

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 334**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/04** (2006.01)

**A61K 31/4725** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2015 PCT/JP2015/059026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15147020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015 E 15770149 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3124480**

54 Título: **Compuesto de amida**

30 Prioridad:

**26.03.2014 JP 2014064590**

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

**02.10.2018**

73 Titular/es:

**ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)  
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome  
Chuo-kuTokyo 103-8411, JP**

72 Inventor/es:

**OKUDA, TAKAO;  
NOZAWA, EISUKE;  
UGAWA, TOHRU y  
MIZOGUCHI, RYO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 684 334 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

Compuesto de amida

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino]etil]benzoico (a continuación en el presente documento denominado "compuesto A" en algunos casos) o una sal del mismo, que es útil como principio activo de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica para tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.

**Técnica anterior**

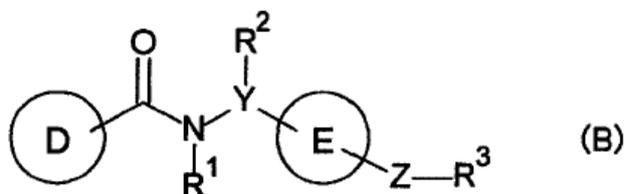
La prostaglandina E2 (a continuación en el presente documento denominada "PGE2") se conoce como uno de los metabolitos en la cascada del ácido araquidónico. La PGE2 presenta diversas actividades fisiológicas y está implicada en una acción de inducción y aumento del dolor, una acción proinflamatoria, una acción antiinflamatoria, una acción de contracción uterina, una acción de promoción del peristaltismo digestivo, una acción de despertar, una acción de inhibición de secreción de ácido gástrico, una acción hipotensora, una acción de inhibición de la agregación plaquetaria, una acción de resorción-promoción ósea, una acción angiogénica, y similares.

Existen cuatro subtipos, EP1, EP2, EP3 y EP4, para los receptores de PGE2, que tienen una amplia distribución en diversos tejidos. La activación del receptor EP1 provoca el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular. La activación del receptor EP3 provoca el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular y provoca la inhibición de adenilato ciclasa, y por tanto disminuye el nivel de AMPc intracelular. La activación de los receptores EP2 y EP4 provoca la activación de adenilato ciclasa, y por tanto aumenta el nivel de AMPc intracelular. En particular, se cree que el receptor EP4 está relacionado con la relajación de músculos lisos, promoción o inhibición de una reacción inflamatoria, diferenciación de linfocitos, hipertrofia o proliferación de células mesangiales, secreción de moco gastrointestinal, y similares (Pharmacology & Therapeutics 2013,138:485-502; Pharmacological Reviews 2013, 65:1010-1052; y American Journal of Physiology Renal Physiology 2004,287, F673-F681).

Un inhibidor de un receptor de PGE2, es decir, un antagonista del receptor EP tiene una actividad de unión al receptor EP e inhibe la acción mediante un receptor EP de PGE2. Por consiguiente, un antagonista del receptor EP se espera que sea un agente para tratar enfermedades provocadas por PGE2. Entre estos, el antagonista del receptor EP4 se espera que sea un fármaco para tratar enfermedades relacionadas con EP4, por ejemplo, enfermedad renal, enfermedades inflamatorias y diversos dolores, en humanos y animales (Journal of American Society Nephrology 2010, 21:1678-1690; Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107:12233-12238; y The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2008, 325:425-434 ). Además, el antagonista selectivo para el receptor EP4 se prefiere desde el punto de vista de que puede evitar los efectos secundarios basados en el antagonismo de otros EP1, EP2 y EP3 (Physiological Reviews 1999, 79:1193-1226; y Annual Reviews Physiology 2001, 63:579-605).

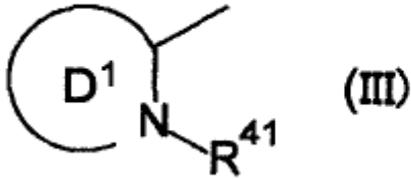
En el documento de patente 1, un compuesto representado por la siguiente fórmula (B) se notifica como antagonista del receptor EP4.

45 [Fórm. quím. 1]



(En la fórmula, el anillo D representa un grupo de la siguiente fórmula (III), o similar, y en la siguiente fórmula, el anillo D<sup>1</sup> representa un heteroanillo monocíclico o bicíclico que contiene nitrógeno que puede estar sustituido con fenilo, R<sup>41</sup> representa -X<sup>2</sup>-B<sup>4</sup>, X<sup>2</sup> representa un alquileo C<sub>1-6</sub> o similar, y B<sup>4</sup> representa arilo, un heteroanillo, o similar, cada uno de los cuales puede estar sustituido con los mismos o diferentes 1 a 5 grupos seleccionados de R<sup>4</sup>. Para los demás símbolos, se remite a este documento de patente).

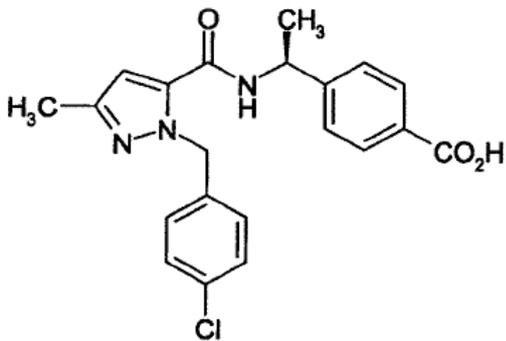
55 [Fórm. quím. 2]



En el ejemplo 205 de este documento de patente, se divulga el siguiente compuesto de ejemplo, y este compuesto del ejemplo se divulga como un compuesto específico en el que el anillo D<sup>1</sup> es pirazol.

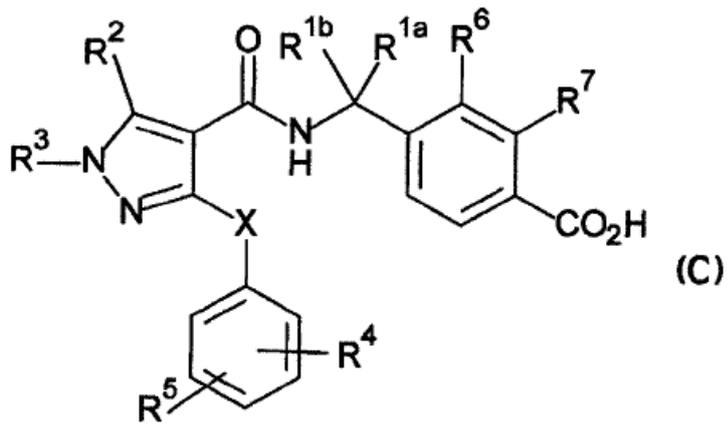
5

[Fórm. quím. 3]



10 En el documento de patente 2, un compuesto representado por la siguiente fórmula (C) se notifica como antagonista del receptor EP4.

[Fórm. quím. 4]

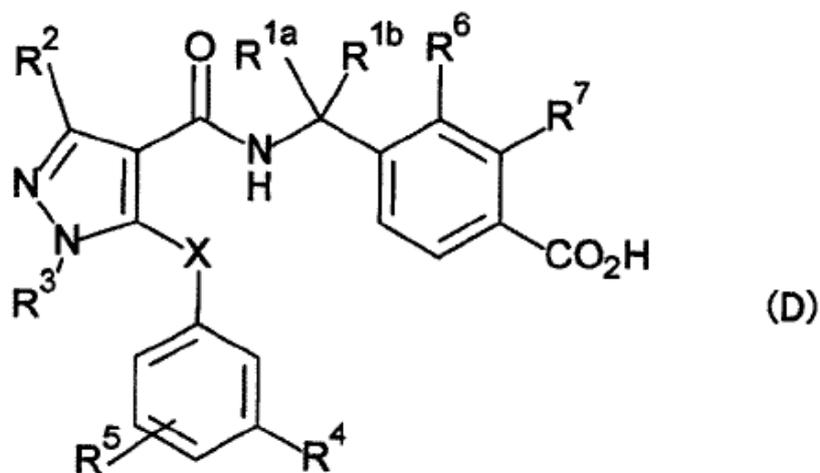


15

(En la fórmula, R<sup>2</sup> representa metilo, fluorometilo, o similar, y R<sup>4</sup> representa fluorometilo, metoxilo, o similar. Para los demás símbolos en la fórmula, se remite a este documento de patente).

20 En el documento de patente 3, un compuesto representado por la siguiente fórmula (D) se notifica como antagonista del receptor EP4.

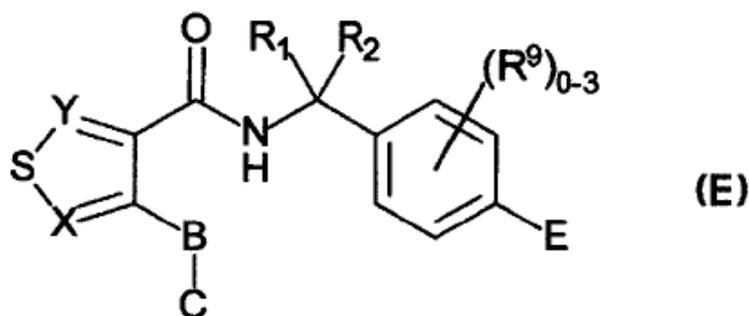
[Fórm. quím. 5]



(En la fórmula,  $R^2$  representa metilo, fluorometilo (por ejemplo, monofluorometilo, difluorometilo y trifluorometilo), o similar, y  $R^4$  representa fluorometilo, metoxilo, o similar. Para los demás símbolos, se remite a este documento de patente).

En el documento de patente 4, un compuesto representado por la siguiente fórmula (E) se notifica como ligando del receptor EP4.

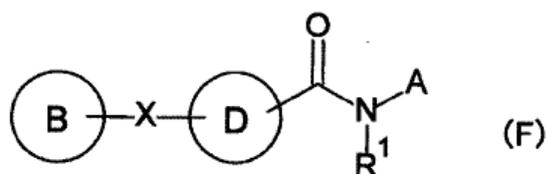
[Fórm. quím. 6]



(Para los símbolos en la fórmula, se remite a este documento de patente).

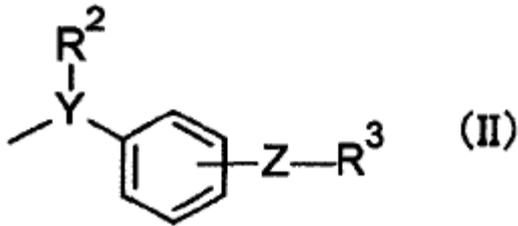
En el documento de patente 5, un compuesto representado por la siguiente fórmula (F) se notifica como antagonista del receptor EP4.

[Fórm. quím. 7]



(En la fórmula, el anillo B y el anillo D son iguales o diferentes entre sí, y representan anillo que puede estar sustituido o un heteroanillo que puede estar sustituido, X representa un enlace sencillo,  $-R^{00}$ , o similar,  $R^{00}$  representa alqueno inferior y  $R^1$  representa H o similar. A representa un grupo de la siguiente fórmula (II), o similar, y en la siguiente fórmula, Y representa CH o similar,  $R^2$  representa  $R^0$  o similar,  $R^0$  representa alquilo inferior, Z representa un enlace sencillo o similar y  $R^3$  representa  $-COOH$  o similar. Para los demás símbolos, se remite a este documento de patente).

[Fórm. quím. 8]



5 En este documento de patente, no hay divulgación de un compuesto específico en el que el anillo D sea pirazol.  
 En los documentos de patente 1 a 5, las estructuras de los compuestos divulgados específicamente en los ejemplos son diferentes de las del compuesto A.

10 **Técnica relacionada**

Documentos de patente

- 15 [Documento de patente 1] WO 2009/139373
- [Documento de patente 2] WO 2012/103071
- [Documento de patente 3] WO 2012/039972
- 20 [Documento de patente 4] WO 2008/017164
- [Documento de patente 5] WO 2009/005076

25 **Divulgación de la invención**

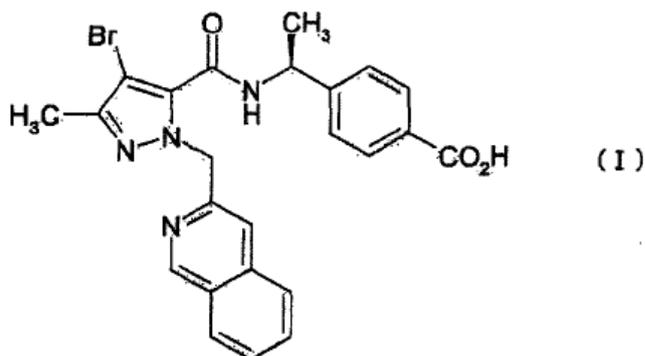
Problemas que van a solucionarse mediante la invención

30 Se proporciona un compuesto que es útil como principio activo de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica para tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.

Medios para solucionar los problemas

35 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios extensps sobre un compuesto que tiene una acción antagonista del receptor EP4 y han encontrado que el ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino]etil]benzoico (compuesto A), representado por la fórmula (I), o una sal del mismo presenta una acción antagonista del receptor EP4 excelente, completando de ese modo la presente invención.

40 [Fórm. quím. 9]



Es decir, la presente invención se refiere al compuesto A o una sal del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende el compuesto A o una sal del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética, que comprende el compuesto A o una sal del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, esta composición farmacéutica incluye un agente para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética, que comprende el compuesto A o una sal del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Además, la presente invención se refiere al uso del compuesto A o una sal del mismo para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética; al uso del compuesto A o una sal del mismo para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética; al compuesto A o una sal del mismo para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética; y a un método para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto A o una sal del mismo a un sujeto. Por otro lado, el "sujeto" es un humano o un animal no humano que necesita la prevención o el tratamiento, y en una realización, un humano que necesita la prevención o el tratamiento.

### 20 Efectos de la invención

El compuesto A o una sal del mismo tiene una acción antagonista del receptor EP4 y puede usarse como principio activo de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.

### 25 Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación se muestra una realización del compuesto A o una sal del mismo de la presente invención. Además, en la presente memoria descriptiva, en un caso en el que el compuesto A se describe simplemente, esto se refiere a compuesto A como forma libre en el que no se forma una sal.

30 (1) Compuesto A o una sal del mismo.

(1-1) Compuesto A.

(1-2) Un metanosulfonato del compuesto A.

35

(2) Un cristal del compuesto A o una sal del mismo descrito en (1).

(3) Un cristal del compuesto A descrito en (1-1).

40 (3-1) Un cristal del compuesto A descrito en (3), en el que la temperatura de inicio de un pico endotérmico en calorimetría diferencial de barrido (análisis de DSC) es de aproximadamente 253 °C.

45 (3-2) Un cristal del compuesto A descrito en (3), que presenta picos a  $2\theta$  (°) = aproximadamente 5,7, aproximadamente 7,9, aproximadamente 11,5, aproximadamente 13,1 y aproximadamente 17,9 en difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo.

50 (3-3) Un cristal del compuesto A descrito en (3), que presenta picos a  $2\theta$  (°) = aproximadamente 5,7, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,9, aproximadamente 9,2, aproximadamente 11,5, aproximadamente 12,5, aproximadamente 13,1, aproximadamente 15,8, aproximadamente 16,3, aproximadamente 16,7, aproximadamente 17,2, aproximadamente 17,9, aproximadamente 18,5 y aproximadamente 19,5 en difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo.

55 (3-4) Un cristal del compuesto A descrito en (3), que tiene una temperatura de inicio de un pico endotérmico en análisis de DSC de aproximadamente 253 °C, y presenta picos a  $2\theta$  (°) = aproximadamente 5,7, aproximadamente 7,9, aproximadamente 11,5, aproximadamente 13,1 y aproximadamente 17,9 en difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo.

60 (3-5) Un cristal del compuesto A descrito en (3), que tiene una temperatura de inicio de un pico endotérmico en análisis de DSC de aproximadamente 253 °C, y presenta picos a  $2\theta$  (°) = aproximadamente 5,7, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,9, aproximadamente 9,2, aproximadamente 11,5, aproximadamente 12,5, aproximadamente 13,1, aproximadamente 15,8, aproximadamente 16,3, aproximadamente 16,7, aproximadamente 17,2, aproximadamente 17,9, aproximadamente 18,5 y aproximadamente 19,5 en difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo.

65 (4) Un cristal de un metanosulfonato del compuesto A descrito en (1-2).

- (4-1) El cristal de un metanosulfonato del compuesto A descrito en (4), que tiene una temperatura de inicio de un pico endotérmico en análisis de DSC de aproximadamente 192 °C.
- 5 (4-2) El cristal de un metanosulfonato del compuesto A descrito en (4), que presenta picos a  $2\theta$  (°) = aproximadamente 4,7, aproximadamente 9,5, aproximadamente 12,0, aproximadamente 13,2, aproximadamente 13,7, aproximadamente 15,3, aproximadamente 18,8, aproximadamente 20,3, aproximadamente 20,9 y aproximadamente 22,8 en difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo.
- 10 (4-3) El cristal de un metanosulfonato del compuesto A descrito en (4), que tiene una temperatura de inicio de un pico endotérmico en análisis de DSC de aproximadamente 192 °C, y presenta picos a  $2\theta$  (°) = aproximadamente 4,7, aproximadamente 9,5, aproximadamente 12,0, aproximadamente 13,2, aproximadamente 13,7, aproximadamente 15,3, aproximadamente 18,8, aproximadamente 20,3, aproximadamente 20,9 y aproximadamente 22,8 en difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo.
- 15 (5-1) Una composición farmacéutica que comprende el compuesto descrito en uno cualquiera de (1) a (1-2), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- (5-2) Una composición farmacéutica que comprende el cristal descrito en uno cualquiera de (2) a (4-3), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 (5-3) Una composición farmacéutica para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética, que comprende el compuesto descrito en uno cualquiera de (1) a (1-2), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 (5-4) Una composición farmacéutica para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética, que comprende el cristal descrito en uno cualquiera de (2) a (4-3), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- (6-1) Uso del compuesto descrito en uno cualquiera de (1) a (1-2) para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.
- 30 (6-2) Uso del cristal descrito en uno cualquiera de (2) a (4-3) para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.
- (7-1) El compuesto descrito en uno cualquiera de (1) a (1-2) para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.
- 35 (7-2) El cristal descrito en uno cualquiera de (2) a (4-3) para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.
- (8-1) Uso del compuesto descrito en uno cualquiera de (1) a (1-2) para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.
- 40 (8-2) Uso del cristal descrito en uno cualquiera de (2) a (4-3) para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.
- 45 (9-1) Un método para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto descrito en uno cualquiera de (1) a (1-2) a un sujeto.
- (9-2) Un método para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética, que comprende administrar una cantidad eficaz del cristal descrito en uno cualquiera de (2) a (4-3) a un sujeto.
- 50 En el presente documento también se da a conocer un profármaco farmacéuticamente aceptable del compuesto A o una sal del mismo. El profármaco farmacéuticamente aceptable se refiere a un compuesto que tiene un grupo que puede convertirse en un grupo carboxilo mediante solvólisis o en condiciones fisiológicas. Los ejemplos del grupo para formar un profármaco incluyen los descritos en Prog. Med., 5, 2157-2161 (1985) o "Pharmaceutical Research and Development" (Hirokawa Publishing Company, 1990), vol. 7, Drug Design, 163-198.
- 55 En la presente invención, una sal del compuesto A es una sal farmacéuticamente aceptable, y el compuesto A puede formar una sal de adición de ácido o una sal con una base en algunos casos. Los ejemplos específicos de la sal incluyen sales de adición de ácido con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido mandélico, ácido tartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido ditoliltartárico, ácido cítrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido aspártico y ácido glutámico, y sales con bases inorgánicas tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y aluminio, o con bases orgánicas tales como metilamina, etilamina, etanolamina, lisina y ornitina, sales con diversos aminoácidos tales como acetil-leucina, o con derivados de aminoácidos, y sales de amonio.
- 60
- 65

Además, la presente invención incluye además diversos hidratos o solvatos, y polimorfismo del compuesto A o una sal del mismo. Además, la presente divulgación se refiere al compuesto A o una sal del mismo, marcado con diversos isótopos radiactivos o no radiactivos.

En la presente memoria descriptiva, el término "aproximadamente" incluido en la descripción del ángulo de difracción ( $2\theta$  ( $^\circ$ )) en un patrón de difracción de rayos X de polvo y la temperatura de inicio ( $^\circ\text{C}$ ) de un pico endotérmico en análisis de DSC tienen un significado que incluye un intervalo de error habitualmente aceptable en este método de medición de datos, y normalmente significa un valor de inicio del ángulo de difracción y el pico endotérmico. El intervalo de error del ángulo de difracción ( $2\theta$  ( $^\circ$ )) en difracción de rayos X de polvo es, en una realización,  $\pm 0,2^\circ$ , y en otra realización,  $\pm 0,1^\circ$ . El intervalo de error de la temperatura de inicio de un pico endotérmico en análisis de DSC ( $^\circ\text{C}$ ) es, en una realización,  $\pm 2^\circ\text{C}$ , y en otra realización,  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

Además, con el patrón de difracción de rayos X de polvo, el espaciamiento de la red cristalina y los patrones globales son importantes para la identificación de cristales en cuanto a las propiedades de los datos, y el ángulo de difracción y la fuerza de difracción pueden variar ligeramente según la dirección de crecimiento del cristal, el tamaño de partícula y las condiciones de medición.

(Método de preparación)

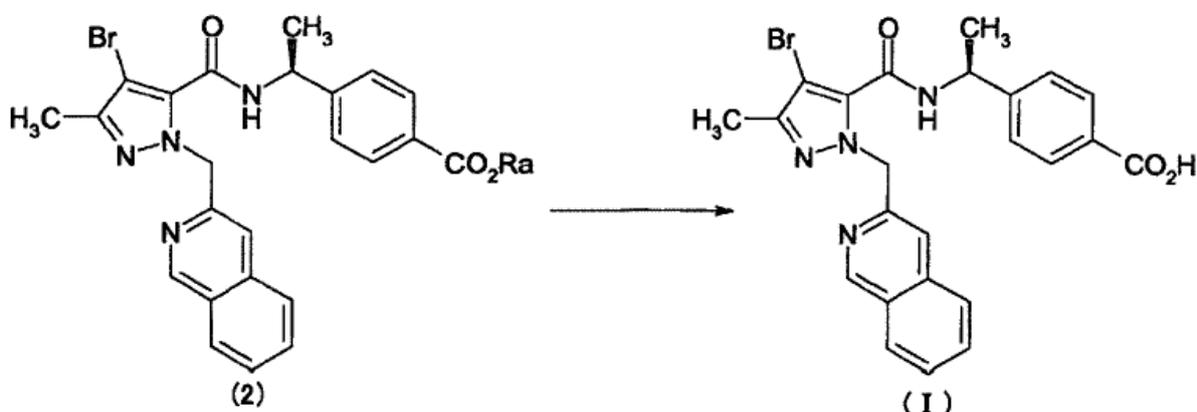
Puede prepararse el compuesto A o una sal del mismo aplicando diversos métodos de síntesis conocidos, usando las características basadas en sus estructuras básicas o los tipos de los sustituyentes. En este momento, según los tipos de los grupos funcionales, es en algunos casos eficaz desde el punto de vista de las técnicas de preparación sustituir el grupo funcional con un grupo protector adecuado (un grupo que es capaz de convertirse fácilmente en el grupo funcional), durante las etapas desde materiales de partida hasta productos intermedios. Los ejemplos del grupo protector incluyen los grupos protectores tal como se describe en "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (4.<sup>a</sup> edición, 2006)", P. G. M. Wuts y T. W. Greene, y similares, que pueden seleccionarse adecuadamente y usarse según las condiciones de reacción. En estos métodos, puede obtenerse un compuesto deseado introduciendo el grupo protector para llevar a cabo la reacción, y entonces, si se desea, retirando el grupo protector.

Además, el profármaco del compuesto A puede prepararse introduciendo un grupo específico durante las etapas desde materiales de partida hasta productos intermedios, de la misma manera que para los grupos protectores anteriores, o llevando a cabo una reacción adicional usando el compuesto A obtenido. La reacción puede llevarse a cabo aplicando un método conocido por un experto en la técnica, tal como esterificación, amidación, deshidratación generales, y similares.

A continuación en el presente documento, se describirán métodos de preparación típicos del compuesto A. Cada uno de los procedimientos de preparación también puede llevarse a cabo con referencia a los documentos adjuntos a la descripción en el presente documento. Además, a menos que se describa específicamente lo contrario, en el caso en el que los símbolos en las fórmulas estructurales en el presente método de preparación también se usan en otras fórmulas estructurales, los mismos símbolos denotan los mismos significados.

(Procedimiento de preparación 1)

[Fórm. quím. 10]



(En la fórmula, Ra es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, o similar.)

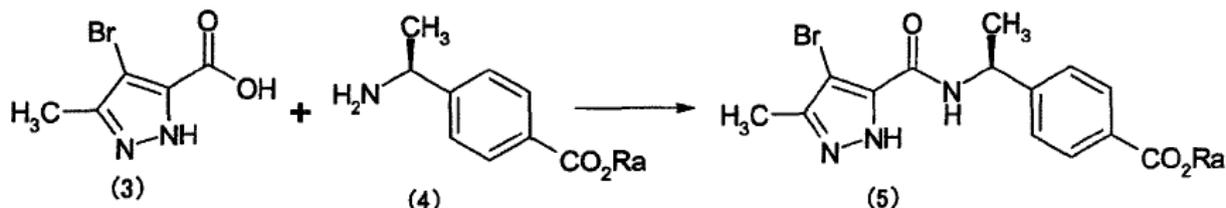
El compuesto A representado por la fórmula (1) puede prepararse mediante la hidrólisis de un compuesto representado por la fórmula general (2). En este caso, la reacción de hidrólisis puede llevarse a cabo con referencia a "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (4.ª edición, 2006)" anteriormente.

5

(Síntesis de material de partida)

Procedimiento de preparación de material de partida 1

10 [Fórm. quím. 11]



Un compuesto de partida (5) puede prepararse mediante una reacción de amidación de un compuesto (3) y un compuesto (4).

15

La reacción se lleva a cabo usando una cantidad equivalente del compuesto (3) y el compuesto (4) o una cantidad en exceso de cualquiera de los mismos, agitando la mezcla en un intervalo desde infraenfriamiento hasta infracalentamiento, preferiblemente a de -20 °C a 60 °C, habitualmente durante de 0,1 horas a 5 días, en un disolvente que es inerte para la reacción, en presencia de un agente de condensación. En este caso, el disolvente no está particularmente limitado, pero los ejemplos del mismo incluyen hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno, xileno y similares, hidrocarburos halogenados tales como diclorometano (DCM), 1,2-dicloroetano (DCE), cloroformo y similares, éteres tales como dietil éter, tetrahidrofurano (THF), dioxano, dimetoxietano (DME) y similares, N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo, acetonitrilo o agua, o una mezcla de los mismos. Como agente de condensación, puede usarse preferiblemente hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilo (HATU), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), azida difenilfosfórica, oxicloruro de fósforo, una resina de poliestireno que porta agente de condensación, por ejemplo, PS-carbodiimida (Argonaut Technologies, Inc., EE. UU.), o similar en algunos casos, pero no se limita a los mismos. Además, puede ser preferible en algunos casos que la reacción use un aditivo tal como, por ejemplo, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o similar, y puede ser ventajoso en algunos casos para el avance suave de la reacción llevar a cabo la reacción en presencia de, por ejemplo, una base orgánica tal como trietilamina (TEA), N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), N-metilmorfolina (NMM) y similares, o una base inorgánica tal como carbonato de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio y similares. Además, es preferible usar una resina de poliestireno que porta isocianato, por ejemplo, PS-isocianato (Argonaut Technologies, Inc., EE. UU.) y similar, con el fin de eliminar la amina en exceso tras la finalización de la reacción. Además, puede usarse una resina de poliestireno que porta sal de amonio cuaternario, por ejemplo, MP-carbonato (Argonaut Technologies, Inc., EE. UU.) y similares, con el fin de eliminar ácido carboxílico en exceso y los aditivos mencionados anteriormente, y similares, tras la finalización de la reacción.

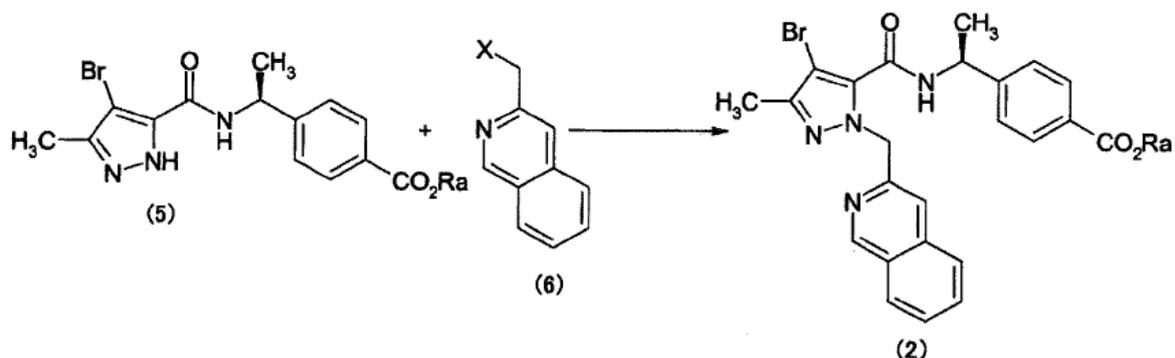
40

Además, también puede usarse un método, en el que el compuesto (3) se induce a un derivado reactivo del mismo, y luego el derivado reactivo se hace reaccionar con el compuesto (4). En este caso, los ejemplos del derivado reactivo del compuesto (3) incluyen haluros de ácido obtenidos mediante la reacción con un agente de halogenación tal como oxicloruro de fósforo, cloruro de tionilo y similares, anhídridos de ácido mixto obtenido mediante la reacción con cloroformiato de isobutilo o similar, ésteres activos obtenidos mediante condensación con HOBt o similar, y otros. La reacción de estos derivados reactivos con el compuesto (4) puede llevarse a cabo en un intervalo desde infraenfriamiento hasta infracalentamiento, preferiblemente a de -20 °C a 60 °C, en un disolvente que es inerte para la reacción, tal como hidrocarburos halogenados, hidrocarburos aromáticos y éteres.

Procedimiento de preparación de material de partida 2

50

[Fórm. quím. 12]



(En la fórmula, X representa un grupo saliente.)

- 5 El compuesto de partida (2) puede prepararse mediante una reacción de alquilación de un compuesto (5) y un compuesto (6).

Los ejemplos específicos del grupo saliente representado por X incluyen grupos halógeno, metanosulfonyloxi, p-toluenosulfonyloxi, trifluorometanesulfonyloxi y similares.

10 Esta reacción se lleva a cabo usando una cantidad equivalente del compuesto (5) y el compuesto (6) o una cantidad en exceso de cualquiera de los mismos, agitando la mezcla en un intervalo desde infraenfriamiento hasta infracalentamiento con reflujo, preferiblemente a de 0 °C a 80 °C, en un disolvente que es inerte para la reacción o sin un disolvente, habitualmente durante de 0,1 horas a 10 días. Los ejemplos del disolvente tal como se usa en el presente documento no están particularmente limitados, pero incluyen hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno, xileno y similares, éteres tales como dietil éter, THF, dioxano, DME y similares, hidrocarburos halogenados tales como DCM, DCE, cloroformo y similares, DMF, DMSO, 1-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, y una mezcla de los mismos. Puede ser ventajoso en algunos casos para el avance suave de la reacción llevar a cabo la reacción en presencia de una base orgánica tal como TEA, DIPEA, NMM y similares, o una base inorgánica tal como terc-butóxido de potasio, carbonato de cesio, carbonato de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio y similares.

25 El compuesto A se aísla y se purifica como su compuesto libre, una sal del mismo, un hidrato, un solvato o un polimorfo. La sal del compuesto A puede prepararse llevando a cabo una reacción de formación de sal convencional.

El aislamiento y la purificación pueden llevarse a cabo empleando operaciones químicas generales tales como extracción, cristalización fraccional, diversos tipos de cromatografía fraccional, y similares.

30 Por ejemplo, los isómeros ópticos pueden obtenerse por medio de métodos de resolución óptica generales para compuestos racémicos (por ejemplo, mediante cristalización fraccional introduciendo el compuesto en sales de diastereómero con bases o ácidos ópticamente activos, cromatografía usando una columna quiral o similar, y otros), o también pueden prepararse a partir de un compuesto de partida ópticamente activo adecuado.

La actividad farmacológica del compuesto A se confirmó mediante las siguientes pruebas.

35 Ejemplo de prueba 1: Prueba de evaluación de afinidad del receptor EP4 de rata

Construcción de vector que expresa receptor EP4 de rata:

40 Se transfectó el gen del receptor EP4 de rata (n.º de registro de GenBank: NM\_032076.1) en un vector de expresión pcDNA3.1-V5-His-TOPO (Invitrogen Inc.).

Expresión transitoria de receptor EP4 de rata:

45 Se transfectó el vector de expresión de un receptor EP4 de rata en una célula HEK-293 (n.º ATCC: CRL-1573). Se llevó a cabo la transfección según una instrucción adjunta, usando reactivo Lipofectoamine (marca registrada) 2000 (Invitrogen Inc.). Tras la transfección, se cultivaron las células en un medio de cultivo  $\alpha$ -MEM durante de 20 a 24 horas.

50 Preparación de fracción de membrana:

Se retiró el medio de cultivo mediante aspiración, se añadieron 10 ml de solución salina tamponada con fosfato

(PBS) enfriada al mismo por placa de 15 cm, y se rasparon las células usando un raspador celular (Sumitomo Bakelite). Se recogieron las células, se centrifugaron (250 x g, 4 °C, 5 min), y luego se suspendieron en 6 ml de Tris-HCl 20 mmol/l enfriado (pH 7,4; Nakalai Tesque Inc., que contenía ácido etilendiaminatetracético 5 mmol/l (EDTA, Nakalai Tesque Inc.)) por placa. Se homogeneizó el producto resultante usando Polytron (marca comercial registrada) y se centrifugó el producto homogeneizado (69 000 x g, 20 min, 4 °C). Se resuspendió el precipitado obtenido en Tris-HCl 20 mmol/l enfriado y se homogeneizó usando de nuevo un Polytron, y se centrifugó el producto homogeneizado (69 000 x g, 20 min, 4 °C). Se suspendió el precipitado obtenido en HEPES-NaOH 50 mmol/l (Dojindo Laboratories) (pH 7,5) a 1 ml por placa, luego se homogeneizó y se crioconservó a -80 °C como fracción de membrana. En este momento, se usó una parte del mismo para la medición de la concentración de proteínas. Se llevó a cabo la medición de la concentración de proteínas por duplicado, usando un kit de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories) según el protocolo convencional adjunto.

#### Ensayo de unión:

Se diluyeron [<sup>3</sup>H]PGE2 y una fracción de membrana celular con un tampón de ensayo (HEPES-NaOH 50 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/l, pH 7,5), y se diluyeron el compuesto de prueba y PGE2 sin marcar (Cayman) con DMSO y el tampón de ensayo. Se estableció la composición del líquido de reacción (200 µl) para que fuera tal como sigue: 50 µl de HEPES-NaOH 50 mmol/l (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/l, [<sup>3</sup>H]PGE2 0,3 nmol/l (Perkin Elmer), 100 µl de una fracción de membrana celular de EP4 de rata (200 µg de proteína/ml) y 50 µl de un compuesto de prueba (concentraciones finales de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 y 100 nmol/l). Para la medición de la unión inespecífica, se añadió la PGE2 sin marcar (Cayman) a una concentración final de 1 µmol/l. La concentración final de DMSO se estableció al 1 %. Se incubó el líquido de reacción en una microplaca de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se filtró el líquido de reacción con un papel de filtro UniFilter-96GF/B (Perkin Elmer), usando un colector FilterMate (Perkin Elmer). Se lavó el papel de filtro tras la filtración tres veces con 300 µl/pocillo de un tampón de ensayo de enfriamiento, y luego se secó en una secadora durante la noche. Se añadieron 50 µl/pocillo de un centellador líquido, MicroScint20 (Perkin Elmer), a lo mismo. Se midió la radiactividad usando un instrumento TopCount (Perkin Elmer). Se llevó a cabo la medición una vez por duplicado en todos los casos. Se determinó la cantidad de unión específica restando la cantidad de unión inespecífica de la cantidad de unión total. Se calculó el valor de Ki según un método convencional.

Como resultado de la evaluación, se encontró que el valor de Ki del compuesto A con respecto al receptor EP4 de rata era de 0,874 nmol/l. Además, el valor de Ki del compuesto del ejemplo 205 en el documento de patente 1 con respecto al receptor EP4 de rata era de 140 nmol/l.

Ejemplo de prueba 2: Prueba de evaluación de la afinidad del receptor EP4 de humano

#### Ensayo de unión:

Se diluyeron [<sup>3</sup>H]PGE2 y una fracción de membrana celular de EP4 de humano (Chemicon) con un tampón de ensayo (HEPES-NaOH 50 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 1 mmol/l (pH 7,4), albúmina sérica bovina al 0,5 % (BSA)), y se diluyeron el compuesto de prueba y PGE2 sin marcar (Sigma) con DMSO y el tampón de ensayo. Se estableció la composición del líquido de reacción (250 µl) para que fuera tal como sigue: 175 µl de un tampón de ensayo que contiene [<sup>3</sup>H]PGE2 (concentración final de 2,9 nmol/l), 50 µl de una fracción de membrana (Chemicon, 40 µg de proteína/ml) y 25 µl de un compuesto de prueba (concentraciones finales de 0,1, 1, 10, 100 y 1000 nmol/l). Para la medición de la unión inespecífica, se añadió la PGE2 sin marcar a una concentración final de 10 µmol/l. Se estableció la concentración final de DMSO al 1 %. Se incubó el líquido de reacción a 25 °C durante 60 minutos. Se filtró el líquido de reacción con un papel de filtro GF/C (Whatman), usando un colector de células (Brandel). Se lavó el papel de filtro tras la filtración tres veces con 1 ml de una disolución que contenía HEPES-NaOH 50 mmol/l (pH 7,4), NaCl 500 mmol/l y BSA al 0,1 %. El papel de filtro GF/C se puso en un vial de ensayo y se añadieron 5 ml de un centellador líquido, Atomlight, a lo mismo. Se midió la actividad radiactiva usando un contador de centelleo líquido (Perkin Elmer). Se llevó a cabo la medición una vez por duplicado en todos los casos. Se determinó la cantidad de unión específica restando la cantidad de unión inespecífica de la cantidad de unión total. Se calculó el valor de Ki según un método convencional.

Como resultado de la evaluación, se encontró que el valor de Ki del compuesto A con respecto al receptor EP4 de humano era de 1,46 nmol/l.

Ejemplo de prueba 3: Prueba de evaluación de la acción antagonista del receptor EP4 de humano mediante la medición de la cantidad de AMPc en células Jurkat humanas

#### Cultivo celular:

Se cultivaron células Jurkat (derivadas de linfoma T de leucemia humana) en las condiciones de 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub>, usando un medio de cultivo RPMI1640 (n.º de producto 11879020, Invitrogen Inc.) con suero bovino fetal al 10 % (FBS) añadido. Tras la proliferación hasta semiconfluencia, se añadió indometacina que tenía una

concentración final de 5  $\mu\text{mol/l}$  a lo mismo, y se cultivaron las células adicionalmente durante 18 horas. Se recogieron estas células en un tubo Spitz de 15 ml, se prepararon a  $1 \times 10^6$  células/ml usando un instrumento Cell Banker (Mitsubishi Kagaku Iatron) y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 5 Tratamiento con compuesto:

Se preparó un compuesto de prueba mediante dilución con un tampón de ensayo que contenía BSA al 0,5 % (1 x HBSS (disolución de sal tamponada de Hanks, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), HEPES-NaOH 20 mmol/l (Nakalai Tesque Inc.) (pH 7,4), IBMX 0,5 mmol/l (3-isobutil-1-metilxantina, WAKO), CHAPS al 0,02 % (Sigma), BSA al 0,5 % (Sigma) e indometacina 2  $\mu\text{mol/l}$  (Sigma)) para ajustarse a una concentración de 3 veces en relación con la concentración final. Se preparó PGE2 a 300 nmol/l con un tampón de ensayo que contenía BSA al 0,5 %. Se prepararon las células Jurkat criopreservadas a  $1 \times 10^6$  células/ml descongelándolas a  $37^\circ\text{C}$  usando un tampón de ensayo que contenía BSA al 0,5 %. A una microplaca negra con fondo en U de 384 pocillos (Corning) se le añadieron los compuestos de prueba (concentraciones finales de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 y 10 nmol/l), las células y PGE2 en este orden cada uno en una cantidad de 5  $\mu\text{l}$ , seguido por agitación con un agitador de placas y luego incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Con el fin de determinar la cantidad del AMPc en el estado de no estimulación con PGE2, se proporcionó un grupo al que no se le añadió PGE2.

#### 20 Medición y análisis de la cantidad de AMPc:

Se usó un kit para AMPc HiRange (Cisbio internacional) para la medición de AMPc. Tras la incubación, se añadieron a cada pocillo 5  $\mu\text{l}$  de un reactivo d2 que se había diluido 0,6 veces con un tampón de lisis (tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,0), KF 0,8 mol/l, TritonX-100 al 1 %, BSA al 0,2 %), seguido por agitación con un agitador de placas. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 5  $\mu\text{l}$  de un reactivo de criptato de europio de un kit que se había diluido 0,6 veces con un tampón de lisis, seguido por agitación con un agitador de placas e incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos con protección de la luz. Tras la incubación, se midieron la intensidad de fluorescencia del criptato a 620 nm y la intensidad de fluorescencia del d2a a 665 nm usando un instrumento ARVO1420 (PerkinElmer). Se añadieron los AMPc a 280, 70, 17,5, 4,38, 1,09, 0,27 y 0,068 nmol/l a cada pocillo y se midió la intensidad de fluorescencia tal como se describió anteriormente para crear una curva patrón. Se realizaron todas las mediciones por triplicado. Se calcularon los valores de  $\text{Cl}_{50}$  del compuesto mediante un método de regresión logística, a partir de la cantidad de AMPc con un tratamiento con el compuesto, tomando la cantidad de AMPc con adición de PGE2 como el 100 % y tomando la cantidad de AMPc sin adición de PGE2 como el 0 %. Se calculó un valor promedio a partir de tres resultados experimentales.

35 Como resultado de la evaluación, se encontró que el valor de  $\text{Cl}_{50}$  con respecto a la acción de producción de AMPc por PGE2 (100 nmol/l) del compuesto A en células Jurkat humanas era de 0,16 nmol/l.

Ejemplo de prueba 4: Prueba de evaluación de la acción antagonista del receptor EP4 de rata mediante la medición de la cantidad de AMPc:

40 Construcción del vector que expresa receptor EP4 de rata:

Se llevó a cabo la construcción de la misma manera que en el ejemplo de prueba 1.

45 Construcción de células que expresan de manera estable receptor EP4 de rata:

Se transfectó el vector de expresión de un receptor EP4 de rata en una célula CHO-K1 (n.º de la ATCC: CCL-61). Se llevó a cabo la transfección según una instrucción adjunta, usando reactivo Lipofectoamine (marca registrada) 2000 (Invitrogen Inc.). Tras la transfección, se cultivaron las células en un medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (n.º de producto 12571063, Invitrogen Inc.) que contenía G418 (Nakalai Tesque Inc.) para adquirir un clon resistente a fármaco.

Cultivo celular y tratamiento con compuesto:

55 Se sembraron células CHO-K1 que expresaban de manera estable un EP4 de rata en placas de 96 pocillos a  $0,5 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{l}$  y se cultivaron durante la noche. Se reemplazó el medio de cultivo por indometacina 2  $\mu\text{mol/l}$ /BSA al 0,5 %/medio de cultivo  $\alpha$ -MEM, y además, tras 60 minutos, se reemplazó por IBMX 1 mmol/l/indometacina 2  $\mu\text{mol/l}$ /BSA al 0,5 %/medio de cultivo  $\alpha$ -MEM. Tras 10 minutos, se añadieron los compuestos de prueba (concentración final de 0,1, 0,3, 1, 3 y 10 nmol/l), y además, tras 10 minutos, se añadió PGE2 a una concentración final de 100 nmol/l (concentración de DMSO final del 0,1 %). Con el fin de calcular la cantidad de AMPc mediante la adición de PGE2, se proporcionó un grupo sin adición de PGE2. Se cultivaron las células y se hicieron reaccionar en un incubador de  $\text{CO}_2$  ( $37^\circ\text{C}$ , el 5 % de  $\text{CO}_2$ ). Tras 30 minutos, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de Triton X-PBS al 0,2 % para la lisis de las células. Se llevó a cabo la prueba por duplicado dos veces.

65 Medición y análisis de la cantidad de AMPc:

Se midió la cantidad de AMPc en el lisado celular usando un kit de AMPc HiRange. Se distribuyó el lisado celular en cada pocillo a una microplaca negra de fondo en U de 384 pocillos en una cantidad de 10  $\mu$ l, 5  $\mu$ l de cada uno de un reactivo d2 y un reactivo de criptato de europio que se añadieron al mismo en este orden, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos con protección de la luz. Tras la incubación, se midieron la intensidad de fluorescencia del criptato a 620 nm y la intensidad de fluorescencia del d2a a 665 nm usando un instrumento ARVO1420. Se añadieron a cada pocillo los AMPc de 280, 70, 17,5, 4,38, 1,09, 0,27 y 0,068 nmol/l para crear una curva patrón y se midió la intensidad de fluorescencia tal como se describió anteriormente. Se calcularon los valores de  $CI_{50}$  de los compuestos de prueba mediante un método de regresión logística a partir de la cantidad de cAMP con un tratamiento con el compuesto de prueba, tomando la cantidad de AMPc con adición de PGE2 que tenía una concentración final de 100 nmol/l como el 100 % y tomando la cantidad de AMPc sin adición de PGE2 como el 0 %. Se calculó un valor promedio a partir de dos resultados experimentales.

Como resultado de la evaluación, se encontró que el valor de  $CI_{50}$  con respecto a la acción de producción de AMPc por PGE2 (100 nmol/l) del compuesto A en células CHO-K1 que expresaban receptor EP4 de rata era de 1,04 nmol/l.

Ejemplo de prueba 5: Prueba de evaluación de la acción antagonista del receptor EP4 de rata *in vivo*

Se usaron ratas SD (macho, 6 semanas de edad) en condiciones sin ayuno para la prueba. Se administró por vía oral (v.o.) un compuesto de prueba disuelto en una disolución mixta de PEG 400:Tween 80 al 20 %:disolución de  $NaHCO_3$  acuosa 1 mol/l = 1:4:5 a la rata a una dosis de 0,03 mg/kg (5 ml/kg). Tras 1 hora, se administró por vía subcutánea (s.c.) un metabolito activo (ONO-AE1-437 (n.º CAS 256382-23-7)) de un agonista de EP4 ONO-4819 disuelto en solución salina fisiológica al lomo de la rata a una dosis de 0,01 mg/kg (5 ml/kg). Tras 30 minutos, se administró lipopolisacárido (LPS, 0,01 mg/kg) a la vena de la cola (2 ml/kg), y tras 60 minutos, se recogieron aproximadamente 0,5 ml de sangre en un tubo que contenía heparina bajo anestesia. Se centrifugó la muestra de sangre (1000 x g, 10 minutos, 4 °C) para separar el plasma. Se midió la concentración de TNF- $\alpha$  en el plasma de rata mediante un kit de ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems). Se calculó la tasa inhibitora del grupo con el compuesto de prueba ( $n = 5$ ) con respecto a la acción inhibitora de la producción de TNF- $\alpha$  del agonista de EP4 tomando la concentración de TNF- $\alpha$  del grupo ( $n = 5$ ) no tratado con ONO-AE1-437 como el 100 % y tomando la concentración de TNF- $\alpha$  del grupo ( $n = 5$ ) tratado con ONO-AE1-437 como el 0 %.

Como resultado de la evaluación, se encontró que el compuesto A (0,03 mg/kg, v.o.) inhibió la tasa inhibitora de producción de TNF- $\alpha$  del agonista de EP4 ONO-AE1-437 (0,01 mg/kg, s.c.) en un 38 %.

Ejemplo de prueba 6: Prueba de evaluación de la acción sobre la actividad de renina en plasma de rata

Se usaron ratas SD (macho, 7 semanas de edad) en condiciones sin ayuno para la prueba. Se administró por vía oral (v.o.) un compuesto de prueba disuelto en una disolución mixta de PEG 400:Tween 80 al 20 %:disolución de  $NaHCO_3$  acuosa 1 mol/l = 1:4:5 a la rata a una dosis de 0,3 mg/kg (5 ml/kg). Tras 1 hora, se administró por vía subcutánea un metabolito activo (ONO-AE1-437) de un agonista de EP4 ONO-4819 disuelto en solución salina fisiológica a lomo de la rata a una dosis de 0,01 mg/kg (5 ml/kg). Tras 10 minutos, se decapitó la rata sin anestesia y se recogieron aproximadamente 2 ml de sangre en un tubo que contenía 3 mg de EDTA·2Na. Se centrifugó la muestra de sangre (1000 x g, 10 minutos, 4 °C) para separar el plasma. A 100  $\mu$ l del plasma se le añadieron 10  $\mu$ l de un tampón de ensayo (se mezclaron 20,4 ml de  $NaH_2PO_4$  2 mol/l, 9,3 ml de  $Na_2HPO_4$  1 mol/l, 15 ml de EDTA·2Na 0,5 mol/l y 0,1 g de CHAPS, seguido por mezclado con agua destilada y dilución hasta 50 ml, pH 5,55) y 1  $\mu$ l de clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo 100 mmol/l. Se recogió la mitad de la cantidad, seguido por incubación a 37 °C durante 90 minutos. Se almacenó la otra mitad de la cantidad a 4 °C y se usó para una reacción de blanco. Se midió la concentración de angiotensina I en ambas muestras mediante un método de ELISA, y se tomó la concentración obtenida restando el valor de la reacción de blanco del valor de la muestra incubada a 37 °C como actividad de renina en plasma (actividad de renina en plasma (PRA)). Tomando la PRA de la tasa inhibitora del grupo ( $n = 5$ ) no tratado con ONO-AE1-437 como el 100 % y tomando la del grupo ( $n = 4$ ) tratado con ONO-AE1-437 como el 0 %, se calculó la tasa inhibitora del grupo con el compuesto de prueba ( $n = 5$ ).

Como resultado de la evaluación, se encontró que el compuesto A (0,3 mg/kg, v.o.) inhibió el aumento de PRA debido al agonista de EP4 ONO-AE1-437 (0,01 mg/kg, s.c.) en un 102 %.

Ejemplo de prueba 7: Prueba para la investigación del efecto sobre albúmina en orina de ratones db/db con diabetes tipo 2

Se usaron ratones db/db (macho, 8 semanas de edad) con diabetes tipo 2 para la prueba. Se midieron las concentraciones de albúmina en muestras de orina obtenidas mediante recogida de orina durante 24 horas mediante un método de ELISA usando un anticuerpo anti-albúmina de ratón (RAM/Alb/7S, Nordic Immunology), y se midió la concentración de creatinina en orina usando un instrumento CRE-EN Kainos (Kainos Co., Ltd.). Se calculó la razón de albúmina-creatinina (ACR) en orina, y se asignó un grupo ( $n = 12$ ) no tratado con el compuesto de prueba y un

grupo ( $n = 12$ ) tratado con el compuesto de prueba sin sesgo en ACR. Se administró el compuesto de prueba suspendido en una disolución de metilcelulosa (MC) al 0,5 % por vía oral al grupo tratado con el compuesto de prueba a una dosis de 0,3 mg/kg una vez al día durante una semana (10 ml/kg). Se administró una disolución de MC al 0,5 % por vía oral al grupo no tratado con el compuesto de prueba a un volumen de administración de 10 ml/kg una vez al día durante una semana. Se recogió orina durante 24 horas desde la finalización de la administración final, y usando la ACR calculada como indicador, se investigó el efecto de mejora del compuesto de prueba sobre la nefropatía temprana de los ratones con diabetes tipo 2. Se determinó la tasa inhibitora de ACR del grupo tratado con el compuesto de prueba tomando el valor de ACR del grupo no tratado con el compuesto de prueba como el 100 %.

Como resultado de la evaluación, se encontró que el compuesto A (0,3 mg/kg, v.o.) inhibió la ACR del ratón db/db con diabetes tipo 2 en un 44 % mediante administración oral durante una semana.

Ejemplo de prueba 8: Prueba para la investigación del efecto sobre la función renal de nefrectomía 5/6 (5/6 Nx) de ratas con insuficiencia renal crónica

Se usaron ratas Wistar (macho, 8 semanas de edad) para la prueba. Se extrajeron dos tercios del riñón izquierdo bajo anestesia con pentobarbital, y tras 1 semana, se nefrectomizó todo el riñón derecho (5/6 Nx). Tras 2 semanas desde la 5/6 Nx, se midieron las concentraciones de proteína en muestras de orina obtenidas mediante recogida de orina durante 24 horas usando un kit de ensayo de proteínas de Bio-Rad, y se midió la concentración de creatinina en orina usando un instrumento Determiner L CRE (Kyowa Medex Co., Ltd.)). Se calculó la razón de proteína urinaria-creatinina (UPCR), y se asignó un grupo ( $n = 12$ ) no tratado con el compuesto de prueba y un grupo ( $n = 12$ ) tratado con el compuesto de prueba sin sesgo en UPCR. Se administró por vía oral el compuesto de prueba suspendido en una disolución de MC al 0,5 % al grupo tratado con el compuesto de prueba a una dosis de 0,2 mg/kg una vez al día durante 6 semanas (5 ml/kg). Se administró una disolución de MC al 0,5 % por vía oral al grupo no tratado con el compuesto de prueba a un volumen de administración de 5 ml/kg una vez al día durante 6 semanas. Se recogió orina durante 24 horas desde la finalización de la administración final, y usando la UPCR calculada como indicador, se investigó el efecto de mejora del compuesto de prueba sobre la nefropatía de la rata con insuficiencia renal crónica. Se determinó la tasa inhibitora de UPCR del grupo tratado con el compuesto de prueba cuando el valor de UPCR del grupo no tratado con el compuesto de prueba se tomó como el 100 %.

Como resultado de la evaluación, el compuesto A (0,2 mg/kg, v.o.) inhibió la UPCR de la rata con insuficiencia renal crónica por nefrectomía 5/6 en un 47 % mediante administración oral durante 6 semanas.

Ejemplo de prueba 9: Prueba de evaluación de la acción antagonista del receptor sobre el receptor EP1/EP2/EP3 de rata (prueba de selectividad)

Se evaluó la acción antagonista del compuesto A en otros subtipos (EP1, EP2 y EP3) del receptor de PGE2 derivado de rata. Para EP1 y EP3, se usó la cantidad de  $Ca^{2+}$  intracelular como indicador, y para EP2, se usó la cantidad de AMPc intracelular como indicador, para investigar la acción del compuesto de prueba.

Construcción de vector de expresión de EP1, EP2 o EP3 de rata:

Se insertaron un gen de receptor EP1 de rata (n.º de registro de GenBank: D88751.1), un gen de receptor EP2 de rata (n.º de registro de GenBank: NM\_031088.1) o un gen de receptor EP3 de rata (n.º de registro de GenBank: M\_012704.1) respectivamente en un vector de expresión pcDNA3.1-V5-His-TOPO (Invitrogen Inc.).

Construcción de células que expresan de manera estable receptor EP1, EP2 o EP3 de rata:

Se transfectó el vector que expresa un receptor EP1, EP2 o EP3 de rata en una célula HEK-293 (para expresar de manera estable un receptor EP1 o EP3 de rata, n.º de la ATCC: CRL-1573) o una célula CHO-K1 (para expresar de manera estable un receptor EP2 de rata, n.º de la ATCC: CCL-61). Se llevó a cabo la transfección según una instrucción adjunta, usando el reactivo Lipofectoamine (marca comercial registrada) 2000 (Invitrogen Inc.). Tras la transfección, se cultivaron las células en un medio de cultivo D-MEM (para expresar de manera estable un receptor EP1 o EP3 de rata) (n.º de producto 11885084, Invitrogen Inc.) que contenía G418 (Nakalai Tesque Inc.) y un medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (para expresar de manera estable un receptor EP2 de rata) que contenía G418 para adquirir un clon resistente a fármaco.

Cultivo de células que expresan de manera estable receptor EP2 y tratamiento con compuesto:

Se sembraron células CHO-K1 que expresan de manera estable EP2 de rata en placas de 96 pocillos a  $1 \times 10^4$  células/100  $\mu$ l y se cultivaron durante la noche en las condiciones de 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub>, usando un medio de cultivo  $\alpha$ -MEM que tenía FBS al 10 % añadido al mismo. Se reemplazó el medio de cultivo por indometacina 2  $\mu$ mol//BSA al 0,1 %/medio de cultivo  $\alpha$ -MEM, y además, tras 60 minutos, se reemplazó por IBMX 1 mmol//indometacina 2  $\mu$ mol//BSA al 0,1 %/medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (n.º de producto 12571063, Invitrogen Inc.).

Tras 10 minutos, se añadieron los compuestos de prueba (concentración final de 0,01, 0,1, 1 y 10  $\mu\text{mol/l}$ ), y además, tras 10 minutos, se añadió PGE2 hasta una concentración final de 100 nmol/l (concentración de DMSO final del 0,1 %). Con el fin de calcular la cantidad de AMPc producida mediante la adición de PGE2, se proporcionó un grupo sin adición de PGE2. Se cultivaron las células y se hicieron reaccionar en un incubador de  $\text{CO}_2$  (37 °C, el 5 % de  $\text{CO}_2$ ). Tras 30 minutos, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de Triton X-PBS al 0,2 % para la lisis de las células. Se llevó a cabo la prueba una vez por duplicado.

Medición y análisis de la cantidad de AMPc en células que expresan de manera estable receptor EP2:

Se midió la cantidad de AMPc contenida en el lisado celular con un kit de AMPc HiRange de la misma manera que en el ejemplo de prueba 4. Se calculó la razón de la cantidad de AMPc cuando se trató con el compuesto de prueba, tomando la cantidad de AMPc con la adición de PGE2 que tenía una concentración final de 100 nmol/l como el 100 % y tomando la cantidad de AMPc sin adición de PGE2 como el 0 %.

Como resultado de la evaluación, el compuesto A no presentaba una acción inhibitoria del 50 % o más a 10 000 nmol/l con respecto al aumento en la cantidad de AMPc en la célula debido a PGE2 a través del receptor EP2 de rata.

Cultivo de células que expresan de manera estable receptores EP1 y EP3 y tratamiento con compuesto:

Se sembraron células HEK-293 que expresaban de manera estable EP1 de rata o EP3 de rata en placas de 96 pocillos a  $1 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{l}$  y se cultivaron durante la noche en las condiciones de 37 °C y el 5 % de  $\text{CO}_2$ , usando un medio de cultivo D-MEM que tenía FBS al 10 % añadido al mismo. A un tampón de ensayo (1  $\times$  HBSS, HEPES-NaOH 20 mmol/l (pH 7,4), probenecid 0,6 mg/ml, BSA al 0,1 %) se le añadió un reactivo fluorescente Dye del kit de ensayo de Ca3 (Molecular Devices, LLC.) a una razón de 70:1. Se reemplazó el medio de cultivo por la disolución de Dye diluida, seguido por incubación durante 3 horas. El compuesto (concentración final de 1 o 10  $\mu\text{mol/l}$ ) se disolvió en DMSO y se añadió al mismo el tampón de ensayo. Tras 5 minutos, se añadió PGE2 a una concentración final de 100 nmol/l (concentración de DMSO final del 1 %). Se llevó a cabo la prueba usando células que expresan de manera estable un receptor EP1 de rata o un receptor EP3 de rata una vez por duplicado.

Medición y análisis de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en células que expresan de manera estable receptor EP1 o EP3:

Se midió la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular usando FLIPR tetra (Molecular Devices, LLC.) con la intensidad de fluorescencia del Dye como indicador. Con el fin de medir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante la adición de PGE2, se proporcionó un grupo al que no se le añadió PGE2. Tomando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se añadió PGE2 a una concentración final de 100 nmol/l como el 100 %, y tomando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando no se añadió PGE2 como el 0 %, se calculó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en porcentaje con un tratamiento con el compuesto.

Como resultado de la evaluación, el compuesto A no presentaba una acción inhibitoria del 50 % o más a 10 000 nmol/l con respecto al aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular debido a PGE2 a través del receptor EP1 o EP3 de la rata.

Ejemplo de prueba 10: Evaluación en trastorno gastrointestinal de rata

Se usaron ratas SD (macho, 7 semanas de edad). Se administró por vía oral un compuesto de prueba disuelto en una disolución mixta de PEG 400:Tween 80 al 20 %: disolución de  $\text{NaHCO}_3$  acuosa 1 mol/l = 1:4:5 a una dosis de 3 mg/kg ( $n = 5$ , 5 ml/kg) durante 7 días. Se administró por vía oral el líquido mixto mencionado anteriormente a un grupo no tratado con el fármaco de prueba ( $n = 5$ ) a un volumen de 5 ml/kg durante 7 días. Se recogió sangre en ayuno durante la noche para determinar la hematología y pruebas de análisis bioquímico de sangre el día siguiente tras la administración final. Tras la recogida de sangre, se realizó inmediatamente la autopsia del animal que se había sacrificado mediante exsanguinación, y se extirparon del mismo el estómago, el duodeno, el yeyuno, el ileon, el ciego, el colon, el recto y el hígado. Se fijaron los órganos extirpados en una disolución de formalina tamponada neutra al 10 % y se usaron para la evaluación histopatológica.

Los resultados de la evaluación, no se observaron hallazgos que indicaran que el compuesto A provocara anomalía.

Como resultado de la prueba, se confirmó que el compuesto A tiene una afinidad por el receptor EP4 y presenta una acción antagonista del receptor EP4 excelente (ejemplos de prueba 1 a 5). Se confirmó que el compuesto A inhibe el aumento en la PRA provocado por el agonista de EP4 (ejemplo de prueba 6). Se confirmó que el compuesto A tiene efectos de mejora en pruebas para la investigación del efecto sobre la albúmina en orina de ratones db/db con diabetes tipo 2 y pruebas para la investigación del efecto sobre la función renal de nefrectomía 5/6 (5/6 Nx) de ratas con insuficiencia renal crónica (ejemplos de prueba 7 y 8).

Por consiguiente, el compuesto A o una sal del mismo puede usarse para la prevención o el tratamiento de insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.

A partir de los resultados del ejemplo de prueba 1 anteriormente, se encontró que el compuesto A tiene una excelente afinidad por el receptor EP4, en comparación con el ejemplo 205 en el documento de patente 1. Además, a partir de los resultados del ejemplo de prueba 10 anteriormente, se encontró que hay poca preocupación de que el compuesto A provoque trastornos gastrointestinales.

A partir de los resultados de las pruebas anteriores, se confirmó que el compuesto A o una sal del mismo tiene una acción antagonista sobre el receptor EP4, y puede usarse como principio activo de una composición farmacéutica para prevenir o tratar diversas enfermedades relacionadas con EP4, y similares. Los ejemplos de las enfermedades relacionadas con EP4 incluyen enfermedades renales (por ejemplo, esclerosis renal, riñón gotoso, enfermedad renal poliquística, síndrome nefrótico, nefritis aguda, hematuria recurrente, hematuria persistente, nefritis crónica, nefritis de progresión rápida, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, nefropatía diabética y síndrome de Bartter), enfermedades cutáneas inflamatorias (por ejemplo, quemadura solar, quemaduras, eccema y dermatitis), enfermedades cardíacas isquémicas provocadas por arteriosclerosis (por ejemplo, infarto de miocardio y angina de pecho), trastornos cerebrovasculares provocados por arteriosclerosis (por ejemplo, dolor de la enfermedad de accidente cerebrovascular incluyendo infarto lacunar, trombosis cerebral, hemorragia cerebral, hemorragia subaracnoidea e infarto cerebral), enfermedades de úlcera péptica (por ejemplo, úlcera gástrica y úlcera duodenal), cáncer maligno y metástasis del mismo (por ejemplo, cáncer de colon y cáncer de mama), dolor (por ejemplo, dolor agudo posoperatorio, dolor traumático, dolor tras retirar puntos, dolor del cuello, los hombros y las muñecas, periartrosis del hombro, osteoartritis (OA), síndrome del túnel carpiano, artritis reumatoide (AR), dolor crónico posoperatorio, cistitis intersticial, síndrome de dolor de vejiga, prostatitis crónica no bacteriana (CP/CPSS), dolor tras lesión de la médula espinal, dolor tras infarto cerebral, esclerosis múltiple (dolor), dolor de la enfermedad de Parkinson, dolor neuropático diabético, dolor posherpético, dolor neuropático por VIH, neuralgia trigeminal, fibromialgia, dolor en la región lumbar (dolor en la región lumbar nociceptivo, general incluyendo dolor en la región lumbar neuropático), estenosis del canal medular lumbar, dolor de trastorno medular (excepto para estenosis del tubo medular lumbar y lesión de la médula espinal), dolor talámico, migraña, cefalea, síndrome de las piernas inquietas (picor de pies), dolor por cáncer y síndrome del intestino irritable), en particular, enfermedades renales tales como insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.

Además, el compuesto A o una sal del mismo puede usarse como agente para tratar y/o prevenir diversos tipos de edema (por ejemplo, edema cardíaco y edema cerebral), hipertensión tal como hipertensión maligna, síndrome premenstrual, cálculos urinarios, enfermedades de disminución de orina provocadas por una enfermedad aguda o crónica, hiperfosfatemia, o similar.

Además, el compuesto A o una sal del mismo puede usarse como agente para tratar y/o prevenir diversos tipos de poliuria (por ejemplo, diabetes insípida central, diabetes insípida nefrogénica, diabetes insípida psicogénica, diabetes mellitus, trastornos de absorción de cloruro de sodio y polidipsia).

Puede prepararse una composición farmacéutica que contiene el compuesto A o una sal del mismo como principio activo según un método generalmente usado, usando un excipiente habitualmente usado en la técnica, es decir, un excipiente farmacéutico, un portador farmacéutico, o similar.

La administración puede llevarse a cabo de cualquier forma de administración oral por medio de comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, preparaciones líquidas, o similares; o administración parenteral por medio de inyecciones tales como inyecciones intraarticulares, intravenosas o intramusculares, supositorios, gotas oculares, pomadas oculares, preparaciones líquidas percutáneas, pomadas, parches percutáneos, preparaciones líquidas transmucosas, parches transmucosos e inhaladores.

Como composición sólida para administración oral, se usan comprimidos, polvo, gránulos, o similares. En una composición sólida de este tipo, se mezclan una o más clases de principios activos con al menos un excipiente inerte. Según un método convencional, la composición puede contener aditivos inertes tales como un lubricante, un disgregante, un agente estabilizante y un agente solubilizante. Según exija la ocasión, los comprimidos o las píldoras pueden recubrirse con un recubrimiento de azúcar, o una película de un material gástrico o entérico.

La composición líquida para administración oral incluye emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes, elixires, o similares farmacéuticamente aceptables, y contiene un diluyente inerte generalmente usado tal como agua purificada o etanol. Además del diluyente inerte, esta composición líquida puede contener un agente auxiliar tal como un agente solubilizante, un agente humectante y un agente de suspensión, un edulcorante, un sabor, un aroma y un antiséptico.

Las inyecciones para administración parenteral incluyen preparaciones, suspensiones y emulsiones líquidas acuosas o no acuosas estériles. El disolvente acuoso incluye, por ejemplo, agua destilada para inyección y solución salina fisiológica. Los ejemplos del disolvente no acuoso incluyen alcoholes tales como etanol. Una composición de este tipo puede contener además un agente de tonicidad, un antiséptico, un agente humectante, un agente emulsionante, un agente dispersante, un agente estabilizante o un agente solubilizante. Estos se esterilizan, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, la incorporación de un bactericida o

irradiación. Además, estos también pueden usarse preparando una composición sólida estéril, y disolviéndola o suspendiéndola en agua estéril o un disolvente estéril para inyección antes de su uso.

5 Los ejemplos del agente para uso externo incluyen pomadas, emplastos, cremas, gelatinas, cataplasmas, pulverizaciones, lociones, gotas oculares, pomadas oculares, y similares. Los agentes contienen bases de pomada, bases de loción, preparaciones, suspensiones, emulsiones líquidas acuosas o no acuosas generalmente usadas, o similares.

10 Como agentes transmucosos tales como un inhalador, un agente transnasal, y similares, se usan aquellos en forma de un estado sólido, líquido o semisólido, y pueden prepararse según un método convencionalmente conocido. Por ejemplo, un excipiente conocido, y también un agente de ajuste del pH, un antiséptico, un tensioactivo, un lubricante, un agente estabilizante, un agente espesante, o similar pueden añadirse apropiadamente a los mismos. Para su administración, puede usarse un dispositivo apropiado para inhalación o soplado. Por ejemplo, un compuesto puede administrarse solo o como un polvo de mezcla formulada, o como una disolución o suspensión en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, usando un pulverizador o dispositivo convencionalmente conocido, tal como un dispositivo de inhalación de administración medida, y similares. Un inhalador de polvo seco o similar puede ser para un uso de administración individual o múltiple, y puede usarse un polvo seco o una cápsula que contiene polvo. Alternativamente, esto puede ser en una forma tal como un pulverizador de aerosol presurizado que usa un propelente apropiado, por ejemplo, un gas adecuado tales como un clorofluoroalcano y dióxido de carbono, u otras formas.

20 En la administración oral, la dosis diaria es preferiblemente de desde aproximadamente 0,001 hasta 100 mg/kg, en una realización, desde 0,1 hasta 30 mg/kg, y en otra realización, desde 0,1 hasta 10 mg/kg, por peso corporal, administrada en una porción o en de 2 a 4 porciones diferenciadas. En el caso de administración intravenosa, la dosis diaria es adecuadamente de desde aproximadamente 0,0001 hasta 10 mg/kg por peso corporal, una vez al día o dos o más veces al día. Además, se administra un agente transmucoso a una dosis en un intervalo de desde aproximadamente 0,001 hasta 100 mg/kg por peso corporal, una vez al día o dos o más veces al día. La dosis se decide apropiadamente en respuesta a casos individuales teniendo en cuenta los síntomas, la edad y el sexo, y similares.

30 Aunque varía dependiendo de la vía de administración, la forma de dosificación, el sitio de administración, los tipos de excipiente y aditivo, la composición farmacéutica de la presente invención incluye del 0,01 en peso al 100 % en peso, en una realización, del 0,01 en peso al 50 % en peso, de uno o más tipos del compuesto A como principio activo.

35 El compuesto A puede usarse en combinación con diversos agentes para tratar o agente para prevenir las enfermedades descritas anteriormente para las que el compuesto A se considera que es eficaz. Las preparaciones que van a usarse al mismo tiempo pueden administrarse simultáneamente, o por separado y de manera continua o a un intervalo de tiempo deseado. Las preparaciones que van a coadministrarse pueden ser una combinación, o pueden prepararse individualmente.

### Ejemplos

45 Los métodos de preparación del compuesto A representado por la fórmula (I) o una sal del mismo se describirán a continuación en más detalle basándose en los ejemplos. Los métodos de preparación para el compuesto A o una sal del mismo no se limitan solo a los métodos de preparación (procedimientos) de los ejemplos específicos mostrados a continuación, y el compuesto A o una sal del mismo puede prepararse mediante cualquier método que sea evidente para un experto en la técnica.

50 Además, el análisis de DSC y la difracción de rayos X de polvo se llevaron a cabo mediante los siguientes métodos.

#### (1) Análisis de DSC

55 Se llevó a cabo el análisis de DSC usando los instrumentos Q1000 y Q2000, fabricados por TA Instruments. Se cargaron aproximadamente 2 mg de una muestra en una cubeta de muestra de aluminio dedicada para este uso, y se midió de manera continua la diferencia en calorías generada entre una muestra y una referencia (cubeta de muestra de aluminio vacía) y se registró con un intervalo de medición fijado desde temperatura ambiente hasta 300 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en un estado en el que la cubeta de muestra no se tapó, bajo una atmósfera de nitrógeno (50 ml/min). Además, la manipulación con un dispositivo que incluye procesamiento de datos fue según el método y los procedimientos instruidos para cada dispositivo.

#### (2) Difracción de rayos X de polvo

65 Se midió la difracción de rayos X de polvo usando un instrumento RINT-TTRII en las condiciones de un tubo: Cu, una corriente de tubo: 300 mA, un voltaje de tubo, 50 kV, una anchura de toma de muestras: 0,020°, una velocidad de barrido: 4°/min, una longitud de onda: 1,54056 angstroms y un ángulo de difracción de medición (2θ): de 2,5 a

40°. Además, la manipulación con un dispositivo que incluye procesamiento de datos fue según el método y los procedimientos indicados en cada dispositivo.

Además, en los ejemplos se usan las siguientes abreviaturas. ESI+: valores de m/z en ESI-MASA, RMN-DMSO-d<sub>6</sub>: pico δ (ppm) en <sup>1</sup>H-RMN en DMSO-d<sub>6</sub>.

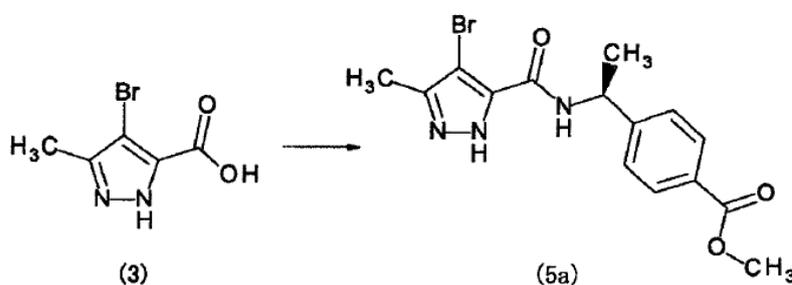
Además, por conveniencia, se representa la concentración en mol/l mediante M. Por ejemplo, una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 M significa una disolución acuosa de hidróxido de sodio de 1 mol/l.

#### 10 Ejemplo 1

Síntesis de ácido 4-[(1S)-1-((4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il)carbonil)amino]etil]benzoico (I)

15 Etapa 1. Síntesis de 4-[(1S)-1-((4-bromo-3-metil-1H-pirazol-5-il)carbonil)amino]etil]benzoato de metilo (5a)

[Fórm. quím. 13]

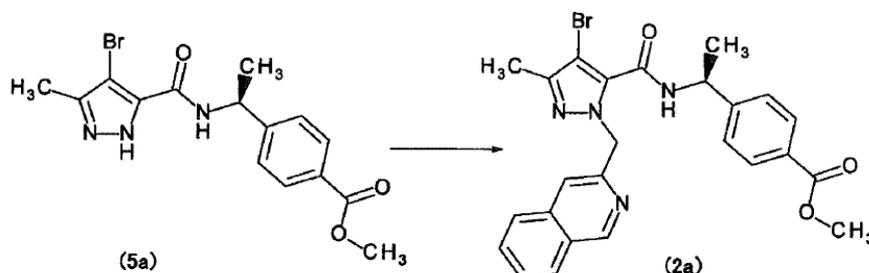


20 A una mezcla de ácido 4-bromo-3-metil-1H-pirazol-5-carboxílico (3) (1,00 g), DMF (20 ml), clorhidrato de 4-[(1S)-1-aminoetil]benzoato de metilo (1,26 g) y HOBT (0,99 g) se le añadió 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,2 ml), seguido por agitación a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla se le añadió acetato de etilo, seguido por agitación bajo enfriamiento con hielo. A la mezcla se le añadió una disolución acuosa de ácido cítrico al 10 %, seguido por separación en una fase orgánica y una fase acuosa, y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo. Se combinaron las fases orgánicas obtenidas, se lavaron secuencialmente con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio saturada, agua y salmuera saturada, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y luego se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida para obtener 4-[(1S)-1-((4-bromo-3-metil-1H-pirazol-5-il)carbonil)amino]etil]benzoato de metilo (5a) (1,75 g).

30 ESI+: 366, 368

Etapa 2. Síntesis de 4-[(1S)-1-((4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il)carbonil)amino]etil]benzoato de metilo (2a)

35 [Fórm. quím. 14]



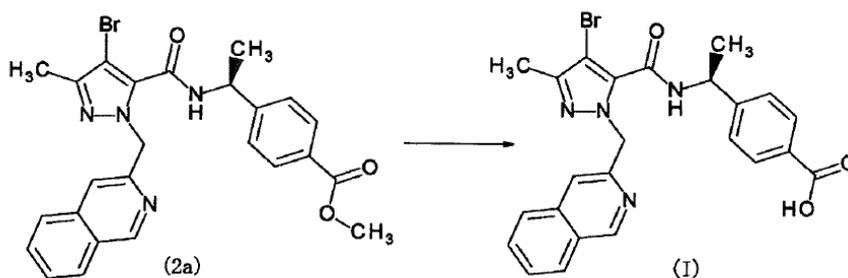
40 Se agitó una mezcla de 4-[(1S)-1-((4-bromo-3-metil-1H-pirazol-5-il)carbonil)amino]etil]benzoato de metilo (5a) (1,72 g) y DMF (20,0 ml) bajo enfriamiento con hielo. A la mezcla se le añadió terc-butóxido de potasio (580 mg), seguido por agitación durante 0,5 horas. A la mezcla se le añadió una mezcla de 3-(bromometil)isoquinolina (1,10 g) y DMF (14 ml), seguido por calentamiento hasta temperatura ambiente y agitación durante 10 días. Se agitó la mezcla obtenida bajo enfriamiento con hielo, y se añadieron a la misma acetato de etilo y una disolución acuosa de ácido cítrico al 10 %, seguido por agitación durante un tiempo y extracción con acetato de etilo. Se lavó

secuencialmente la fase orgánica obtenida con una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, agua y salmuera saturada, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y luego se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano normal:acetato de etilo=6:4) para obtener 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino)etil]benzoato de metilo (2a) (518 mg).

RMN-DMSO- $d_6$ : 9,28 (1H, d, J=7,8 Hz), 9,23 (1H, s), 8,13 (1H, d, J=7,8 Hz), 7,89 (1H, d, J=7,8 Hz), 7,81-7,76 (1H, m), 7,72-7,64 (3H, m), 7,50 (1H, s), 7,38 (2H, d, J=8,3 Hz), 5,65-5,54 (2H, m), 5,12-5,04 (1H, m), 3,83 (3H, s), 2,17 (3H, s), 1,37 (3H, d, J=7,0 Hz).

Etapa 3. Síntesis de ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino)etil]benzoico (I)

[Fórm. quím. 15]



A una mezcla de 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino)etil]benzoato de metilo (2a) (486 mg), THF (10,0 ml) y metanol (10,0 ml) se le añadió una disolución acuosa de hidróxido de sodio 2 M (5,0 ml) bajo enfriamiento con hielo, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 17 horas. A la mezcla se le añadió ácido clorhídrico 1 M (10,0 ml) bajo enfriamiento con hielo, seguido por calentamiento hasta temperatura ambiente y agitación durante 2 horas. Se recogió el sólido precipitado mediante filtración y se lavó con agua para obtener ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino)etil]benzoico (I) (411 mg) como cristales.

ESI+: 493, 495

RMN-DMSO- $d_6$ : 12,9-12,7 (1H, m), 9,30 (1H, d, J=7,8 Hz), 9,24 (1H, s), 8,13 (1H, d, J=8,1 Hz), 7,91 (1H, d, J=8,1 Hz), 7,81-7,76 (1H, m), 7,74-7,66 (3H, m), 7,53 (1H, s), 7,40 (2H, d, J=8,2 Hz), 5,60 (2H, s), 5,14-5,03 (1H, m), 2,16 (3H, s), 1,37 (3H, d, J=7,0 Hz).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{24}H_{21}BrN_4O_3$ : C, 58,43; H, 4,29; N, 11,36; Br, 16,20.

Hallado: C, 58,33; H, 4,38; N, 11,24; Br, 16,07.

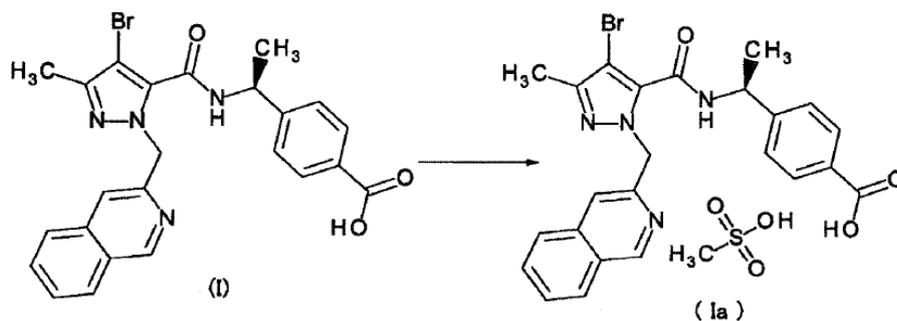
Como resultado obtenido al someter los cristales obtenidos en la etapa 3 del ejemplo 1 a medición de difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo, se obtuvo un diagrama que incluye picos a  $2\theta$  ( $^\circ$ ) = 5,7, 7,9, 8,3, 8,9, 9,2, 11,5, 12,5, 13,1, 15,8, 16,3, 16,7, 17,2, 17,9, 18,5 y 19,5.

Como resultado del análisis de DSC de los cristales obtenidos en la etapa 3 del ejemplo 1, la temperatura de inicio de un pico endotérmico fue de 253  $^\circ$ C.

Ejemplo 2

Síntesis de metanosulfonato de ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino)etil]benzoico (Ia)

[Fórm. quím. 16]



A una mezcla de ácido 4-[(1S)-1-({[4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil}amino)etil]benzoico (I) (1000,0 mg) y dioxano (30 ml) se le añadió ácido metanosulfónico (140  $\mu$ l) bajo enfriamiento con hielo. Se calentó la mezcla obtenida hasta 90 °C y se agitó durante 1 hora. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se recogió el sólido precipitado mediante filtración para obtener metanosulfonato de ácido 4-[(1S)-1-({[4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil}amino)etil]benzoico (Ia) como cristales (1030 mg).

10 ESI+: 493, 495

RMN-DMSO- $d_6$ : 9,32 (1H, s), 9,27 (1H, d, J=7,7 Hz), 8,17 (1H, d, J=7,9 Hz), 7,95 (1H, d, J=7,9 Hz), 7,90-7,79 (1H, m), 7,77-7,66 (3H, m), 7,59 (1H, s), 7,40 (2H, d, J=7,8 Hz), 5,71-5,54 (2H, m), 5,16-5,00 (1H, m), 2,33 (3H, s), 2,17 (3H, s), 1,37 (3H, d, J=7,1 Hz).

15

Análisis elemental: Calc. para  $C_{24}H_{21}BrN_4O_3 \cdot CH_4O_3S$ : C, 50,94; H, 4,27; N, 9,50; S, 5,44; Br, 13,56.

Hallado: C, 50,65; H, 4,25; N, 9,36; S, 5,41; Br, 13,42.

20 Como resultado obtenido al someter los cristales obtenidos en el ejemplo 2 a medición de difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo, se obtuvo un diagrama que incluye picos a  $2\theta$  (°) = 4,7, 9,5, 12,0, 13,2, 13,7, 15,3, 18,8, 20,3, 20,9 y 22,8.

25 Como resultado del análisis de DSC de los cristales obtenidos en el ejemplo 2, la temperatura de inicio de un pico endotérmico fue de 192 °C.

### Aplicabilidad industrial

30 El compuesto A o una sal del mismo tiene una acción antagonista del receptor EP4 y puede usarse como principio activo de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.

**REIVINDICACIONES**

1. Ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino]etil]benzoico o sal del mismo.
2. Compuesto según la reivindicación 1, que es metanosulfonato de ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino]etil]benzoico.
3. Compuesto según la reivindicación 2, que es un cristal de metanosulfato de ácido 4-[(1S)-1-([4-bromo-1-(isoquinolin-3-ilmetil)-3-metil-1H-pirazol-5-il]carbonil)amino]etil]benzoico.
4. Compuesto según la reivindicación 3, que es un cristal que tiene una temperatura de inicio de un pico endotérmico en análisis de DSC de 192 °C, y que tiene picos a  $2\theta$  (°) = 4,7, 9,5, 12,0, 13,2, 13,7, 15,3, 18,8, 20,3, 20,9 y 22,8 en difracción de rayos X de polvo usando Cu como tubo.
5. Composición farmacéutica que comprende el compuesto o una sal del mismo según la reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Composición farmacéutica que comprende el cristal según la reivindicación 3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. Compuesto o sal del mismo según las reivindicaciones 1-4 o composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 6, para su uso en un método para prevenir o tratar insuficiencia renal crónica y/o nefropatía diabética.