

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 149**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2014 PCT/JP2014/059853**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14163147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2014 E 14780139 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2982675**

54 Título: **Sal de derivado de pirazoloquinolina y cristal de esta**

30 Prioridad:

05.04.2013 JP 2013079639

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
4-6-10 Koishikawa Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

OZAKI, SHUNSUKE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 645 149 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

Sal de derivado de pirazoloquinolina y cristal de esta

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a sales de derivados de pirazoloquinolina con actividad inhibitoria contra la fosfodiesterasa 9 (PDE9) y cristales de estas.

10 **Técnica anterior**

El monofosfato de guanosina cíclico (denominado cGMP en lo sucesivo en la presente), que funciona como mensajero secundario en células, se sabe que desempeña una función importante en varias funciones fisiológicas que incluyen las conductas de aprendizaje y la memoria.

15 En el sitio postsináptico de los circuitos neuronales del cerebro, el monóxido de nitrógeno (denominado NO en lo sucesivo en la presente) biosintetizado por una sintetasa del monóxido de nitrógeno activa una guanilato-ciclasa, que es una cGMP-sintetasa. La guanilato-ciclasa activada biosintetiza cGMP a partir del trifosfato de guanosina. El cGMP activa una proteína cinasa dependiente de cGMP (denominada PKG en lo sucesivo en la presente) para fosforilar diversas proteínas que participan en la plasticidad sináptica. Se sabe que la activación de la cascada NO/cGMP/PKG participa en la inducción de la plasticidad sináptica (potenciación a largo plazo; denominada LTP en lo sucesivo en la presente) del hipocampo conocido como sustrato neuronal para conductas de aprendizaje y la memoria (remítase, por ejemplo, a la referencia 1 de la bibliografía no relacionada con patentes). Se sabe que un medicamento que activa la transmisión de señales de la cascada mejora la LTP del hipocampo y la conducta de aprendizaje de animales, en cambio se sabe que un medicamento que inhibe la cascada exhibe la acción opuesta (referencia 2 de la bibliografía no relacionada con patentes). Por tanto, a partir de estos descubrimientos, se prevé que un aumento de cGMP en el cerebro produzca una mejora de las conductas de aprendizaje y la memoria.

30 El cGMP es metabolizado como 5'-GMP, que no posee acción activante de PKG, por acción de una fosfodiesterasa (denominada PDE en lo sucesivo en la presente). Se sabe que la PDE tiene 11 familias, y se sabe que la PDE9 metaboliza específicamente cGMP y que se expresa en el cerebro, el bazo, el intestino delgado y análogos (remítase, por ejemplo, a la referencia 3 de la bibliografía no relacionada con patentes). Es decir, se prevé que la inhibición de PDE9 provoque un aumento de cGMP en los cerebros. Se ha reportado que de hecho un inhibidor de PDE9 incrementa la LTP en el hipocampo y mejora las conductas de aprendizaje y la memoria en una prueba de reconocimiento de objetos nuevos/prueba de aprendizaje de evitación pasiva o similar en animales (referencia 4 de la bibliografía no relacionada con patentes). Desde un punto de vista clínico, la actividad de la guanilato-ciclasa disminuye y la posibilidad de una reducción en el nivel de cGMP se indica en la corteza temporal superior de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer (referencia 5 de la bibliografía no relacionada con patentes). Por tanto, es muy probable que la PDE9 esté estrechamente relacionada con patologías de enfermedades neurodegenerativas y enfermedades psiquiátricas, en particular con patologías de disfunciones cognitivas y similares en la enfermedad de Alzheimer, tales como la enfermedad de Alexander, enfermedad de Alpers, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; conocida como la enfermedad de Lou Gehrig o enfermedad de las neuronas motoras), ataxia-telangiectasia, enfermedad de Batten (conocida también como la enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten), demencia de Binswanger (encefalopatía angiosclerótica subcortical), trastorno bipolar, encefalopatía esponjiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, demencia inducida por quimioterapia, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, depresión, síndrome de Down, degeneración del lóbulo frontotemporal (que incluye la demencia frontotemporal, demencia semántica y afasia progresiva no fluente), enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, glaucoma, enfermedad (corea) de Huntington, demencia asociada con el VIH, hipercinesia, enfermedad de Kennedy, síndrome de Korsakoff (síndrome amnésico de confabulación), enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, afasia logopéica progresiva, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelosa de tipo 3), esclerosis múltiple, atrofia múltiple (atrofia olivopontocerebelosa), miastenia grave, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, demencia de inicio precoz (deterioro cognitivo leve), esclerosis lateral primaria, afasia progresiva primaria, demencia inducida por radiación, enfermedad de Refsum (enfermedad por acumulación del ácido fitánico), enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, esquizofrenia, demencia semántica, demencia senil, síndrome de Shy-Drager, ataxia espinocerebelosa, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski (parálisis supranuclear progresiva), y amiloidosis vascular y demencia vascular (demencia multiinfarto).

60 **Lista de citas****Bibliografía no relacionada con patentes**

65 [Referencia 1 de la bibliografía no relacionada con patentes] Domek-Lopacinska *et al.*, "Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology", *J Physiol Pharmacol.*, vol. 56, Supl. 2: págs. 15-34, 2005

[Referencia 2 de la bibliografía no relacionada con patentes] Wang X., "Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system", *J. Neurochem.*, vol. 68, págs. 443-456, 1997

5 [Referencia 3 de la bibliografía no relacionada con patentes] Fisher *et al.*, "Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase", *J. Biol. Chem.*, vol. 273: págs. 15559-15564, 1998

[Referencia 4 de la bibliografía no relacionada con patentes] van der Staay *et al.*, "The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents", *Neuropharmacology*, vol. 55: págs. 908-918, 2008

10 [Referencia 5 de la bibliografía no relacionada con patentes] Bonkale *et al.*, "Reduced nitric oxide responsive soluble guanylyl cyclase activity in the superior temporal cortex of patients with Alzheimer's disease", *Neurosci. Lett.*, vol 187, págs. 5-8, 1995

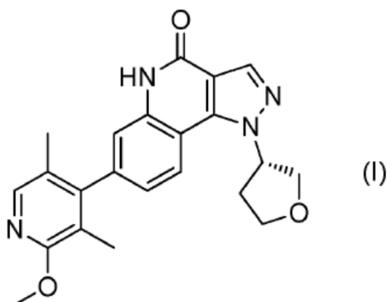
Compendio de la invención

15

Problema técnico

20

Se descubrió un compuesto representado por la siguiente fórmula (I) ((S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona; denominado compuesto (I) en lo sucesivo en la presente) como un compuesto novedoso con actividad inhibitoria de PDE9 y se presentó una solicitud de patente para tales invenciones (PCT/JP2012/075748):



25

Referente a compuestos con potencial para su uso como fármacos, las propiedades físicas de sus sales o cristales de las sales por lo general ejercen unos grandes efectos sobre la biodisponibilidad del fármaco, la pureza de las sustancias farmacéuticas, las formulaciones farmacéuticas y similares.

30

Un objeto de la presente invención consiste en, por lo tanto, proporcionar una sal del compuesto (I) o un cristal de esta con potencial para su uso como sustancia farmacéutica en fármacos, y con unas características de disolución y absorción oral mejoradas.

Solución al problema

35

Los inventores de la presente han examinado en profundidad el compuesto (I) para resolver los problemas descritos anteriormente y, como resultado de esto, han descubierto sales del compuesto (I) o cristales de estas, lo cual hace que se complete la invención.

Así pues, la presente invención se refiere a:

40

[1] sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona;

45

[2] sal monobenzenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona;

50

[3] un cristal de la sal de acuerdo con 1 o 2;

[4] un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 10.1° en difracción de rayos X en polvo;

55

[5] un cristal de la sal monobenzenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° en difracción de rayos X en polvo;

[6] una composición farmacéutica que comprende la sal de acuerdo con [1] como principio activo;

- 5 [P12] un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 10.1° en difracción de rayos X en polvo;
- [P12.1] un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° y 10.1° en difracción de rayos X en polvo;
- 10 [P12.2] un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° , 10.1° y 11.1° en difracción de rayos X en polvo;
- [P12.3] un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° , 10.1° , 11.1° , 18.2° y 25.8° en difracción de rayos X en polvo;
- 15 [P12.4] un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° , 10.1° , 11.1° , 16.2° , 17.6° , 18.2° , 22.0° , 22.4° , 23.8° y 25.8° en difracción de rayos X en polvo;
- [P12.5] un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos en desplazamientos químicos (ppm) de 13.3, 61.9, 114.3, 138.9 y 172.0 en un espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C ;
- 25 [P13] un cristal de la sal monobencenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° en difracción de rayos X en polvo;
- 30 [P13.1] un cristal de la sal monobencenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° y 14.6° en difracción de rayos X en polvo;
- [P13.2] un cristal de la sal monobencenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° , 13.7° y 14.6° en difracción de rayos X en polvo;
- 35 [P13.3] un cristal de la sal monobencenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 6.6° , 9.9° , 13.7° , 14.6° y 25.7° en difracción de rayos X en polvo;
- 40 [P13.4] un cristal de la sal monobencenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 6.6° , 9.9° , 13.7° , 14.6° , 19.0° , 19.6° , 20.5° , 21.7° , 23.5° y 25.7° en difracción de rayos X en polvo;
- 45 [P13.5] un cristal de la sal monobencenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona que tiene picos en desplazamientos químicos (ppm) de 16.8, 67.9, 114.0, 137.7 y 160.7 en un espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C ;
- 50 [P14] una composición farmacéutica que comprende la sal de acuerdo con [P1] como principio activo;
- [P14.1] una composición farmacéutica que comprende la sal de acuerdo con [P8] o [P9] como principio activo;
- [P14.2] una composición farmacéutica que comprende el cristal de acuerdo con [P12], [P12.1], [P12.2], [P12.3], [P12.4] o [P12.5] como principio activo; y
- 55 [P14.3] una composición farmacéutica que comprende el cristal de acuerdo con [P13], [P13.1], [P13.2], [P13.3], [P13.4] o [P13.5] como principio activo.

60 Efectos ventajosos de la invención

Las sales del compuesto (I) y los cristales de estas que se proporcionan en la presente invención poseen unas características de disolución y absorción oral mejoradas, y potencial para su uso como sustancia farmacéutica en fármacos.

65

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal monomaleato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 1. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

10 La Figura 2 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal monobencenosulfonato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 2. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

La Figura 3 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal clorhidrato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 3. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

15 La Figura 4 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal bromhidrato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 4. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

20 La Figura 5 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal *p*-toluenosulfonato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 5. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

La Figura 6 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal nitrato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 6. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

25 La Figura 7 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal sulfato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 7. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

30 La Figura 8 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal metanosulfonato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 8. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

La Figura 9 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal fosfato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 9. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

35 La Figura 10 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal *L*-tartrato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 10. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

40 La Figura 11 es un patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal malonato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 11. La abscisa muestra el ángulo de difracción (2θ) y la ordenada muestra la intensidad del pico.

45 La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de disolución llevado a cabo con el compuesto (I), la sal monomaleato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 1 y la sal monobencenosulfonato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 2. La abscisa muestra el tiempo (minutos) y la ordenada muestra la concentración ($\mu\text{g/mL}$) en términos del compuesto (I).

50 La Figura 13 es un gráfico que muestra cambios en la concentración en plasma del compuesto (I) tras la administración oral del compuesto (I) y la sal monomaleato del compuesto (I) obtenida en el Ejemplo 1, a perros. La abscisa muestra el tiempo (horas) y la ordenada muestra la concentración del compuesto ($\mu\text{g/mL}$) en términos del compuesto (I).

Descripción de las realizaciones

55 Las sales, los cristales y los métodos para producirlos de acuerdo con la presente invención se ilustrarán a continuación detalladamente.

Una "sal", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una "sal con su significado habitual" o un cocrystal que contiene el compuesto (I) con actividad inhibitoria de PDE9 y un ácido farmacéuticamente aceptable. La "sal con su significado habitual" se refiere a un compuesto constituido por un componente cargado positivamente del compuesto (I) básico y un componente cargado negativamente de un ácido. Además, el cocrystal se refiere a un complejo cristalino en el que las moléculas del compuesto (I) y el ácido se empaquetan dentro de la red cristalina en una proporción constante y con una configuración constante.

65 Específicamente, una sal de acuerdo con la presente invención es una sal con su significado habitual o un cocrystal que contiene el compuesto (I) y un ácido seleccionado del grupo constituido por ácidos carboxílicos orgánicos, ácidos sulfónicos orgánicos y ácidos inorgánicos.

Los ejemplos de ácidos carboxílicos orgánicos incluyen preferentemente el ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido cítrico y sal del ácido malónico, y más preferentemente el ácido maleico, ácido tartárico y ácido malónico.

5 Los ejemplos de ácidos sulfónicos orgánicos incluyen preferentemente el ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico y ácido canforsulfónico, y más preferentemente el ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido toluenosulfónico.

10 Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen preferentemente el ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido carbónico y ácido bicarbónico, y más preferentemente el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico.

15 Las sales de acuerdo con la presente invención pueden ser solvatos. Un "solvato de una sal del compuesto (I)", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un sólido que la sal del compuesto (I) y moléculas de disolvente forman juntos. Los ejemplos de disolventes en los solvatos incluyen disolventes de tipo cetona tales como acetona, 2-butanona y ciclohexanona; disolventes de tipo éster tales como acetato de metilo y acetato de etilo; disolventes de tipo éter tales como 1,2-dimetoxietano y éter *t*-butil metílico; disolventes de tipo alcohol tales como metanol, etanol, 1-propanol e isopropanol, disolventes polares tales como *N*-metil-2-pirrolidona, *N,N*-dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo; y agua.

25 Un "cristal", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un cristal de una sal del compuesto (I). Por consiguiente, por ejemplo, un cristal de una sal monomaleato del compuesto (I) se refiere a un cristal de una sal con su significado habitual formada entre el compuesto (I) y el ácido maleico, o un cocrystal formado entre el compuesto (I) y el ácido maleico.

Los ejemplos de cristales preferidos en la presente incluyen

30 un cristal de una sal monomaleato del compuesto (I), que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 10.1° en difracción de rayos X en polvo.

un cristal de una sal monomaleato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° y 10.1° en difracción de rayos X en polvo;

35 un cristal de una sal monomaleato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° , 10.1° y 11.1° en difracción de rayos X en polvo;

40 un cristal de una sal monomaleato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° , 10.1° , 11.1° , 18.2° y 25.8° en difracción de rayos X en polvo;

un cristal de una sal monomaleato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.1° , 10.1° , 11.1° , 16.2° , 17.6° , 18.2° , 22.0° , 22.4° , 23.8° y 25.8° en difracción de rayos X en polvo;

45 un cristal de una sal monobencenosulfonato del compuesto (I), que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° en difracción de rayos X en polvo.

un cristal de una sal monobencenosulfonato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° y 14.6° en difracción de rayos X en polvo;

50 un cristal de una sal monobencenosulfonato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° , 13.7° y 14.6° en difracción de rayos X en polvo;

55 un cristal de una sal monobencenosulfonato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 6.6° , 9.9° , 13.7° , 14.6° y 25.7° en difracción de rayos X en polvo;

un cristal de una sal monobencenosulfonato del compuesto (I), que tiene picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 6.6° , 9.9° , 13.7° , 14.6° , 19.0° , 19.6° , 20.5° , 21.7° , 23.5° y 25.7° en difracción de rayos X en polvo; o

60 un cristal de una sal monomaleato del compuesto (I), caracterizado por tener picos en desplazamientos químicos (ppm) de 13.3, 61.9, 114.3, 138.9 y 172.0 en un espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C ;

un cristal de una sal monobencenosulfonato del compuesto (I), caracterizado por tener picos en desplazamientos químicos (ppm) de 16.8, 67.9, 114.0, 137.7 y 160.7 en un espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C .

65

Los picos de difracción de rayos X en polvo, descritos anteriormente, son característicos de los respectivos cristales de las sales monomaleato del compuesto (I) o de las sales monobencenosulfonato del compuesto (I).

En general, pueden surgir errores en ángulos de difracción (2θ) dentro del rango de $\pm 0.2^\circ$ en difracción de rayos X en polvo y, por tanto, se debe considerar que los valores descritos anteriormente de los ángulos de difracción incluyen valores dentro del rango de aproximadamente $\pm 0.2^\circ$. Por consiguiente, en la presente invención no solamente se incluyen cristales con picos a exactamente los mismos ángulos de difracción en difracción de rayos X en polvo, sino también cristales con picos dentro de un rango de error de aproximadamente $\pm 0.2^\circ$ respecto a los ángulos de difracción.

Por tanto, por ejemplo, la frase “que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 10.1° ”, tal como se utiliza en la presente, significa “que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción (2θ) comprendido entre 9.9° y 10.3° ”. Lo mismo se aplica también a otros ángulos de difracción.

La frase “que tiene picos en desplazamientos químicos (ppm) de 13.3, 61.9, 114.3, 138.9 y 172.0”, tal como se utiliza en la presente, significa “que tiene picos siendo cada uno sustancialmente equivalente a los picos en desplazamientos químicos (ppm) de 13.3, 61.9, 114.3, 138.9 y 172.0, cuando se lleva a cabo una espectrometría de RMN en estado sólido de ^{13}C en una condición de medición convencional o sustancialmente la misma condición que en la presente memoria descriptiva”.

Cuando se determina si “tiene picos sustancialmente equivalentes a” o no, se debe considerar que los valores descritos anteriormente de los desplazamientos químicos incluyen valores dentro del rango de aproximadamente ± 0.5 ppm ya que en general pueden aparecer errores en desplazamientos químicos (ppm) dentro del rango de ± 0.5 ppm en un espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C . En la presente invención se incluyen, por tanto, no solamente cristales con exactamente los mismos desplazamientos químicos en un espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C , sino también cristales con desplazamientos químicos dentro de un rango de error de aproximadamente ± 0.5 ppm. Por tanto, por ejemplo, la frase “que tiene un pico en un desplazamiento químico (ppm) de 13.3”, tal como se utiliza en la presente, significa “que tiene un pico en un desplazamiento químico (ppm) de 12.8 a 13.8”. Lo mismo se aplica también a otros desplazamientos químicos en espectros de RMN en estado sólido de ^{13}C .

A continuación se ilustrará el método para producir sales del compuesto (I) o cristales o similares de estas, que constituyen una realización de acuerdo con la presente invención.

Producción del Compuesto (I)

El compuesto (I) de acuerdo con la presente invención se puede sintetizar a partir de 3-oxotetrahidrofurano, 2-fluoro-5-metilpiridina y ácido 4-bromo-2-fluorobenzoico como materiales de partida tal como se describe específicamente más adelante en el Ejemplo de referencia 1.

Métodos para producir sales del compuesto (I)

Se pueden obtener sales del compuesto (I) mediante métodos convencionales para producir sales. Específicamente, se pueden producir, por ejemplo, suspendiendo o disolviendo el compuesto (I) en un disolvente, con calentamiento en caso necesario, a continuación añadiendo a la suspensión o solución obtenida un ácido seleccionado del grupo constituido por ácidos carboxílicos orgánicos, ácidos sulfónicos orgánicos y ácidos inorgánicos, y agitando o dejando reposar la suspensión o solución resultante durante de varios minutos a varios días a temperatura ambiente o con enfriamiento en baño de hielo. Las sales del compuesto (I) se pueden obtener como cristales o sustancias amorfas según los métodos de producción. Los ejemplos de los disolventes que se han de utilizar en estos métodos incluyen disolventes de tipo alcohol tales como etanol, 1-propanol e isopropanol; acetonitrilo; disolventes de tipo cetona tales como acetona y 2-butanona; disolventes de tipo éster tales como acetato de etilo; disolventes de tipo hidrocarburo saturado tales como hexano y heptano; disolventes de tipo éter tales como éter *t*-butil metílico o agua. Cada uno de estos disolventes se puede utilizar solo, o se pueden mezclar y utilizar dos o más.

En los métodos descritos anteriormente para producir el compuesto (I), las sales del compuesto (I) se pueden producir después de sintetizar el compuesto (I) empleando los métodos anteriores.

Métodos para producir cristales de sales del compuesto (I)

Un cristal de una sal del compuesto (I) se puede producir mediante los métodos indicados anteriormente para producir sales del compuesto (I) o disolviendo por calentamiento la sal del compuesto (I) en un disolvente y cristalizándola mediante enfriamiento con agitación.

La sal del compuesto (I) que se ha de utilizar en la cristalización puede encontrarse en cualquier forma: puede ser un hidrato, un anhídrido, una sustancia amorfa, una sustancia cristalina (incluidas aquellas constituidas por una pluralidad de polimorfos cristalinos) o una combinación de estos.

5 Los ejemplos de los disolventes que se han de utilizar en la cristalización incluyen disolventes de tipo alcohol tales como metanol, etanol, isopropanol y 1-propanol; acetonitrilo; disolventes de tipo amida tales como *N,N*-dimetilformamida; disolventes de tipo éster tales como acetato de etilo; disolventes de tipo hidrocarburo saturado tales como hexano y heptano; disolventes de tipo cetona tales como acetona y 2-butanona; disolventes de tipo éter tales como éter *t*-butil metílico o agua. Además, cada uno de estos disolventes se puede utilizar solo, o se pueden mezclar y utilizar dos o más.

10 La cantidad del disolvente que se ha de utilizar se puede seleccionar convenientemente, siempre que el límite inferior sea la cantidad en la que la forma libre del compuesto (I) o la sal de este se disuelva por calentamiento o la suspensión se pueda agitar, y que el límite superior sea la cantidad en la que el rendimiento del cristal no se reduzca significativamente.

15 El cristal obtenido mediante los métodos descritos anteriormente es una forma monocristalina. Esta forma cristalina es estable, no se convierte rápidamente en otras formas cristalinas o sustancias amorfas, posee unas propiedades físicas buenas y también es adecuada para la formulación.

20 Se puede añadir o no un germen cristalino (p. ej., el cristal de la sal deseada del compuesto (I)) durante la cristalización. La temperatura, a la cual se añade el germen cristalino, no está particularmente limitada y está comprendida preferentemente entre 0 y 60°C.

25 Como temperatura que se ha de emplear cuando se disuelve la sal del compuesto (I) por calentamiento, aquella a la cual el compuesto (I) se disuelve se puede seleccionar convenientemente dependiendo del disolvente, pero está comprendida preferentemente dentro del rango de entre la temperatura a la que el disolvente de recristalización comienza a refluir y 50°C, y más preferentemente entre 65 y 55°C.

30 El enfriamiento durante la cristalización podría proporcionar sustancias que contienen formas diferentes de cristales (polimorfismo) si el enfriamiento es rápido. Por lo tanto, es deseable llevar a cabo el enfriamiento controlando la velocidad de enfriamiento, según proceda, teniendo en cuenta su efecto sobre la calidad, el tamaño de grano y propiedades similares del cristal. Se prefiere, por ejemplo, un enfriamiento con una velocidad de enfriamiento comprendida entre 40 y 5°C/hora. Se prefiere aún más que el enfriamiento sea a una velocidad de enfriamiento comprendida, por ejemplo, entre 25 y 5°C/hora.

35 Además, la temperatura de cristalización final se puede seleccionar convenientemente para el rendimiento, la calidad y propiedades similares del cristal, y preferentemente está comprendida entre 30 y -25 °C.

40 El cristal deseado se puede obtener aislando el cristal formado mediante un procedimiento de filtración convencional, lavando el cristal separado por filtración con un disolvente, en caso necesario, y después secándolo. Como disolvente que se ha de utilizar para lavar el cristal, se puede utilizar el mismo disolvente que en la cristalización. Preferentemente es, por ejemplo, acetona, 2-butanona, acetato de etilo, éter *t*-butil metílico y una mezcla de disolventes constituida por hexano/2-butanona (en una proporción en volumen de 2:3).

45 El cristal aislado mediante el procedimiento de filtración se puede secar, según proceda, exponiéndolo al aire o a una corriente de nitrógeno, o por calentamiento.

50 Como tiempo de secado, el tiempo hasta que la cantidad de disolvente residual sea inferior a la cantidad predefinida se puede seleccionar, según proceda, dependiendo de la cantidad de producción, el aparato de secado, la temperatura de secado y parámetros similares. Además, el secado se puede llevar a cabo con una corriente de aire o a presión reducida. El grado de reducción de la presión se puede seleccionar, según proceda, dependiendo de la cantidad de producción, el aparato de secado, la temperatura de secado y parámetros similares. El cristal obtenido se puede exponer al aire, en caso necesario, tras secarlo.

55 En los métodos mencionados anteriormente para producir el compuesto (I), los cristales descritos anteriormente se pueden producir después de sintetizar el compuesto (I) empleando además los métodos mencionados anteriormente para producir sales del compuesto (I) y, en caso necesario, los métodos para producir cristales de sales del compuesto (I).

60 Cabe esperar que las sales del compuesto (I) y los cristales de estas obtenidos mediante los métodos de producción explicados anteriormente incrementen la concentración de cGMP en el cerebro ya que poseen actividad inhibitoria de PDE9, tal como muestran los datos de actividad en el ensayo farmacológico ilustrativo que se describe más adelante. La actividad inhibitoria de PDE9 y el aumento de cGMP en el cerebro produce una mejora en la conducta de aprendizaje y la memoria, y tales sales y cristales tienen potencial para su uso como agente terapéutico para la disfunción cognitiva y alteraciones similares en la enfermedad de Alzheimer.

Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este se puede preparar desde un punto de vista farmacéutico mediante un método convencional y se puede elaborar la forma farmacéutica, por ejemplo, un preparado oral (comprimido, gránulo, polvo, cápsula, jarabe o similar), una inyección (para la administración intravenosa, para la administración intramuscular, para la administración subcutánea, para la administración intraperitoneal y para otras) y un preparado externo (preparado endérmico (pomada, parche y similar), gotas oftálmicas, gotas nasales, supositorios y similares).

Si se produce un preparado sólido oral, a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este se añaden, según se requiera, un excipiente, un aglutinante, un desintegrante, un lubricante, un colorante y agentes similares, y se pueden producir un comprimido, un gránulo, un polvo y una cápsula mediante métodos convencionales. El comprimido, gránulo, polvo, cápsula y similar puede estar recubierto con una película, en caso necesario.

Los ejemplos del excipiente incluyen lactosa, almidón de maíz y celulosa cristalina; los ejemplos del aglutinante incluyen hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa; los ejemplos del desintegrante incluyen carboximetilcelulosa de calcio y croscarmelosa de sodio; los ejemplos del lubricante incluyen estearato de magnesio y estearato de calcio; los ejemplos del colorante incluyen óxido de titanio; y los ejemplos de un agente de recubrimiento pelculígeno incluyen hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa, pero, obviamente, estos aditivos no se limitan a estos ejemplos.

Normalmente estos preparados sólidos, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos, pueden contener cada uno entre un 0.001 y un 99.5% en peso, preferentemente entre un 0.01 y un 90% en peso o porcentajes similares, de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Si se produce una inyección (para la administración intravenosa, para la administración intramuscular, para la administración subcutánea, para la administración intraperitoneal y para otras), a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este se añaden, según se requiera, un regulador del pH, un agente tamponante, un agente de suspensión, un solubilizante, un antioxidante, un conservante (antiséptico), un agente isotónico y agentes similares, y se puede producir una inyección mediante un método convencional. Los preparados se pueden liofilizar para transformarlos en preparados liofilizados del tipo de disolución extemporánea.

Como regulador del pH y agente tamponante, se puede utilizar, por ejemplo, un ácido orgánico o un ácido inorgánico y/o una sal de estos o similar. Además, como agente de suspensión, se puede utilizar, por ejemplo, metilcelulosa, polisorbato 80, carboximetilcelulosa de sodio o similar. Como solubilizante, se puede utilizar, por ejemplo, polisorbato 80, monolaurato de sorbitán polioxietileno o similar. Como antioxidante, se puede utilizar, por ejemplo, α -tocoferol o similar. Como conservante, se puede utilizar, por ejemplo, *para*-hidroxibenzoato de metilo, *para*-hidroxibenzoato de etilo o similar. Como agente isotónico, se puede utilizar, por ejemplo, glucosa, cloruro de sodio, manitol o similar. El regulador del pH, el agente tamponante, el agente de suspensión, el solubilizante, el antioxidante, el conservante (antiséptico) y el agente isotónico, obviamente, no se limitan a estos.

Normalmente estas inyecciones pueden contener entre un 0.000001 y un 99.5% en masa, y preferentemente entre un 0.00001 y un 90% en masa o un porcentaje similar de la sal del compuesto (I) o el cristal de esta, en relación con la masa total de las inyecciones.

Si se produce un preparado externo, se añade una materia prima de base a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este y se añaden, según se requiera, por ejemplo, el conservante, un estabilizante, el regulador del pH, el antioxidante, el colorante y agentes similares, y se pueden producir, por ejemplo, un preparado endérmico (pomada, parche y similar), gotas oftálmicas, gotas nasales, supositorios y similares mediante métodos convencionales.

Como materia prima de base que se ha de emplear, se pueden utilizar diversas materias primas que se utilizan habitualmente en, por ejemplo, medicamentos, productos parafarmacéuticos y productos cosméticos. Los ejemplos específicos de estos incluyen materias primas tales como aceites animales y vegetales, aceites minerales, aceites de tipo éster, ceras, emulsionantes, alcoholes superiores, ácidos grasos, aceites silicónicos, surfactantes, fosfolípidos, alcoholes, alcoholes polihídricos, polímeros hidrosolubles, minerales arcillosos y agua purificada.

Normalmente estos preparados externos pueden contener cada uno entre un 0.000001 y un 99.5% en peso, preferentemente entre un 0.00001 y un 90% en peso o porcentajes similares, de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

La dosis de la sal del compuesto (I) o el cristal de esta varía dependiendo de la intensidad del síntoma, la edad, el sexo, el peso corporal, la forma farmacéutica, el tipo de sal, el tipo específico de enfermedad y factores similares. En el caso de los adultos, normalmente se administran por vía oral de aproximadamente 30 μ g a 10 g, preferentemente de 100 μ g a 5 g, y más preferentemente de 100 μ g a 1 g al día, o se administran por inyección de aproximadamente

30 µg a 1 g, preferentemente de 100 µg a 500 mg, y más preferentemente de 100 µg a 300 mg al día, en cada caso, en una única dosis o en dosis divididas.

Ejemplo

5 La presente invención se describirá a continuación detalladamente haciendo referencia a los Ejemplos de referencia y los Ejemplos, pero no se limita a estos Ejemplos de referencia y Ejemplos.

10 Se utilizarán las siguientes abreviaturas en los Ejemplos y los Ejemplos de referencia en la presente memoria descriptiva.

CDI: 1,1'-carbonildiimidazol

DCM: diclorometano

15 DMF-DMA: acetal dimetílico de *N,N*-dimetilformamida

DMF: *N,N*-dimetilformamida

20 DMSO: sulfóxido de dimetilo

DTT: ditioneitol

IPA: alcohol isopropílico

25 KTB: *tert*-butóxido de potasio

MTBE: éter *t*-butil metílico

30 NBS: *N*-bromosuccinimida

Complejo de Pd(dppf)Cl₂·DCM: Complejo de [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaladio (II) y DCM

35 Pd(PPh₃)₄: tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0)

TEA: trietilamina

TFA: ácido trifluoroacético

40 THF: tetrahidrofurano

Tris: trishidroximetilaminometano

45 El desplazamiento químico en el espectro de resonancia magnética nuclear de protón se registra en unidades δ (ppm) respecto al tetrametilsilano; y la constante de acoplamiento se registra en hercios (Hz). Las abreviaturas de los patrones de multiplicidad son los siguientes: s: singlete, d: doblete, t: triplete, c: cuadruplete, m: multiplete, s a: singlete ancho y d a: doblete ancho.

50 En la difracción cristalina de rayos X en polvo de los cristales producidos en los siguientes Ejemplos, los cristales obtenidos se colocaron sobre la plataforma para muestras de un difractor de rayos X en polvo y se analizaron en las siguientes condiciones.

Condiciones de medición

55 Portamuestras: aluminio

Diana: cobre

Detector: contador de centelleo

60 Voltaje del tubo: 50 kV

Corriente del tubo: 300 mA

65 Rendija: DS de 0.5 mm (rendija limitante de la altura de 2 mm), SS abierta, RS abierta

Velocidad de barrido: 10°/min

Intervalo de muestreo: 0.02°

5 Rango de barrido: de 5 a 35°

Goniómetro: goniómetro horizontal

10 Los espectros de RMN en estado sólido de ^{13}C de los cristales se midieron en las siguientes condiciones.

Condiciones de medición

Aparato empleado: AVANCE400 (de Bruker Corporation)

15 Temperatura de medición: temperatura ambiente (22 °C)

Material de referencia: glicina (referencia externa: 176.03 ppm)

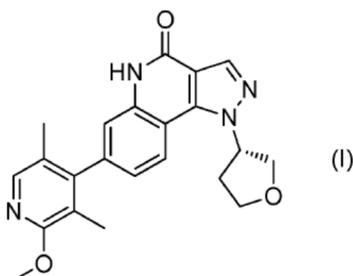
20 Núcleo medido: ^{13}C (100.6248425 MHz)

Tiempo de repetición del pulso: 3 segundos

Modo del pulso: medición TOSS

25 Ejemplo de referencia 1

Síntesis de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona



30 (1) Síntesis de 2-[dihidrofuran-3(2H)-ilideno]hidrazincarboxilato de bencilo

Se disolvió 3-oxotetrahidrofurano (5.70 g) en metanol (150 mL) y se añadió carbazato de bencilo (10 g) a la solución. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró. Se obtuvieron 14.8 g de un residuo como un producto crudo. Este se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

35

(2) Síntesis de (±)-2-(tetrahidrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo

Se suspendió 2-[dihidrofuran-3(2H)-ilideno]hidrazincarboxilato de bencilo (14.8 g) en agua (96 mL). Se añadió ácido acético (42.1 mL) a la suspensión a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión se transformó en una solución. Se añadió cianoborohidruro de sodio (4.0 g) a la solución en pequeñas porciones. La solución mezclada se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C. La mezcla de reacción se neutralizó añadiendo una solución acuosa de hidróxido de sodio 5 N. La mezcla se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro y después se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (metanol/acetato de etilo, 5%). Se obtuvo el compuesto del título (13.9 g).

45

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.73-1.80 (m, 1H), 1.92-2.06 (m, 1H), 3.66-3.82 (m, 3H), 3.82-4.03 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 7.31-7.40 (m, 5H).

50 (3) Síntesis de (-)-2-(tetrahidrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo y (+)-2-(tetrahidrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo

Se añadió una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (30 mL) a una solución de (±)-2-(tetrahidrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo (11.5 g) en MTBE (110 mL). La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se separó la capa orgánica. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, y se secó con sulfato de magnesio anhidro, y el desecante se retiró por

55

filtración. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano, de 25 a 50%) y la fracción diana se concentró. Se añadieron éter dietílico (30 mL) y hexano (15 mL) al residuo. El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó a presión reducida para obtener (\pm)-2-(tetrahydrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo puro (6.17 g).

Este producto se disolvió en etanol y se filtró a través de un filtro Millipore. El filtrado resultante se resolvió ópticamente en dos condiciones.

Condición 1: CHIRALCELTM fabricada por DAICEL Corp., OD-H ($\Phi \times = 20$ mm, L = 250 mm), 20% de IPA-hexano, 25 mL/min.

Condición 2: CHIRALPAKTM fabricada por DAICEL Corp., AD-H ($\Phi \times = 20$ mm, L = 250 mm), 20% de IPA-hexano, 24 mL/min. La fracción deseada se concentró para obtener el compuesto del título con un tiempo de retención corto y una rotación óptica (-) (2.60 g, >99% de ee [OD-H, 20% de IPA/hexano, tiempo de retención = 11.2 min]), y el compuesto del título con un tiempo de retención largo y una rotación óptica (+) (2.59 g, 97.2% de ee [OD-H, 20% de IPA/hexano, tiempo de retención = 12.4 min]).

(4) Síntesis de clorhidrato de (S)-(tetrahydrofuran-3-il)hidracina

Se disolvió (-)-2-(tetrahydrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo (50 g) en metanol (500 mL), y se añadieron dicarbonato de di-*t*-butilo (92.4 g) y paladio sobre carbón (50% de humedad) (5 g). La mezcla se agitó a 25°C y 15 psi durante 48 horas en una atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en éter diisopropílico (300 mL). Tras enfriar a 0°C, se añadieron ácido clorhídrico/éter diisopropílico (500 mL) a la solución. La mezcla se agitó a 10 °C durante 14 horas. El sólido precipitado se recogió por filtración. Se realizó la misma operación partiendo de (-)-2-(tetrahydrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo (70 g) nueve veces y se realizó la misma operación partiendo de (-)-2-(tetrahydrofuran-3-il)hidrazincarboxilato de bencilo (50 g) una vez. El sólido resultante se trató con DCM/etanol (10/1) (1 L) durante dos horas. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido resultante se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (235 g).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.87-2.09 (m, 2H), 3.55-3.71 (m, 2H), 3.71-3.84 (m, 3H).

La configuración absoluta del compuesto del título resultante se confirmó que era una forma (S) según la cristalografía de rayos X.

(5) Síntesis de 2-fluoro-3-yodo-5-metilpiridina

Se añadió diisopropilamina (92 mL) a THF (1.2 L) y la mezcla se enfrió hasta -18°C en atmósfera de nitrógeno. A esta solución se añadió gota a gota una solución (224 mL) de *n*-butillitio 2.69 M en hexano. Tras la adición por goteo, la temperatura se incrementó hasta -5°C en 20 minutos mientras se agitaba esta mezcla. La solución de reacción se enfrió hasta -73 °C. A esta solución de reacción se añadió gota a gota una solución en THF (240 mL) de 2-fluoro-5-metilpiridina (61 g). La mezcla de reacción se agitó a -75 °C durante tres horas y media. A esta solución de reacción se añadió gota a gota una solución en THF (24 mL) de yodo (139 g). La mezcla de reacción se agitó a -75 °C durante 1 hora y 55 minutos. Tras la reacción, se añadió agua (220 mL) a la solución de reacción a la misma temperatura. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 5 minutos. Se dejó que la solución de reacción alcanzara de nuevo la temperatura ambiente y después se añadió agua (1.2 L). A esta mezcla se añadieron una solución acuosa (300 mL) de tiosulfato de sodio pentahidratado (136 g) y agua (300 mL), y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Esta mezcla se extrajo con MTBE (1.2 L). La capa orgánica se lavó con solución salina saturada (500 mL). Las capas acuosas combinadas se extrajeron con MTBE (1 L). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Se retiró el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió *n*-heptano al residuo y la mezcla se enfrió. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido se lavó con *n*-heptano. El filtrado se enfrió y el sólido precipitado se recogió por filtración. El procedimiento se repitió 5 veces para obtener el compuesto del título (109.69 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.29-2.31 (m, 3H), 7.93-8.14 (m, 2H).

ESI-MS *m/z* 238 [M+H]⁺

(6) Síntesis de 2-fluoro-4-yodo-3,5-dimetilpiridina

Se añadió diisopropilamina (88 mL) a THF (1.2 L) y la mezcla se enfrió hasta -18°C en atmósfera de nitrógeno. A esta solución se añadió gota a gota una solución (215 mL) de *n*-butillitio 2.69 M en hexano. Tras la adición por goteo, la temperatura se incrementó hasta -5°C en 30 minutos mientras se agitaba esta mezcla. La solución de reacción se enfrió hasta -72 °C. A esta solución de reacción se añadió gota a gota una solución en THF (240 mL) de 2-fluoro-3-yodo-5-metilpiridina (109.69 g). La mezcla de reacción se agitó a -74 °C durante una hora y media. A esta

solución de reacción se añadió gota a gota una solución en THF (160 mL) de yoduro de metilo (36 mL). La mezcla de reacción se agitó a una temperatura comprendida entre -70°C y -74°C durante 2 horas. Tras la reacción, se añadió agua (200 mL) a la solución de reacción a la misma temperatura. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 2 minutos. Se dejó que la solución de reacción alcanzara de nuevo la temperatura ambiente y después se añadió agua (1.2 L). Esta mezcla se agitó durante 3 min. Se añadió más agua (300 mL). Esta mezcla se extrajo con MTBE (1.2 L). La capa orgánica se lavó con solución salina saturada (500 mL). Las capas acuosas combinadas se extrajeron con MTBE (1 L). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Se retiró el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió *n*-heptano (100 mL) al residuo y la mezcla se enfrió. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido se lavó con *n*-heptano. El filtrado se enfrió y el sólido precipitado se recogió por filtración. El procedimiento se repitió dos veces para obtener el compuesto del título (86.9 g).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.39-2.40 (m, 6H), 7.80-7.82 (m, 1H).

ESI-MS m/z 252 $[\text{M}+\text{H}]^+$

(7) Síntesis de 4-yodo-2-metoxi-3,5-dimetilpiridina

A una solución en THF (954 mL) de 2-fluoro-4-yodo-3,5-dimetilpiridina (97.4 g) se añadió a 20°C, una solución en metanol (185 mL) de metóxido de sodio al 28%. Esta mezcla se agitó a una temperatura comprendida entre 55°C y 65°C durante 2 horas. La solución de reacción se enfrió, y después se separó añadiendo MTBE (1 L) y agua (1 L). La capa orgánica se lavó con solución salina saturada. Las capas acuosas combinadas se extrajeron con MTBE (500 mL x 2). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Se retiró el agente desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió *n*-heptano (50 mL) al residuo y la mezcla se agitó a 0°C durante 1 hora. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido se lavó con *n*-heptano frío (10 mL). Se obtuvo el compuesto del título (42.6 g). El filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió *n*-heptano (5 mL) al residuo y la mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido se lavó con *n*-heptano frío (2 mL) para obtener el compuesto del título (20.2 g). El filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió *n*-heptano (5 mL) al residuo y la mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos. El sólido precipitado se recogió por filtración. El sólido se lavó con *n*-heptano frío (2 mL). Se obtuvo el compuesto del título (10.7 g). Al combinarlos, se obtuvo el compuesto del título (73.5 g).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.33-2.34 (m, 3H), 2.36-2.38 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 7.76 (s, 1H).

ESI-MS m/z 264 $[\text{M}+\text{H}]^+$

(8) Síntesis de 3-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-oxopropanoato de etilo

Se añadió CDI (8.88 g) a una suspensión del ácido 4-bromo-2-fluorobenzoico (N.º CAS 112704-79-7) (10 g) en DCM (97 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3.5 horas. Esta solución se denomina "solución 1".

A una suspensión de malonato de etilo potásico (15.5 g) en acetonitrilo (303 mL) en otro matraz se añadió TEA (15.9 mL) y después cloruro de magnesio (10.9 g), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y 10 minutos. A esta mezcla de reacción se añadió gota a gota en 25 minutos la "solución 1" preparada anteriormente y después la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se concentró hasta la mitad de su volumen a presión reducida. El residuo obtenido se diluyó con acetato de etilo (500 mL) y, después de añadir ácido clorhídrico 5 N (250 mL) con enfriamiento con hielo, se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La capa orgánica se separó. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, 5-20%) para obtener el compuesto del título (12.8 g).

ESI-MS m/z 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$

(9) Síntesis de 5-(4-bromo-2-fluorofenil)-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo

Una solución de 3-(4-bromo-2-fluorofenil)-3-oxopropanoato de etilo (45 g) en DMF-DMA (165 mL) se agitó a 50°C durante 2 horas y 15 minutos. La solución de reacción se concentró a presión reducida. Se añadió tolueno (200 mL) al residuo y la mezcla se concentró de nuevo a presión reducida. Se añadió etanol (950 mL) al residuo y la mezcla se calentó hasta 50°C. A la solución se añadió gota a gota en 35 minutos una solución acuosa (60 mL) de clorhidrato de (S)-(tetrahidrofuran-3-il)hidrazina (21.6 g). La mezcla de reacción obtenida se agitó a 50 °C durante 2 horas y 10 minutos. La solución de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró hasta la mitad de su volumen a presión reducida. Se añadió agua (200 mL) al residuo y el etanol se eliminó por destilación a presión reducida. Se añadió acetato de etilo (500 mL) al residuo obtenido y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina

saturada, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, de 10% a 15%) y después mediante cromatografía en columna de recorrido corto de gel de sílice NH (gel de sílice recubierto con propilamina de Fuji Silysia Chemical Ltd.) (acetato de etilo/*n*-heptano, 33%) para obtener el compuesto del título (43.1 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.19 (t, J=7.2 Hz, 3H), 2.19-2.49 (m, 2H), 3.87-4.07 (m, 3H), 4.11-4.25 (m, 3H), 4.58-4.65 (m, 1H), 7.17-7.26 (m, 1H), 7.39-7.47 (m, 2H), 8.06 (s, 1H).

ESI-MS m/z 407 [M+Na]⁺

(10) Síntesis de 5-[2-fluoro-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo

Una mezcla de 5-(4-bromo-2-fluorofenil)-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (43.1 g), bis(pinacolato)diboro (34.3 g), complejo de Pd(dppf)Cl₂·DCM (4.59 g) y acetato de potasio (33.1 g) se secó a presión reducida utilizando una bomba de vacío durante 1 hora. Una solución del residuo seco en DMF (430 mL) se agitó a 80°C durante 3 horas y 10 minutos. Se dejó que la solución de reacción alcanzara de nuevo la temperatura ambiente y después se filtró a través de Celite™. El filtrado se concentró a presión reducida. Al residuo se añadió acetato de etilo (430 mL) y solución salina saturada (200 mL), y la mezcla se agitó durante 5 minutos. La materia insoluble se eliminó por filtración utilizando Celite™. La capa orgánica se separó del filtrado. La capa acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio anhidro y se filtraron, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, 10-15%) para obtener el compuesto del título (51.9 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.16 (t, J=7.2 Hz, 3H), 1.37 (s, 12H), 2.15-2.49 (m, 2H), 3.85-4.06 (m, 3H), 4.14 (c, J=7.2 Hz, 2H), 4.20 (dd, J=15.6, 8.4 Hz, 1H), 4.57-4.66 (m, 1H), 7.30 (t, J=7.2 Hz, 0.5H), 7.35 (t, J=7.2 Hz, 0.5H), 7.63 (dd, J=5.6, 2.0 Hz, 1H), 7.70 (dd, J=7.2, 2.0 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H).

(11) Síntesis de 5-[2-fluoro-4-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo

Se añadieron agua (170 mL), 4-yodo-2-metoxi-3,5-dimetilpiridina (35.6 g), Pd(PPh₃)₄ (6.52 g) y carbonato de cesio (110 g) a una solución de 5-[2-fluoro-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (51.9 g) en 1,4-dioxano (500 mL), y la mezcla de reacción se dejó reaccionar a 110°C durante seis horas. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara de nuevo la temperatura ambiente y después se separó la capa orgánica. La capa orgánica se concentró a presión reducida. Se añadieron la capa acuosa, acetato de etilo (700 mL) y agua (100 mL) al residuo resultante, y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con agua y salmuera, se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (acetato de etilo/*n*-heptano, de 5% a 14%). A continuación, el producto se purificó de nuevo mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (acetato de etilo/*n*-heptano, de 2% a 10%) para obtener el compuesto del título (43.5 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.16 (t, J=7.2 Hz, 1.5H), 1.17 (t, J=7.2 Hz, 1.5H), 1.97 (s, 1.5H), 1.98 (s, 1.5H), 1.99 (s, 1.5H), 2.00 (s, 1.5H), 2.25-2.55 (m, 2H), 3.92-4.27 (m, 6H), 3.99 (s, 1.5H), 4.00 (s, 1.5H), 4.65-4.75 (m, 1H), 7.01 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.05 (d, J=7.2 Hz, 1H), 7.39 (t, J=7.2 Hz, 0.5H), 7.45 (t, J=7.2 Hz, 0.5H), 7.93 (s, 1H), 8.12 (s, 1H).

ESI-MS m/z 440 [M+H]⁺

(12) Síntesis del ácido 5-[2-fluoro-4-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxílico

Una solución acuosa de hidróxido de sodio 5 N (79 mL) se añadió a una solución de 5-[2-fluoro-4-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (43.2 g) en etanol (574 mL) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a 60°C durante dos horas y 10 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró hasta la mitad de su volumen a presión reducida. Se añadió agua (300 mL) al residuo y el etanol se eliminó por destilación a presión reducida. Se añadió MTBE (130 mL) al residuo resultante y la capa acuosa se separó. La capa orgánica se extrajo con agua (30 mL). Las capas acuosas combinadas se acidificaron con ácido clorhídrico 5 N (78 mL) con enfriamiento con hielo y se extrajeron dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto del título (39.0 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.91 (s, 1.5H), 1.94 (s, 1.5H), 1.98 (s, 1.5H), 2.01 (s, 1.5H), 2.25-2.56 (m, 2H), 3.92-4.17 (m, 3H), 3.96 (s, 1.5H), 4.00 (s, 1.5H), 4.23 (dd, J=16.0, 8.0 Hz, 1H), 4.65-4.77 (m, 1H), 6.99 (ad, J=10.0 Hz, 1H), 7.03 (dr d, J=7.6 Hz, 1H), 7.38 (t, J=7.6 Hz, 0.5H), 7.44 (t, J=7.6 Hz, 0.5H), 7.90 (s, 0.5H), 7.94 (s, 0.5H), 8.14 (s, 1H).

ESI-MS m/z 434 [M+Na]⁺(13) Síntesis de 5-[2-fluoro-4-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxamida

5 Se añadió CDI (21.4 g) de una vez a una solución del ácido 5-[2-fluoro-4-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxílico (38.7 g) en DMF (290 mL) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 95 minutos. Se añadió amoniaco acuoso al 28% (95 mL) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 35 minutos. Se añadió más amoniaco acuoso al 28% (95 mL) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se añadieron cloroformo (250 mL) y agua (80 mL) al residuo resultante, y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se volvió a extraer con cloroformo (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (60 mL × 3) y salmuera, se secaron con sulfato de magnesio anhidro y se filtraron. El filtrado se hizo pasar a través de un lecho de sílice (gel de sílice NH). El filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (37.2 g).

1H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.98 (as, 6H), 2.24-2.60 (m, 2H), 3.90-4.20 (m, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.23 (dd, J=16.0, 8.0 Hz, 1H), 4.62-4.71 (m, 1H), 5.32 (as, 2H), 7.05 (ad, J=10.0 Hz, 1H), 7.10 (dd, J=7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.42-7.56 (m, 1H), 7.94 (as, 1H), 8.03 (s, 1H).

ESI-MS m/z 411 [M+H]⁺(14) Síntesis de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

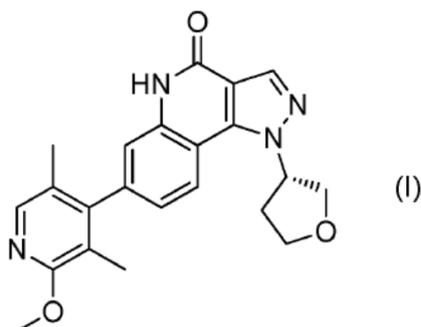
25 Se añadió hidróxido de sodio en polvo (9.43 g) de una vez a una solución de 5-[2-fluoro-4-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)fenil]-1-[(S)-tetrahidrofuran-3-il]-1H-pirazol-4-carboxamida (37.2 g) en DMSO (186 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 50 minutos y después a 70°C durante 45 minutos. Con enfriamiento con agua, se añadió agua (600 mL) gota a gota a la mezcla de reacción y a continuación se añadió ácido acético (13.5 mL) gota a gota. El polvo precipitado se recogió por filtración. El polvo recogido se lavó con agua y MTBE, y después se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (34.0 g).

1H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.92-1.94 (m, 3H), 1.94-1.96 (m, 3H), 2.55-2.66 (m, 1H), 2.76-2.86 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 4.09-4.16 (m, 1H), 4.24-4.37 (m, 2H), 4.39-4.45 (m, 1H), 5.61-5.68 (m, 1H), 7.04 (d, J=1.5 Hz, 1H), 7.08 (dd, J=1.5 Hz, 8.3Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 8.13 (d, J=8.3 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.86 (s, 1H).

ESI-MS m/z 391 [M+H]⁺

40 El compuesto del título mostró una rotación óptica de (-) y su pureza óptica fue ≥99% de ee [AD-H, 100% de etanol, tiempo de retención: 9.7 min].

Ejemplo de referencia 2

Síntesis de (-)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-onaSíntesis de (+)-5-(2,4-dimetoxibencil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona(1) Síntesis de 3-(4-bromo-2-clorofenil)-3-oxopropionato de etilo

Se suspendió el ácido 4-bromo-2-clorobenzoico (1 g) en DCM (10 mL). Se añadió CDI (960 mg) a la suspensión resultante y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se denomina "solución 1". Se suspendió malonato de etilo potásico (1.1 g) en acetonitrilo (20 mL) en otro matraz en atmósfera de nitrógeno y se añadió TEA

(1.5 mL). La solución resultante se enfrió hasta 0°C y se añadió cloruro de magnesio (805 mg) poco a poco y después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió la "solución 1" preparada anteriormente. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. La mezcla de reacción se agitó de nuevo a 50 °C durante 9 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se eliminó el DCM. El residuo obtenido se enfrió hasta 0°C, se añadieron acetato de etilo (50 mL) y ácido clorhídrico 2 N (20 mL), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La capa orgánica resultante se separó. La capa acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo. El extracto se combinó con la capa orgánica y se secó con sulfato de magnesio anhidro. Se retiró el desecante por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, de 0% a 10%) para obtener de este modo el compuesto del título (1.2 g).

ESI-MS *m/z* 307 [M + H]⁺

(2) Síntesis de (±)-5-(4-bromo-2-clorofenil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo

Se disolvió 3-(4-bromo-2-clorofenil)-3-oxopropanoato de etilo (2.00 g) en DMF-DMA (6.96 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en etanol (40 mL). Se añadió clorhidrato de (±)-(tetrahidrofuran-3-il)hidrazina (998 mg) a la solución y la mezcla se calentó a reflujo durante dos horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo y la capa orgánica se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, de 10% a 30%) para obtener el compuesto del título (1.05 g).

ESI-MS *m/z* 401 [M + H]⁺

(3) Síntesis del ácido (±)-5-(4-bromo-2-clorofenil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazol-4-carboxílico

Una mezcla de (±)-5-(4-bromo-2-clorofenil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo (1.05 g) y una solución acuosa de hidróxido de sodio 5 N (1.58 mL) se agitó en una mezcla de disolventes constituida por etanol (20 mL) y agua (5 mL) a 60°C durante tres horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. Se añadió ácido clorhídrico 5 N al residuo y después se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro y el desecante se separó por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (1 g).

ESI-MS *m/z* 371 [M + H]⁺

(4) Síntesis de (±)-5-(4-bromo-2-clorofenil)-*N*-(2,4-dimetoxibencil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazol-4-carboxamida

Se disolvió el ácido (±)-5-(4-bromo-2-clorofenil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazol-4-carboxílico (1 g) en DCM (20 mL) y se añadió CDI (611 mg) seguido de agitación a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió 2,4-dimetoxibencilamina (0.809 mL) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. Se añadió una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio a la mezcla de reacción y después se extrajo con DCM. La capa orgánica se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, de 10% a 40%) para obtener el compuesto del título (1.26 g).

ESI-MS *m/z* 522 [M + H]⁺

(5) Síntesis de (±)-7-bromo-5-(2,4-dimetoxibencil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazol[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona

Se disolvió (±)-5-(4-bromo-2-clorofenil)-*N*-(2,4-dimetoxibencil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (1.26 g) en THF (25 mL) y se añadió KTB (597 mg) a 0°C. La mezcla se agitó durante 12 horas mientras se calentaba gradualmente hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, se añadió agua y después se filtró. El residuo de la filtración se conservó por separado. El filtrado se extrajo con acetato de etilo y la capa orgánica se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, de 10% a 70%). La fracción resultante y el residuo de la filtración obtenido anteriormente se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto del título (488 mg).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.50-2.62 (m, 1H), 2.72-2.82 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 4.07-4.15 (m, 1H), 4.19-4.32 (m, 2H), 4.35-4.42 (m, 1H), 5.46-5.57 (m, 3H), 6.34 (dd, *J*=8.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.52 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.99 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J*=8.6 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.82 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.89 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H).

ESI-MS *m/z* 506 [M + Na]⁺

(6) Síntesis de (±)-5-(2,4-dimetoxibencil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

Una mezcla de (±)-7-bromo-5-(2,4-dimetoxibencil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (300 mg), bis(pinacolato)diboro (204 mg), complejo de Pd(dppf)Cl₂·DCM (13.6 mg) y acetato de potasio (182 mg) se hizo reaccionar en una mezcla de disolventes constituida por 1,4-dioxano (15 mL) y DMSO (1 mL) utilizando un reactor de microondas a 130°C durante tres horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo y la capa orgánica se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a un lecho de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo para obtener el compuesto del título (428 mg) como un producto crudo.

ESI-MS m/z 532 [M + H]⁺

(7) Síntesis de 3,5-dibromo-2-metoxipiridin-4-amina

Una mezcla de 2-metoxipiridin-4-ilamina (15 g) y NBS (47.3 g) se agitó en ácido acético como disolvente (150 mL) a temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio 5 N (200 mL) al residuo a 0°C, y después se extrajo con éter dietílico. La capa orgánica se purificó directamente en un lecho de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, 10%) para obtener el compuesto del título (32.4 g).

ESI-MS m/z 283 [M + H]⁺

(8) Síntesis de 2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-amina

Se calentó una mezcla de 3,5-dibromo-2-metoxipiridin-4-amina (16 g), trimetilboroxina (19.8 mL), complejo de Pd(dppf)Cl₂·DCM (4.15 g) y carbonato de potasio (23.5 g) a reflujo en una mezcla de disolventes constituida por 1,4-dioxano (320 mL) y agua (32 mL) durante 12 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. Se añadieron agua y acetato de etilo al residuo, y después se filtró a través de Celite™. El filtrado se extrajo con acetato de etilo, la capa orgánica se sometió a un lecho de gel de sílice (gel de sílice NH) y se eluyó con acetato de etilo. Se añadió gel de sílice NH (30 g) a la solución resultante y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (acetato de etilo/*n*-heptano, de 0% a 30%) para obtener el compuesto del título (4.43 g).

ESI-MS m/z 153 [M + H]⁺

(9) Síntesis de 4-bromo-2-metoxi-3,5-dimetilpiridina

Una mezcla de bromuro de cobre (I) (12.1 g) y *t*-butilnitrito (7.07 mL) se agitó en acetonitrilo como disolvente (80 mL) a 70°C durante 10 minutos. Se añadió una solución de 2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-amina (3.9 g) en acetonitrilo (40 mL) gota a gota a la mezcla de reacción a la misma temperatura y la mezcla se agitó a 70°C durante una hora. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. Se añadieron acetato de etilo y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio al residuo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite™ y el filtrado se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (*n*-heptano, 100%, seguido de un lecho de gel de sílice NH, *n*-heptano, 100%) para obtener el compuesto del título (4.3 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.28-2.29 (m, 3H), 2.29-2.31 (m, 3H), 3.93 (s, 3H), 7.77-7.84 (m, 1H).

ESI-MS m/z 216 [M+H]⁺

(10) Síntesis de (±)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

Una mezcla de (±)-5-(2,4-dimetoxibencil)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (219 mg), 4-bromo-2-metoxi-3,5-dimetilpiridina (134 mg), Pd(PPh₃)₄ (23.8 mg) y carbonato de cesio (403 mg) se hizo reaccionar en una mezcla de disolventes constituida por 1,4-dioxano (8 mL) y agua (2 mL) utilizando un reactor de microondas a 130°C durante 70 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se purificó directamente mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/*n*-heptano, de 10% a 90%). El producto del acoplamiento resultante se disolvió en TFA (4 mL) y la mezcla se agitó a 70°C durante dos horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. Se añadió una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio al residuo y después se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM, 100% después acetato de etilo/*n*-heptano, de 50% a 100%) para obtener el compuesto del título (78 mg).

ESI-MS m/z 391 [M + H]⁺

(11) Síntesis de (+)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona y (-)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

Se analizó la (±)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona mediante cromatografía en columna quiral [columna quiral fabricada por DAICEL Corp., AD-H (0.46 cm de Φ x 15 cm), fase móvil; 100% de etanol] para identificar la forma (+) a 7.8 min y la forma (-) a 9.7 min, y para confirmar que la resolución óptica es posible. Se disolvió (±)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (78 mg) en una mezcla de disolventes constituida por etanol (12 mL) y metanol (12 mL), y la solución se filtró a través de un tapón de algodón. El filtrado se resolvió ópticamente mediante cromatografía en columna quiral [columna quiral: columna AD-H, disolvente de elución: 100% de etanol, flujo: 10 mL/min, tiempo de elución: 80 minutos/elución, inyección: 2 mL/inyección, tiempo de retención corto: forma (+), tiempo de retención largo: Forma (-) para obtener 26.4 mg de una forma (+) y 25.2 mg de una forma (-) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.92-1.94 (m, 3H), 1.94-1.96 (m, 3H), 2.55-2.66 (m, 1H), 2.76-2.86 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 4.09-4.16 (m, 1H), 4.24-4.37 (m, 2H), 4.39-4.45 (m, 1H), 5.61-5.68 (m, 1H), 7.04 (d, J=1.5 Hz, 1H), 7.08 (dd, J=1.5 Hz, 8.3 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 8.13 (d, J=8.3 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.86 (s, 1H).

ESI-MS m/z 391 [M+H]⁺

Se utilizó (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, sintetizada de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1 descrito anteriormente, en la síntesis de las siguientes sales.

Ejemplo 1

Síntesis de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (576.32 mg) se añadieron ácido maleico (243.97 mg) y éter *t*-butil metílico (6 mL), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (713.04 mg) como un sólido blanco.

¹H-RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1.87 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 2.52-2.56 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.93 (ddd, J=8, 7, 6 Hz, 1H), 4.03 (dddd, J=8, 8, 7, 2 Hz, 1H), 4.16 (ddd, J=9, 5, 3 Hz, 1H), 4.21 (dd, J=9, 6 Hz, 1H), 5.85-5.89 (m, 1H), 6.25 (s, 2H), 7.09 (dd, J=8, 1 Hz, 1H), 7.21 (d, J=1 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.35 (d, J=8 Hz, 1H), 11.51 (s, 1H).

¹³C-RMN (100 MHz, estado sólido) δ (ppm): 13.3, 16.1, 16.7, 29.5, 35.9, 57.2, 58.0, 61.9, 67.4, 69.7, 74.6, 111.8, 114.3, 122.5, 123.2, 125.7, 126.9, 127.9, 132.7, 133.8, 136.0, 138.9, 154.8, 156.2, 157.8, 158.9, 162.0, 163.4, 164.7, 172.0

Ángulos de difracción de rayos X en polvo (2θ ± 0.2°): 9.1°, 10.1°, 11.1°, 16.2°, 17.6°, 18.2°, 22.0°, 22.4°, 23.8°, 25.8°.

El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 2

Síntesis de la sal monobencenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (991.7 mg) se añadieron 2-butanona (10 mL) y ácido benzenosulfónico monohidratado (708.0 mg), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (1393.9 mg) como un sólido blanco.

¹H-RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1.87 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 2.52-2.56 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.93 (ddd, J=8, 7, 6 Hz, 1H), 4.01-4.05 (m, 1H), 4.16 (ddd, J=9, 5, 3 Hz, 1H), 4.21 (dd, J=9, 6 Hz, 1H), 5.85-5.89 (m, 1H), 7.09 (dd, J=8, 1 Hz, 1H), 7.22 (d, J=1 Hz, 1H), 7.32-7.26 (m, 3H), 7.59-7.57 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.35 (d, J=8 Hz, 1H), 11.51 (s, 1H).

¹³C-RMN (100 MHz, estado sólido) δ (ppm): 12.8, 16.8, 31.3, 35.2, 59.1, 61.0, 61.6, 62.0, 67.9, 70.1, 70.6, 74.7, 111.6, 114.0, 117.5, 122.7, 125.4, 126.8, 128.8, 130.1, 137.7, 139.2, 146.4, 157.8, 159.6, 160.7

5 Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($2\theta \pm 0.2^\circ$): 6.6°, 9.9°, 13.7°, 14.6°, 19.0°, 19.6°, 20.5°, 21.7°, 22.7°, 23.5°, 25.7°.

10 El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal monobenzenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 3

15 Síntesis de la sal clorhidrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

20 A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (984.6 mg) se añadieron acetona (20 mL) y ácido clorhídrico 5 N (620 μ L), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (1100.21 mg) como un sólido blanco.

Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($2\theta \pm 0.2^\circ$): 11.2°, 12.4°, 12.7°, 17.1°, 23.5°, 26.5°, 29.4°.

25 El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal clorhidrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 4

30 Síntesis de la sal bromhidrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

35 A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (614.45 mg) se añadieron acetona (6 mL) y ácido bromhídrico al 47% (220 μ L), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (719.23 mg) como un sólido blanco.

Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($2\theta \pm 0.2^\circ$): 5.6°, 11.1°, 12.3°, 18.5°, 19.3°, 22.9°, 23.4°, 26.3°, 29.2°.

40 El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal bromhidrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 5

45 Síntesis de la sal p-toluenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

50 A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (100.6 mg) se añadieron 2-butanona (4 mL) y ácido p-toluenosulfónico (65.1 mg), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (153.15 mg) como un sólido blanco.

55 Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($2\theta \pm 0.2^\circ$): 6.5°, 9.8°, 13.9°, 14.4°, 15.3°, 18.5°, 19.3°, 20.3°, 22.8°, 23.3°, 25.4°, 28.2°.

60 El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal p-toluenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 5.

Ejemplo 6

65 Síntesis de la sal nitrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (22.80 mg) se añadieron acetato de etilo (300 μ L) y ácido nítrico al 60% (5.3 μ L), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (14.97 mg) como un sólido blanco.

Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($(2\theta \pm 0.2^\circ)$): 11.1°, 11.7°, 14.8°, 15.3°, 16.4°, 19.2°, 23.6°, 24.2°, 25.8°.

El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal nitrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 7

Síntesis de la sal sulfato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (23.53 mg) se añadieron 2-butanona (300 μ L) y ácido sulfúrico al 95% (4 μ L), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (27.34 mg) como un sólido blanco.

Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($(2\theta \pm 0.2^\circ)$): 10.7°, 14.0°, 14.5°, 16.2°, 19.1°, 20.0°, 22.8°, 23.6°, 25.3°.

El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal sulfato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 8

Síntesis de la sal metanosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (22.52 mg) se añadieron 2-butanona (300 μ L) y ácido metanosulfónico (4.5 μ L), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (28.69 mg) como un sólido blanco.

Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($(2\theta \pm 0.2^\circ)$): 12.7°, 14.8°, 17.8°, 18.7°, 23.4°, 29.8°.

El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal metanosulfato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 8.

Ejemplo 9

Síntesis de la sal fosfato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona (22.29 mg) se añadieron 2-butanona (300 μ L) y ácido fosfórico (4.6 μ L), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras añadir más hexano (200 μ L) y agitar, el material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (23.09 mg) como un sólido blanco.

Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($(2\theta \pm 0.2^\circ)$): 9.5°, 11.3°, 15.2°, 16.7°, 18.4°, 23.5°, 24.0°.

El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal fosfato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 10

Síntesis de la sal L-tartrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazolo[4,3-c]quinolin-4(5H)-ona

A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona (27.42 mg) se añadieron acetona (300 μ L) y ácido *L*-tartáico (20.18 mg), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (34.89 mg) como un sólido blanco.

5 Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($2\theta \pm 0.2^\circ$): 10.1°, 14.1°, 16.7°, 17.4°, 18.2°, 20.6°, 23.4°, 24.0°, 24.3°, 26.5°.

10 El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal *L*-tartrato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 10.

Ejemplo 11

15 Síntesis de la sal malonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona

20 A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona (27.70 mg) se añadieron acetona (300 μ L) y ácido malónico (26.65 mg), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El material sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida a temperatura ambiente para obtener de este modo el compuesto del título (30.49 mg) como un sólido blanco.

25 Ángulos de difracción de rayos X en polvo ($2\theta \pm 0.2^\circ$): 10.5°, 16.8°, 17.4°, 17.8°, 18.3°, 18.9°, 21.7°, 22.8°, 24.2°, 25.2°, 26.4°.

El patrón de difracción de rayos X en polvo del cristal de la sal malonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona, obtenida mediante el método descrito anteriormente, se muestra en la Figura 11.

30 Ejemplo 12

Síntesis de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona

35 A (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona (500 mg) se añadió acetato de etilo (2 mL) y la mezcla se agitó a 25°C durante 20 minutos. Se añadió una solución del ácido maleico (223.0 mg) disuelto completamente en acetato de etilo (7.5 mL) a la suspensión anterior y la mezcla se agitó a 25°C durante 7 días. El sólido se recogió por filtración y el cristal se lavó con acetato de etilo (1 mL) y se secó a presión reducida a 40°C para obtener de este modo el compuesto del título (366.9 mg) como un sólido blanco.

40 El compuesto del título obtenido mostró los mismos picos de difracción de rayos X en polvo que en el Ejemplo 1.

[Ejemplos de ensayo]

45 Ejemplo de ensayo de la actividad inhibitoria de PDE9

1) Preparación de una proteína PDE9 recombinante humana

50 Se amplificó un fragmento de 1ADNc de hspPDE9A basándose en una secuencia base (N.º de acceso: AF048837) del hspPDE9A1, registrada en la base de datos GenBank, y utilizando las siguientes secuencias (Hokkaido System Science Co., Ltd.) como cebador y una genoteca de ADNc de hipocampo humano (Clontech Laboratories, Inc.) como plantilla de ADN y utilizando ADN-polimerasa Pfu50 (Invitrogen Corp.), y mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en las siguientes condiciones.

55 Un cebador hPDE9-1: AGGATGGGATCCGGCTCCTCCA (SEQ No. 1)

Un cebador hPDE9A-3: CAGGCACAGTCTCCTTCACTG (SEQ No. 2)

60 Las condiciones de la PCR: [96°C, 5 min] \times 1 ciclo, [(96°C, 10 s), (57°C, 5 s), (72°C, 2 min)] \times 30 ciclos

El fragmento de 1ADNc de hspPDE9A obtenido se incorporó en un vector de clonación TOPO-TA (Invitrogen Corp.) y se chequeó la secuencia base; y después el resultado se transfectó en un vector pcDNA 3.1/myc His-tag (Invitrogen Corp.) para sintetizar de este modo un vector de expresión de PDE9 humana para células de mamífero. El vector de expresión de PDE9 humana para células de mamífero se transfectó con expresión transitoria a una célula HEK293 utilizando un reactivo LIPOFETAMINE 2000 (Gibco). Se confirmó mediante un método de transferencia de Western

que la PDE9A se expresaba en la célula HEK293, y a continuación el fragmento de 1ADNc de PDE9A humana se transfirió en un vector pYNG (Katakura Industries Co., Ltd.) para crear de este modo un vector de expresión para células de insecto. Se purificó un sobrenadante de gusano de seda homogeneizado, en el que se expresó una gran cantidad de PDE9, mediante una columna de Ni equilibrada utilizando un tampón A (20 mmol/L de Tris-HCl, pH: 8.0, 1 mmol/L de DTT, 10 mmol/L de imidazol). Después de mezclar el sobrenadante y la columna de Ni durante 1 hora, se realizó una limpieza utilizando un tampón B (20 mmol/L Tris-HCl, pH: 8.0, 1 mmol/L DTT) y se realizó una elución utilizando un tampón C (20 mmol/L de Tris-HCl, pH: 8.0, 1 mmol/L de DTT, 100 mmol/L de imidazol). Se recogió una fracción de la elución preparativamente para obtener de este modo una solución de la enzima PDE9.

2) Medición de la acción inhibitoria de PDE9

A 100 μ L de una solución de un tampón D (40 mmol/L de Tris-HCl, pH: 7.4, 10 mmol/L de $MgCl_2$, DTT 1 mM, cGMP 2 μ M) que contenía [3H]-cGMP (0.5 μ Ci/mL), se añadieron 10 μ L de una solución del compuesto para su evaluación (una solución en la que se disolvió un compuesto en DMSO y se diluyó hasta la concentración en DMSO fuera del 5%) y 90 μ L de una solución preparada diluyendo la solución de la enzima PDE9 preparada anteriormente con un tampón E (40 mmol/L de Tris-HCl, pH: 7.4, 10 mmol/L de $MgCl_2$, DTT 1 mM, 1 mmol/L de EGTA) con enfriamiento con hielo. La solución mezclada resultante se incubó a 30°C durante 10 min y después se calentó durante 2 min en agua hirviendo para detener la reacción enzimática de la PDE9. A continuación, se dejó que el resultado alcanzara de nuevo la temperatura ambiente; se añadieron 50 μ L de 5'-nucleotidasa (Biomol GmbH, 10 unidades/mL); y el resultado se incubó a 30°C durante 10 min para convertir de este modo el [3H]-5-GMP formado en la reacción previa en [3H]-guanosina. Se añadieron 500 μ L de una resina de intercambio iónico (resina Bio-Rad AG1-X2, tamaño de malla: 200-400, H_2O : resina = 2 : 1) al líquido de reacción resultante, y se dejó reposar durante 10 min y después se centrifugó (2000 rpm, 10 min); y un sobrenadante en el que la [3H]-guanosina estaba presente se transfirió a un LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se midió la radioactividad con un contador de centelleo de microplacas TopCount NXT y un contador de luminiscencia (PerkinElmer, Inc.).

El porcentaje de inhibición del compuesto de evaluación se calculó utilizando la siguiente expresión, considerando que la radioactividad de un control que no contenía el compuesto de evaluación era (A), la radioactividad de un blanco que no contenía enzima era (B) y la radioactividad del compuesto de evaluación era (C).

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - \left\{ \frac{(C) - (B)}{(A) - (B)} \right\} \times 100 (\%)$$

El valor de CI_{50} para PDE9 del compuesto de evaluación se determinó a partir del porcentaje de inhibición para concentraciones diferentes. El valor de CI_{50} del compuesto (I) sintetizado de acuerdo con el Ejemplo de referencia 2 frente a PDE9 fue 0.00943 μ M.

Efecto sobre el cGMP en el líquido cefalorraquídeo de roedor

Los compuestos de ensayo se administraron a ratones ICR macho (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.), ratas Sprague-Dawley (SD) macho (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) o ratas Long-Evans (LE) macho (Institute for Animal Reproduction (fundación general incorporada)), y después se extrajo líquido cefalorraquídeo bajo anestesia con pentobarbital y se conservó a -20°C. La medición de cGMP en el líquido cefalorraquídeo se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento EIA de acetilación del kit EIA para cGMP (GE Healthcare) o el procedimiento de no acetilación del kit EIA para cGMP (Cayman Chemical). Los resultados se calcularon utilizando la siguiente fórmula como un aumento (C) en la cantidad de cGMP en el grupo al que se le administró el compuesto de ensayo (B) respecto a la cantidad de cGMP en el grupo al que se le administró vehículo (A).

$$\text{aumento de cGMP (C)} = \frac{(B) - (A)}{(A)} \times 100 (\%)$$

En el caso del compuesto (I) sintetizado de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1, el aumento de cGMP fue de un 274% 1 hora después de administrar una dosis de 10 mg/kg a ratas LE.

Efecto sobre el cGMP en el hipocampo de roedor

Los compuestos de ensayo se administraron a ratas SD macho (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) o ratas LE macho (Institute for Animal Reproduction (fundación)). A continuación se realizó un tratamiento con microondas bajo anestesia con pentobarbital, y los hipocampos se aislaron, se sometieron a medición para determinar sus pesos húmedos, después se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. En la medición del cGMP en el hipocampo, se añadió una solución de ácido perclórico 0.5 M/EDTA 1 mM de modo que el peso húmedo constituyera el 5% (p/v), y la mezcla se homogeneizó. Tras homogeneizar, el homogenato se centrifugó (10000 rpm, 15 min) y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante recogido se neutralizó con una solución 2 M de bicarbonato de potasio y se centrifugó (13000 rpm, 10 min). La concentración de cGMP en el sobrenadante se midió de acuerdo con el procedimiento EIA de no acetilación del kit EIA para cGMP (GE Healthcare). Los resultados se calcularon utilizando la siguiente fórmula como un aumento (C) en la cantidad de

cGMP en el grupo al que se le administró el compuesto de ensayo (B) respecto a la cantidad de cGMP en el grupo al que se le administró vehículo (A).

5 aumento de cGMP (C) = [(B) - (A)]/(A) x 100 (%)

En el caso del compuesto (I) sintetizado de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1, el aumento de cGMP fue de un 58% 1 hora después de administrar una dosis de 10 mg/kg a ratas LE.

10 Ensayo de disolución

15 Cada uno del compuesto (I) (50 mg), el compuesto del Ejemplo 1 (30 mg) y el compuesto del Ejemplo 2 (30 mg) se introdujo en una cápsula de hidroxipropilmetilcelulosa junto con un peso equivalente de lactosa hidratada. Un 708-DS de Agilent Technologies se equipó con palas agitadoras pequeñas y recipientes pequeños, y se utilizó como aparato de ensayo de disolución. A cada cápsula rellena de fármaco se añadieron 50 mL de líquido intestinal simulado en estado de ayuno (un tampón fosfato de pH 6.5 que contenía lecitina 0.75 mM y taurocolato de sodio 3 mM) que se había calentado hasta 37°C. El fármaco se disolvió haciendo rotar la pala agitadora a una velocidad de 50 rpm. Se extrajeron muestras de la solución disuelta en diferentes momentos y se midieron las concentraciones del fármaco por HPLC. Los ensayos de disolución de este tipo en los que se emplea líquido intestinal simulado en estado de ayuno se suelen utilizar para evaluar las características de disolución y absorción de los fármacos (p. ej., Takano *et al.*, "Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test", *Pharm Res.*, vol. 23, págs. 1144-1156, 2006.). Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la gráfica de la Figura 12. La concentración del compuesto del Ejemplo 2 conseguida cuando este se utilizó mostró valores de aproximadamente el doble y la concentración del compuesto del Ejemplo 1 conseguida cuando se utilizó este mostró valores de aproximadamente el cuádruple o quíntuple, respecto a la concentración del compuesto (I) conseguida cuando se utilizó este.

[Tabla 1]

TIEMPO (MINUTOS)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)		
	COMPUESTO (I)	EJEMPLO 1	EJEMPLO 2
6	0.1	6.4	0.0
10	0.3	11.8	0.5
15	1.8	20.8	7.3
20	3.2	23.3	9.3
30	4.4	27.9	10.2
60	5.0	25.0	10.7
90	5.2	23.9	10.6
120	5.1	22.1	10.7
180	5.2	18.8	9.4
240	5.4	18.8	9.0

30 Ensayo sobre las características de absorción oral en perros

35 Cada uno del compuesto (I) (100 mg) y el compuesto del Ejemplo 1 (130 mg: la sal monomaleato, 100 mg en términos de la forma libre) se introdujo en una cápsula de hidroxipropilmetilcelulosa para preparar una muestra para su administración. Las cápsulas resultantes se administraron, junto con una pequeña cantidad de agua, a 4 perros de raza beagle, y se extrajeron muestras de sangre en cada momento de evaluación = 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la administración. La concentración de fármaco en el plasma obtenido por centrifugación se midió por LC-MS/MS. El compuesto (I) y el compuesto del Ejemplo 1 se administraron a cada individuo en un modo cruzado con un periodo de reposo de una semana intermedio y se compararon los cambios en la concentración de fármaco en el plasma. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y la gráfica de la Figura 13. BQL significa por debajo del límite de cuantificación y NC no calculado. Los valores para el área bajo la curva de concentración de fármaco en plasma-tiempo (AUC) se muestran en la Tabla 3. El valor de AUC medio obtenido cuando se administró el compuesto (I) fue de 1.88 ± 0.95 µg·h/mL mientras que el valor de AUC medio obtenido cuando se administró el compuesto del Ejemplo 1 fue de 4.00 ± 0.45 µg·h/mL: la tasa de absorción fue mayor y la variación en los valores menor con el compuesto del Ejemplo 1.

45 Por tanto, las sales/cristales de acuerdo con la presente invención mostraron unas características de disolución y absorción oral preferibles como materias primas para fármacos.

[Tabla 2]

TIEMPO (HORAS)	CONCENTRACIÓN EN PLASMA (µg/mL)					DESVIACIÓN ESTÁNDAR
	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	MEDIA	

ES 2 645 149 T3

COMPUESTO (I)						
0.25	BQL	BQL	BQL	BQL	NC	NC
0.5	0.005	0.029	0.034	BQL	0.023	0.015
1	0.055	0.067	0.142	0.017	0.070	0.052
2	0.094	0.061	0.133	0.227	0.129	0.036
4	0.064	0.051	0.104	0.208	0.106	0.028
6	0.045	0.045	0.077	0.164	0.083	0.019
8	0.043	0.041	0.074	0.151	0.077	0.019
24	0.234	0.007	0.009	0.028	0.069	0.130
EJEMPLO 1						
0.25	BQL	BQL	0.279	BQL	NC	NC
0.5	0.428	0.140	0.377	0.006	0.315	0.199
1	0.506	0.457	0.422	0.422	0.452	0.039
2	0.343	0.469	0.337	0.401	0.388	0.074
4	0.219	0.313	0.272	0.322	0.282	0.047
6	0.158	0.224	0.217	0.248	0.212	0.036
8	0.134	0.199	0.147	0.210	0.172	0.035
24	0.102	0.023	0.020	0.074	0.055	0.046

[Tabla 3]

	ÁREA BAJO LA CURVA DE CONCENTRACIÓN EN PLASMA-TIEMPO (µg·h/mL)	
	COMPUESTO (I)	EJEMPLO 1
Perro 1	2.66	3.83
Perro 2	0.77	4.16
Perro 3	1.43	3.49
Perro 4	2.68	4.54
MEDIA	1.88	4.00
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.95	0.45

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Eisai R&D Management Co., Ltd.
 <120> SAL DE DERIVADO DE PIRAZOLOQUINOLINA Y CRISTAL DE ESTA
 <130> FP13-0699

10 <150> JP 2013-079639
 <151> 2013-004-05
 <160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hPDE9-1

25 <400> 1
 Aggatgggat cgggctcctc ca 22

30 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> hPDE9A-3
 <400> 2
 Caggcacagt ctcttcact g 21

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona.
2. Sal monobenzenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona.
- 10 3. Un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 10.1° en difracción de rayos X en polvo.
- 15 4. Un cristal de la sal monomaleato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona que tiene picos en desplazamientos químicos (ppm) de 13.3, 61.9, 114.3, 138.9 y 172.0 en el espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C .
- 20 5. Un cristal de la sal monobenzenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona que tiene un pico de difracción a un ángulo de difracción ($2\theta \pm 0.2^\circ$) de 9.9° en difracción de rayos X en polvo.
6. Un cristal de la sal monobenzenosulfonato de (S)-7-(2-metoxi-3,5-dimetilpiridin-4-il)-1-(tetrahidrofuran-3-il)-1*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona que tiene picos en desplazamientos químicos (ppm) de 16.8, 67.9, 114.0, 137.7 y 160.7 en el espectro de RMN en estado sólido de ^{13}C .
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende la sal de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para su uso como principio activo.

Fig.1

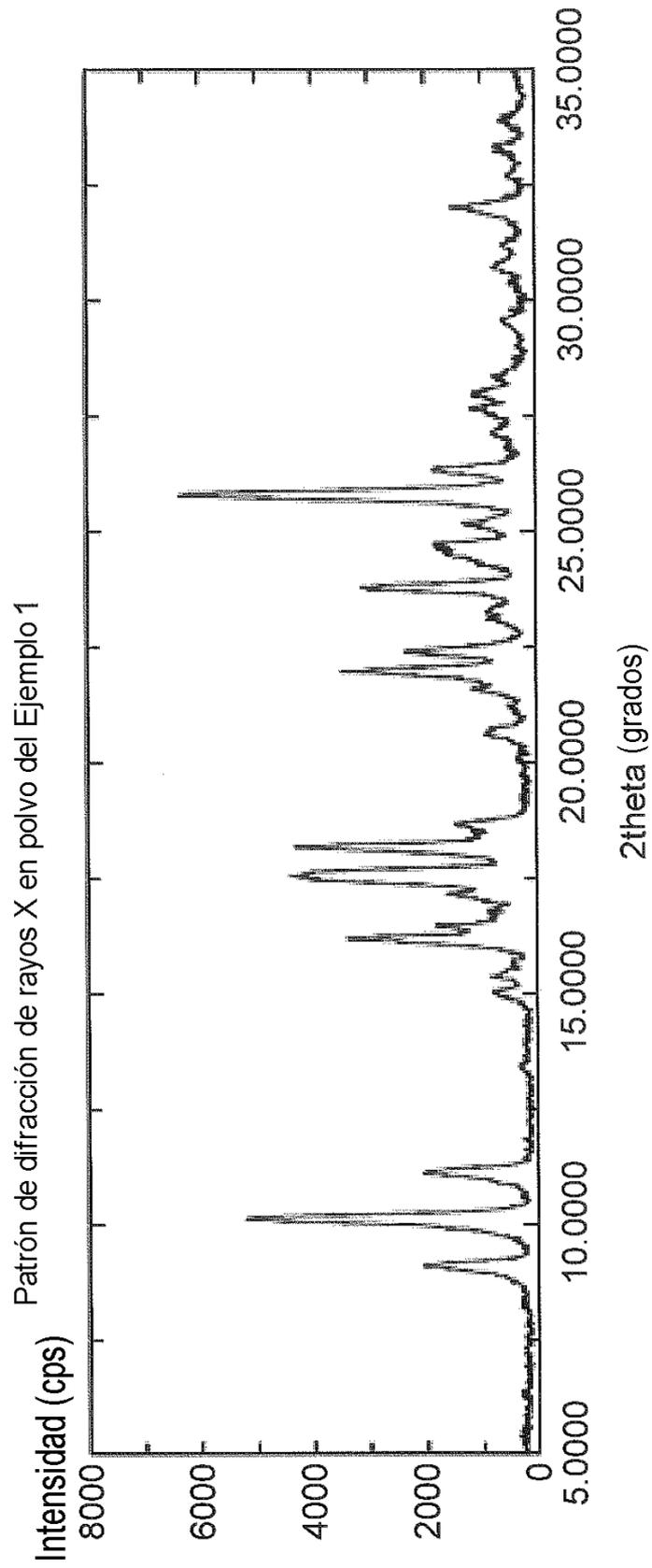


Fig.2

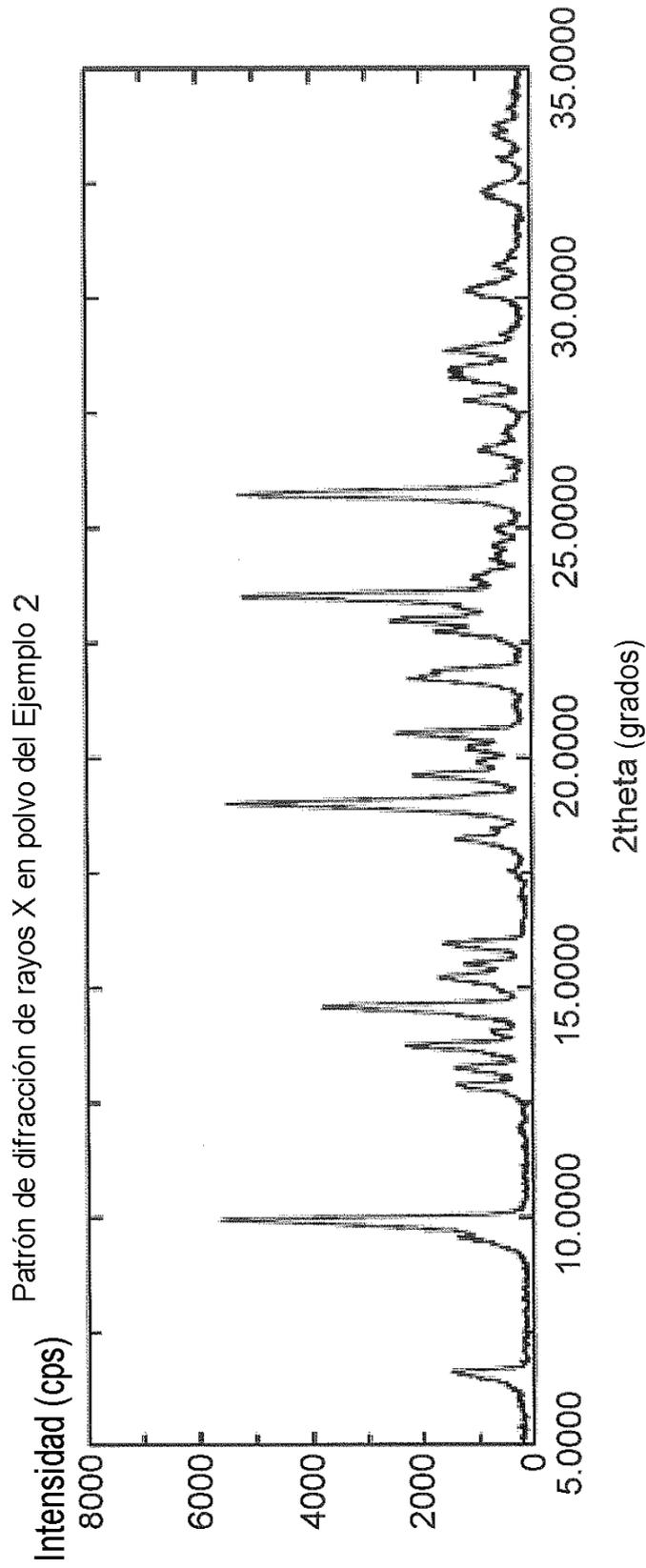


Fig.3

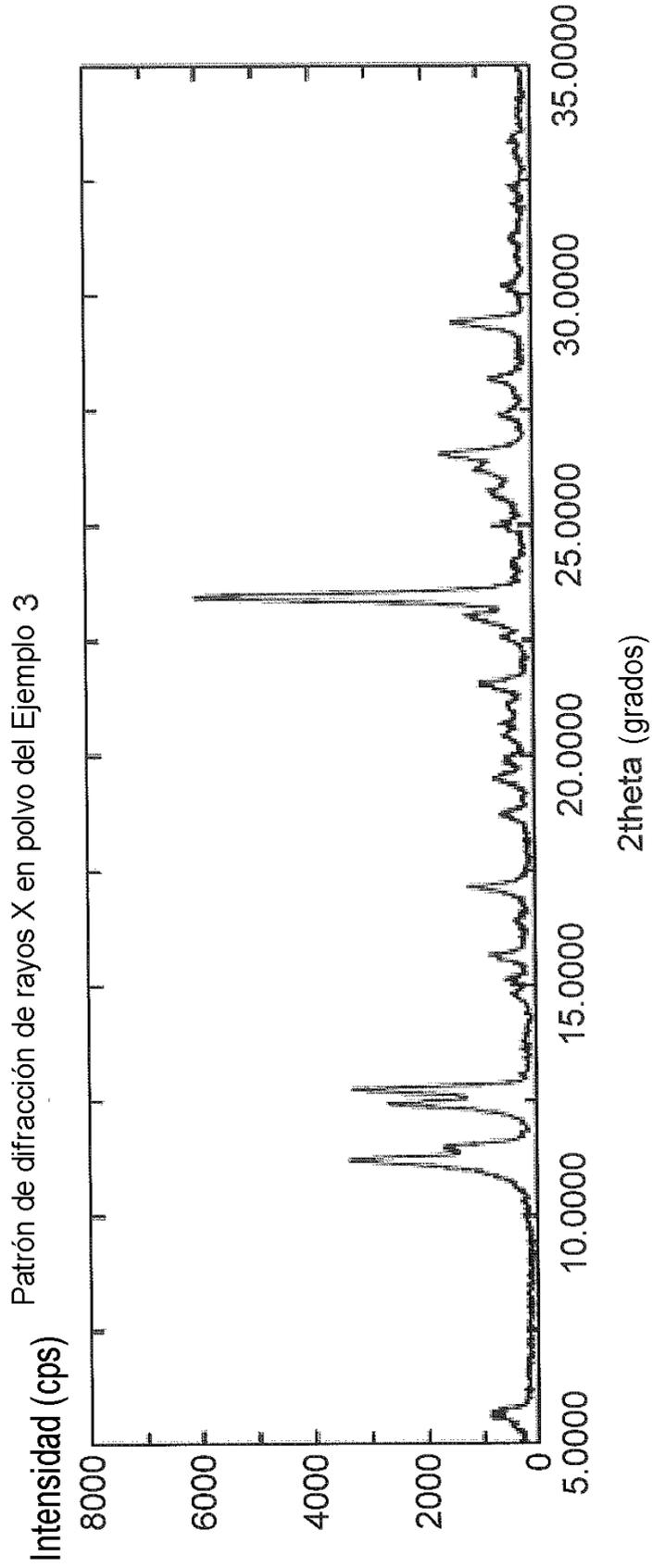


Fig.4

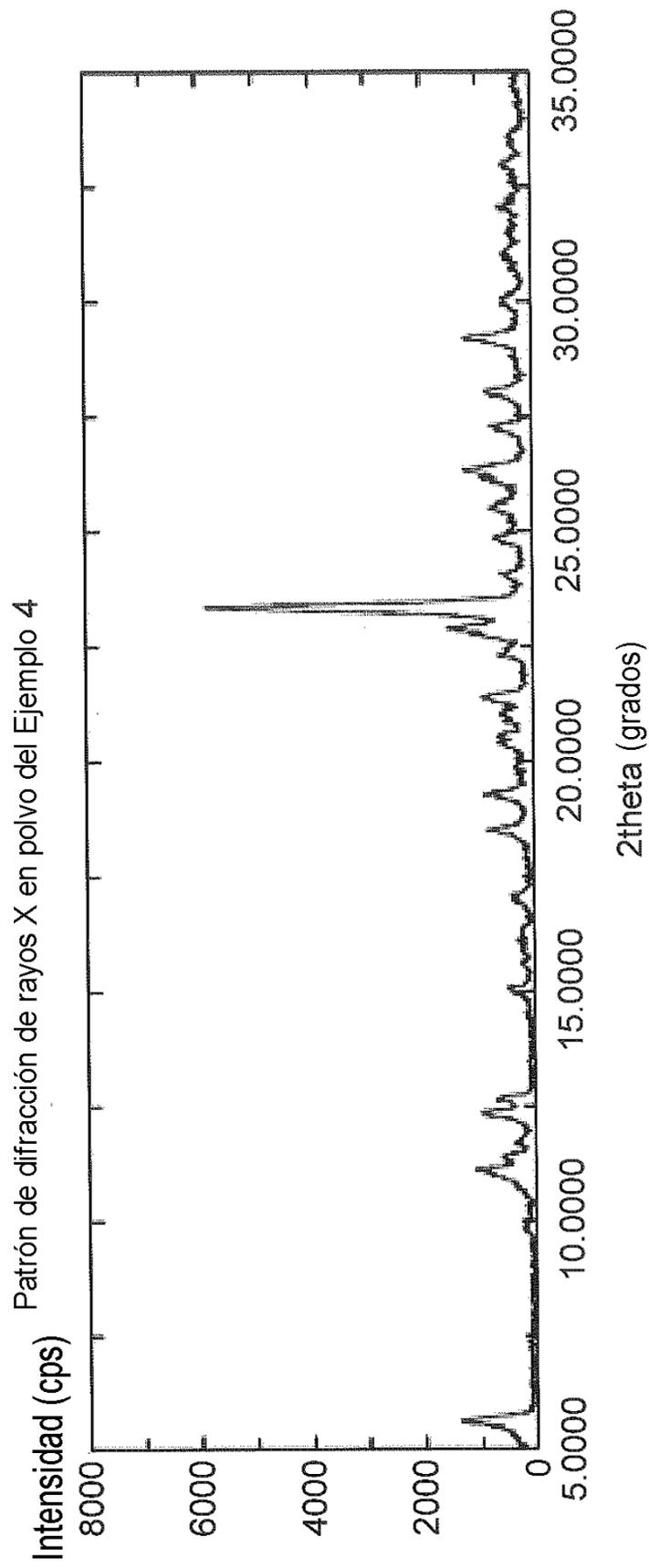


Fig.5

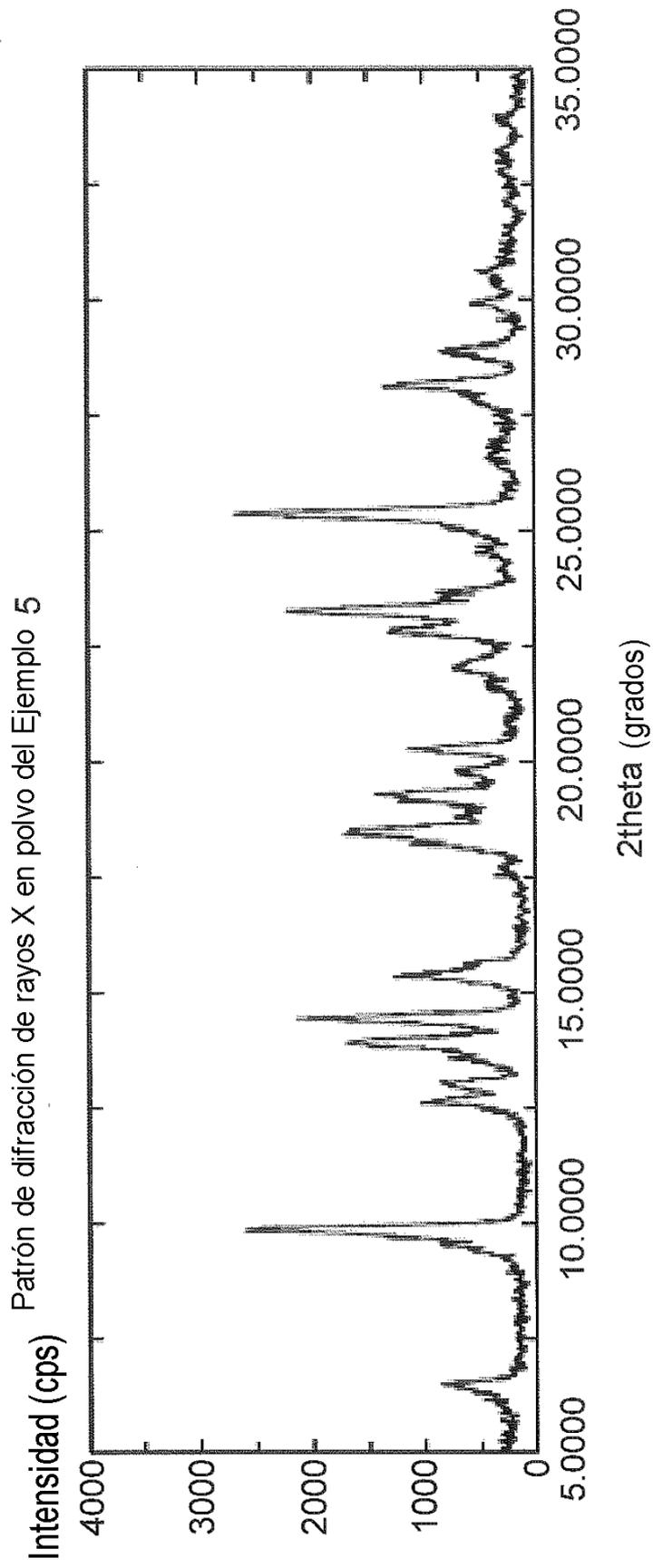


Fig.6

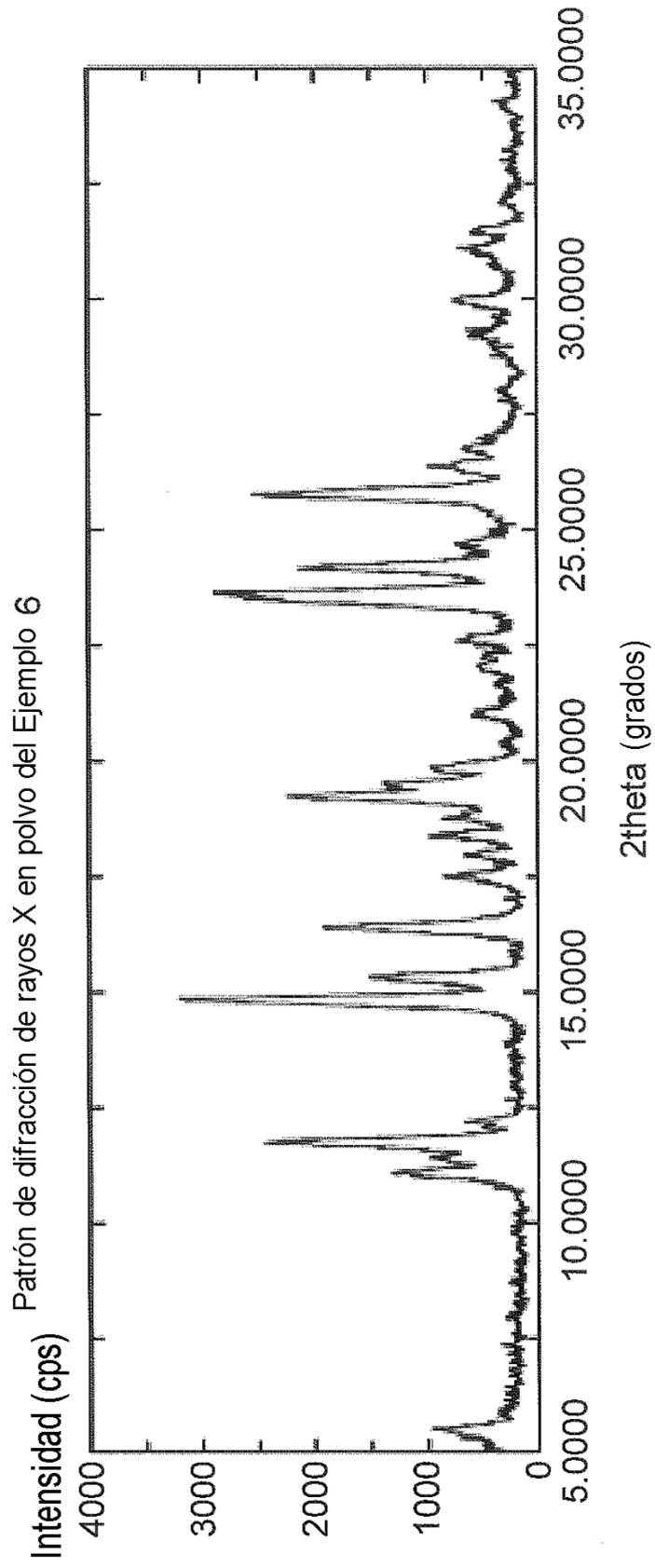


Fig.7

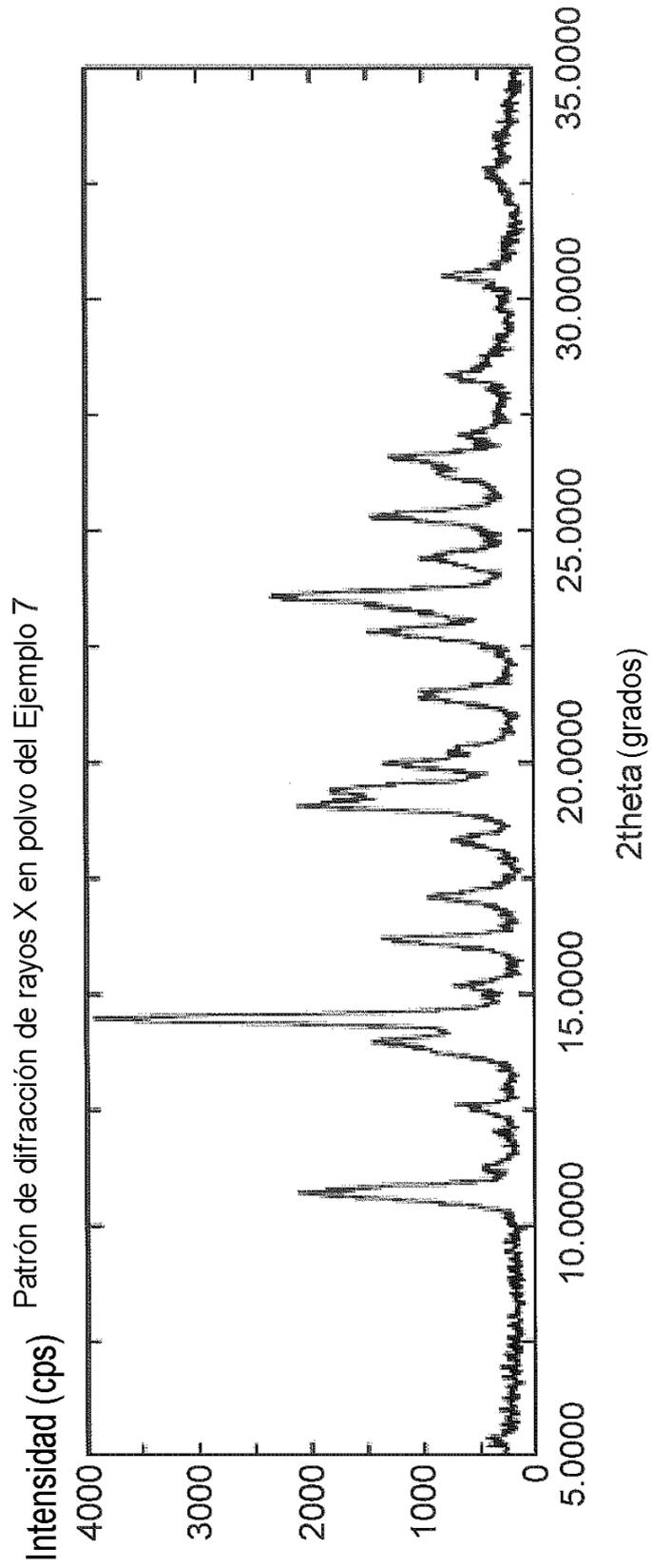


Fig.8

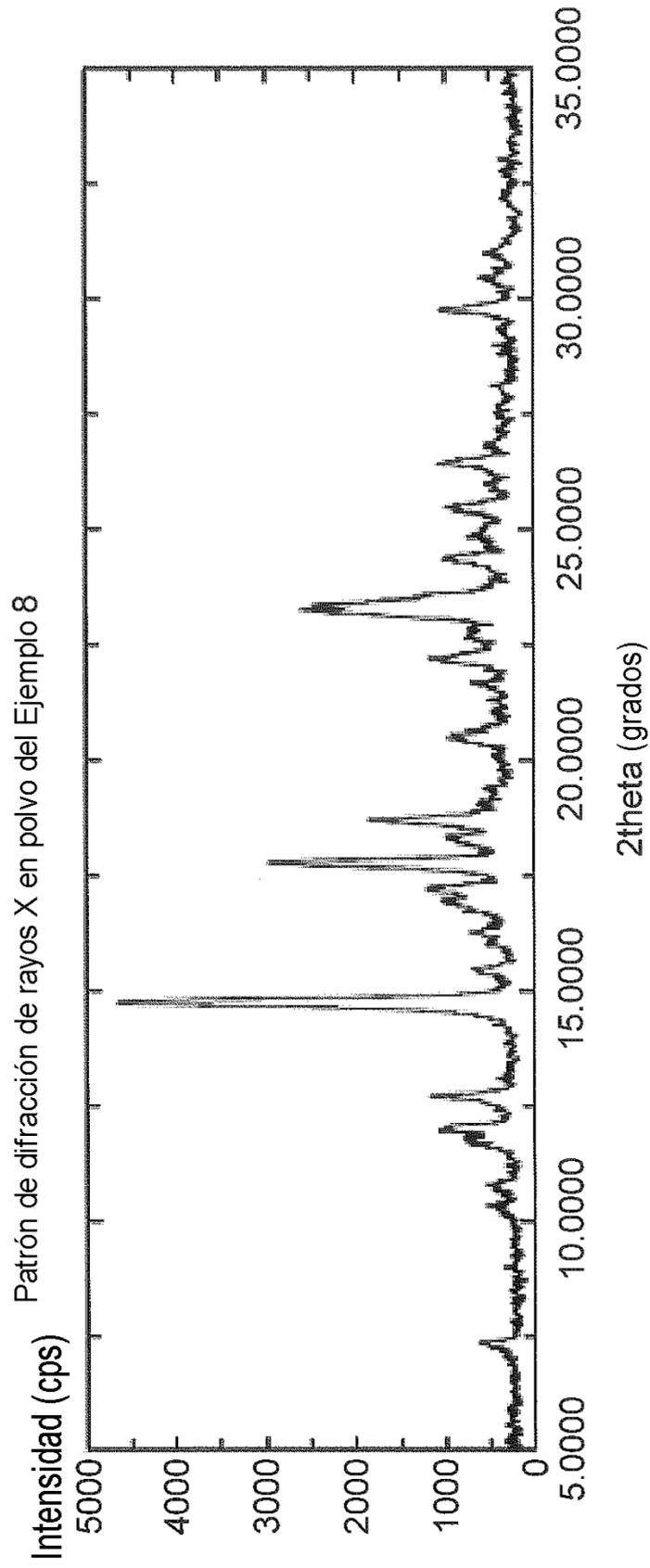


Fig.9

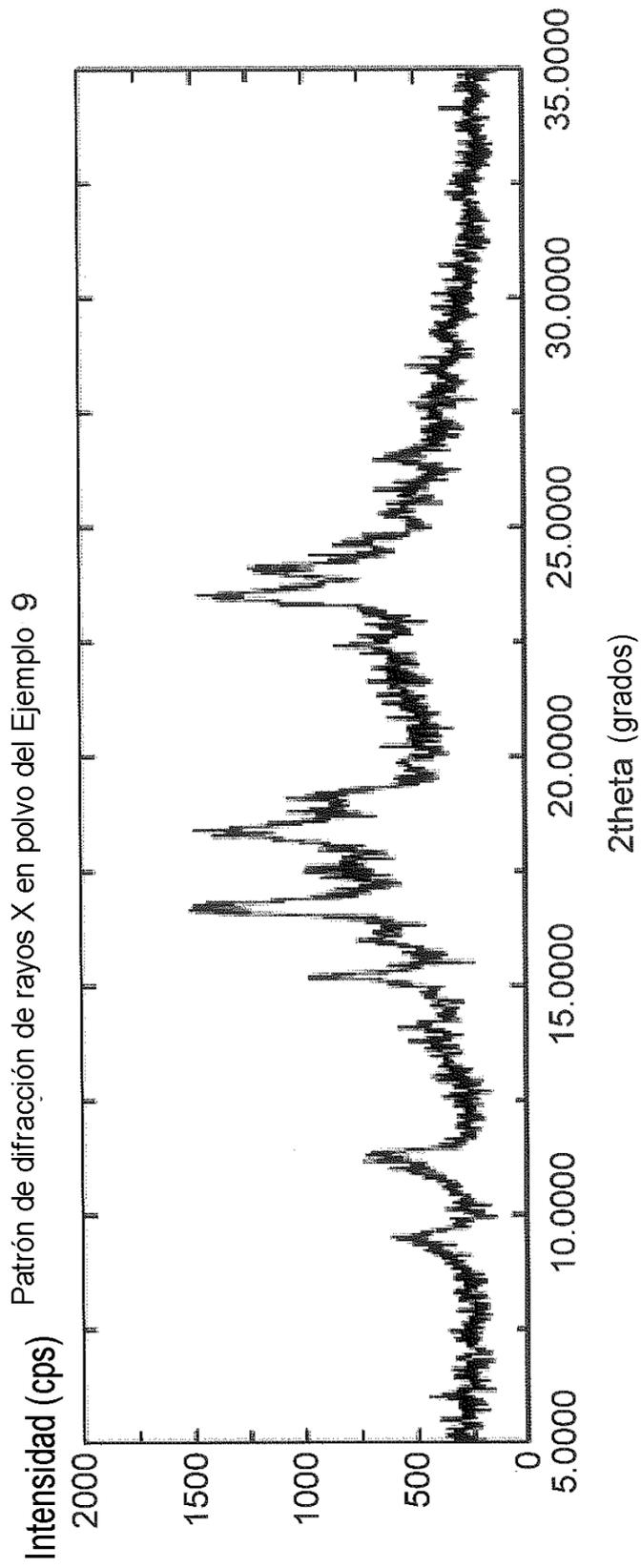


Fig.10

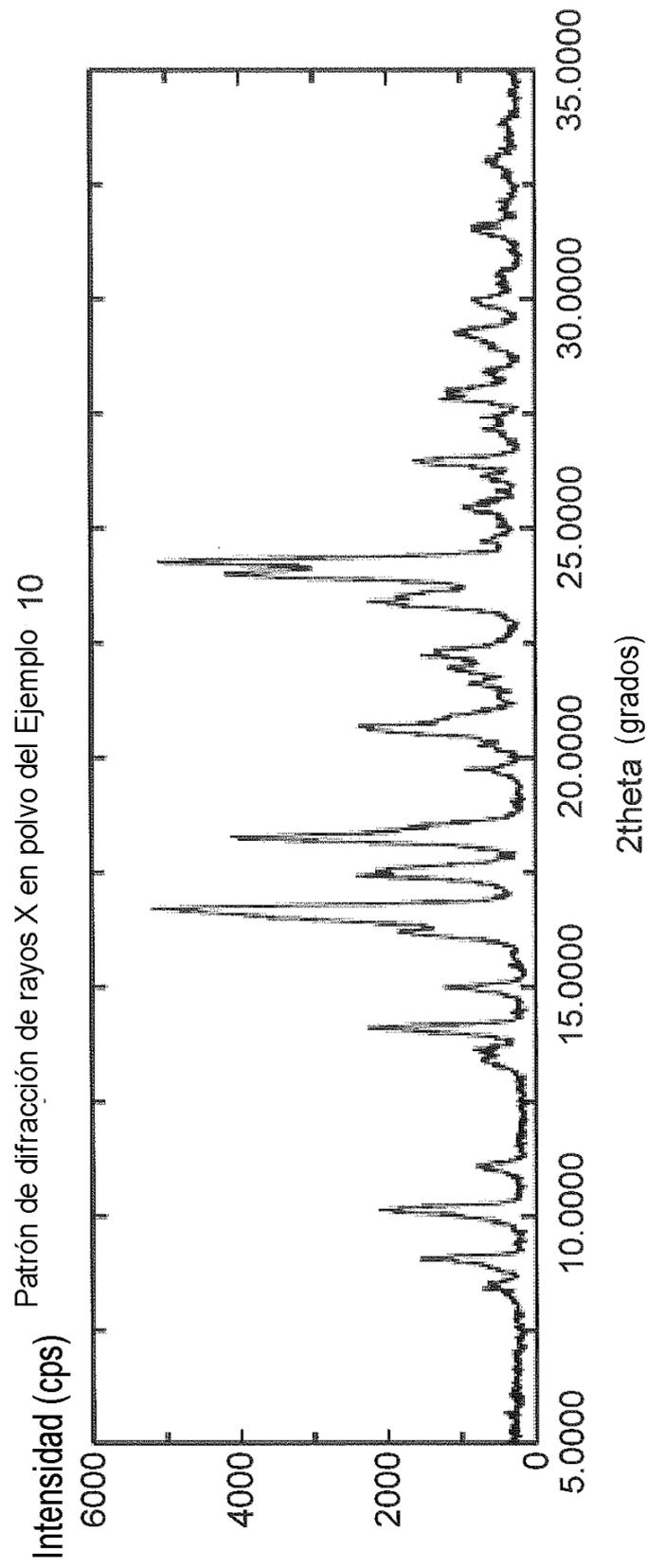


Fig.11

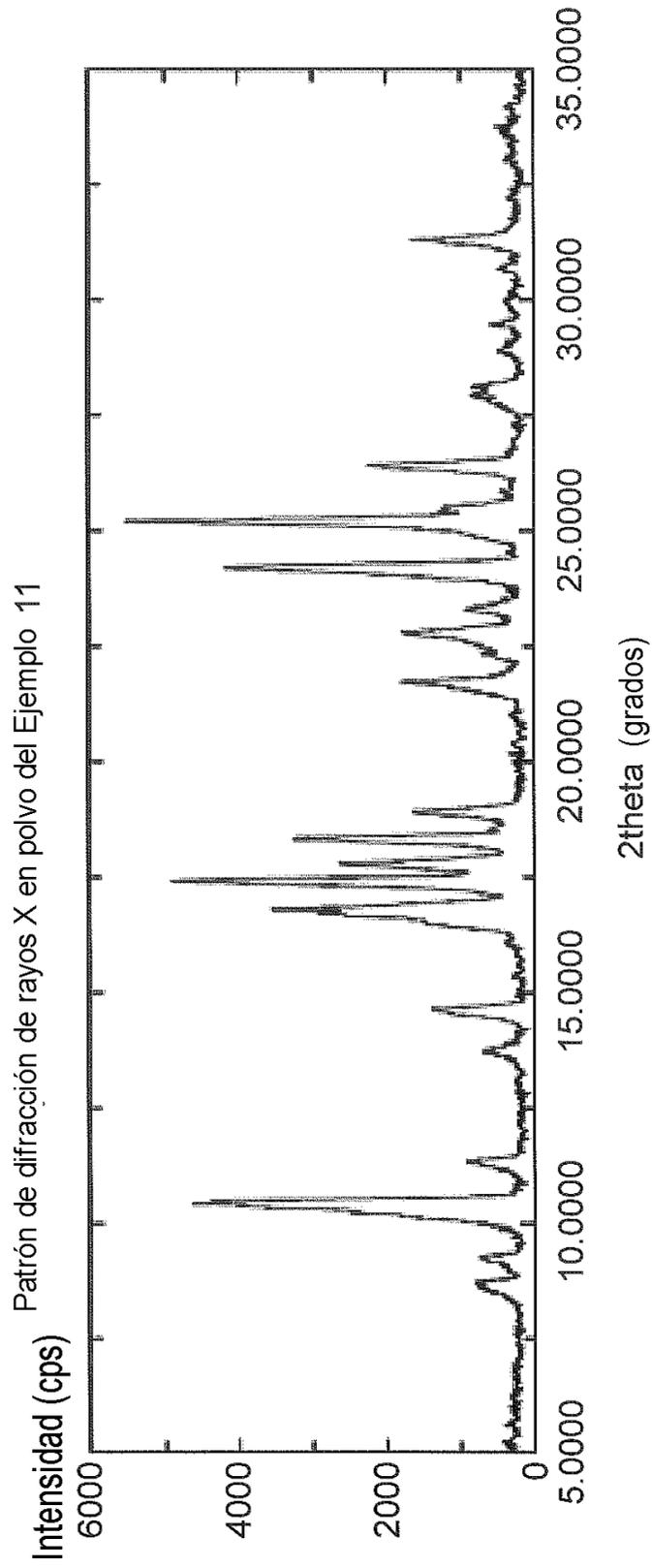


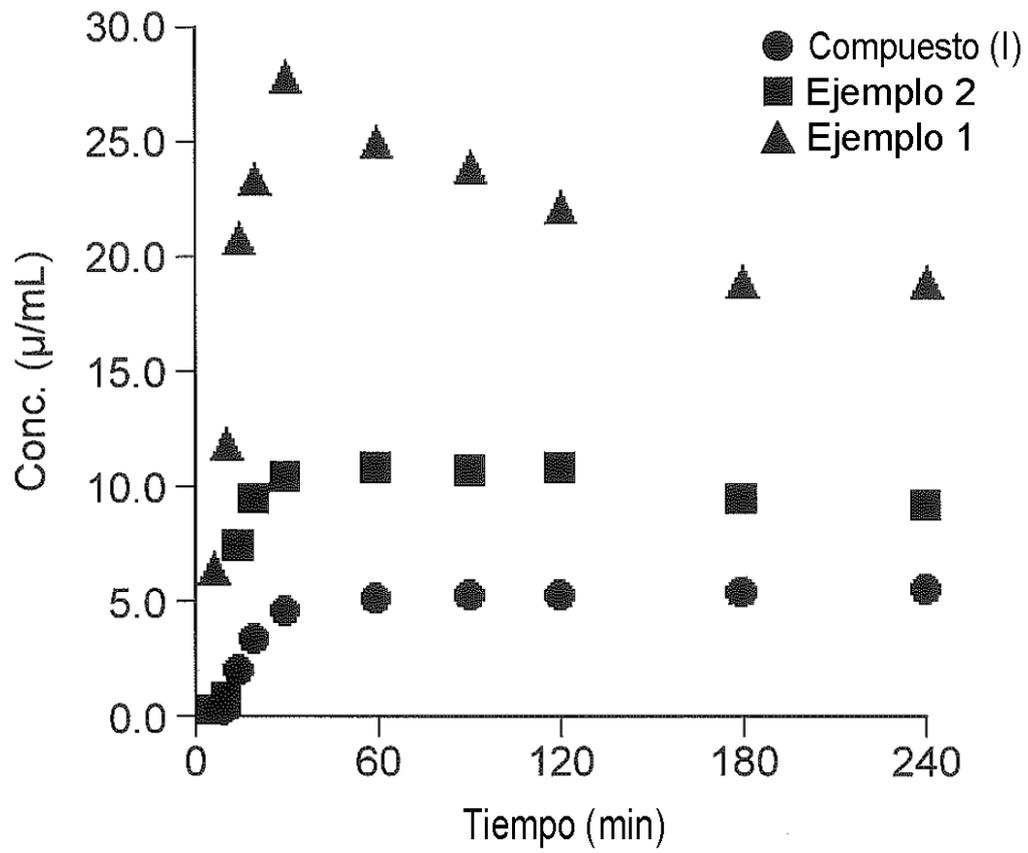
Fig.12

Fig.13