcionar el compuesto del título como un sólido cristalino de color naranja pálido; <sup>1</sup>H RMN (400MHz, DMSO - d<sub>6</sub>) δ 8,4 (1H, m), 7,7 (1H, s), 7,49 (2H, m), 7,29 (2H, t), 7,2 (2H, s a), 6,22 (1H, s), 3,68 (1H, m), 3,44 (1H, m), 1,22 (3H, s); LC-MS Rt 4,41 min [M+H]<sup>+</sup> 426 (Método 10minLC\_v003).

**Ejemplo 8**

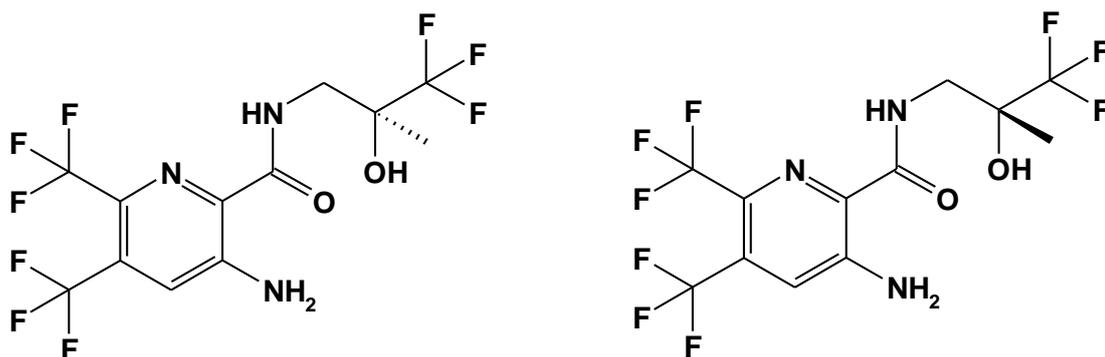
- 20 ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.



- 25 Este compuesto se preparó a partir de la ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (Ejemplo 2), de una manera análoga al Ejemplo 8. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, DMSO - d<sub>6</sub>) δ 8,42 (1H, m), 7,7 (1H, s), 7,5 (2H, m), 7,3 (2H, t), 7,21 (2H, s a), 6,24 (1H, s), 3,68 (1H, m), 3,44 (1H, m), 1,22 (3H, s); LC-MS Rt = 4,39 min [M+H]<sup>+</sup> 426 (Método 10minLC\_v003).

**Ejemplos 16 y 17**

((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico y ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico



Paso 1: (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico

5 A una solución agitada del ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (producto intermedio M) (1,16 g, 3,29 mmol) en NMP (32 ml), se le agregó clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol (comercialmente disponible) (591 mg, 3,29 mmol), seguido por HATU (1,25 g, 3,29 mmol), y  $\text{NEt}_3$  (918  $\mu\text{l}$ , 6,59 mmol), y la mezcla de reacción se dejó agitando a RT. Después de 1 hora, se agregaron 0,2 eq. adicionales de  $\text{NEt}_3$ . Después de 15 min, se agregaron 0,4 eq. adicionales de  $\text{NEt}_3$  y 0,2 eq. de amina. Después de 30 min, se agregó 0,1 eq. adicional de HATU. Después de 30 min, se había consumido la mayor parte del material de partida.

10 La mezcla de reacción se agregó a EtOAc (50 ml), se lavó con NaOH 0,1 M, y la capa acuosa se retro-extrajo con EtOAc (50 ml, 2 veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (150 ml, 2 veces), salmuera (100 ml), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), y se concentraron al vacío, para dar el producto crudo como un aceite de color naranja.

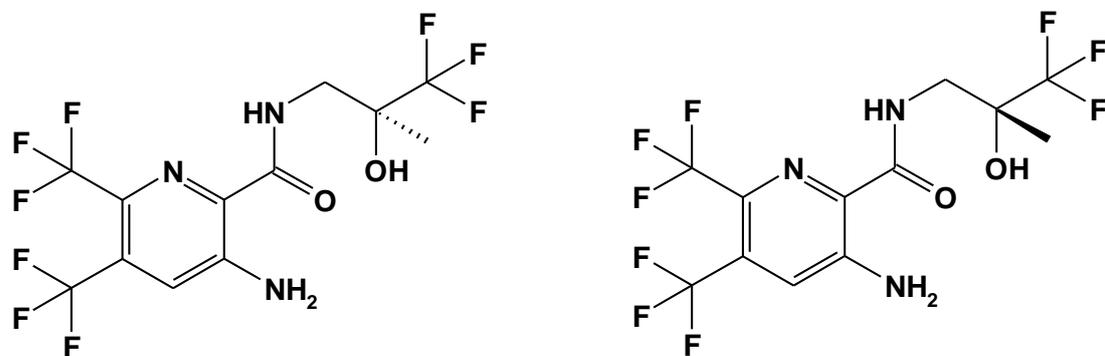
15 El material crudo se purificó mediante cromatografía sobre sílice, eluyendo con el 0 al 15% de EtOAc en iso-hexano, para proporcionar el producto del título como un sólido de color amarillo; LC-MS Rt 1,32 min; MS m/z 478,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; Método 2minLC\_v003.

Paso 2: (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

20 A una solución agitada de la (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (985 mg, 2,064 mmol) en EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  2:1 (7,5 ml), se le agregó clorhidrato de hidroxilamina (1,43 g, 20,64 mmol), seguido por  $\text{NEt}_3$  (575 ml, 4,13 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta reflujo (aproximadamente 98°C) durante 11,5 horas, y entonces se dejó enfriar hasta la RT. El solvente se eliminó al vacío, y el residuo resultante se repartió entre EtOAc (25 ml), y agua (25 ml). La capa acuosa se separó y se extrajo con EtOAc (25 ml, 2 veces), y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), y se concentraron al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía sobre sílice, eluyendo con el 0 al 25% de EtOAc en iso-hexano, para proporcionar el producto del título como un sólido de color amarillo pálido; LC-MS: Rt 1,24 min; MS m/z 400,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; Método 2minLC\_v003.

25

Paso 3: ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico y ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.



30 Estos compuestos se prepararon mediante la separación quiral de la (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

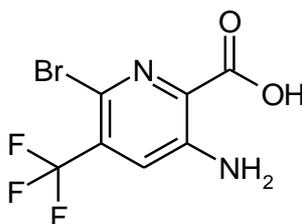
Enantiómero 1: LC-MS Rt 1,23 min; MS m/z 400,0 [M+H]<sup>+</sup>; Método 2minLC\_v003. Tiempo de retención de SFC 5,07 min.

Enantiómero 2: LC-MS Rt 1,23 min; MS m/z 400,0 [M+H]<sup>+</sup>; Método 2minLC\_v003. Tiempo de retención de SFC 5,13 min.

## 5 Preparación de productos intermedios

### Producto intermedio A

#### Ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico



#### Producto intermedio A1: 2-bromo-3-nitro-5-trifluoro-metil-piridina

- 10 El 3-nitro-5-(trifluoro-metil)-piridin-2-ol (31,00 g, 149 mmol) se disolvió en acetonitrilo (250 ml), para dar una solución de color café oscuro. Se agregó oxibromuro de fósforo (V) (85 g, 298 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 4,5 horas, y entonces se agitó a RT durante la noche. La mezcla de reacción se apagó vertiendo agua (600 ml) que contenía carbonato ácido de sodio (110 g) con agitación vigorosa. La mezcla de color café oscuro se extrajo con DCM (200 ml, 3 veces), y la fase orgánica se lavó con agua (200 ml), y salmuera (100 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>), y se concentró al vacío, para proporcionar el producto del título como un aceite de color café. <sup>1</sup>H-RMN: [400MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub> 8,87 (1H, d, J = 1,4Hz, ArH), 8,39 (1H, d, J = 1,9Hz, ArH).

#### Producto intermedio A2: 3-nitro-5-trifluoro-metil-piridin-2-carbonitrilo

- 20 La 2-bromo-3-nitro-5-trifluoro-metil-piridina (10,00 g, 36,87 mmol) se disolvió en tolueno (250 ml) con agitación, para dar una solución de color amarillo pálido. Se agregó bromuro de tetrabutil-amonio (11,90 g, 36,9 mmol), seguido por cianuro de cobre (I) (9,92 g, 111 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 10 horas. Después de enfriar a RT, la mezcla de reacción se repartió entre agua (750 ml) y EtOAc (750 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (250 ml, 2 veces) y salmuera (100 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), y se concentraron al vacío, para proporcionar el producto del título. <sup>1</sup>H-RMN: [400MHz, DMSO-d<sub>6</sub> δ<sub>H</sub> 9,55 (1H, m, ArH), 9,24 (1H, m, ArH)

#### Producto intermedio A3: Metil-éster del ácido 3-amino-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico

- 25 El 3-nitro-5-trifluoro-metil-piridin-2-carbonitrilo (6,5 g, 29,9 mmol) se disolvió en EtOAc (150 ml), para dar una solución de color amarillo pálido, y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agregó paladio al 10% sobre carbón activado (3,19 g, 2,99 mmol), y la mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se disolvió en HCl conc. (45 ml), y se calentó hasta reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT, y se concentró al vacío. El sólido se disolvió en MeOH (300 ml), y se agregó ácido sulfúrico (14,4 ml). La solución resultante se calentó a reflujo durante 48 horas. La reacción se dejó enfriar hasta RT, entonces se neutralizó mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub> (ac.) al 10% (600 ml). El producto se extrajo en DCM (200 ml, 3 veces), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (200 ml), salmuera (50 ml), (MgSO<sub>4</sub>), y se concentraron al vacío. El sólido resultante se purificó mediante cromatografía sobre sílice: Gradiente de eluyente: isohexano (500 ml), EtOAc al 10% en isohexano (1000 ml), EtOAc al 20% en isohexano (1500 ml), para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido <sup>1</sup>H-RMN: [400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ<sub>H</sub> 8,13 (1H, d, J = 1,7Hz, ArH), 7,60 (1H, d, J = 1,3Hz, ArH), 7,01 (2H, a, NH<sub>2</sub>), 3,85 (3H, s, ArOCH<sub>3</sub>), m/z 221,1 [M+H]<sup>+</sup>

#### Producto intermedio A4: Metil-éster del ácido 3-amino-6-bromo-5-tri-fluoro-metil-piridin-2-carboxílico

- 40 El metil-éster del ácido 3-amino-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (9,49 g, 43,16 mmol) se suspendió en agua (300 ml). Se agregó ácido sulfúrico (4,60 ml, 86 mmol), seguido por la adición por goteo, durante 30 min, de una solución de bromo (2,222 ml, 43,1 mmol) en ácido acético (29,6 ml, 517 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 18 horas. Se agregaron 100 ml adicionales de agua, seguidos por 0,25 eq. Adicionales de la mezcla de bromo/AcOH (550 μl de bromo en 7,4 ml de AcOH), y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 90 minutos

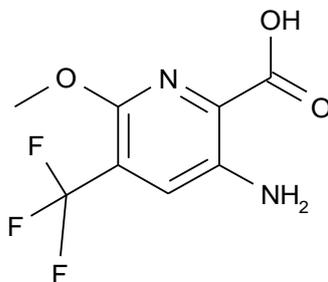
- adicionales. La mezcla de reacción se diluyó con 500 ml de agua, y se neutralizó mediante la adición de  $\text{NaHCO}_3$  sólido (aproximadamente 85 g). La suspensión se extrajo con DCM (300 ml, 3 veces), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  (ac.) saturado (250 ml), agua (250 ml), y salmuera (100 ml), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), y se concentraron al vacío. El material crudo se recrystalizó a partir de MeOH en ebullición (aproximadamente 300 ml), para dar el producto del título como un sólido de color naranja pálido;  $m/z$  301,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $^1\text{H}$ -RMN: [400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$   $\delta_{\text{H}}$  7,77 (1H, s, ArH), 7,17 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 3,86 (3H, s,  $\text{ArCO}_2\text{CH}_3$ ).

Producto intermedio A: Ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico

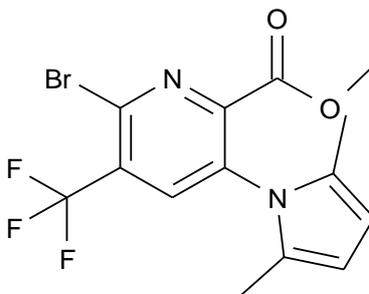
- El metil-éster del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (1,40 g, 4,68 mmol) se suspendió en MeOH (15 ml); se agregó hidróxido de sodio (solución acuosa 2,0 M) (14,04 ml, 28,1 mmol), y la suspensión se agitó a RT durante la noche. La mezcla se concentró al vacío, y el residuo resultante se disolvió en agua (100 ml), y entonces se acidificó mediante la adición de HCl (ac.) 5,0M. El producto se extrajo en acetato de etilo (75 ml, 2 veces), y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (50 ml), salmuera (25 ml), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), y se concentraron al vacío, para proporcionar el producto del título como un sólido de color amarillo.  $^1\text{H}$ -RMN: [400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta_{\text{H}}$  13,24 (1H, s a,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 7,74 (1H, s, ArH), 7,17 92H, s a  $\text{ArNH}_2$ ).  $m/z$  285,1, 287,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$

- 15 Producto intermedio D:

Ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico



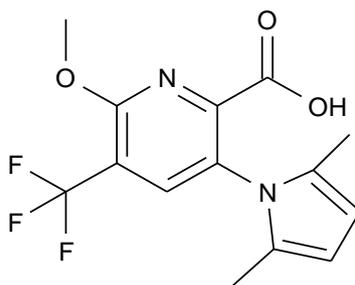
Producto intermedio D1: Metil-éster del ácido 6-bromo-3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico



- 20 El metil-éster del ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (producto intermedio A4) (2 g, 6,69 mmol) se suspendió en tolueno (8 ml), y se trató con ácido p-toluen-sulfónico (TsOH) (0,115 g, 0,669 mmol), y acetoniil-acetona (0,941 ml, 8,03 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas (utilizando un aparato Dean-Stark), y se dejó enfriar a RT durante la noche. La solución de color rojo oscuro/negra resultante se concentró al vacío, para eliminar el tolueno, y el residuo crudo se diluyó con EtOAc (200 ml), se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  (50 ml), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), y se concentró al vacío, para dar un sólido de color café. La purificación del sólido mediante cromatografía sobre sílice, eluyendo con EtOAc/iso-hexano, proporcionó el compuesto del título; LC-MS Rt = 5,58 min  $[\text{M}+\text{H}]^+$  377/379 (Método 10minLC\_v002).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,50 (1H, s), 7,77 (2H, s), 5,83 (3H, s), 1,90 (6H, s);  $^{19}\text{F}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  -62,26 ( $\text{CF}_3$ , s).

- 30 Producto intermedio D2: Ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico



El metil-éster del ácido 6-bromo-3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (2 g, 5,30 mmol) se disolvió en MeOH (40 ml), y se trató con NaOH 2M (20 ml), para dar una suspensión, la cual se agitó a RT durante 1 hora, para proporcionar una solución transparente. El solvente se eliminó al vacío, y el residuo resultante se acidificó a un pH de 1 con HCl 5M. La mezcla se extrajo con EtOAc (200 ml), y el extracto orgánico se secó (MgSO<sub>4</sub>), y se concentró al vacío, para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color café oscuro, el cual se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional; LC-MS Rt = 1,50 min [M+H]<sup>+</sup> 315,2.1/316,2 (Método 2minLC\_v002); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 14,42-12,61 (COOH, a), 8,25 (1H, s), 5,84 (2H, s), 4,13 (3H, s), 1,97 (6H, s); <sup>19</sup>F RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -62,43 (CF<sub>3</sub>, s).

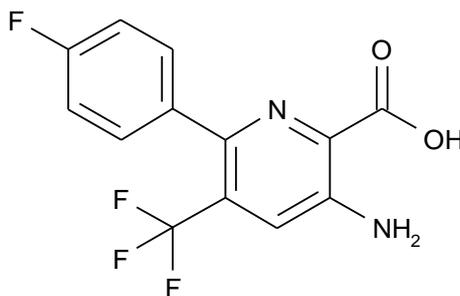
10 Producto intermedio D: Ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico

El ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (2,1 g, 6,68 mmol) se disolvió en EtOH (40 ml) y agua (20 ml). A esta mezcla se le agregó TEA (2,79 ml, 20,05 mmol), seguida por clorhidrato de hidroxilamina (4,64 g, 66,8 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 horas. Después de enfriar a RT, la mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml), y se lavó con HCl acuoso (1M, 100 ml). La fase acuosa se retro-extrajo con EtOAc (100 ml), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), y se concentraron al vacío, para proporcionar el producto como un sólido de color naranja. El material puede utilizarse crudo o recristalizado a partir de isohexano-EtOAc (10:1) LC-MS Rt = 1,0 min [M+H]<sup>+</sup> 237 (Método 2minLC\_v003).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,5 (NH<sub>2</sub>, a), 7,70 (1H, s), 3,89 (3H, s).

Producto intermedio de referencia G:

20 Ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico

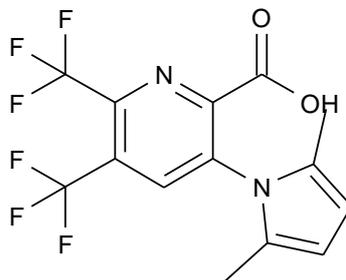


Una mezcla que comprendía ácido 3-amino-6-bromo-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (producto intermedio A) (1 g, 3,51 mmol), ácido 4-fluoro-fenil-borónico (0,736 g, 5,26 mmol), y dicloruro de 1,1'-bis-(difenil-fosfonio)-ferroceno-paladio (0,286 g, 0,351 mmol), y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0M (3,3 ml) en THF (10 ml), se calentó a reflujo durante 10 horas. Después de enfriar a RT, la mezcla se repartió entre DCM (100 ml) y NaOH 1 M (100 ml, 2 veces). La fase acuosa se acidificó con HCl 5M, y la solución lechosa resultante se extrajo en DCM (100 ml, 2 veces). La porción orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), y se concentró al vacío, para proporcionar el producto como un aceite crudo. El material crudo se purificó mediante cromatografía por evaporación instantánea sobre un cartucho de sílice, eluyendo con un gradiente de DCM:MeOH a partir del 0% al 10% de MeOH, para proporcionar el producto del título como un sólido de color amarillo pálido;

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ 12,9 (1H, s a, COOH), 7,7 (1H, s, CH, Ar-H), 7,4 (2H, m, Ar-H), 7,25 (2H, m, Ar-H), 7,1 (2H, s a, NH<sub>2</sub>).

Producto intermedio M

Ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico



Producto intermedio M1: Metil-éster del ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico

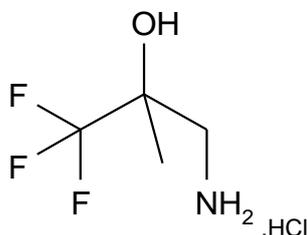
5 Una mezcla agitada de KF (2,12 g, 5,62 mmol), y CuI (0,490 g, 8,43 mmol) se calentó en un vial para microondas sellado de 10,0 a 20,0 ml al vacío, hasta que empezó a aparecer un color verdoso claro. El vial se colocó entonces bajo nitrógeno para enfriarse. Entonces se agregó una solución del metil-éster del ácido 6-bromo-3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (producto intermedio D) (2,64 ml, 16,86 mmol) en DMF seca/NMP seca 1:1 (14 ml), seguida por TMS-CF<sub>3</sub> (2,64 ml, 16,86 mmol). Luego se utilizó un septo nuevo para sellar el vial, y la mezcla de reacción se calentó utilizando radiación de microondas con agitación a 100°C durante 3 horas, y se dejó enfriar. La mezcla se agregó a una solución de NH<sub>3</sub> 5M (50 ml), y entonces se extrajo con dietil-éter (50 ml, 4 veces). 10 Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una solución de NH<sub>3</sub> 5M (20 ml, 3 veces), HCl 1M (50 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml, 2 veces), salmuera (50 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>), y se concentró al vacío, para dar un aceite de color café. El material crudo se purificó mediante cromatografía sobre sílice, eluyendo con iso-hexano / EtOAc, del 0 al 10%, para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color naranja; LC-MS Rt 1,37 min; MS m/z 367,1 [M+H]<sup>+</sup>; Método 2minLC\_v003.

Producto intermedio M: Ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico

A una solución agitada del metil-éster del ácido 3-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico (1,28 g, 3,49 mmol) en MeOH (25 ml), se le agregó NaOH 1M (7 ml, 6,99 mmol), y la mezcla de reacción se dejó agitándose a RT durante 30 min. El solvente se eliminó al vacío, y se agregó agua (20 ml) al residuo restante. El pH se ajustó a un pH de 4/5 mediante la adición de HCl 1M. La mezcla se extrajo con EtOAc (20 ml, 3 veces), y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se concentraron al vacío, y se secaron en un horno de vacío (50°C) durante la noche, para dar el producto del título crudo como un sólido de color naranja, el cual se utilizó sin purificación adicional; LC-MS: Rt 1,23 min; MS m/z 353,1 [M+H]<sup>+</sup>; Método 2minLC\_v003.

25 Producto intermedio R

Clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol



Paso 1: 1,1,1-trifluoro-2-metil-3-nitro-propan-2-ol

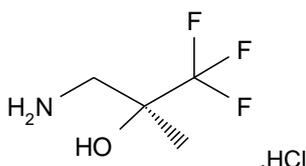
30 Al LiOH (0,193 g, 8,06 mmol) en un matraz de fondo redondo, de 3 bocas, se le agregaron agua (25 ml), nitro-metano (3,76 ml, 81 mmol), y trifluoro-acetona (7,95 ml, 89 mmol). Se agregaron cloruro de cetil-trimetil-amonio (3,8 g, 10,88 mmol), y MgSO<sub>4</sub> (1,9 g, 16,12 mmol), y la solución de color amarillo resultante se agitó a 20-25°C durante 2 días. La mezcla de reacción se vertió en dietil-éter (120 ml), y se lavó con agua (200 ml, 3 veces), y salmuera (100 ml, 1 vez). La porción orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío, para proporcionar el compuesto del título como un líquido de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4,7 (1H d), δ 4,5 (1H, d), δ 3,7 (1H, ancho), δ 1,6 (3H, s).

Paso 2: Clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol

5 Se agregó Pd/C (1 g) a un recipiente de vidrio de 200 ml. Se agregó etanol (50 ml, seco), con precaución, bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Se disolvió 1,1,1-trifluoro-2-metil-3-nitro-propan-2-ol (10 g, 57,8 mmol) en etanol (50 ml, seco), y se agregó al recipiente de vidrio. La mezcla de reacción se puso bajo una presión positiva de hidrógeno (5 bar) a RT, y se hidrogenó durante 2 días. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite® (material de filtro), y se lavó con un exceso de etanol. El solvente se eliminó al vacío, para proporcionar un aceite incoloro. El aceite se disolvió en MeOH (50 ml), y se trató por goteo con HCl (1M) en MeOH (30 ml). La solución se dejó agitándose durante 30 minutos y se concentró al vacío, destilándose azeotrópicamente con MeCN, para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco ceroso; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8,3 (3H, ancho s), 6,9 (1H, ancho), 3,0 (2H, q), 1,4 (3H, s).

10 Producto intermedio RA

(S)-clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol



Paso 1: 3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil-carbamato de bencilo

15 A una suspensión con agitación de clorhidrato de amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol (producto intermedio R) (1,5 g, 8,35 mmol) en DCM (50 ml), se le agregó TEA (93,54 g, 35,0 mmol), seguida por 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-carbonato de bencilo (1,983 g, 7,96 mmol). La mezcla se agitó a RT durante 6 horas, y entonces se diluyó con agua. La porción orgánica se separó utilizando un separador de fases, y se concentró al vacío. La purificación mediante cromatografía sobre sílice, eluyendo con el 0 al 70% de EtOAc en iso-hexano, proporcionó el producto del título; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,34 (6H, m), 5,98 (1H, s), 5,05 (2H, s), 3,31 (1H, m), 3,18 (1H, m), 1,21 (3H, s) LC-MS: Rt 1,05 min; MS m/z 278,1 [M+H]<sup>+</sup>; Método 2minLC\_v003.

20

Paso 2: Separación de enantiómeros de 3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil-carbamato de bencilo

El 3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil-carbamato de bencilo (1,7 g) se disolvió en 2-propanol (10 ml), y se purificó utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase móvil: 10% de 2-propanol / 90% de CO<sub>2</sub>

25 Columna: 2 x Chiralcel OJ-H, 250 x 10 mm de diámetro interno, 5 μm (columnas acopladas en serie).

Detección: UV a 220 nm.

Velocidad de flujo: 10 ml/min

Concentración de la muestra: 1,7 g en 10 ml de 2-propanol

Volumen de inyección: 75 μl

30 Primer pico eluido: Rt = 6,94 minutos (R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil-carbamato de bencilo

Segundo pico eluido: Rt = 8,04 minutos (S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil-carbamato de bencilo (Estereoquímica confirmada mediante el análisis del compuesto final preparado por medio de los siguientes pasos).

Paso 3: (S)-clorhidrato de 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol

35 Una mezcla que comprendía (S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil-carbamato de bencilo en EtOH (165 ml) se bombeó a través de un H-Cube (reactor de hidrogenación, de 1 a 2 ml/min, presión de 1 bar, RT) durante 8 horas utilizando un cartucho de catalizador de paladio sobre carbono al 10%. Se agregó HCl 1,25 M en metanol (130 ml), y la mezcla se agitó durante 30 min. El solvente se eliminó al vacío, destilándose azeotrópicamente con MeCN, para proporcionar el producto del título como un polvo de color blanco; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,3 (3H, ancho), 6,8 (1H, s), 3,0 (2H, s), 1,5 (3H, s).

40 De una manera alternativa, el 3-amino-1,1,1-trifluoro-2-metil-propan-2-ol racémico puede resolverse en los

enantiómeros separados mediante recristalización o bien con ácido(S)-mandélico o bien con ácido L-tartárico en isopropanol o etanol.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica seleccionado de:
- ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- 5 (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico y
- ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Compuesto ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en el
- 10 tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
3. Compuesto ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- 15 4. Compuesto (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
5. Compuesto ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en el
- 20 tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
6. Compuesto ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
7. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que
- 25 comprende:
- un compuesto seleccionado de:
- ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- 30 ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico y
- ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y
- uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que la composición comprende el
- 35 compuesto ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que la composición comprende el compuesto ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-

carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que la composición comprende el compuesto (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 11. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que la composición comprende el compuesto ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que la composición comprende el compuesto ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 13. Uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado de:

((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

(3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico y

20 ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

14. Uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 13, en el que el compuesto es ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

25 15. Uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 13, en el que el compuesto es ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

30 16. Uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 13, en el que el compuesto es (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico,

17. Uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 13, en el que el compuesto es ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

35 18. Uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 13, en el que el compuesto es ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico.

19. Combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que comprende:

un primer compuesto activo que comprende un compuesto seleccionado de:

40 ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

(3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico y

((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico;

5 un segundo compuesto activo seleccionado de agentes osmóticos, bloqueadores de ENaC, agentes antiinflamatorios, agentes broncodilatadores, agentes anti-histamínicos, agentes anti-tusivos, agentes antibióticos y sustancias de fármaco de ADNasa, en la que los compuestos activos primero y segundo pueden estar en la misma o diferente composición farmacéutica.

20. Combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 19, en la que el primer compuesto activo es ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 21. Combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 19, en la que el primer compuesto activo es ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 22. Combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 19, en la que el primer compuesto activo es (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

23. Combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 19, en la que el primer compuesto activo es ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 24. Combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 19, en la que el primer compuesto activo es ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida del ácido 3-amino-5,6-bis-trifluoro-metil-piridin-2-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.