

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 428**

51 Int. Cl.:

C07D 239/70 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2015 PCT/EP2015/067501**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016365**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015 E 15744229 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3174861**

54 Título: **Dihidropirimidinonas bicíclicas sustituidas y su uso como inhibidores de la actividad de la elastasa de neutrófilos**

30 Prioridad:

31.07.2014 EP 14179288

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

05.02.2020

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)**

**Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**OOST, THORSTEN;
ANDERSKEWITZ, RALF;
GNAMM, CHRISTIAN;
HOESCH, HOLGER;
MORSCHHAEUSER, GERD;
PETERS, STEFAN y
RIES, UWE JOERG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

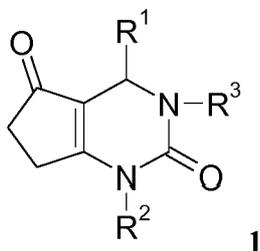
ES 2 740 428 T3

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

Dihidropirimidinonas bicíclicas sustituidas y su uso como inhibidores de la actividad de la elastasa de neutrófilos

5 La presente invención se refiere a dihidropirimidinonas bicíclicas sustituidas de fórmula 1



10 y los compuestos para su uso como inhibidores de la actividad de la elastasa de neutrófilos, a composiciones farmacéuticas que contienen las mismas, y a los compuestos para su uso como agentes para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades pulmonares, gastrointestinales y genitourinarias, enfermedades inflamatorias de la piel y los ojos y otros trastornos autoinmunitarios y alérgicos, rechazo de aloinjertos y enfermedades oncológicas.

15 Información de antecedentes

- Las siguientes referencias describen inhibidores de la elastasa de neutrófilos con un núcleo de dihidropirimidinona monocíclica: GB2392910, WO04024700, WO05082864, WO05082863, DE102006031314, US100010024, WO10115548, WO09080199, DE102007061766, WO06136857, WO06082412, WO12002502.
- Las siguientes referencias describen inhibidores de la elastasa de neutrófilos con un núcleo de tetrahidropirrolpirimidinadiona bicíclica: WO07129060, WO08135537, US090093477, WO09013444, WO09060206, WO09060203, WO09060158, US110034433.
- Las siguientes referencias describen inhibidores de la elastasa de neutrófilos con estructuras de núcleo distintas a las mencionadas anteriormente en el presente documento: WO04020412, WO04020410, WO03053930, WO10078953, WO09135599, DE102009004197, WO11110858, WO11110859, WO09060158, WO09037413, WO04024701, US130065913, WO13018804, WO12002502, US 2014/0171414, WO14009425, WO2014029831, WO2014029832 y WO2014029830, WO14122160, WO14135414.
- Para una revisión de diversos inhibidores de la elastasa de neutrófilos, véase: P. Sjö (*Future Med. Chem.* 2012, 4, 651-660).

30 Breve resumen de la invención

La elastasa de neutrófilos (EN) es una serina proteasa de 29 kDa. Se expresa en células precursoras de la médula ósea, se almacenan en los gránulos de los granulocitos de sangre periférica en altas concentraciones y se libera tras la activación celular. A los sustratos de la EN pertenecen elementos importantes de la matriz extracelular (MEC): elastina, fibronectina, laminina, colágeno y proteoglicanos. La actividad de la elastasa de neutrófilos conduce a la degradación de la ECM, aumenta la migración y la quimiotaxis de los monocitos y las células del músculo liso vascular y afecta directamente a los componentes de las vías de la coagulación y fibrinolítica (PAI-1 y TFPI). El aumento de la actividad de la elastasa de neutrófilos se asocia a enfermedades fibróticas e inflamatorias crónicas de varios órganos. El potencial de los inhibidores de la elastasa de neutrófilos como terapias antiinflamatorias se ha revisado por P. A. Henriksen en *Current Opinion in Hematology* 2014, 21,23-28. Los inhibidores de la elastasa de neutrófilos, por tanto, tendrán un papel importante en el tratamiento de diferentes enfermedades como la EPOC, la fibrosis pulmonar idiopática y otras enfermedades fibróticas, el cáncer, la lesión pulmonar aguda, el síndrome de dificultad respiratoria aguda, la bronquiectasia, la fibrosis quística, la deficiencia de alfa1-antitripsina y otras.

45 El problema de la presente invención es preparar nuevos compuestos que, sobre la base de su eficacia farmacéutica como inhibidores de la actividad de la elastasa de neutrófilos, se puedan usar terapéuticamente, es decir, para el tratamiento de procesos fisiopatológicos provocados por la actividad aumentada de la elastasa de neutrófilos.

50 Se ha descubierto sorprendentemente que los compuestos de la presente invención tienen las siguientes propiedades que son ventajosas en vista de las indicaciones de la presente invención.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, son eficaces como inhibidores de la elastasa de neutrófilos y presentan una potencia inhibitoria favorable, como se determina mediante la concentración inhibitoria semimáxima (CI₅₀), en un ensayo de inhibición enzimática.

55 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, son adicionalmente eficaces como inhibidores de la proteinasa de serina proteasa de neutrófilos 3 y presentan potencia

inhibidora favorable, como se determina mediante la concentración inhibitoria semimáxima (CI₅₀), en un ensayo de inhibición enzimática. Esta actividad inhibitoria sobre una segunda serina proteasa de neutrófilos puede ser beneficiosa para la eficacia farmacológica.

5 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una potencia inhibitoria favorable, como se determina mediante la concentración eficaz semimáxima (CE₅₀), en un ensayo en plasma o sangre completa, por ejemplo, como se describe en T. Stevens et al. (*J. Pharm. Exp. Ther.* 2011, 339, 313-320).

10 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una potencia favorable in vivo, como se determina, por ejemplo, mediante la dosis eficaz semimáxima (DE₅₀), en modelos de lesión pulmonar inducida por elastasa de neutrófilos humanos en ratón o rata, por ejemplo, como se describe en Tremblay et al. (*Chest* 2002, 121, 582-588) o T. Stevens et al. (*J. Pharm. Exp. Ther.* 2011, 339, 313-320).

15 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una estabilidad metabólica favorable en un ensayo microsómico in vitro para determinar la estabilidad metabólica como se describe en E. Kerns y L. Di (*Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*, Elsevier, 1ª ed., 2008), capítulo 29 y las referencias en el mismo.

20 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una estabilidad metabólica favorable en un ensayo de hepatocitos in vitro para determinar la estabilidad metabólica como se describe en E. Kerns y L. Di (*Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*, Elsevier, 1ª ed., 2008), capítulo 29 y las referencias en el mismo.

25 Se espera que una estabilidad metabólica mejorada en un ensayo in vitro se traduzca en un aclaramiento (CL) reducido in vivo, porque se reduce la conversión metabólica en el hígado. Basándose en la ecuación farmacocinética $CL/F_{oral} = \text{dosis}/ABC$ (F_{oral} : biodisponibilidad oral, ABC: área bajo la curva), se espera que un aclaramiento reducido in vivo conduzca a una mayor exposición sistémica normalizada por la dosis (ABC) del fármaco.

30 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una permeabilidad favorable en un método de capa de células Caco-2 in vitro para determinar la permeabilidad como se describe en E. Kerns y L. Di (*Druglike properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*, Elsevier, 1ª ed., 2008), capítulo 26 y las referencias en el mismo. Para un fármaco oral, se espera que la permeabilidad mejorada se traduzca en una mayor fracción del fármaco absorbida en el tracto intestinal, dando como resultado, por tanto, una exposición sistémica normalizada por la dosis (ABC) más alta.

40 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una relación de flujo de salida (permeabilidad en la dirección de flujo de salida dividida por la permeabilidad en la dirección de flujo de entrada) favorable, es decir, baja, en un método de capa de células Caco-2 o MDCK in vitro como se describe en E. Kerns y L. Di (*Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*, Elsevier, 1ª ed., 2008), capítulos 26 y 27 y las referencias en el mismo. Para un fármaco oral, se espera que una relación de flujo de salida mejorada, es decir, reducida, se traduzca en una fracción más alta del fármaco absorbido en el tracto intestinal, dando como resultado, por tanto, una exposición sistémica normalizada por la dosis (ABC) más alta.

50 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una solubilidad acuosa favorable en un método de solubilidad cinética o termodinámica como se describe en E. Kerns y L. Di (*Druglike properties: concepts, 15 structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*, Elsevier, 1ª ed., 2008), capítulo 25 y las referencias en el mismo. Para un fármaco oral, se espera que la solubilidad acuosa mejorada se traduzca en una fracción más alta del fármaco absorbido en el tracto intestinal, dando como resultado una exposición sistémica normalizada por la dosis (ABC) y/o una biodisponibilidad oral (F_{oral}) y/o una concentración plasmática máxima después de la administración ($C_{máx}$) más altas. Además, se espera que la solubilidad acuosa mejorada reduzca el riesgo de problemas de desarrollo, tales como formulaciones caras, aumento del tiempo de desarrollo y alta carga de fármaco.

60 Una exposición sistémica normalizada con la dosis (ABC) comparativamente más alta puede ser ventajosa de varias maneras: (1) Si se necesita conseguir una determinada exposición sistémica (ABC) para la eficacia, el fármaco puede dosificarse en una cantidad menor. Las dosificaciones más bajas tienen las ventajas de una menor carga de fármaco (fármaco parental y metabolitos del mismo) para el paciente, lo que provoca potencialmente menos efectos secundarios, y menores costes de producción para el producto farmacológico. (2) Una exposición sistémica normalizada por la dosis (ABC) comparativamente más alta puede conducir a una eficacia aumentada o a una duración prolongada de la acción del fármaco cuando se aplica la misma dosis.

65 Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables,

presentan una estabilidad metabólica favorable, una permeabilidad favorable y una solubilidad acuosa favorable. En consecuencia, se espera que algunos compuestos de la presente invención presenten propiedades farmacocinéticas (FC) favorables después de la dosificación oral, en particular, una exposición sistémica favorable (área bajo la curva, ABC), conduciendo, por tanto, a una eficacia favorable in vivo.

Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan propiedades farmacocinéticas (FC) favorables. Las propiedades FC pueden determinarse en especies animales preclínicas, por ejemplo, ratón, rata, hámster, perro, cobaya, mini cerdo, macaco, mono rhesus. Las propiedades FC de un compuesto pueden describirse, por ejemplo, mediante los siguientes parámetros: tiempo de residencia medio (TRM), semivida de eliminación ($t_{1/2}$), volumen de distribución (V_D), área bajo la curva (ABC), aclaramiento (CL) y biodisponibilidad después de la administración oral (F_{oral}), concentración plasmática máxima después de la administración ($C_{máx}$), tiempo para alcanzar la $C_{máx}$ ($T_{máx}$).

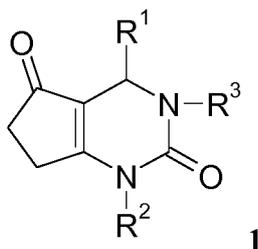
Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una inhibición favorable, es decir, baja, de las isozimas del citocromo P450 (CYP) en los correspondientes ensayos in vitro para determinar la inhibición de las isoenzimas del CYP como se describe en E. Kerns y L. Di (*Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*, Elsevier, 1ª ed, 2008), el capítulo 32 y las referencias en el mismo. Se espera que la inhibición reducida de las isoenzimas del CYP se traduzca en un menor riesgo de interacciones fármaco-fármaco indeseables que es la interferencia de un fármaco con el comportamiento metabólico o farmacocinético normal de un fármaco coadministrado.

Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan un potencial de inducción del citocromo P450 (CYP) favorable, es decir, bajo. La inducción del CYP puede afectar a la farmacocinética de una molécula de fármaco tras dosis múltiples, lo que puede dar como resultado interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco indeseables con fármacos coadministrados. La inducción de CYP puede conducir a una exposición reducida del compuesto inductor (por ejemplo, autoinducción) o una exposición reducida de un compuesto coadministrado metabolizado por la enzima inducida. La inducción del CYP también puede conducir a un aumento en el metabolismo de un fármaco provocando cambios en los resultados farmacológicos (metabolito activo) y toxicológico (metabolito tóxico).

Algunos compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo las sales fisiológicamente aceptables, presentan una inhibición favorable, es decir, baja, del canal hERG en un ensayo de pinzamiento zonal como se describe en E. Kerns y L. Di (*Druglike properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*, Elsevier, 1ª ed., 2008), capítulo 34 y las referencias citadas en el mismo.

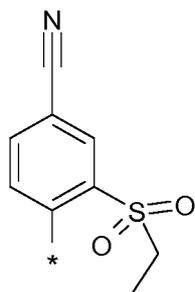
Descripción detallada de la invención

Un compuesto de fórmula 1

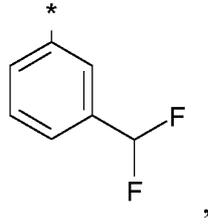


en la que

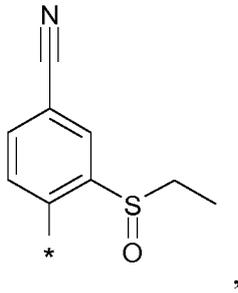
R^1 es



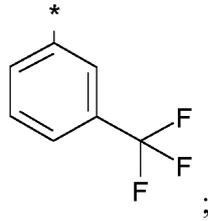
R² es



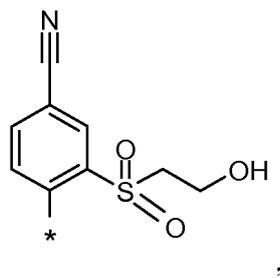
5 y R³ es H;
o
R¹ es



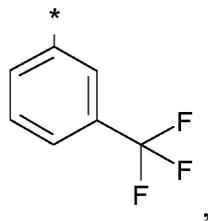
10 R² es



15 y R³ es CH₃;
o
R¹ es



20 R² es



25 y R³ es CH₃;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

TÉRMINOS Y DEFINICIONES UTILIZADOS

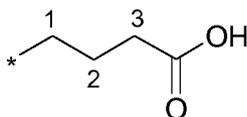
Los términos que no se definen específicamente en el presente documento deben tener los significados que les daría un experto en la materia a la luz de la divulgación y el contexto. Sin embargo, como se usan en la memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado y se cumplen las siguientes convenciones.

En los grupos, radicales o restos que se definen a continuación, el número de átomos de carbono se especifica con frecuencia precediendo al grupo, por ejemplo, alquilo C₁₋₆ significa un grupo alquilo o radical que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

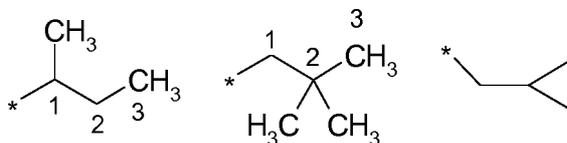
En general, en grupos individuales como HO, H₂N, S(O), S(O)₂, NC (ciano), HOOC, F₃C o similares, el experto en la materia puede ver el punto o puntos de unión del radical a la molécula a partir de las valencias libres del propio grupo. Para grupos combinados que comprenden dos o más subgrupos, el último subgrupo nombrado es el punto de unión del radical, por ejemplo, el sustituyente "aril-alquilo C₁₋₃-" significa un grupo arilo que está unido a un grupo alquilo C₁₋₃, el último de los cuales está unido al núcleo o al grupo al que se une el sustituyente.

En caso de que un compuesto de la presente invención se represente en forma de un nombre químico y como una fórmula, en caso de cualquier discrepancia, prevalecerá la fórmula. Puede usarse un asterisco en las subfórmulas para indicar el enlace que está conectado a la molécula central según se define.

Por ejemplo, la expresión "grupo 3-carboxipropilo" representa el siguiente sustituyente:



en el que el grupo carboxi está unido al tercer átomo de carbono del grupo propilo. Las expresiones grupo "1-metilpropil-", "2,2-dimetilpropil-" o "ciclopropilmetil-" representan los siguientes grupos:



El asterisco puede usarse en las subfórmulas para indicar el enlace que está conectado a la molécula central según se define.

Muchos de los siguientes términos pueden usarse repetidamente en la definición de una fórmula o grupo y, en cada caso, tienen uno de los significados proporcionados anteriormente, independientemente uno del otro.

El término "sustituido" como se usa en el presente documento, significa que uno o más hidrógenos en el átomo designado se reemplazan con una selección entre el grupo indicado, a condición de que no se exceda la valencia normal del átomo designado y de que la sustitución dé como resultado un compuesto estable.

Las expresiones "prevención", "profilaxis", "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" utilizadas en el presente documento deben entenderse como sinónimos y en el sentido de que el riesgo de desarrollar una afección mencionada anteriormente en el presente documento se reduce, especialmente en un paciente que tiene un riesgo elevado de desarrollar dichas afecciones o una anamnesis correspondiente, por ejemplo, un riesgo elevado de desarrollar un trastorno metabólico tal como la diabetes o la obesidad u otro trastorno mencionado en el presente documento. Por tanto, la expresión "prevención de una enfermedad" como se usa en el presente documento significa el tratamiento y el cuidado de un individuo en riesgo de desarrollar la enfermedad antes del inicio clínico de la enfermedad. El propósito de la prevención es combatir el desarrollo de la enfermedad, afección o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas o complicaciones y para prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades, afecciones o trastornos relacionados. El éxito de dicho tratamiento preventivo se refleja estadísticamente mediante la incidencia reducida de dicha afección en una población de pacientes con riesgo de desarrollar esta afección en comparación con una población de pacientes equivalente sin tratamiento preventivo.

La expresión "tratamiento" o "terapia" significa el tratamiento terapéutico de pacientes que ya hayan desarrollado una o más de dichas afecciones de forma manifiesta, aguda o crónica, incluyendo el tratamiento sintomático con el fin de aliviar los síntomas de la indicación específica o el tratamiento causal con el fin de revertir o revertir parcialmente la afección o retrasar la progresión de la indicación en la medida de lo posible, dependiendo de la

afección y de la gravedad de la misma. Por tanto, la expresión "tratamiento de una enfermedad", como se usa en el presente documento, significa el tratamiento y el cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, afección o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, afección o trastorno, así como para aliviar los síntomas o complicaciones asociados a la enfermedad, afección o trastorno.

A menos que se indique específicamente, a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, una fórmula o un nombre químicos dados deberán incluir los tautómeros y todos los estereoisómeros, los isómeros ópticos y los isómeros geométricos (por ejemplo, enantiómeros, diastereómeros, isómeros E/Z, etc...) y los racematos de los mismos, así como mezclas en diferentes proporciones de los enantiómeros separados, mezclas de diastereómeros o mezclas de cualquiera de las formas anteriores donde existen dichos isómeros y enantiómeros, así como sales, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y solvatos de los mismos, tales como, por ejemplo, hidratos incluyendo solvatos de los compuestos libres o solvatos de una sal del compuesto.

Se apreciará que los compuestos de la presente invención contienen al menos un átomo de carbono sustituido asimétricamente y, por tanto, pueden aislarse en forma de enantiómeros puros o en forma de una mezcla racémica o no racémica de ambos enantiómeros. Se apreciará que algunos de los compuestos de la presente invención contienen más de un centro estereogénico, es decir, más de un átomo de carbono o de azufre asimétricamente sustituido y, por tanto, pueden aislarse en forma de diastereómeros puros o en forma de mezclas diastereoméricas, tanto en formas ópticamente activas o racémicas.

La invención contempla todos los estereoisómeros concebibles, en particular los diastereómeros y enantiómeros que se mencionan en el presente documento, por ejemplo, en forma sustancialmente pura, en forma enriquecida (por ejemplo, sustancialmente libre de cualquiera o todos los demás enantiómeros y/o diastereómeros no deseados) y/o en cualquier relación de mezcla, incluyendo las formas racémicas, así como las sales de los mismos.

En general, pueden obtenerse estereoisómeros sustancialmente puros de acuerdo con los principios de síntesis conocidos para un experto en el campo, por ejemplo, mediante separación de mezclas correspondientes, mediante el uso de materiales de partida estereoquímicamente puros y/o mediante síntesis estereoselectiva. Se sabe en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante síntesis, por ejemplo, a partir de materiales de partida ópticamente activos y/o mediante el uso de reactivos quirales.

Pueden prepararse compuestos enantioméricamente puros de la presente invención o intermedios mediante síntesis asimétrica, por ejemplo, mediante preparación y posterior separación de compuestos diastereoméricos o intermedios apropiados que pueden separarse mediante métodos conocidos (por ejemplo, mediante separación cromatográfica o cristalización) y/o mediante el uso de reactivos quirales, tales como materiales de partida quirales, catalizadores quirales o auxiliares quirales.

Adicionalmente, el experto en la materia sabe cómo preparar compuestos enantioméricamente puros a partir de las mezclas racémicas correspondientes, tal como mediante la separación cromatográfica de las mezclas racémicas correspondientes en fases estacionarias quirales; o mediante resolución de una mezcla racémica usando un agente de resolución apropiado, por ejemplo, por medio de la formación de sal diastereomérica del compuesto racémico con ácidos o bases ópticamente activos, resolución posterior de las sales y liberación del compuesto deseado de la sal; o mediante derivatización de los compuestos racémicos correspondientes con reactivos auxiliares quirales ópticamente activos, posterior separación del diastereómero y retirada del grupo auxiliar quiral; o mediante resolución cinética de un racemato (por ejemplo, mediante resolución enzimática); mediante cristalización enantioselectiva de un conglomerado de cristales enantiomorfos en condiciones adecuadas; o mediante cristalización (fraccionada) en un disolvente adecuado en presencia de un auxiliar quiral ópticamente activo.

El término halógeno generalmente denota flúor, cloro, bromo y yodo.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con tejidos humanos y de animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, y proporcionados en una relación de beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos desvelados en los que el compuesto parental se modifica haciendo sales de ácido o base del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales de ácidos minerales u orgánicos de restos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Por ejemplo, dichas sales incluyen sales de amoníaco, L-arginina, betaína, benetamina, benzetamina, hidróxido de calcio, colina, deanol, dietanolamina (2,2'-iminobis(etanol)), dietilamina, 2-(dietilamino)-etanol, 2-aminoetanol, etilendiamina, N-etil-glucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, lisina, hidróxido de magnesio, 4-(2-hidroxi-etil)-morfolina, piperazina, hidróxido de potasio, 1-(2-hidroxi-etil)-piperidina, hidróxido de sodio, trietanolamina (2,2',2''-nitrilotris-(etanol)), trometamina, hidróxido de cinc, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido L-aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 2,5-

dihidroxibenzoico, ácido 4-acetamido-benzoico, ácido (+)-canfórico, ácido (+)-canfor-10-sulfónico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido decanoico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido etilendiaminotetraacético, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido D-glucoheptónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, glicina, ácido glicólico, ácido hexanoico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido isobutírico, ácido DL-láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, lisina, ácido maleico, ácido (-)-L-málico, ácido malónico, ácido DL-mandélico, ácido metanosulfónico, ácido galactárico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido octanoico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico (ácido embónico), ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido (-)-L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido 4-amino-salicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tánico, ácido (+)-L-tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico y ácido undecilénico. Se pueden formar otras sales farmacéuticamente aceptables con cationes de metales como aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, cinc y similares. (Véase también *Pharmaceutical salts*, Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci., (1977), 66, 1-19).

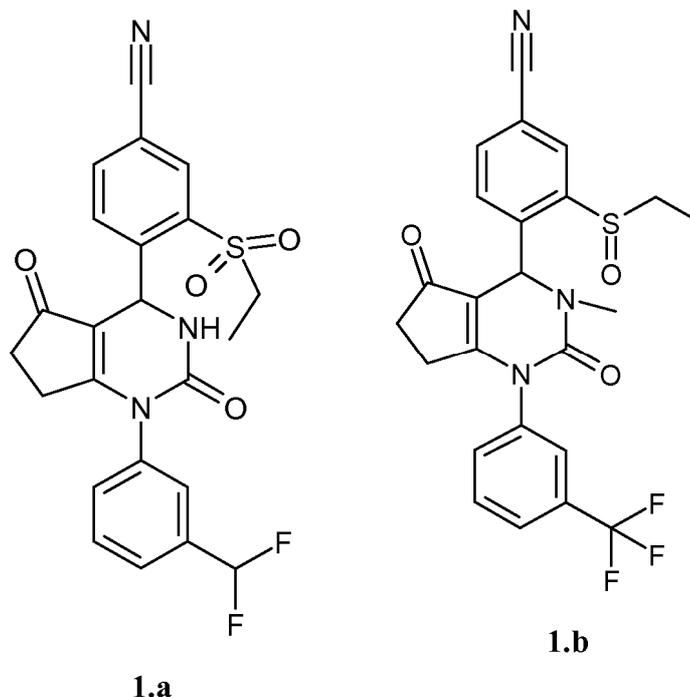
Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con una cantidad suficiente de la base o ácido apropiados en agua o en un diluyente orgánico como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo o mezcla de los mismos.

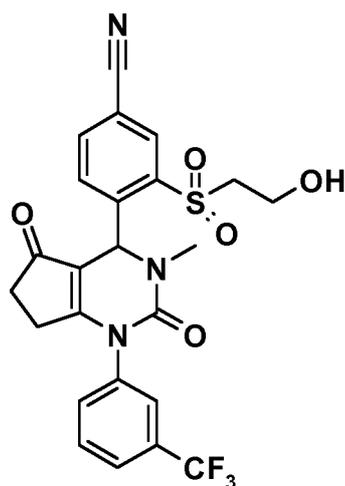
Las sales de otros ácidos distintos de los mencionados anteriormente que, por ejemplo, son útiles para purificar o aislar los compuestos de la presente invención (por ejemplo, sales de trifluoroacetato) también comprenden una parte de la invención.

Por el término "halo" añadido a un grupo "alquilo", "alquilen" o "cicloalquilo" (saturado o insaturado) se entiende un grupo alquilo o cicloalquilo de este tipo en el que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados por un átomo de halógeno seleccionado entre flúor, cloro o bromo, preferentemente flúor y cloro, se prefiere en particular el flúor. Los ejemplos incluyen: H_2FC- , HF_2C- , F_3C- .

REALIZACIONES

Se incorporan los compuestos anteriores de fórmula 1, seleccionados entre el grupo que consiste en los compuestos 1.a a 1.c.

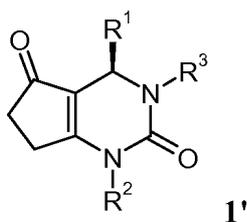




1.c

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

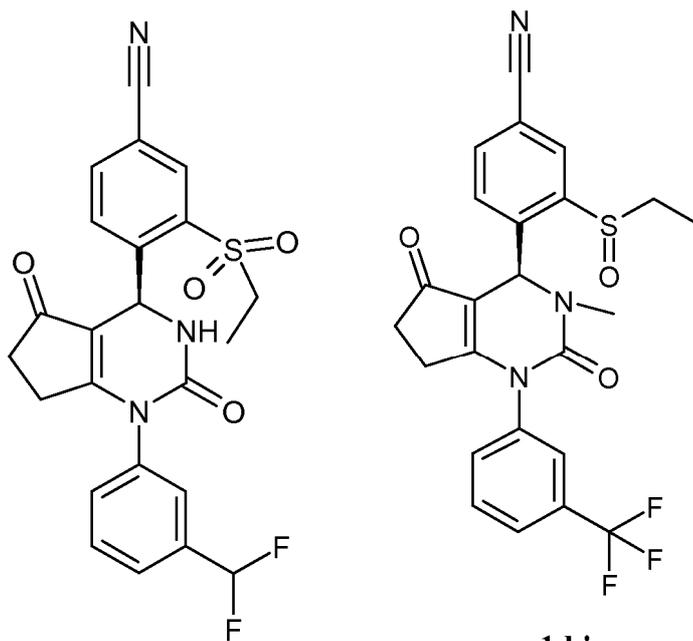
- 5 Se incorporan los compuestos anteriores de fórmula 1, en la que la configuración de la fórmula 1 es la fórmula 1'



1'

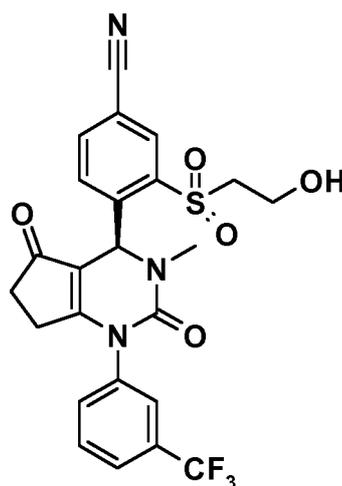
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 10 Se incorporan los compuestos anteriores de fórmula 1', seleccionados entre el grupo que consiste en los compuestos 1.a' a 1.c'



1.a'

1.b'



1.c'

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 5 Se incorporan los compuestos anteriores de fórmula 1, en los que los compuestos se seleccionan entre el grupo que consiste en los ejemplos B.1.2B, C5.1, C.5.2 y D.5A o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otra realización de la invención es un compuesto anterior de fórmula 1 para su uso como medicamento.

- 10 Una realización adicional de la invención es un compuesto anterior de fórmula 1 para su uso como medicamento para el tratamiento del asma y enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias gastrointestinales, glomerulonefritis, enfermedades eosinofílicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección por microbios patógenos y artritis reumatoide.

- 15 Una realización adicional de la invención es un compuesto anterior de fórmula 1 para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades neutrofilicas, fibrosis quística (FQ), fibrosis no quística, fibrosis pulmonar idiopática, bronquiectasia, vasculitis asociada a ACAN, cáncer de pulmón, bronquiectasia por fibrosis no quística, enfisema, bronquitis crónica, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), hipertensión pulmonar, hipertensión arterial pulmonar (HAP) y deficiencia de alfa-1-antitripsina (DAAT).

- 20 Una realización adicional de la invención es un compuesto anterior de fórmula 1 para su uso como medicamento para el tratamiento de la obesidad y la inflamación relacionada, la resistencia a la insulina, la diabetes, el hígado graso y la esteatosis hepática.

- 25 Una realización adicional de la presente invención es un compuesto anterior de fórmula 1, para su uso como fármaco para el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico, aneurisma aórtico abdominal y enfermedad de injerto contra hospedador (EICH).

- 30 Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica, que contiene uno o más de los compuestos anteriores de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente activa de los mismos.

- 35 Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un compuesto anterior de fórmula 1, un compuesto farmacéuticamente activo seleccionado entre el grupo que consiste en betamiméticos, anticolinérgicos, corticoesteroides, inhibidores de PDE4, antagonistas de LTD4, inhibidores de EGFR, inhibidores de catepsina C, inhibidores de CRTH2, inhibidores de 5-LO, antagonistas de los receptores de histamina e inhibidores de SYK, pero también combinaciones de dos o tres sustancias activas.

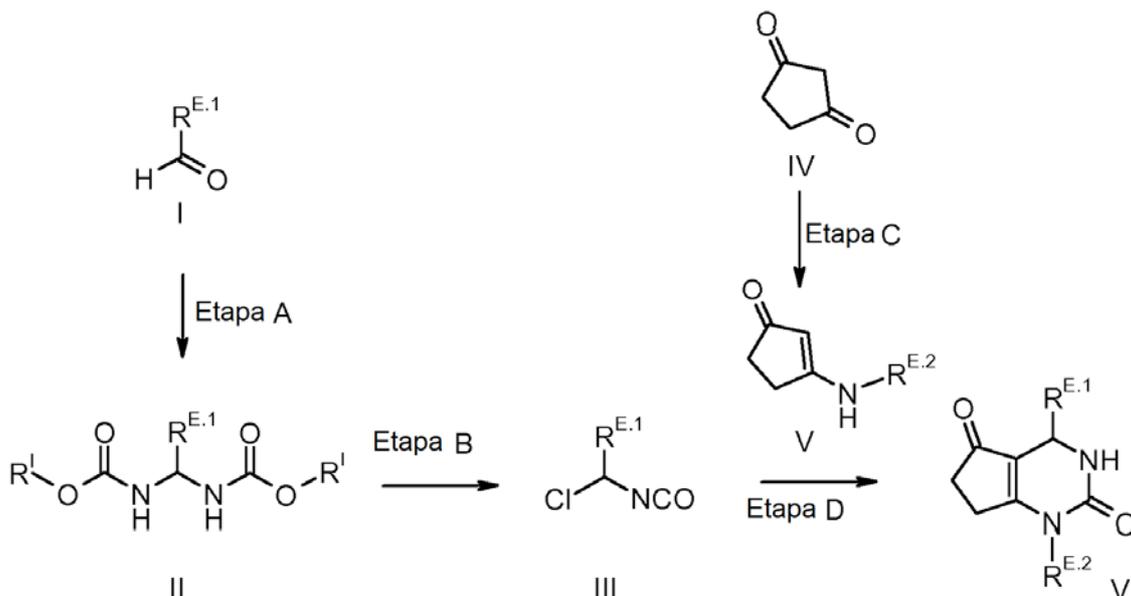
PREPARACIÓN

- 40 Los compuestos de acuerdo con la presente invención y sus intermedios pueden obtenerse usando métodos de síntesis que son conocidos por los expertos en la materia y se describen en la bibliografía de síntesis orgánica. Preferentemente, los compuestos se obtienen de manera análoga a los métodos de preparación que se explican más detalladamente a continuación, en particular como se describe en la sección experimental. En algunos casos, el orden de realización de las etapas de reacción puede variar. También pueden usarse variantes de los métodos de reacción que son conocidos por los expertos en la materia pero que no se describen en detalle en el presente documento. Los procesos generales para preparar los compuestos de acuerdo con la invención serán evidentes para los expertos en la materia que estudian los siguientes esquemas. Los materiales de partida están disponibles

en el mercado o pueden prepararse mediante métodos que se describen en la bibliografía o en el presente documento, o pueden prepararse de una manera análoga o similar. Cualquier grupo funcional en los materiales de partida o intermedios puede protegerse usando grupos protectores convencionales. Estos grupos protectores pueden escindirse nuevamente en una etapa adecuada dentro de la secuencia de reacción usando métodos familiares para el experto en la materia.

Los compuestos de la invención que entran en la fórmula VI son accesibles usando la vía de síntesis que se ilustra en el Esquema 1; R^I , $R^{E.1}$, $R^{E.2}$ tienen los significados que se han definido anteriormente en el presente documento antes y que se definen en lo sucesivo en el presente documento.

ESQUEMA 1



Los intermedios II (Etapa A, intermedio I \rightarrow intermedio II) pueden prepararse como se describe en Vovk et al. (*Synlett* 2006, 3, 375-378) o en el documento PL2004/369.318, por calentamiento de un aldehído alifático o aromático I con un carbamato, por ejemplo, carbamato de metilo, carbamato de etilo (uretano) o carbamato de bencilo en presencia de un ácido fuerte de Bronsted o un ácido de Lewis, por ejemplo, ácido sulfúrico, cloruro de hidrógeno, ácido *p*-toluenosulfónico, Amberlyst 15, ácido tetrafluorobórico, ácido trifluoroacético o trifluoruro de boro, ya sea sin disolvente como una masa fundida o en un disolvente adecuado, tal como benceno, tolueno, acetonitrilo, dietil éter, cloroformo, anhídrido acético o mezclas de los mismos. La reacción tiene lugar en 1 a 24 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre la temperatura ambiente y 160 °C, o el punto de ebullición del disolvente, respectivamente. Preferentemente, la reacción se realiza con carbamato de etilo fundido como reactivo y una cantidad catalítica de ácido sulfúrico concentrado a temperaturas de 140-160 °C sin ningún disolvente adicional.

La cloración (Etapa B, intermedio II \rightarrow intermedio III) puede hacerse como se describe en Vovk et al. (*Synlett* 2006, 3, 375-378) y Sinitza et al. (*J. Org. Chem.* Unión Soviética 1978, 14, 1107) por calentamiento del intermedio II junto con un agente de cloración, por ejemplo, pentacloruro fosforoso, cloruro de fosforilo, cloruro de sulfurilo en un disolvente orgánico, por ejemplo, benceno o tolueno. La reacción tiene lugar en 1 a 24 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 50 °C y 150 °C.

Como alternativa, los intermedios III pueden prepararse como se describe en Jochims et al. (*Chem. Ber.* 1982, 115, 860-870) por α -halogenación de isocianatos alifáticos, por ejemplo, isocianato de bencilo, usando, por ejemplo, un agente de bromación, por ejemplo, *N*-bromosuccinimida. Los isocianatos pueden sintetizarse como se describe en el documento US6207665 y en Charalambides et al. (*Synth. Commun.* 2007, 37, 1037-1044), haciendo reaccionar un precursor de amina con fosgeno.

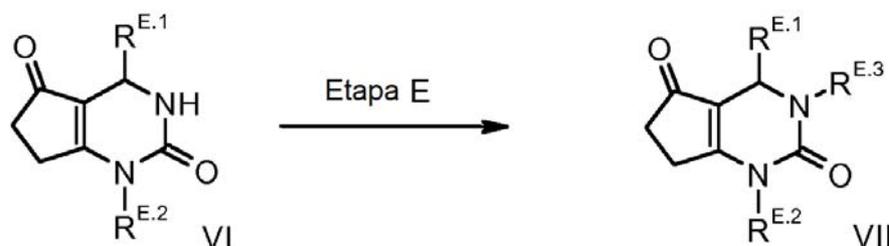
Los intermedios V (Etapa C, intermedio IV \rightarrow intermedios V) pueden prepararse como se describe en Chen et al. (*Synth. Commun.* 2010, 40, 2506-2510) y Tietcheu et al. (*J. Heterocyclic Chem.* 2002, 39, 965-973) haciendo reaccionar ciclopentano-1,3-diona (IV) y una amina alifática o aromática en presencia de un catalizador, por ejemplo, triflato de iterbio [$\text{Yb}(\text{OTf})_3$] o un ácido, por ejemplo, cloruro de hidrógeno, ácido acético o ácido *p*-toluenosulfónico, opcionalmente en un disolvente, por ejemplo, agua, ácido acético, acetonitrilo, benceno, tolueno. La reacción tiene lugar en 1-24 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre la temperatura ambiente y 120 °C, prefiriéndose mucho más la temperatura ambiente.

Como alternativa, los intermedios V pueden prepararse como se describe en Scott et al. (*J. Med. Chem.* 1993, 36, 1947-1955) por condensación directa del compuesto de 1,3-dicarbonilo con una amina alifática o aromática a reflujo en un disolvente adecuado, por ejemplo, benceno o tolueno con retirada azeotrópica de agua. Como alternativa, los intermedios V pueden prepararse como se describe en Mariano et al. (*J. Org. Chem.* 1984, 49, 220-228) haciendo reaccionar una amina alifática o aromática con 3-cloro-2-ciclopenten-1-ona, que puede prepararse a partir de ciclopentano-1,3-diona.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención (Etapa D, intermedios III \rightarrow compuestos de la invención VI) pueden prepararse como se describe en Vovk et al. (*Synlett* 2006, 3, 375-378), Vovk et al. (*Russ. J. Org. Chem.* 2010, 46, 709-715) y Kushnir et al. (*Russ. J. Org. Chem.* 2011, 47, 1727-1732) haciendo reaccionar los intermedios III con los intermedios V en un disolvente orgánico, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, benceno o tolueno. La reacción tiene lugar en 1-24 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 100 °C.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención que entran en la fórmula VII son accesibles a través de la vía de síntesis representada en el esquema 2; R^{E.1}, R^{E.2}, R^{E.3} tienen los significados que se han definido anteriormente en el presente documento antes y que se definen en lo sucesivo en el presente documento.

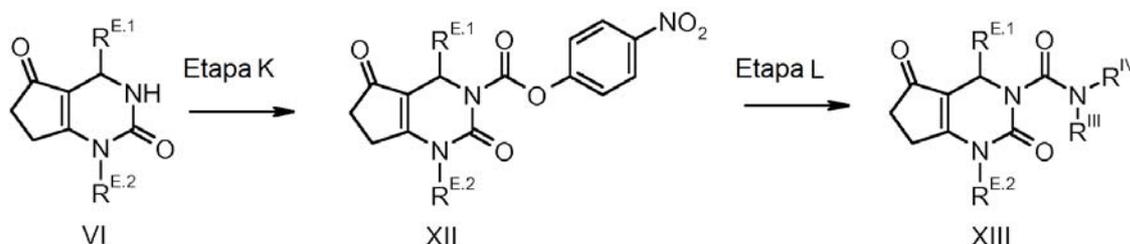
ESQUEMA 2



Los compuestos de la invención que entran en la fórmula VII (Etapa E, compuestos de la invención VI \rightarrow compuestos de la invención VII, R^{E.3} = alquilo o alquilo sustituido) pueden prepararse como se describe en el documento WO04024700 haciendo reaccionar los compuestos de la invención VI con un agente alquilante, por ejemplo, un sulfato de dialquilo, por ejemplo, sulfato de dimetilo, un haluro de alquilo, por ejemplo, yoduro de metilo o un sulfonilato de alquilo, por ejemplo, tosilato de bencilo, en presencia de una base adecuada, por ejemplo, hidruro de sodio, hidróxido de sodio, carbonato de cesio, diisopropilamida de litio, hexametildisilazida de potasio, hexametildisilazida de litio, un reactivo de organolitio, por ejemplo, *tert*-butil-litio o un reactivo de Grignard, por ejemplo, cloruro de isopropilmagnesio, en un disolvente orgánico, por ejemplo, tetrahidrofurano, *N,N*-dimetilformamida, acetonitrilo, 1,4-dioxano, diclorometano o tolueno. La reacción tiene lugar en 1-72 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 100 °C.

Los compuestos XIII son accesibles a través de las vías de síntesis representadas en el esquema 3; R^{III}, R^{IV}, R^{E.1}, R^{E.2} tienen los significados que se han definido anteriormente en el presente documento antes y que se definen en lo sucesivo en el presente documento.

ESQUEMA 3

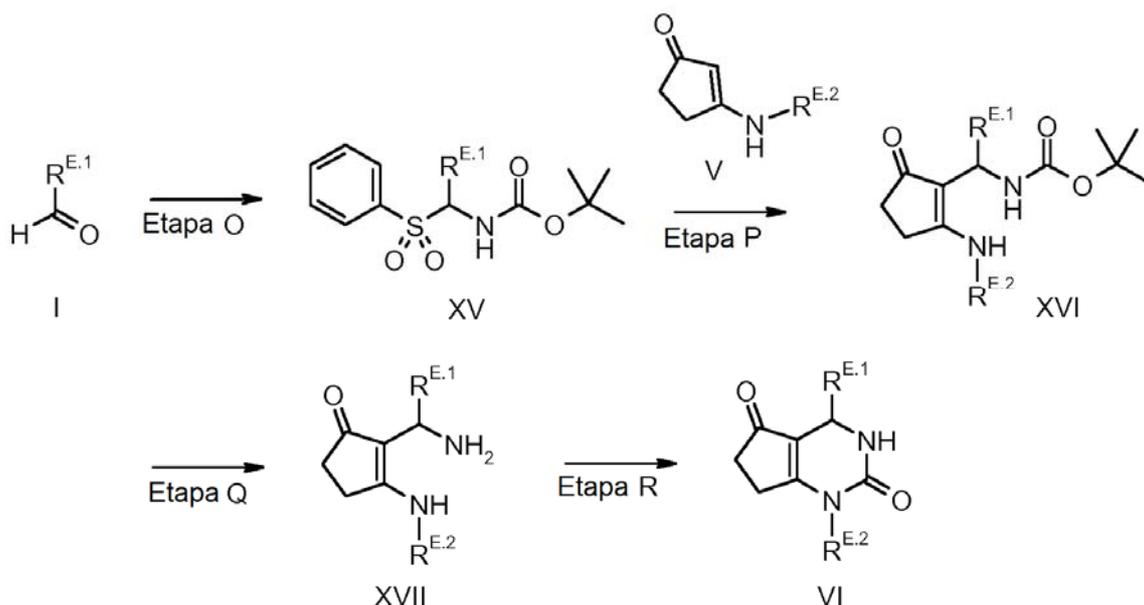


Los intermedios XII de carbamato de 4-nitrofenilo (Etapa K, compuestos de la invención \rightarrow intermedios XII VI) pueden prepararse como se describe en el documento WO09080199, haciendo reaccionar los compuestos de la invención VI con cloroformiato de 4-nitrofenilo en presencia de una base, por ejemplo, trietilamina, *N,N*-diisopropiletilamina o *N*-metilmorfolina, opcionalmente en presencia de un catalizador, por ejemplo, 4-dimetilaminopiridina en un disolvente orgánico, por ejemplo, diclorometano, tetrahidrofurano, acetonitrilo o *N,N*-dimetilformamida. La reacción tiene lugar en 1-24 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 50 °C, prefiriéndose mucho más la temperatura ambiente.

Los compuestos XIII (Etapa L, intermedios de carbamato de 4-nitrofenilo XII → compuestos de la invención XIII) pueden prepararse como se describe en el documento WO09080199, haciendo reaccionar los intermedios XII con una amina $R^{III}NH_2$ o $R^{III}R^{IV}NH$ en un disolvente orgánico, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, tolueno o *N,N*-dimetilformamida. La reacción tiene lugar en 1-72 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 50 °C, prefiriéndose mucho más la temperatura ambiente.

Además de la vía de síntesis representada en el Esquema 1, los compuestos de la invención que entran en la fórmula VI también son accesibles usando la vía de síntesis representada en el Esquema 4, $R^{E.1}$, $R^{E.2}$ tienen los significados que se han definido anteriormente en el presente documento antes y que se definen en lo sucesivo en el presente documento.

ESQUEMA 4



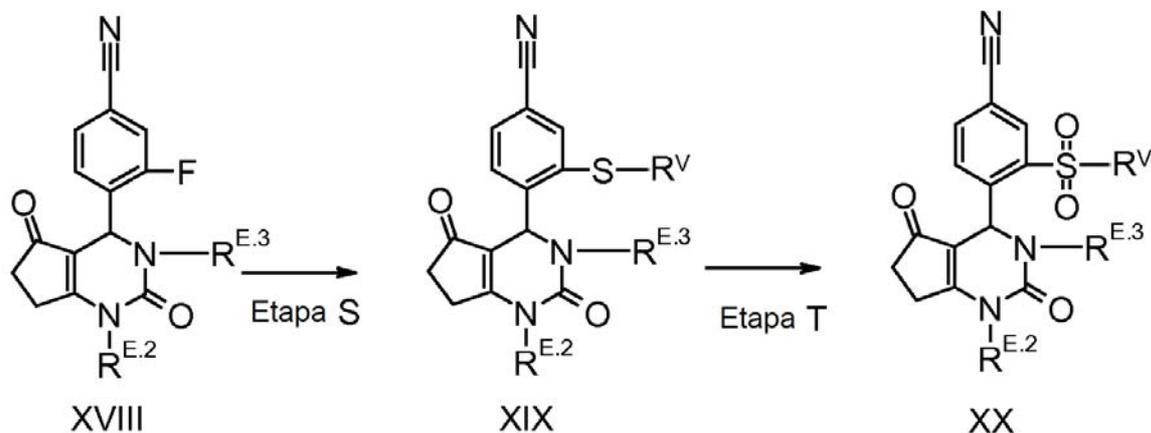
Los intermedios XV (Etapa O, intermedio I → intermedio XV) pueden prepararse como se describe en Best et al. (*J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 18193-18196) o en Yang et al. (*Org. Synth.* 2009, 86, 11-17), haciendo reaccionar un aldehído aromático I con un sulfinato adecuado, por ejemplo, ácido benzenosulfínico de sodio y un carbamato adecuado, por ejemplo, carbamato de metilo o carbamato de *tert*-butilo, en presencia de un ácido adecuado, por ejemplo, ácido fórmico, en un disolvente adecuado, por ejemplo, tetrahidrofurano, etanol, metanol o una mezcla de disolventes, por ejemplo, tetrahidrofurano y agua. Como alternativa, como se describe en Reingruber et al. (*Adv. Synth. Catal.* 2009, 351, 1019-1024) o en el documento WO06136305, puede usarse un ácido de Lewis adecuado, por ejemplo, cloruro de trimetilsililo, como ácido y puede usarse acetonitrilo o tolueno como disolvente. La reacción tiene lugar en 1-6 días. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 50 °C, prefiriéndose mucho más la temperatura ambiente.

Los intermedios XVI (Etapa P, intermedio XV → intermedio XVI) pueden prepararse de forma análoga al método que se describe para la preparación de los compuestos de la invención VI (Esquema 1, Etapa D, intermedio III → compuesto de la invención VI), haciendo reaccionar los intermedios XV con los intermedios V en presencia de una base adecuada, por ejemplo, hidruro de sodio o *tert*-butóxido de sodio, en un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo, tetrahidrofurano o 2-metiltetrahidrofurano. La reacción tiene lugar en 1-24 h. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 50 °C, prefiriéndose mucho más la temperatura ambiente. Los intermedios XVII (Etapa Q, intermedio XVI → intermedio XVII) pueden prepararse haciendo reaccionar los intermedios XVI con un ácido adecuado, por ejemplo, cloruro de hidrógeno, en un disolvente adecuado, por ejemplo, 1,4-dioxano. La reacción tiene lugar entre 1-72 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y la temperatura ambiente, prefiriéndose mucho más la temperatura ambiente.

Los compuestos de la invención que entran en la fórmula VI (Etapa R, intermedio XVII → compuesto de la invención VI) pueden prepararse como se describe en Csütörtöki et al. (*Tetrahedron Lett.* 2011, 67, 8564-8571) o en el documento WO11042145, haciendo reaccionar los intermedios XVII con un reactivo adecuado, por ejemplo, fosgeno, trifosgeno o carbonildiimidazol, en presencia de una base adecuada, por ejemplo, trietilamina, *N,N*-diisopropiletilamina, piridina o carbonato de sodio, en un disolvente adecuado, por ejemplo, acetonitrilo, diclorometano o tolueno. La reacción tiene lugar entre 1-72 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 50 °C, prefiriéndose mucho más la temperatura ambiente.

Los compuestos de la invención que entran en la fórmula XX son accesibles a través de las vías de síntesis representadas en el esquema 5; R^V, R^{E.2}, R^{E.3} tienen los significados que se han definido anteriormente en el presente documento antes y que se definen en lo sucesivo en el presente documento.

ESQUEMA 5



5

Los Intermedios XIX (Etapa S, compuestos XVIII \rightarrow compuestos XIX, R^{E.3} = H o alquilo) pueden prepararse haciendo reaccionar los fluoro intermedios XVIII con un tiol R^V-SH en presencia de una base adecuada, por ejemplo, hidruro de sodio, hidróxido de sodio, carbonato de cesio, diisopropilamida de litio, hexametildisilazida de potasio, hexametildisilazida de litio, un reactivo de organolitio, por ejemplo, *tert*-butil-litio o un reactivo de Grignard, por ejemplo, cloruro de isopropilmagnesio, en un disolvente orgánico, por ejemplo, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetonitrilo, 1,4-dioxano, diclorometano o tolueno. La reacción tiene lugar en 1-72 horas. Las temperaturas de reacción preferidas están entre 0 °C y 100 °C.

Los compuestos de la invención que entran en la fórmula XX pueden prepararse por oxidación de los intermedios de sulfuro XIX (Etapa T, intermedios XIX \rightarrow compuestos de la invención XX, R^{E.3} = H o alquilo) con un agente oxidante, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ácido 3-cloro-perbenzoico, ácido peryódico, peryodato de sodio, permanganato de potasio, aducto de urea-peróxido de hidrógeno, opcionalmente en presencia de un catalizador de metal, en un disolvente adecuado, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, metanol, etanol, agua o mezclas de los mismos. La reacción tiene lugar en 1-72 h. Las temperaturas de reacción preferidas están entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente empleado.

Los compuestos de la invención que llevan grupos sulfóxido pueden prepararse por oxidación de los intermedios sulfuro correspondiente con un agente oxidante, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ácido 3-cloro-perbenzoico, ácido peryódico, peryodato de sodio, hidroperóxido de *tert*-butilo, aducto de urea-peróxido de hidrógeno, opcionalmente en presencia de un catalizador metálico, por ejemplo, metiltrioxorrenio, FeCl₃, Sc(OTf)₃, complejos de titanio (IV), en un disolvente adecuado, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, etanol, metanol, agua o mezclas de los mismos. La reacción tiene lugar en 1-72 h. Las temperaturas de reacción preferidas están entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente empleado.

30

OBSERVACIONES PRELIMINARES

El término temperatura ambiente denota una temperatura de aproximadamente 20 °C. Como regla general, se han obtenido espectros de RMN ¹H y/o espectros de masas de los compuestos preparados. Los tiempos de retención proporcionados se miden en las siguientes condiciones (TFA: ácido trifluoroacético, DEA: dietilamina, scCO₂: dióxido de carbono supercrítico):

35

Nombre del método:		V011_S01		
Columna:		XBridge C18, 4,6 x 30 mm, 3,5 μm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, NH ₃ al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temp [°C]
0,0	97	3	5	60
0,2	97	3	5	60
1,6	0	100	5	60
1,7	0	100	5	60

ES 2 740 428 T3

Nombre del método:		V012_S01		
Columna:		XBridge C18, 4,6 x 30 mm, 3,5 µm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, TFA al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temp [°C]
0,0	97	3	5	60
0,2	97	3	5	60
1,6	0	100	5	60
1,7	0	100	5	60

Nombre del método:		X012_S01		
Columna:		Xbridge BEH C18, 2,1 x 30 mm, 1,7 µm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, TFA al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]
0,0	99	1	1,6	60
0,02	99	1	1,6	60
1,00	0	100	1,6	60
1,10	0	100	1,6	60

Nombre del método:		X012_S02		
Columna:		Xbridge BEH C18, 2,1 x 30 mm, 1,7 µm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, TFA al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]
0,0	99	1	1,3	60
0,02	99	1	1,3	60
1,00	0	100	1,3	60
1,10	0	100	1,3	60

Nombre del método:		Z011_S03		
Columna:		XBridge C18, 3 x 30 mm, 2,5 µm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, NH ₃ al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Nombre del método:		Z017_S04		
Columna:		ZORBAX™ SB-C18, 3 x 30 mm, 1,8 µm		
Proveedor de la columna:		Agilent		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, TFA al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Nombre del método:		Z018_S04		
Columna:		Sunfire, 3 x 30 mm, 2,5 µm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, TFA al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

ES 2 740 428 T3

Nombre del método:		005_CA01		
Columna:		SunFire C18, 3,0 x 30 mm, 2,5 µm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, TFA al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]
0,0	98	2	2,0	60,0
1,2	0	100	2,0	60,0
1,4	0	100	2,0	60,0

Nombre del método:		005_CA07		
Columna:		SunFire C18, 3,0 x 30 mm, 2,5 µm		
Proveedor de la columna:		Waters		
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [H ₂ O, TFA al 0,1 %]	% de disolvente [acetonitrilo]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]
0,0	95	5	1,5	60,0
1,3	0	100	1,5	60,0
1,5	0	100	1,5	60,0
1,6	95	5	1,5	60,0

Nombre del método:		I_IA_20_MeOH_NH3			
Columna:		Chiralpak IA 4,6 x 250 mm, 5 µm			
Proveedor de la columna:		Daicel			
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [MeOH, NH ₃ 20 mM]	% de disolvente [scCO ₂]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]	Contrapresión [bar]
10 min	20	80	4	40	150

Nombre del método:		I_IA_25_MeOH_NH3			
Columna:		Chiralpak IA 4,6 x 250 mm, 5 µm			
Proveedor de la columna:		Daicel			
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [MeOH, NH ₃ 20 mM]	% de disolvente [scCO ₂]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]	Contrapresión [bar]
10 min	25	75	4	40	150

Nombre del método:		I_IB_20_MeOH_DEA			
Columna:		Chiralpak IB 4,6 x 250 mm, 5 µm			
Proveedor de la columna:		Daicel			
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [MeOH, DEA al 0,2 %]	% de disolvente [scCO ₂]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]	Contrapresión [bar]
10 min	20	80	4	40	150

Nombre del método:		I_IB_20_MeOH_NH3			
Columna:		Chiralpak IB 4,6 x 250 mm, 5 µm			
Proveedor de la columna:		Daicel			
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [MeOH, NH ₃ 20 mM]	% de disolvente [scCO ₂]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]	Contrapresión [bar]
10 min	20	80	4	40	150

Nombre del método:		I_IC_25_MeOH_NH3			
Columna:		Chiralpak IC 4,6 x 250 mm, 5 µm			
Proveedor de la columna:		Daicel			
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [MeOH, NH ₃ 20 mM]	% de disolvente [scCO ₂]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]	Contrapresión [bar]
10 min	25	75	4	40	150

Nombre del método:		I_IC_30_MeOH_NH3			
Columna:		Chiralpak IC 4,6 x 250 mm, 5 µm			
Proveedor de la columna:		Daicel			
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [MeOH, NH ₃ 20 mM]	% de disolvente [scCO ₂]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]	Contrapresión [bar]
10 min	30	70	4	40	150

Nombre del método:		I_IC_40_MeOH_NH3			
Columna:		Chiralpak IC 4,6 x 250 mm, 5 µm			
Proveedor de la columna:		Daicel			
Tiempo de gradiente/disolvente [min]	% de disolvente [MeOH, NH ₃ 20 mM]	% de disolvente [scCO ₂]	Flujo [ml/min]	Temperatura [°C]	Contrapresión [bar]
10 min	40	60	4	40	150

Síntesis de los materiales de partida

5

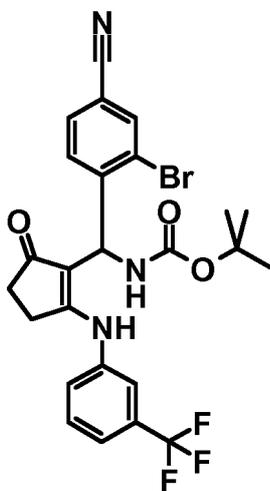
El siguiente material de partida se prepara como se describe en la bibliografía citada:

3-(3-(Trifluorometil)fenilamino)-ciclopent-2-enona: *Aust. J. Chem.* 2005, 58, 870-876.

10 SÍNTESIS DE INTERMEDIOS

INTERMEDIO A.1

15 Éster *terc*-butílico del ácido {(2-bromo-4-ciano-fenil)-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico



Etapa 1:

20

Éster *terc*-butílico del ácido [bencenosulfonil-(2-bromo-4-ciano-fenil)-metil]-carbámico

25 Se añade ácido fórmico (3,9 ml, 104 mmol) a una mezcla de carbamato de *terc*-butilo (1,90 g, 16,2 mmol), 2-bromo-4-cianobenzaldehído (N.º de CAS 89891-69-0, 3,41 g, 16,2 mmol) y bencenosulfonato de sodio (2,67 g, 16,2 mmol) en una mezcla de THF (7,0 ml) y agua (60 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 días. Se añade agua (180 ml) y el precipitado se filtra y se lava con agua. El precipitado se trata con *terc*-butil metil éter (30 ml) y la mezcla se agita durante 30 minutos. El precipitado se separa por filtración, se lava con *terc*-butil metil éter y se seca. Rendimiento: 3,35 g. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 451 (patrón de isótopos de bromo); Tiempo de retención por HPLC: 0,66 min (X012_S01).

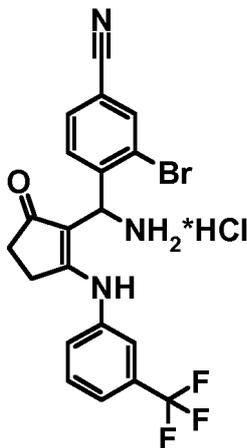
30

Etapa 2:

35 Éster *terc*-butílico del ácido {(2-bromo-4-ciano-fenil)-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico

Se añade hidruro de sodio (al 60 % en aceite mineral, 360 mg, 9,00 mmol) en pequeñas porciones a una mezcla de 3-(3-(trifluorometil)fenilamino)-ciclopent-2-enona (2,16 g, 8,96 mmol) y 2-metiltetrahidrofurano (30 ml). Después de 30 minutos se añade éster *terc*-butílico del ácido [bencenosulfonil-(2-bromo-4-cianofenil)-metil]-carbámico (Etapa 1, 3,35 g, 7,43 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Se añade agua y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua, se secan sobre MgSO₄ y se concentran a presión reducida. El residuo se trata con *terc*-butil metil éter y la mezcla se agita durante 15 min. El precipitado se separa por filtración, se lava con *terc*-butil metil éter y se seca. Rendimiento: 3,18 g. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 550 (patrón de isótopos de bromo); Tiempo de retención por HPLC: 0,73 min (X012_S01).

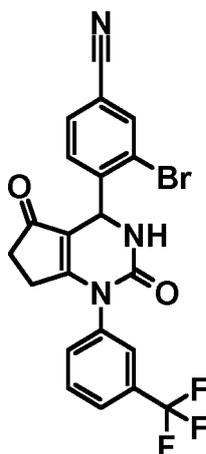
INTERMEDIO A.2



15 Clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-bromo-benzonitrilo

Se añade una solución de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (4 M, 15,2 ml, 61 mmol) a una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido {(2-bromo-4-ciano-fenil)-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico (INTERMEDIO A.1, 6,71 g, 12,2 mmol) en 1,4-dioxano (30 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h y después se enfría en un baño de hielo. El precipitado se separa por filtración, se lava con acetonitrilo frío y dietil éter y se seca. Rendimiento: 5,90 g. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 450 (patrón de isótopos de bromo); Tiempo de retención por HPLC: 1,17 min (V011_S01).

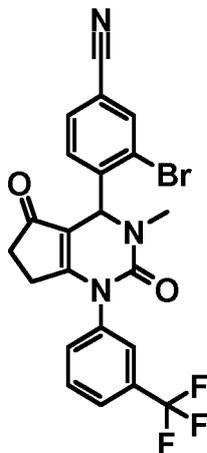
INTERMEDIO A.3



3-Bromo-4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

Se añade trietilamina (4,11 ml, 29,3 mmol) a una mezcla de clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-bromo-benzonitrilo (INTERMEDIO A.2, 28,5 g, 58,6 mmol) y 1,1'-carbonildiimidazol (11,9 g, 73,2 mmol) en acetonitrilo (290 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se añade agua (1,5 l) y el precipitado se filtra, se lava con agua y se seca. Rendimiento: 24,5 g. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 476 (patrón de isótopos de bromo); Tiempo de retención por HPLC: 1,11 min (V011_S01).

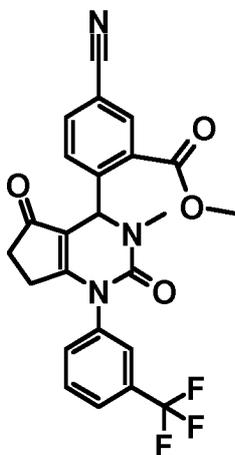
INTERMEDIO A.4



5 3-Bromo-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

Se añade yoduro de metilo (3,61 ml, 58,0 mmol) a una mezcla de 3-bromo-4-(2,5-dioxo-1-(3-(trifluorometil)fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il)benzonitrilo (INTERMEDIO A.3, 23,0 g, 48,3 mmol) y carbonato de cesio (20,5 g, 62,8 mmol) en DMF (230 ml) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se añaden agua y acetato de etilo y se separan las fases. La fase orgánica se lava con agua, se seca sobre MgSO₄ y se concentra. Rendimiento: 24,0 g. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 490 (patrón de isótopos de bromo); Tiempo de retención por HPLC: 1,18 min (V011_S01).

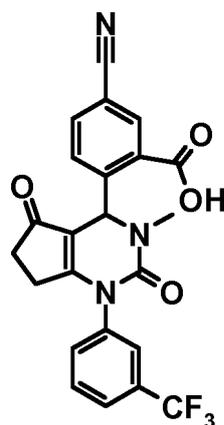
15 INTERMEDIO A.5



20 Éster metílico del ácido 5-ciano-2-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]benzoico

Una solución de 3-bromo-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo (INTERMEDIO A.4, 11,85 g, 24,2 mmol), 1,1-bis(difenilfosfino)-ferroceno (1,34 g, 2,42 mmol), acetato de paladio (0,27 g, 1,21 mmol) y acetato de sodio (5,95 g, 72,5 mmol) se trata con monóxido de carbono a 5 bar (500 kPa) y 100 °C durante 40 h. Después de la evaporación de los compuestos volátiles a presión reducida, se añaden agua y acetato de etilo y las fases se separan. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ y se concentra a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (ciclohexano/acetato de etilo 1:1). Rendimiento: 8,0 g. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 470; Tiempo de retención por HPLC: 1,15 min (V011_S01).

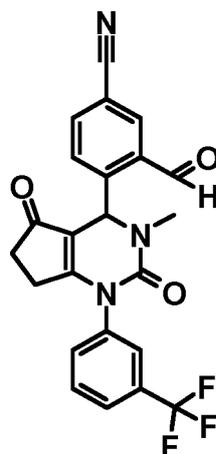
30 INTERMEDIO A.6



Ácido 5-ciano-2-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzoico

- 5 Una mezcla de éster metílico del ácido 5-ciano-2-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzoico (INTERMEDIO A.5, 6,70 g, 14,3 mmol) e hidróxido de litio (1,03 g, 42,8 mmol) en 1,4-dioxano (135 ml) y agua (67,0ml) se agita a temperatura ambiente durante 90 min. Se añaden agua (250 ml) y ácido clorhídrico (1,0 M, 44 ml) y la mezcla de reacción se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con agua, se seca sobre MgSO₄ y se concentra a presión reducida. Rendimiento: 6,2 g. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 456; Tiempo de retención por HPLC: 0,63 min (X012_S01).

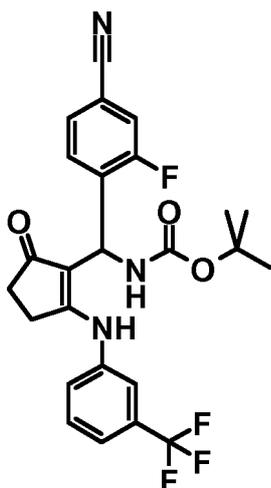
INTERMEDIO A.7



- 15 3-Formil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

- 20 Se añade peryodinano de Dess-Martin (2,36 g; 5,57 mmol) a una solución de 3-hidroximetil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo (EJEMPLO A.1; 2,05 g; 4,644 mmol) en diclorometano (100 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 90 min. La mezcla de reacción se inactiva con una mezcla de solución al 10 % de tiosulfato de sodio (50 ml) y solución saturada de NaHCO₃ (50 ml) y se separan las fases. La capa acuosa se extrae con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua, se secan sobre MgSO₄ y se concentran a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (diclorometano/metanol 98:2). Rendimiento: 510 mg; Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 440; Tiempo de retención por HPLC: 0,63 min (X012_S02).

INTERMEDIO B.1



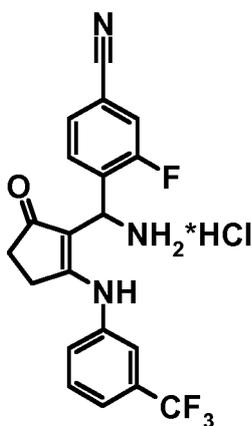
Éster *terc*-butílico del ácido {(4-ciano-2-fluoro-fenil)-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico

5

Se prepara INTERMEDIO B.1 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO A.1, reemplazando 2-bromo-4-cianobenzaldehído por 3-fluoro-4-formil-benzonitrilo (N.º de CAS 105942-10-7) como material de partida. La purificación del material en bruto se realiza mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, ácido fórmico al 0,1 %). Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 490; Tiempo de retención por HPLC: 1,13 min (Z018_S04).

10

INTERMEDIO B.2



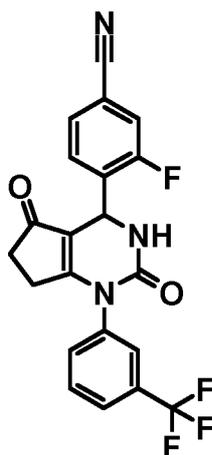
15

Clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-fluoro-benzonitrilo

Se prepara INTERMEDIO B.2 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO A.2, reemplazando el INTERMEDIO A.1 por el INTERMEDIO B.1 como material de partida. Espectro de masas de IEN: [M+H-NH₃]⁺ = 373; Tiempo de retención por HPLC: 0,81 min (Z018_S04).

20

INTERMEDIO B.3

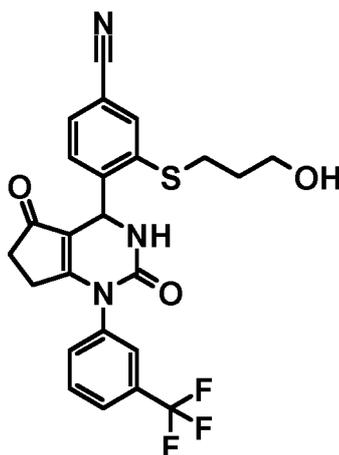


4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-fluoro-benzonitrilo

- 5 Se prepara INTERMEDIO B.3 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO A.3, reemplazando el INTERMEDIO A.2 por el INTERMEDIO B.2 como de partida material. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 416$; Tiempo de retención por HPLC: 0,97 min (Z018_S04).

INTERMEDIO B.4

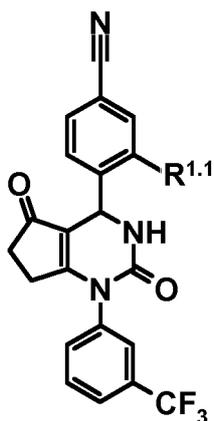
10



4-[2,5-Dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-(3-hidroxi-propilsulfanil)-benzonitrilo

- 15 A una mezcla de hidruro de sodio (al 55 % en aceite mineral, 32 mg, 0,73 mmol) en DMF (0,30ml) se le añade a 0 °C 3-mercapto-1-propanol (55 μ l, 0,64 mmol) y la mezcla se agita a 0 °C durante 25 min. Se añade una solución de 4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-fluoro-benzonitrilo (INTERMEDIO B.3, 110 mg, 0,21 mmol) en DMF (0,30 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante
- 20 2,5 h. La mezcla de reacción se inactiva con agua, se acidifica con ácido acético diluido y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 13 mg. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 488$; Tiempo de retención por HPLC: 0,93 min (Z018_S04).

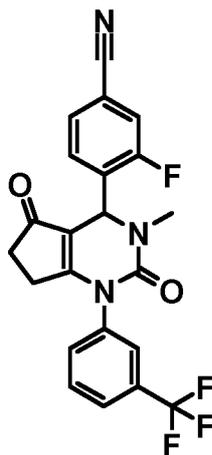
- 25 El siguiente INTERMEDIO B.4.1 se prepara de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO B.4, reemplazando 3-mercapto-1-propanol por 2-metoxi-etanol como material de partida.



INTERMEDIO	R ^{1.1}	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
B.4.1		488	1,00	Z018_S04

INTERMEDIO B.5

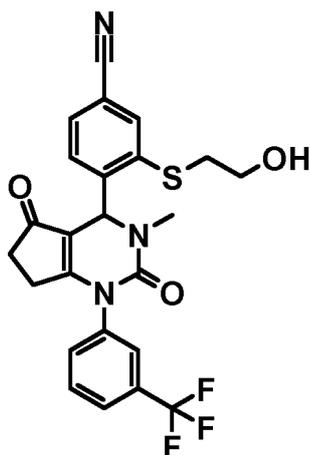
5



3-Fluoro-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

10 Se prepara INTERMEDIO B.5 de forma análoga a la descrita para el INTERMEDIO A.4, reemplazando el INTERMEDIO A.3 por el INTERMEDIO B.3. La mezcla de reacción se purifica mediante HPLC de fase inversa (Agilent ZOR-BAX™ SB-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 430; Tiempo de retención por HPLC: 1,02 min (Z018_S04).

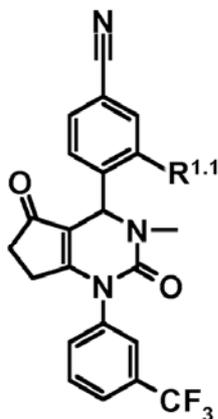
15 INTERMEDIO B.6



3-(2-Hidroxi-etilsulfanil)-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

5 Se prepara INTERMEDIO B.6 de forma análoga a la descrita para el INTERMEDIO B.4, reemplazando el INTERMEDIO B.3 por el INTERMEDIO B.5 y el 3-mercapto-1-propanol por 2-mercaptoetanol como materiales de partida, respectivamente. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 488$; Tiempo de retención por HPLC: 0,97 min (Z018_S04).

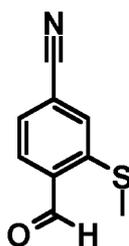
10 Los siguientes intermedios B.6.1 y B.6.2 se preparan de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO B.6, empleando el tiol apropiado como material de partida, respectivamente.



15

INTERMEDIO	R ^{1.1}	EM $[M+H]^+$	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
B.6.1		502	0,98	Z018_S04
B.6.2		502	1,07	Z018_S04

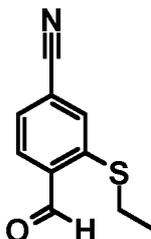
INTERMEDIO C.1



4-Formil-3-metilsulfanil-benzonitrilo

5 Se añade carbonato de potasio (3,8 g; 27,7 mmol) a una mezcla de 3-fluoro-4-formil-benzonitrilo (2,0 g; 13,4 mmol) y tiometanolato de sodio (1,175 g; 16,77 mmol) en DMF (10 ml) y la mezcla se agita a 120 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se enfría con un baño de hielo. Se añade agua y el precipitado se filtra, se lava con agua y se seca. Rendimiento: 1,98 g. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 178$; Tiempo de retención por HPLC: 0,73 min (Z011_S03).

10 INTERMEDIO C.2

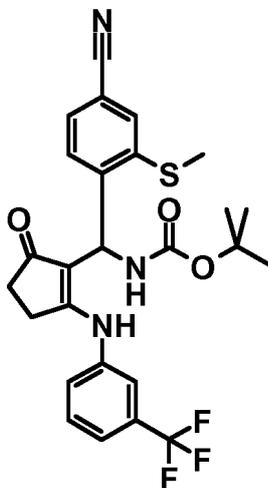


15 3-Etilsulfanil-4-paramil-benzonitrilo

Se prepara INTERMEDIO C.2 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO C.1, reemplazando el tiometanolato de sodio por tioetanolato de sodio (temperatura de reacción 50 °C). Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 192$; Tiempo de retención por HPLC: 0,81 min (Z011_S03).

20 INTERMEDIO C.3

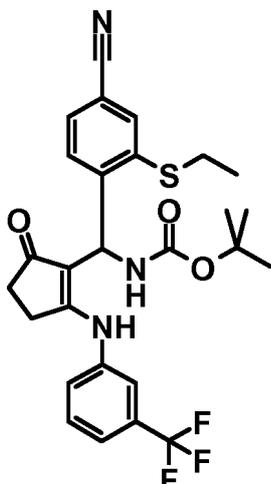
Éster *terc*-butílico del ácido {(4-ciano-2-metilsulfanil-fenil)-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico



25 Se prepara INTERMEDIO C.3 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO A.1, reemplazando 2-bromo-4-cianobenzaldehído por 4-formil-3-metilsulfanil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.1). Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 518$; Tiempo de retención por HPLC: 1,14 min (Z017_S04).

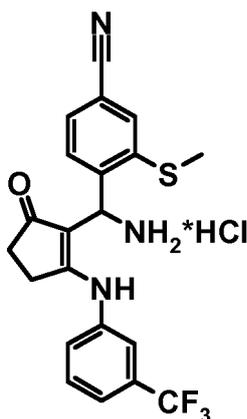
30 INTERMEDIO C.4

35 Éster *terc*-butílico del ácido {(4-ciano-2-etilsulfanil-fenil)-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico



5 Se prepara INTERMEDIO C.4 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO A.1, reemplazando 2-bromo-4-cianobenzaldehído por 3-etilsulfanil-4-formil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.2). Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 532$; Tiempo de retención por HPLC: 1,19 min (Z018_S04).

INTERMEDIO C.5



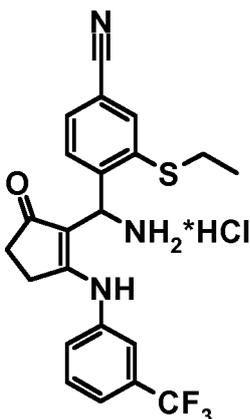
10

Clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-metilsulfanil-benzonitrilo

15 Una solución de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (4 M, 5 ml, 20 mmol) se añade a una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido {(4-ciano-2-metilsulfanil-fenil)-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico (INTERMEDIO C.3, 4,3 g, pureza del 80 %, 6,7 mmol) en acetonitrilo (10 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. El precipitado se filtra, se lava con acetonitrilo frío y se seca. Rendimiento: 4,14 g. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 418$; Tiempo de retención por HPLC: 0,90 min (Z011_S03).

INTERMEDIO C.6

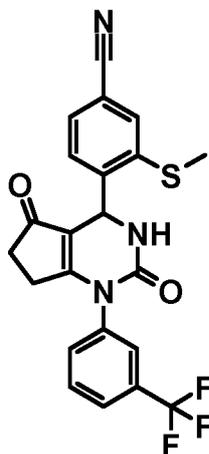
20



Clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-etilsulfanil-benzonitrilo

5 Se prepara INTERMEDIO C.6 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO C.5, reemplazando el INTERMEDIO C.3 por el INTERMEDIO C.4. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 432$; Tiempo de retención por HPLC: 0,94 min (Z011_S03).

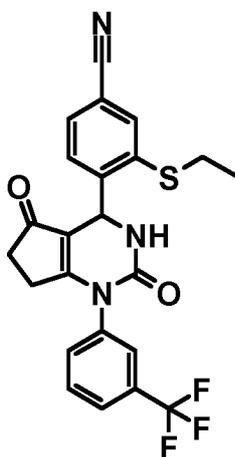
INTERMEDIO C.7



10 4-[2,5-Dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metilsulfanil-benzonitrilo

15 Se añade trietilamina (95 μ l, 0,68 mmol) a una mezcla de clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(3-trifluorometil-fenilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-metilsulfanil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.5, 570 mg, 1,13 mmol basado en una pureza del 90 %) y 1,1'-carbonildiimidazol (220 mg, 1,36 mmol) en acetonitrilo (3 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se trata con agua. El precipitado se filtra, se lava con agua y se seca. Rendimiento: 460 mg; Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 444$; Tiempo de retención por HPLC: 0,98 min (Z017_S04).

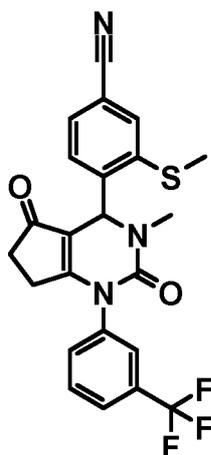
20 INTERMEDIO C.8



25 4-[2,5-Dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etilsulfanil-benzonitrilo

Se prepara INTERMEDIO C.8 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO C.7, reemplazando el INTERMEDIO C.5 por el INTERMEDIO C.6. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 458$; Tiempo de retención por HPLC: 1,03 min (Z018_S04).

30 INTERMEDIO C.9



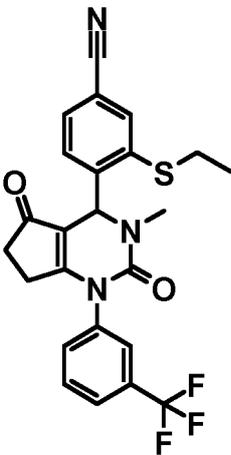
4-[3-Metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metilsulfanil-benzonitrilo

5

Se añade yoduro de metilo (834 μ l, 13,4 mmol) a una mezcla de 4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metilsulfanil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.7; 1,981 g; 4,467 mmol) y carbonato de cesio (2,911 g, 8,935 mmol) en DMF (5 ml) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se purifica mediante HPLC de fase inversa (Stablebond, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 1,145 g. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 458$; Tiempo de retención por HPLC: 1,03 min (Z017_S04).

10

INTERMEDIO C.10



15

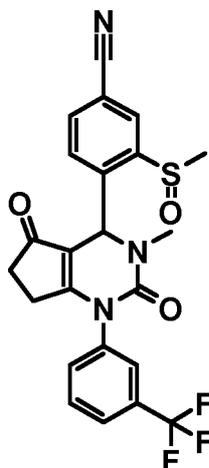
4-[3-Metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etil-sulfanil-benzonitrilo

20

Se prepara INTERMEDIO C.10 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO C.9, reemplazando el INTERMEDIO C.7 por el INTERMEDIO C.8. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 472$; Tiempo de retención por HPLC: 1,09 min (Z018_S04).

25

INTERMEDIO C.11.1 E INTERMEDIO C.11.2



3-Metanosulfinil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

5

Se añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (al 77 %, 46 mg, 0,203 mmol) a temperatura ambiente a una solución de 4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metilsulfanil-benzonitrilo (Intermedio C.9, 93 mg, 0,203 mmol) en diclorometano (5 ml) y la mezcla se agita durante 20 min. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Sunfire, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %), produciendo los dos diastereoisómeros.

10

INTERMEDIO C.11.1:

Rendimiento: 46 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 474$; Tiempo de retención por HPLC: 0,94 min (diastereómero que eluye antes) (Z018_S04).

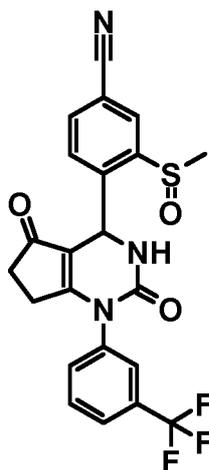
15

INTERMEDIO C.11,2:

Rendimiento: 46 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 474$; Tiempo de retención por HPLC: 0,96 min (diastereómero que eluye más tarde) (Z018_S04).

20

INTERMEDIO C.12.1 E INTERMEDIO C.12.2



25 4-[2,5-Dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil) 2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metanosulfinil-benzonitrilo

Se añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (77 %, 51 mg, 0,226 mmol) a temperatura ambiente a una solución de 4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metilsulfanil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.7, 100 mg, 0,226 mmol) en diclorometano (3 ml) y la mezcla se agita durante 20 min. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Sunfire, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %), produciendo los dos diastereoisómeros.

30

INTERMEDIO C.12.1:

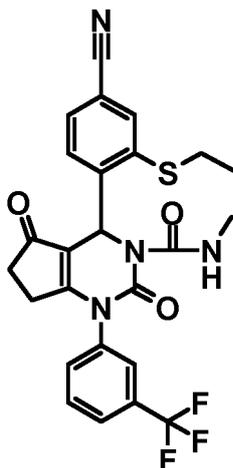
Rendimiento: 35 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 460$; Tiempo de retención por HPLC: 0,90 min (diastereómero que eluye antes) (Z018_S04).

INTERMEDIO C.12.2:

5 Rendimiento: 26 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 460$; Tiempo de retención por HPLC: 0,92 min (diastereómero que eluye más tarde) (Z018_S04).

INTERMEDIO C.13

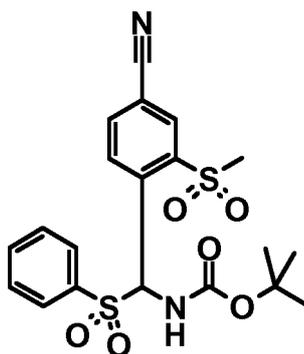
10



Metilamida del ácido 4-(4-ciano-2-etilsulfanil-fenil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-1,2,4,5,6,7-hexahidrociclopentapirimidina-3-carboxílico

15 A una mezcla de 4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etilsulfanilbenzonitrilo (INTERMEDIO C.8; 100 mg; pureza del 90 %; 0,20 mmol) y diisopropiletamina (130 μ l; 0,76 mmol) en acetonitrilo (1 ml) se añaden a temperatura ambiente en pequeñas porciones durante un período de 5 h 4-nitrofenilcloroformiato (160 mg; 0,79 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (140 mg; 1,15 mmol). Se añade metilamina (1 M en THF; 1 ml; 1,00 mmol) a la mezcla que contiene el intermedio de carbamato de 4-nitrofenilo y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se purifica mediante HPLC de fase inversa (Sunfire, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 58 mg. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 515$; Tiempo de retención por HPLC: 1,08 min (Z018_S04).

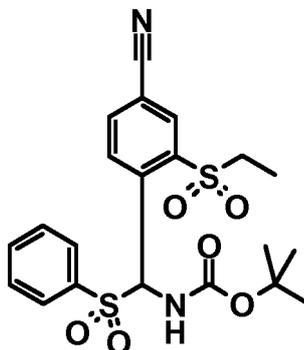
25 INTERMEDIO D.1



Éster *tert*-butilico del ácido [bencenosulfonil-(4-ciano-2-metanosulfonil-fenil)-metil]-carbamácido

30 Se añade ácido fórmico (6,2 ml, 164 mmol) a una mezcla de carbamato de *tert*-butilo (3,05 g, 26,0 mmol), 4-formil-3-(metilsulfonil)benzonitrilo (preparación de acuerdo con el documento US 2011/34433, 5,44 g, 26,0 mmol) y bencenosulfonato de sodio (4,27 g, 26,0 mmol) en THF (10,0 ml) y agua (25,0 ml) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 días. Se añade agua y el precipitado se retira por filtración, se lava con agua y acetónitrilo y se seca. Rendimiento: 5,10 g. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 451$; Tiempo de retención por HPLC: 0,59 min (X012_S01).

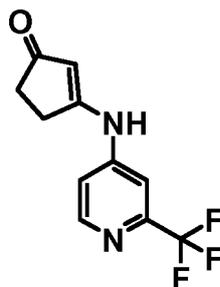
INTERMEDIO D.2



Éster *tert*-butilico del ácido [bencenosulfonil-(4-ciano-2-etanosulfonil-fenil)-metil]-carbámico

5 Se prepara INTERMEDIO D.2 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO D.1, reemplazando 4-formil-3-(metilsulfonil)benzonitrilo por 3-etanosulfonil-4-formil-benzonitrilo (preparación de acuerdo con el documento US 2011/34433). Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 465$; Tiempo de retención por HPLC: 1,03 min (Z017_S04).

10 INTERMEDIO D.3



3-(2-Trifluorometil-piridin-4-ilamino)ciclopent-2-enona

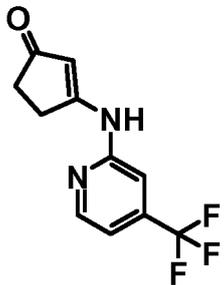
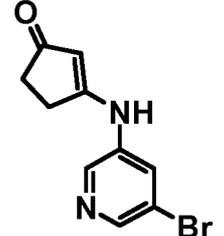
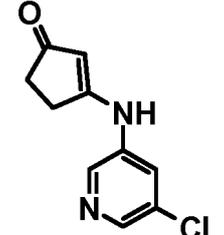
15 Una solución de 1,3-ciclopentanodiona (3,03 g, 30,8 mmol) y 4-amino-2-trifluorometilpiridina (5,00 g, 30,8 mmol) en ácido acético (15,0 ml) se agita a 130 °C en un horno de microondas durante 5 h. La mezcla de reacción se diluye con metanol y agua y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, ácido fórmico al 0,1 %). Rendimiento: 4,52 g; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 243$; Tiempo de retención por HPLC: 0,77 min (Z018_S04).

Se preparan INTERMEDIOS D.3.1 - D.3.4 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO D.3, empleando la amina apropiada como material de partida, respectivamente.

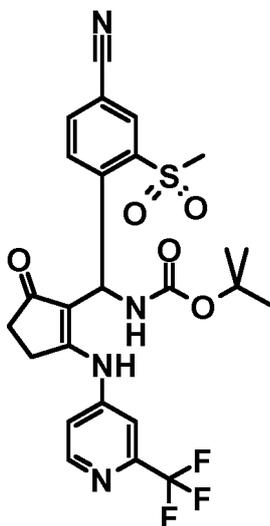
25 Tabla 1

INTERMEDIO	R	EM $[M+H]^+$	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.3.1		243	0,77	Z018_S04

(continuación)

INTERMEDIO	R	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.3.2		243	0,86	Z018_S04
D.33		253 (patrón de isotipos de bromo)	0,72	Z018_S04
D.3.4		209 (patrón de isotipos de cloro)	0,68	Z017_S04

INTERMEDIO D.4



5

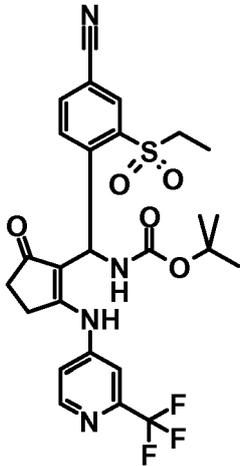
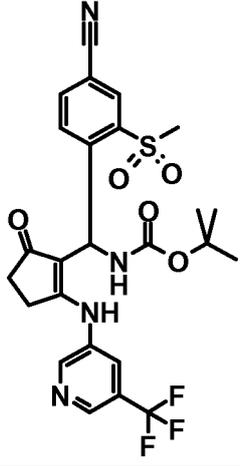
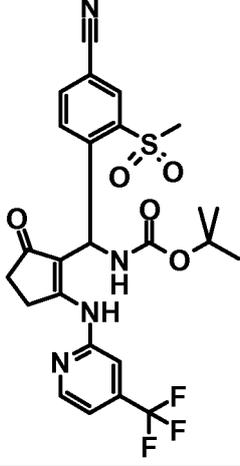
Éster *terc*-butílico del ácido (4-ciano-2-metanosulfonyl-fenil)-[5-oxo-2-(2-trifluorometil-piridin-4-ilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico

- 10 Se añade hidruro de sodio (al 60 % en aceite mineral, 515 mg, 12,9 mmol) en pequeñas porciones a una mezcla de 3-(2-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)ciclopent-2-enona (INTERMEDIO D.3, 2,60 g, 10,7 mmol) en 2-metiltetrahydrofurano (40,0 ml). Después de 10 min se añade éster *terc*-butílico del ácido [bencenosulfonyl-(4-ciano-2-metanosulfonyl-fenil)-metil]-carbámico (INTERMEDIO D.1, 4,83 g, 10,7 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Se añaden agua y acetato de etilo y se separan las fases. La fase orgánica se lava con agua y se concentra a presión reducida. Rendimiento: 6,20 g; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 551; Tiempo de retención por HPLC: 1,12 min (Z018_S04).

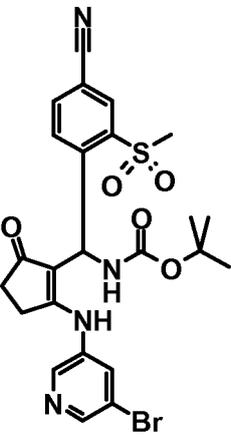
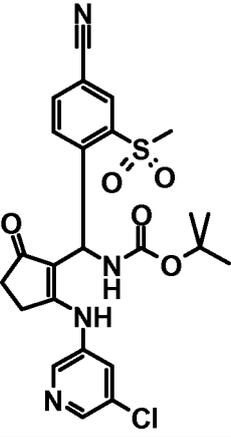
15

Se preparan INTERMEDIOS D.4.1 - D.4.5 de manera análoga a la descrita para el INTERMEDIO D.4, empleando los materiales de partida que se indican en la siguiente tabla.

Tabla 2

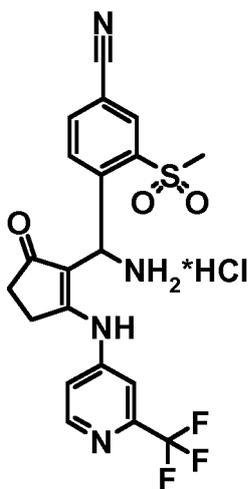
INTERMEDIO	Materiales de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.4.1	INTERMEDIOS D.2 y D.3		565	1,15	Z018_S04
D.4.2	INTERMEDIOS D.1 y D.3.1		551	1,12	Z018_S04
D.4.3	INTERMEDIOS D.1 y D.3.2		551	1,23	Z018_S04

(continuación)

INTERMEDIO	Materiales de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.4.4	INTERMEDIOS D.1 y D.3.3		561 (patrón de isotipos de bromo)	1,08	Z018_S04
D.4.5	INTERMEDIOS D.1 y D.3.4		517 (patrón de isotipos de cloro)	1,06	Z017_S04

INTERMEDIO D.5

5



Clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(2-trifluorometil-piridin-4-ilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-metanosulfonil-benzonitrilo

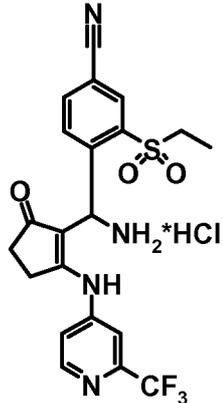
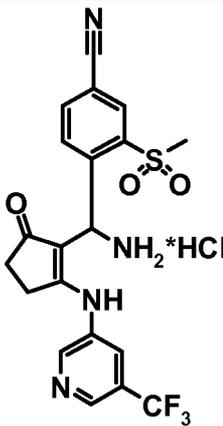
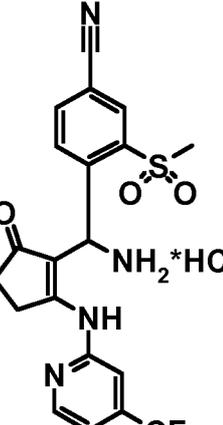
10

A una solución de éster *terc*-butílico del ácido {(4-ciano-2-metanosulfonil-fenil)-[5-oxo-2-(2-trifluorometil-piridin-4-ilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico (INTERMEDIO D.4, 5,20 g, 9,45 mmol) en 1,4-dioxano (100 ml) se le añade de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (4 M, 50,0 ml, 200 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluye con metil *terc*-butil éter y el precipitado se separa por filtración, se

lava con metil *tert*-butil éter y se seca. Rendimiento: 4,40 g. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 451$; Tiempo de retención por HPLC: 0,78 min (Z018_S04). Se preparan INTERMEDIOS D.5.1 - D.5.5 de forma análoga a la descrita para el INTERMEDIO D.5, empleando los materiales de partida que se indican en la siguiente tabla.

5

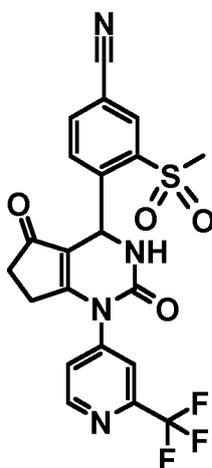
Tabla 3

INTERMEDIO	Material de partida	Estructura	EM $[M+H]^+$	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.5.1	INTERMEDIO D.4.1		465	1,82	Z018_S04
D.5.2	INTERMEDIO D.4.2		451	0,78	Z018_S04
D.5.3	INTERMEDIO D.4.3		451	0,84	Z018_S04

(continuación)

INTERMEDIO	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.5.4	INTERMEDIO D.4.4		461 (patrón de isotipos de bromo)	0,74	Z018_S04
D.5.5	INTERMEDIO D.4.5		417 (patrón de isotipos de cloro)	0,74	Z0111_S03

INTERMEDIO D.6



5

4-[2,5-Dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metanosulfonyl-benzonitrilo

- 10 A una solución de clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(2-trifluorometil-piridin-4-ilamino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-metanosulfonyl-benzonitrilo (INTERMEDIO D.5, 4,78 g, 9,81 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se le añade 1,1'-carbonildiimidazol (1,99 g, 12,3 mmol) y trietilamina (0,34 ml, 2,45 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida. El residuo se trata con agua, el

precipitado se filtra, se lava con agua y se seca. Rendimiento: 3,73 g. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 477$; Tiempo de retención por HPLC: 0,90 min (Z018_S04).

INTERMEDIO D.6A E INTERMEDIO D.6B: ENANTIÓMEROS DEL INTERMEDIO D.6 RACÉMICO

5 Los enantiómeros del INTERMEDIO D.6 racémico (300 mg, 0,63 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IC, 20 x 250 mm, 5 μ m, MeOH al 20 % + amoníaco 20 mM en CO₂ supercrítico, 40 °C, 120 bar (12 MPa) (12 MPa) de contrapresión).

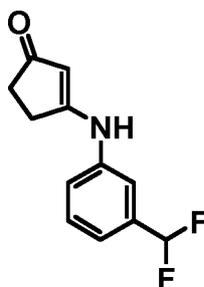
10 INTERMEDIO D.6A:

Rendimiento: 92 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 477$; Tiempo de retención: 2,67 min (enantiómero que eluye antes) (I_IB_20_MeOH_NH₃).

15 INTERMEDIO D.6B:

Rendimiento: 96 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 477$; Tiempo de retención: 3,03 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IB_20_MeOH_NH₃).

20 INTERMEDIO D.7

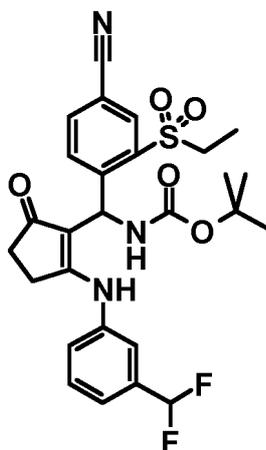


25 3-(3-(Difluorometil)fenilamino)ciclopent-2-enona

Una mezcla deciclopentano-1,3-diona (2,00 g, 20,4 mmol), 3-(difluorometil)anilina (2,92 g, 20,4 mmol) y trifluorometanosulfonato de iterbio (III) (63 mg, 0,10 mmol) se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Se añaden metanol y agua y el precipitado resultante se filtra y se seca. Rendimiento: 2,75 g; Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 224$; Tiempo de retención por HPLC: 0,82 min (V012_S01).

30

INTERMEDIO D.8



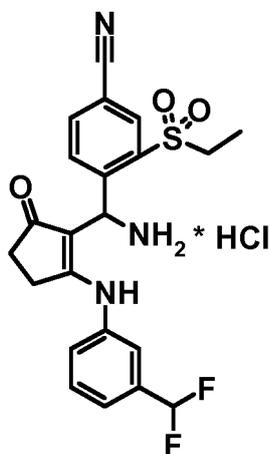
35 Éster *tert*-butílico del ácido (4-ciano-2-etanosulfonyl-fenil)-[2-(3-difluorometil-fenilamino)-5-oxo-ciclopent-1-enil]-metil]-carbámico

Se añade hidruro de sodio (al 60 % en aceite mineral, 155 mg, 3,88 mmol) en pequeñas porciones a una mezcla de 3-(3-(difluorometil)fenilamino)ciclopent-2-enona (INTERMEDIO D.7; 936 mg, 4,20 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (10 ml). Después de 30 min se añade éster *tert*-butílico del ácido [bencenosulfonyl-(4-ciano-2-etanosulfonyl-fenil)-metil]-carbámico (INTERMEDIO D.2, 1,50 g, 3,23 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la

40

noche. Se añaden acetato de etilo y agua y se separan las fases. La fase orgánica se lava con agua, se seca sobre MgSO_4 y se concentra a presión reducida. Rendimiento: 2,35 g. Espectro de masas de IEN: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 546$; Tiempo de retención por HPLC: 1,14 min (Z017_S04).

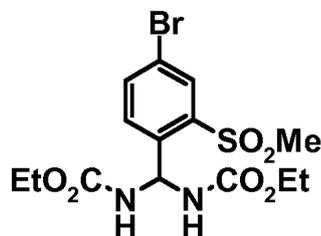
5 INTERMEDIO D.9



Clorhidrato de 4-{amino-[2-(3-difluorometil-fenilamino)-5-oxo-ciclopent-1-enil]-metil}-3-etanosulfonil-benzonitrilo

10 Se añade una solución de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (4 M, 3,0 ml, 12,0 mmol) a una solución de éster *terc*-butílico del ácido {(4-ciano-2-etanosulfonil-fenil)-[2-(3-difluorometil-fenilamino)-5-oxo-ciclopent-1-enil]-metil}-carbámico (INTERMEDIO D.8, 2,35 g, pureza del 75 %, 3,23 mmol) en acetonitrilo (6 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h y después se enfría en un baño de hielo. El precipitado se filtra, se lava con acetonitrilo frío y se seca. Rendimiento: 1,52 g. Espectro de masas de IEN: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 446$; Tiempo de retención por HPLC: 0,86 min (Z017_S04).

INTERMEDIO E.1

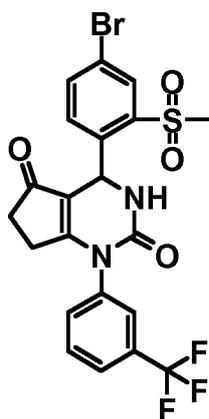


20 (4-Bromo-2-metilsulfonil)fenil)metilendicarbamato de dietilo

25 En un matraz de fondo redondo de tres bocas equipado con un tubo de secado lleno de cloruro de calcio y una entrada de nitrógeno, se calientan 4-bromo-2-metanosulfonil-benzaldehído (4,50 g, 17,10 mmol) y carbamato de etilo (3,35 g, 37,63 mmol) a 145 °C durante 5 h. El matraz se purga con un flujo de nitrógeno y se añade ácido sulfúrico concentrado (aproximadamente 200 μl , aproximadamente 3 mmol) gota a gota lentamente. Después de 7 h, la mezcla de reacción solidificada se enfría a temperatura ambiente, se tritura, se mezcla con agua y se seca. El residuo se purifica mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (gradiente diclorometano a diclorometano/metanol 95:5). Rendimiento: 5,05 g; Espectro de masas de IEN: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 423$ (patrón de isótopos de bromo); Tiempo de retención por HPLC: 0,77 min (Z011_S03).

INTERMEDIO E.2

35 4-(4-Bromo-2-metanosulfonil-fenil)-1-(3-trifluorometil-fenil)-3,4,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentapirimidina-2,5-diona



Etapa 1:

5 4-Bromo-1-(cloro(isocianato)metil)-2-(metilsulfonyl)benzene

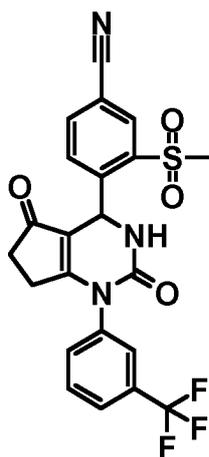
Se añade pentacloruro de fósforo (5,47 g, 26,2 mmol) a una suspensión (4-bromo-2-metilsulfonyl)fenil)metilendicarbamato de dietilo (INTERMEDIO E.1, 5,05 g, 11,9 mmol) en tolueno (30ml) y la mezcla se calienta a reflujo durante 3 h. El tolueno se evapora a presión reducida y la mezcla se purifica después por destilación a presión reducida (aproximadamente 160 °C, 0,1 mbar (0,1 hPa). Rendimiento: 945 mg.

Etapa 2:

15 4-(4-Bromo-2-metanosulfonyl-fenil)-1-(3-trifluorometil-fenil)-3,4,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentapirimidina-2,5-diona

Se añade 3-(3-(trifluorometil)fenilamino)-ciclopent-2-enona (234 mg, 0,97 mmol) a una solución de 4-bromo-1-(cloro(isocianato)metil)-2-(metilsulfonyl)benzene (Etapa 1, 945 mg, 2,91 mmol) en diclorometano (10 ml). La mezcla se calienta a reflujo durante la noche y después se concentra a presión reducida. El residuo se purifica mediante HPLC de fase inversa (Agilent ZORBAX™ SB-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, ácido fórmico al 0,1 %). Rendimiento: 110 mg; Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 529 (patrón de isótopos de bromo); Tiempo de retención por HPLC: 1,21 min (Z017_S04).

INTERMEDIO E.3



25 4-(2,5-Dioxo-1-(3-(trifluorometil)fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il)-3-(metilsulfonyl)benzonitrilo

En una atmósfera de argón, una mezcla de 4-(4-bromo-2-(metilsulfonyl)fenil)-1-(3-(trifluorometil)fenil)-3,4,6,7-tetrahidro-1H-ciclopentapirimidina-2,5-diona (INTERMEDIO E.2, 110 mg, 0,21 mmol), cianuro de cinc (32 mg, 0,27 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (24 mg, 21 μmol) en DMF (2ml) se calienta a 110 °C durante la noche y después se enfría a temperatura ambiente. Se añade agua y se filtra la mezcla. El precipitado se purifica mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (gradiente ciclohexano/acetato de etilo de 8:2 a 3:7). Rendimiento: 40 mg; Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 476; Tiempo de retención por HPLC: 0,94 min (Z017_S04).

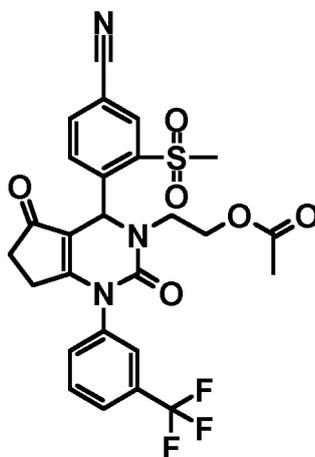
35 INTERMEDIO E.3A E INTERMEDIO E.3B: ENANTIÓMEROS DEL INTERMEDIO E.3

Los enantiómeros del 4-(2,5-dioxo-1-(3-(trifluorometil)fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il)-3-(metilsulfonyl)benzonitrilo racémico (INTERMEDIO E.3, 1,82 g, 3,83 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IB), 20 x 250 mm, 5 µm, MeOH al 15 % + dietilamina al 0,2 % en CO₂ supercrítico, 40 °C, 120 bar (12 MPa) de contrapresión).

5 INTERMEDIO E.3A:
Rendimiento 620 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 476; Tiempo de retención: 2,52 min (enantiómero que eluye antes) (I_IB_20_MeOH_DEA).

10 INTERMEDIO E.3B:
Rendimiento 554 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 476; Tiempo de retención: 2,78 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IB_20_MeOH_DEA).

15 INTERMEDIO E.4

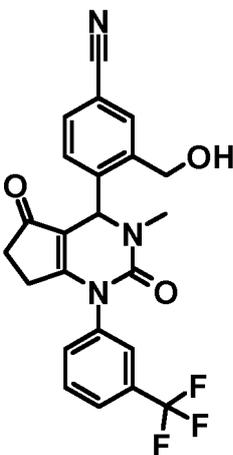


20 Éster 2-[4-(4-ciano-2-metanosulfonyl-fenil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometilfenil)-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidin-3-il]-etilico del ácido acético

A una mezcla de 4-(2,5-dioxo-1-(3-(trifluorometil)fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il)-3-(metilsulfonyl)benzonitrilo (INTERMEDIO E.3, 300 mg, 0,57 mmol) y carbonato de cesio (463 mg, 1,42 mmol) en DMF (5,0 ml) se le añade acetato de 2-bromoetilo (0,20 ml, 1,82 mmol) y la mezcla se agita a 50 °C durante 3 días. La mezcla de reacción se diluye con acetonitrilo y agua y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 104 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 562; Tiempo de retención por HPLC: 1,03 min (Z018_S04).

30 Síntesis de Ejemplos

EJEMPLO de referencia A.1



35 3-Hidroximetil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-

benzonitrilo

A una solución de ácido 5-ciano-2-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzoico (INTERMEDIO A.6; 700 mg; 1,537 mmol) en THF (10,5 ml) se le añade 1,1'-carbildildimidazol (274 mg; 1,691 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h y se enfría a 5 °C. Se añade borohidruro de sodio (87 mg; 2,31 mmol) en agua (1,4 ml) gota a gota, manteniendo la temperatura entre 5 °C y 10 °C. La mezcla de reacción se agita durante 45 min y se inactiva con HCl acuoso 1 M. Se añaden acetato de etilo y agua y se separan las fases. La capa orgánica se lava con agua, se seca sobre MgSO₄ y se concentra a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (diclorometano/metanol 95:5 → 75:25). Rendimiento: 390 mg; Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 442; Tiempo de retención por HPLC: 0,61 min (X012_S02).

EJEMPLOS de referencia A.1A Y A.1B: ENANTIÓMEROS DEL EJEMPLO A.1

Los enantiómeros del EJEMPLO A.1 (1220 mg) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IC, 20 x 250 mm, 5 μm, MeOH al 30 % + amoníaco 20 mM en CO₂ supercrítico, caudal 10 ml/min; 150 bar (12 MPa) de contrapresión).

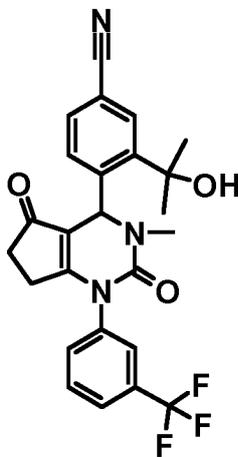
EJEMPLO de referencia A.1A:

Rendimiento 330 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 442; Tiempo de retención: 2,93 min (enantiómero que eluye antes) (I_IC_40_MEOH_NH3).

EJEMPLO de referencia A.1B:

Rendimiento 314 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 442; Tiempo de retención: 4,54 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IC_40_MEOH_NH3).

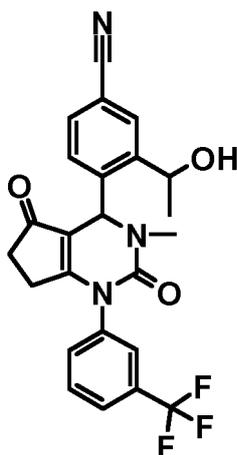
EJEMPLO de referencia A.2



3-(1-Hidroxi-1-metil-etil)-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]benzonitrilo

A una solución de éster metílico del ácido 5-ciano-2-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]benzoico (INTERMEDIO A.5; 400 mg; 0,852 mmol) en THF (5 ml) se le añade una solución de cloruro de metilmagnesio en THF (3 M, 625 μl; 1,875 mmol) gota a mano a 0 °C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche y se inactiva con HCl 1 M. Se añaden acetato de etilo y agua y se separan las fases. La capa orgánica se lava con agua, se seca sobre MgSO₄ y se concentra a presión reducida. El residuo se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters Xbridge™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 90 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 470; Tiempo de retención por HPLC: 0,69 min (X012_S02).

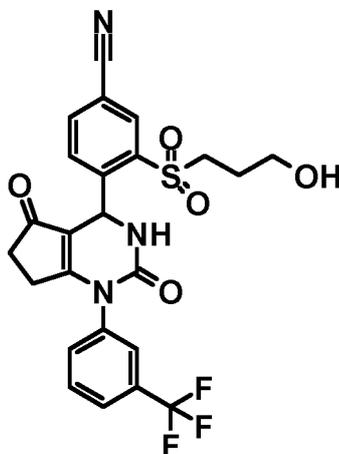
Ejemplo de Referencia A.3



3-(1-Hidroxietil)-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometilfenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]benzonitrilo

5 Una solución de cloruro de metilmagesio en THF (3 M, 0,239 ml; 0,717 mmol) se añade a 5 °C a una solución de 3-formil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo (INTERMEDIO A.7, 300 mg; 0,683 mmol) en dietil éter (3 ml) y THF (2,5 ml). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 15 min y 1 h a temperatura ambiente. Se añaden agua y HCl acuoso 1 M hasta que el pH es ácido. Se
10 añade acetato de etilo y las fases se separan. La capa orgánica se seca sobre MgSO₄ y se concentra a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (primer ciclo: diclorometano/ metanol 98:2, segundo ciclo: ciclohexano/ acetato de etilo 2:8). Rendimiento: 112 mg; Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 456; Tiempo de retención por HPLC: 0,62 min (X012_S02).

15 Ejemplo B.1



20 4-[2,5-Dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-(3-hidroxipropilsulfanil)-benzonitrilo

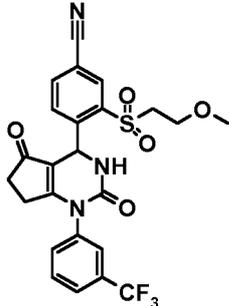
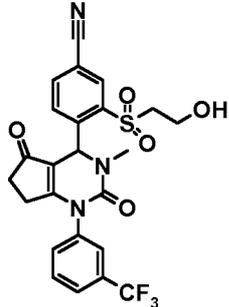
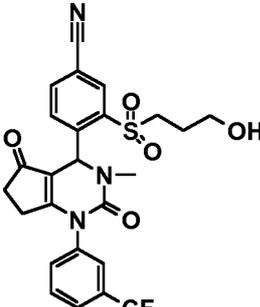
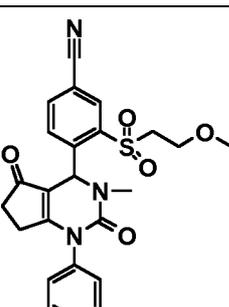
A una solución de 4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometilfenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-(3-hidroxipropilsulfanil)benzonitrilo (INTERMEDIO B.4, 13 mg, 0,027 mmol) en diclorometano (2,0 ml) se le añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (40 mg, 0,18 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Agilent ZORBAX™ SB-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 5 mg. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 520; Tiempo de retención por HPLC: 0,93 min (Z018_S04).

30 Los siguientes EJEMPLOS o Ejemplos de referencia B.1.1 - B.1.4 se preparan de manera análoga a la descrita para el EJEMPLO B.1, empleando los materiales de partida que se indican en la siguiente tabla.

Tabla 4

EJEMPLO o Ejemplo de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC

(continuación)

EJEMPLO o Ejemplo de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
Referencia B.1.1	INTERMEDIO B. 4.1		520	0,99	Z018_S04
Ejemplo B.1.2	INTERMEDIO B. 6		520	0,96	Z018_S04
Referencia B.1.3	INTERMEDIO B. 6.1		534	0,99	Z018_S04
Referencia B.1.4	INTERMEDIO B. 6.2		534	1,04	Z018_S04

EJEMPLO B.1.2A y EJEMPLO B.1.2B: Enantiómeros del EJEMPLO B.1.2

- 5 Los enantiómeros del EJEMPLO B.1.2 (142 mg) se separan mediante cromatografía de fluido supercrítico preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IB, 10 x 250 mm, 5 µm, MeOH al 20 % + NH₃ 20 mM en CO₂ supercrítico, flujo 10 ml/min, 120 bar (12 MPa) de contrapresión, 40 °C).

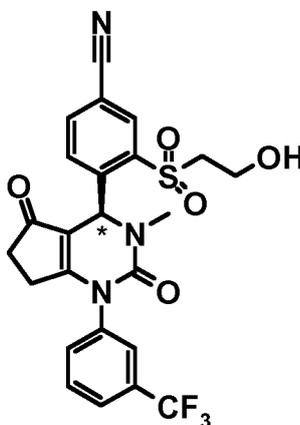
Ejemplo B.1.2A:

- 10 Rendimiento 65 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 520; Tiempo de retención: 2,15 min (enantiómero que eluye antes) (I_IB_20_MEOH_NH3).

Ejemplo B.1.2B:

Rendimiento 63 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 520$; Tiempo de retención: 2,77 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IB_20_MEOH_NH3).

5 Una estructura de rayos X del EJEMPLO B.1.2B unido a la elastasa de neutrófilos reveló la siguiente estructura y la configuración en el carbono marcado con un asterisco:



10 EJEMPLO de referencia B.1.3A y EJEMPLO de referencia B.1.3B: Enantiómeros de
EJEMPLO B.1.3

15 Los enantiómeros del EJEMPLO de referencia B.1.3 (120 mg) se separan mediante cromatografía de fluido supercrítico preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IB, 20 x 250 mm, 5 μ m, MeOH al 15 % + NH₃ 20 mM en CO₂ supercrítico, caudal 60 ml/min, 150 bar (15 MPa) de contrapresión, 40 °C).

EJEMPLO de referencia B.1.3A:

20 Rendimiento 60 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 534$; Tiempo de retención: 2,03 min (enantiómero que eluye antes) (I_IB_20_MEOH_NH3).

EJEMPLO de referencia B.1.3B:

25 Rendimiento 54 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 534$; Tiempo de retención: 2,27 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IB_20_MEOH_NH3).

EJEMPLO de referencia C.1A y EJEMPLO de referencia C.1B: Enantiómeros del INTERMEDIO C.11.1

30 Los enantiómeros del INTERMEDIO C.11.1 (diastereómero que eluye antes, 490 mg, 1,035 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IB, 10 x 250 mm, 5 μ m, MeOH al 20 % + NH₃ 20 mM en CO₂ supercrítico, flujo 10 ml/min, 120 bar (12 MPa) de contrapresión).

EJEMPLO de referencia C.1A:

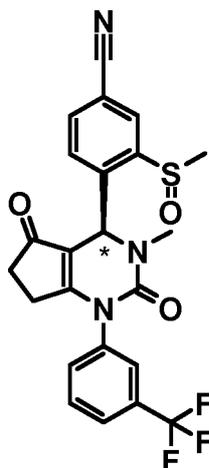
35 Rendimiento 167 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 474$; Tiempo de retención: 2,83 min (enantiómero que eluye antes) (I_IB_20_MEOH_NH3).

EJEMPLO de referencia C.1B:

40 Rendimiento 170 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 474$; Tiempo de retención: 3,25 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IB_20_MEOH_NH3).

45 Una estructura de rayos X del EJEMPLO de referencia C.1B unido a la elastasa de neutrófilos reveló la siguiente estructura y configuración en el carbono marcado con un asterisco:

EJEMPLO de referencia C.1B



EJEMPLO de referencia C.2A y EJEMPLO de referencia C.2B: Enantiómeros del INTERMEDIO C.11.2

- 5 Los enantiómeros del INTERMEDIO C.11.2 (diastereómero que eluye más tarde, 317 mg, 0.670 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IA, MeOH al 20 % + NH₃ 20 mM en CO₂ supercrítico, flujo 60 ml/min, 150 bar (15 MPa) de contrapresión).

EJEMPLO de referencia C.2A

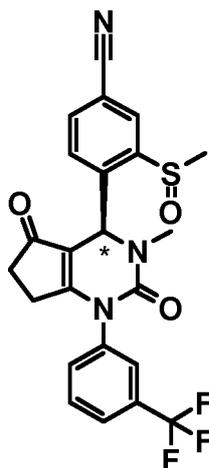
- 10 Rendimiento 126 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 474; Tiempo de retención: 1,58 min (enantiómero que eluye antes) (I_IA_20_MEOH_NH3).

EJEMPLO de referencia C.2B

- 15 Rendimiento 126 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 474; Tiempo de retención: 2,33 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IA_20_MEOH_NH3).

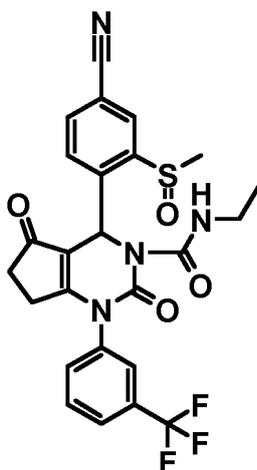
- 20 Una estructura de rayos X del EJEMPLO de referencia C.2A unido a la elastasa de neutrófilos reveló la siguiente estructura y configuración en el carbono marcado con un asterisco:

EJEMPLO de referencia C.2A



- 25 Por tanto, el EJEMPLO de referencia C.1B y el EJEMPLO de referencia C.2A tienen la misma configuración en el carbono marcado con un asterisco y difieren con respecto a la configuración del átomo de azufre. Por tanto, el EJEMPLO de referencia C.1B y el EJEMPLO de referencia C.2A son diastereómeros.

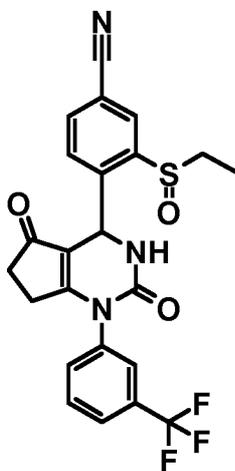
- 30 EJEMPLO de referencia C.3



5 Etilamida del ácido 4-(4-ciano-2-metanosulfinil-fenil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidina-3-carboxílico

5 A una mezcla de 4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metanosulfinil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.12.2, diastereómero que eluye más tarde, 26 mg; 0,057 mmol), diisopropiletilamina (38 μ l; 0,23 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (8 mg; 0,06 mmol) en acetonitrilo (3 ml) se le añade 4-nitro-fenilcloroformiato (12,6 mg; 0,062 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agita durante 10 5 h. Se añade etilamina (2 M en THF; 114 μ l; 0,228 mmol) a la mezcla de reacción que contiene el intermedio de carbamato de 4-nitrofenilo y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se purifica mediante HPLC de fase inversa (Sunfire, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 4 mg. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 531$; Tiempo de retención por HPLC: 1,02 min (Z018_S04).

15 EJEMPLO de referencia C.4.1 Y EJEMPLO C.4.2



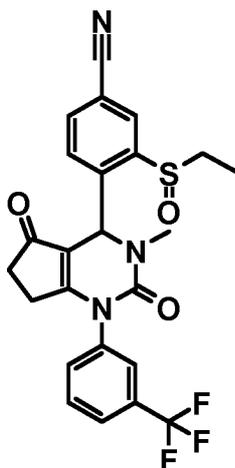
20 4-[2,5-Dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfinil-benzonitrilo

20 Se añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (al 77 %, 45 mg, 0,201 mmol) a temperatura ambiente a una solución de 4-[2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etilsulfinil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.8, 106 mg, 0,210 mmol) en diclorometano (2 ml) y la mezcla se agita durante 20 min. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Sunfire, gradiente de 25 acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %), produciendo los dos diastereoisómeros. EJEMPLO de referencia C.4.1: Rendimiento: 15 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 474$; Tiempo de retención por HPLC: 0,91 min (diastereómero que eluye antes) (Z018_S04).

30 EJEMPLO de referencia C.4.2:

Rendimiento: 32 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 474$; Tiempo de retención por HPLC: 0,93 min (diastereómero que eluye más tarde) (Z018_S04).

EJEMPLO C.5.1 y EJEMPLO C.5.2



5 3-Etanosulfinil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

Se añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (al 77 %, 24 mg, 0,107 mmol) a temperatura ambiente a una solución de 4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etilsulfanil-benzonitrilo (INTERMEDIO C.10, 53 mg, 0,112 mmol) en diclorometano (1 ml) y la mezcla se agita durante 20 min. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica mediante HPLC de fase inversa (Sunfire, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %), produciendo los dos diastereómeros.

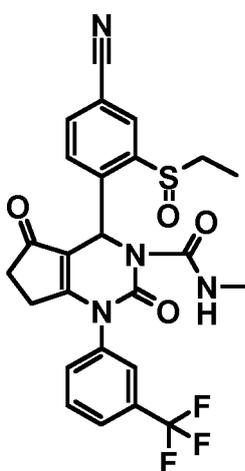
EJEMPLO C.5.1:

15 Rendimiento: 26 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 488$; Tiempo de retención por HPLC: 0,96 min (diastereómero que eluye antes) (Z018_S04).

EJEMPLO C.5.2:

20 Rendimiento: 17 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 488$; Tiempo de retención por HPLC: 0,97 min (diastereómero que eluye más tarde) (Z018_S04).

EJEMPLO de referencia C.6.1 Y EJEMPLO de referencia C.6.2



25 Metilamida del ácido 4-(4-ciano-2-etanosulfinil-fenil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidina-3-carboxílico

30 Se añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (al 77 %, 24 mg, 0,107 mmol) a temperatura ambiente a una solución de metilamida del ácido 4-(4-ciano-2-etilsulfanil-fenil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidina-3-carboxílico (INTERMEDIO C.13, 58 mg, 0,113 mmol) en diclorometano (2 ml) y la mezcla se agita durante 20 min. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y el residuo se purifica mediante HPLC

de fase inversa (Sunfire, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %) produciendo los dos diastereoisómeros.

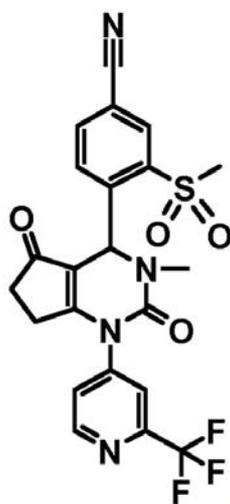
EJEMPLO de referencia C.6.1:

- 5 Rendimiento: 7 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+$ = 531; Tiempo de retención por HPLC: 0,98 min (diastereómero que eluye antes) (Z018_S04).

EJEMPLO de referencia C.6.2:

- 10 Rendimiento: 15 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+$ = 531; Tiempo de retención por HPLC: 1,00 min (diastereómero que eluye más tarde) (Z018_S04).

EJEMPLO de referencia D.1A

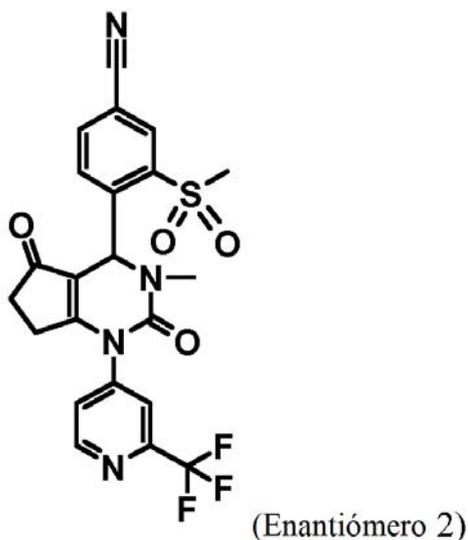


(Enantiómero 1)

- 15 3-Metanosulfonil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo
- 20 A una mezcla de 4-[2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metanosulfonil-benzonitrilo (INTERMEDIO D.6A, enantiómero que eluye antes, 92 mg, 0,19 mmol) y carbonato de cesio (126 mg, 0,39 mmol) en DMF (3,0 ml) se le añade una solución de yoduro de metilo en metil *tert*-butil éter (c = 2 mol/l, 116 μ l, 0,23 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 h. Se añade hielo a la mezcla de reacción, la mezcla se acidifica con ácido trifluoroacético y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 54 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+$ = 491; Tiempo de retención por HPLC: 0,98 min (Z018_S04). Como el material de partida es enantiopuro, se supone que el EJEMPLO D.1A es enantiopuro y tiene la misma configuración que el material de partida.
- 25

EJEMPLO de referencia D.1B

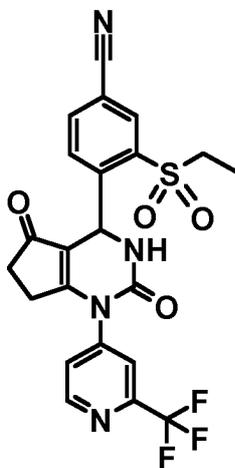
30



3-Metanosulfonil-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

5 Se prepara EJEMPLO D.1B de manera análoga a la descrita para el EJEMPLO D.1A, reemplazando el INTERMEDIO D.6A (enantiómero que eluye antes) por el INTERMEDIO D.6B (enantiómero que eluye más tarde) como material de partida. Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 491$; Tiempo de retención por HPLC: 0,98 min (Z018_S04). El EJEMPLO de referencia D.1B es el enantiómero del EJEMPLO D.1A. Como el material de partida es enantiopuro, se supone que el EJEMPLO de referencia D.1B es enantiopuro y tiene la misma configuración que el material de partida.

EJEMPLO de referencia D.2

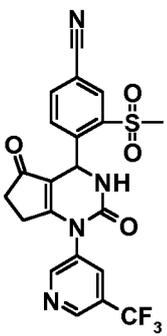
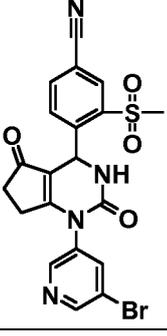
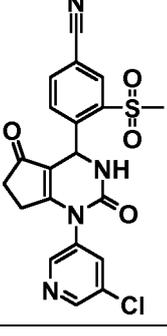


15 4-[2,5-Dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonil-benzonitrilo

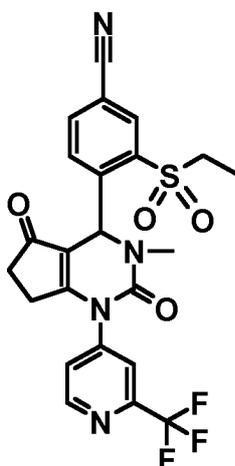
20 A una solución de clorhidrato de 4-{amino-[5-oxo-2-(2-trifluorometil-piridin-4-il-amino)-ciclopent-1-enil]-metil}-3-etanosulfonil-benzonitrilo (INTERMEDIO D.5.1, 706 mg, 1,41 mmol) y trietilamina (50 μ l, 0,36 mmol) en acetonitrilo (3,0ml) se le añade 1,1'-carbonildiimidazol (260 mg, 1,60 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 15 min. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, ácido fórmico al 0,1 %). Rendimiento: 562 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 491$; Tiempo de retención por HPLC: 0,94 min (Z018_S04).

25 Se preparan EJEMPLOS de referencia D.2.1 - D.2.4 de manera análoga a la descrita para el EJEMPLO de referencia D.2, empleando los materiales de partida que se indican en la siguiente tabla, respectivamente.

30 Tabla 5

EJEMPLO de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.2.1	INTERMEDIO D.5.2		477	0,89	Z018_S04
D.2.2	INTERMEDIO D.5.3		477	0,91	Z018_S04
D.2.3	INTERMEDIO D.5.4		487 (patrón de isotipos de bromo)	0,85	Z018_S04
D.2.4	INTERMEDIO D.5.5		443 (patrón de isotipos de cloro)	0,62	005_CA07

EJEMPLO de referencia D.3



3-Etanosulfonyl-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

5 Una solución de yoduro de metilo en metil *tert*-butil éter (c = 2 mol/l, 97 μ l, 0,19 mmol) se añade a una mezcla de 4-[2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonyl-benzonitrilo (EJEMPLO D.2, 80 mg, 0,16 mmol) y carbonato de cesio (97 mg, 0,30 mmol) en DMF (1,0 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se acidifica con ácido acético y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 63 mg. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 505; Tiempo de retención por HPLC: 1,02 min (Z018_S04).

EJEMPLO de referencia D.3A Y EJEMPLO de referencia D.3B: ENANTIÓMEROS DEL EJEMPLO de referencia D.3

15 Los enantiómeros de 3-etanosulfonyl-4-[3-metil-2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo racémico (EJEMPLO D.3, 104 mg, 0,206 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IC, 10 x 250 mm, 5 μ m, MeOH al 30 % + NH₃ 20 mM en CO₂ supercrítico, 40 °C, 120 bar (12 MPa) de contrapresión).

20 EJEMPLO de referencia D.3A:

Rendimiento 45 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 505; Tiempo de retención: 1,94 min (enantiómero que eluye antes) (I_IC_30_MeOH_NH₃).

25 EJEMPLO de referencia D.3B:

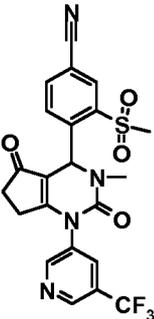
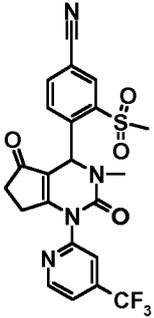
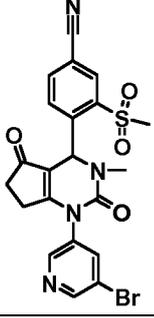
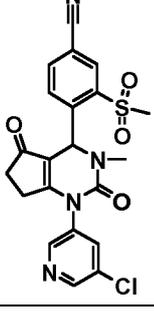
Rendimiento 47 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 505; Tiempo de retención: 2,36 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IC_30_MeOH_NH₃).

30 Los EJEMPLOS de referencia D.3.1 - D.3.4 se preparan de manera análoga a la descrita para el EJEMPLO D.3, empleando los materiales de partida que se indican en la siguiente tabla, respectivamente.

Tabla 6

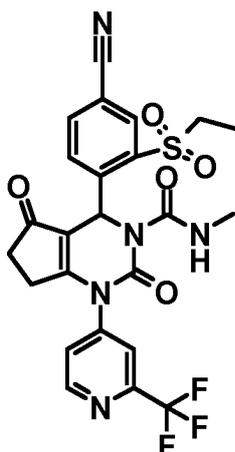
EJEMPLO de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.3.1	EJEMPLO de referencia D.2.1		491	0,97	Z018_S04

(continuación)

EJEMPLO de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.3.1	EJEMPLO de referencia D.2.1		491	0,97	Z018_S04
D.3.2	EJEMPLO de referencia D.2.2		491	0,99	Z018_S04
D.3.3	EJEMPLO de referencia D.2.3		501 (patrón de isótipos de bromo)	0,94	Z018_S04
D.3.4	EJEMPLO de referencia D.2.4		457 (patrón de isótipos de cloro)	0,91	Z017_S04

EJEMPLO de referencia D.4

5



Metilamida del ácido 4-(4-ciano-2-etanosulfonyl-phenyl)-2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidina-3-carboxílico

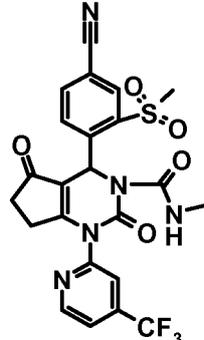
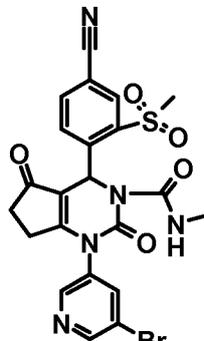
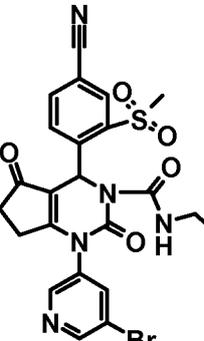
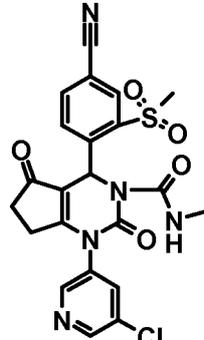
5 Una mezcla de 4-[2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonyl-benzonitrilo (EJEMPLO D.2, 80 mg, 0,16 mmol), clorofornato de 4-nitrofenilo (100 mg, 0,50 mmol), 4-dimetilaminopiridina (70 mg, 0,57 mmol) y diisopropiletilamina (0,12 ml, 0,71 mmol) en acetonitrilo (1,0ml) se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se añade metilamina (c = 2 mol/l, 1,0 ml; 2,00 mmol) a la mezcla que contiene el intermedio de carbamato de 4-nitrofenilo y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se acidifica con ácido acético y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 43 mg. Espectro de masas de IEN: [M+H]⁺ = 548; Tiempo de retención por HPLC: 0,99 min (Z018_S04).

15 Se preparan EJEMPLOS de referencia D.4.1 - D.4.10 de forma análoga a la descrita para el EJEMPLO de referencia D.4, empleando los materiales de partida que se indican en la siguiente tabla, respectivamente.

Tabla 7

EJEMPLO de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.4.1	EJEMPLO de referencia D.2 (etilamina en lugar de etilo)		562	1,03	Z018_S04
D.4.2	EJEMPLO de referencia D.2.1		534	0,95	Z018_S04

(continuación)

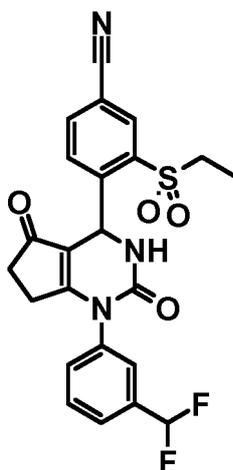
EJEMPLO de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.4.4	EJEMPLO de referencia D.2.2		534	0,97	Z018_S04
D.4.6	EJEMPLO de referencia D.2.3		544 (patrón de isotipos de bromo)	0,92	Z018_S04
D.4.7	EJEMPLO de referencia D.2.3 (etil amina en lugar de metil amina)		558 (patrón de isotipos de bromo)	0,96	Z018_S04
D.4.8	EJEMPLO de referencia D.2.4		500 (patrón de isotipos de cloro)	0,88	Z017_S04

(continuación)

EJEMPLO de referencia	Material de partida	Estructura	EM [M+H] ⁺	Tiempo de retención [min]	Método de HPLC
D.4.9	EJEMPLO de referencia D.2.4 (etil amina en lugar de metil)		514 (patrón de isotipos de cloro)	0,93	Z017_S04
D.4.10*	INTERMEDIO D.6A		548	1,00	Z018_S04
*Como el material de partida INTERMEDIO D.6.A es enantiopuro, se supone que el EJEMPLO de referencia D.4.10 es enantiopuro y tiene la misma configuración que el material de partida.					

EJEMPLO de referencia D.4.1A Y EJEMPLO de referencia D.4.1B: ENANTIÓMEROS DEL EJEMPLO de referencia D.4.1

- 5 Los enantiómeros de etilamida del ácido 4-(4-ciano-2-etanosulfonilo-fenil)-2,5-dioxo-1-(2-trifluorometil-piridin-4-il)-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidina-3-carboxílico racémica (EJEMPLO D.4.1, 127 mg, 0,226 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak Ia, 10 x 250 mm, 5 µm, MeOH al 25 % en CO₂ supercrítico, 40 °C, 120 bar (12 MPa) de contrapresión).
- 10 EJEMPLO de referencia D.4.1A:
Rendimiento 56 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 562; Tiempo de retención: 1,51 min (enantiómero que eluye antes) (I_IA_25_MeOH_NH₃).
- 15 EJEMPLO de referencia D.4.1B:
Rendimiento 54 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 562; Tiempo de retención: 2,59 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IC_25_MeOH_NH₃).
- 20 EJEMPLO D.5



4-[1-(3-Difluorometil-fenil)-2,5-dioxo-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonil-benzonitrilo

- 5 Se añade trietilamina (238 μ l, 1,699 mmol) a una mezcla de clorhidrato de 4-{amino-[2-(3-difluorometil-fenilamino)-5-oxo-ciclopent-1-enil]-metilo}-3-etanosulfonil-benzonitrilo (INTERMEDIO D.9, 1,516 g, pureza del 90 %, 2,831 mmol) y 1,1'-carbonildiimidazol (551 mg, 3,40 mmol) en acetonitrilo (10 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentra a presión reducida y el residuo se trata con agua. El precipitado se filtra y se seca. Rendimiento: 1,24 g. Espectro de masas de IEN: $[M+H]^+ = 472$; Tiempo de retención por HPLC: 0,92 min (Z017_S04).

EJEMPLO D.5A Y EJEMPLO D.5B: ENANTIÓMETROS DEL EJEMPLO D.5

- 15 Los enantiómeros de 4-[1-(3-difluorometil-fenil)-2,5-dioxo-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonil-benzonitrilo racémico (EJEMPLO D.5, 490 mg, 1,04 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Lux C1, 2x 250 mm, 5 μ m, MeOH, flujo de 21 ml/min).

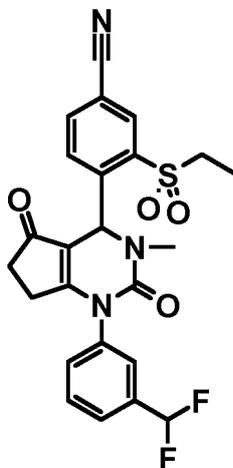
EJEMPLO D.5A:

- 20 Rendimiento 262 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 472$; Tiempo de retención: 2,95 min (enantiómero que eluye antes) (I_IB_20_MeOH_NH₃).

EJEMPLO D.5B:

- 25 Rendimiento 223 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 472$; Tiempo de retención: 3,66 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IB_20_MeOH_NH₃).

EJEMPLO de referencia D.6

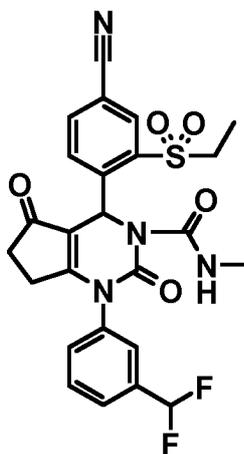


30

4-[1-(3-Difluorometil-fenil)-3-metil-2,5-dioxo-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonil-benzonitrilo

Se añade yoduro de metilo (20 μ l, 0,32 mmol) a una mezcla de 4-[1-(3-difluorometil-fenil)-2,5-dioxo-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonil-benzonitrilo (EJEMPLO D.5, 50 mg, 0,106 mmol) y carbonato de cesio (69 mg, 0,212 mmol) en DMF (1 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 36 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 486; Tiempo de retención por HPLC: 0,79 min (005_CA01).

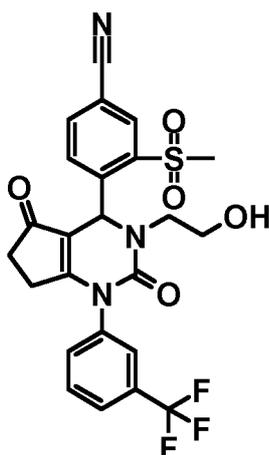
EJEMPLO de referencia D.7



Metilamida del ácido 4-(4-ciano-2-etanosulfonil-fenil)-1-(3-difluorometil-fenil)-2,5-dioxo-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidina-3-carboxílico

Se añade cloroformiato de 4-nitrofenilo (23 mg; 0,12 mmol) a una mezcla de 4-[1-(3-difluorometil-fenil)-2,5-dioxo-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-etanosulfonil-benzonitrilo (EJEMPLO D.5; 50 mg; 0,106 mmol), DIPEA (72 μ l; 0,42 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (14 mg; 0,12 mmol) en acetonitrilo (1 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Se añade cloroformiato de 4-nitrofenilo (23 mg; 0,12 mmol) y la reacción se agita durante 1 h. Se añade metilamina (2 M en THF, 159 μ l; 0,318 mmol) a la mezcla que contiene el intermedio de carbamato de 4-nitrofenilo y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se purifica mediante HPLC de fase inversa (Stablebond, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 32 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 529; Tiempo de retención por HPLC 0,98 min (Z017_S04).

EJEMPLO de Referencia E.1

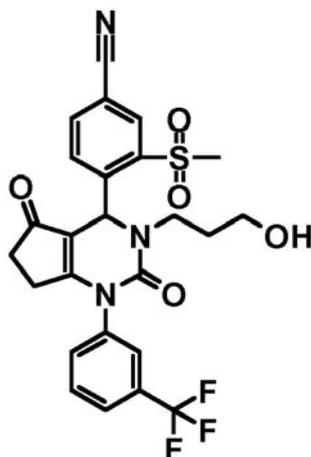


4-[3-(2-Hidroxi-etil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metanosulfonil-benzonitrilo

Se agita éster 2-[4-(4-ciano-2-metanosulfonil-fenil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-1,2,4,5,6,7-hexahidro-ciclopentapirimidin-3-il]-etílico del ácido acético (INTERMEDIO E.4, 40 mg, 0,071 mmol) con ácido trifluoroacético (2,0 ml, 26 mmol) a 60 °C durante la noche y la mezcla se concentra a presión reducida. El residuo se agita con acetonitrilo y agua durante 2 h (\rightarrow hidrólisis del éster del ácido trifluoroacético) y después se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 17 mg;

Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 520$; Tiempo de retención por HPLC: 0,96 min (Z018_S04).

EJEMPLO de Referencia E.2



(Enantiómero)

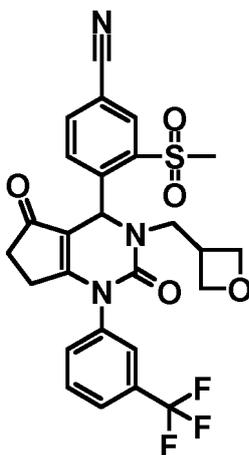
5

4-[3-(3-Hidroxiopropil)-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-3-metanosulfonyl-benzonitrilo

10 A una mezcla de 4-(2,5-dioxo-1-(3-(trifluorometil)fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il)-3-(metilsulfonyl)benzonitrilo (INTERMEDIO E.3A, enantiómero que eluye antes, 150 mg, 0,32 mmol) y carbonato de cesio (206 mg, 0,63 mmol) en DMF (2,0 ml) se le añade 3-bromo-1-propanol (55 μ l, 0,63 mmol) y la mezcla se agita a 50 °C durante la noche. La mezcla de reacción se trata con agua con hielo, se acidifica con ácido trifluoroacético y se purifica mediante HPLC de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %).
15 Rendimiento: 40 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 534$; Tiempo de retención por HPLC: 0,97 min (Z018_S04). Como el material de partida es enantiopuro, se supone que el EJEMPLO E.2 es enantiopuro y tiene la misma configuración que el material de partida.

EJEMPLO de Referencia E.3

20



25 3-Metanosulfonyl-4-[3-oxetan-3-ilmetil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometil-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzonitrilo

A una mezcla de 4-(2,5-dioxo-1-(3-(trifluorometil)fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il)-3-(metilsulfonyl)benzonitrilo (INTERMEDIO E.3, 150 mg, 0,32 mmol) y carbonato de cesio (206 mg, 0,63 mmol) en DMF (2,0 ml) se le añade 3-bromometil-oxetano (95 mg, 0,63 mmol) y la mezcla se agita a 50 °C durante la noche. La mezcla de reacción se trata con agua con hielo, se acidifica con ácido trifluoroacético y se purifica mediante HPLC
30 de fase inversa (Waters SunFire™-C₁₈, gradiente de acetonitrilo en agua, TFA al 0,1 %). Rendimiento: 55 mg; Espectro de masas de IEN $[M+H]^+ = 546$; Tiempo de retención por HPLC: 1,01 min (Z018_S04).

EJEMPLO de referencia E.3A Y EJEMPLO de referencia E.3B: ENANTIÓMEROS DEL EJEMPLO de referencia E.3

Los enantiómeros de 3-metanosulfonil-4-[3-oxetan-3-ilmetil-2,5-dioxo-1-(3-trifluorometilo-fenil)-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopentapirimidin-4-il]-benzocitrilo racémico (EJEMPLO de referencia E.3, 55 mg, 0,065 mmol) se separan mediante cromatografía de fluidos supercríticos preparativa sobre una fase quiral (Daicel Chiralpak IC, 10 x 250 mm, 5 µm, MeOH al 30 % + NH₃ 20 mM en CO₂ supercrítico, 40 °C, 120 bar (12 MPa) de contrapresión).

5 EJEMPLO de referencia E.3A:
Rendimiento 11 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 546; Tiempo de retención: 4,12 min (enantiómero que eluye antes) (I_IC_30_MeOH_NH₃).

10 EJEMPLO de referencia E.3B:
Rendimiento 11 mg; Espectro de masas de IEN [M+H]⁺ = 546; Tiempo de retención: 4,66 min (enantiómero que eluye más tarde) (I_IC_30_MeOH_NH₃).

15 DATOS FARMACOLÓGICOS

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos más detallados que ilustran, a modo de ejemplo, los principios de la invención.

20 ENSAYO DE ELASTASA DE NEUTRÓFILOS HUMANA

25 Materiales: se adquirió elastasa de neutrófilos humana en Calbiochem (N.º de Cat.: 324681) y el sustrato de la elastasa MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC en Bachem (N.º de Cat.: 1-1270). Todos los demás materiales fueron de la calidad más alta disponible en el mercado.

Se usaron los siguientes tampones: tampón compuesto: Tris 100 mM, NaCl 500 mM, ajustado a pH 7,5; Tampón de ensayo: Tris 100 mM, NaCl 500 mM, ajustado a pH 7,5, que contiene BSA al 0,01 %.

30 Condiciones de ensayo: Los compuestos de ensayo se prediluyeron en DMSO y posteriormente en tampón compuesto (DMSO al 5 % final). Se mezclaron 5 µl de estas diluciones de compuestos con 10 µl de elastasa de neutrófilos (9 ng/ml en tampón de ensayo) en una OptiPlate de color negro de 384 pocillos (Perkin Elmer, N.º de Cat.: 6007270) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 10 µl de solución de sustrato en el tampón de ensayo (concentración final de 250 µM) y las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la inactivación de la enzima, las intensidades de fluorescencia se midieron a longitudes de onda de excitación de 380 nm y de emisión de 460 nm.

40 Cada placa contiene pocillos con un control de valor alto (DMSO + enzima + sustrato) y pocillos con un control de valor bajo (DMSO + enzima + sustrato inactivado). Los valores de CI₅₀ se estimaron usando una curva de respuesta a la concentración sigmoidea con pendiente variable. Las medias de valores bajos se tomaron como el 0 %, las medias de valores altos se tomaron como el 100 %. Los valores de CI₅₀ de los compuestos seleccionados en el ensayo de elastasa de neutrófilos se enumeran en la Tabla 8.

TABLA 8

Ejemplo o ejemplo de referencia	CI ₅₀ [nM]
A.1	1,6
A.1 A	<1
A.1B	2780
A.2	<1
A.3	<1
B.1	2,1
B.1.1	5,7
B.1.2A	224
B.1.2B	<1
B.1.3A	<1
B.1.3B	11
B.1.4	<1
C.1A	1825
C.1B	<1
C.2A	<1
C.2B	13
C.3	<1
C.4.1	5,2
C.4.2	8,9
C.5.1	1,9

(continuación)

Ejemplo o ejemplo de referencia	Cl ₅₀ [nM]
C.5.2	1,9
C.6.1	<1
C.6.2	<1
D.1A	2,6
D.1B	19
D.2	24
D.2.1	60
D.2.2	65
D.2.3	101
D.2.4	103
D.3	4,0
D.3A	2810
D.3B	1,4
D.3.1	8,8
D.3.2	9,5
D.3.3	13
D.3.4	8,1
D.4	<1
D.4.1	<1
D.4.1A	<1
D.4.1B	338
D.4.2	<1
D.4.3	<1
D.4.4	<1
D.4.5	<1
D.4.6	1,2
D.4.7	<1
D.4.8	<1
D.4.9	<1
D.4.10	<1
D.5	5,5
D.5A	2,2
D.5B	892
D.6	<1
D.7	<1
E.1	<1
E.2	<1
E.3A	<1
E.3B	106

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ELASTASA DE NEUTRÓFILOS EN PLASMA HUMANO

- 5 Se mezcla sangre citrada de donantes humanos sanos con suspensión de zimosán y la mezcla se incuba a temperatura ambiente. Esto conduce a la estimulación de los neutrófilos y la liberación de la elastasa de neutrófilos en el plasma. La sangre estimulada se centrifuga para generar el plasma enriquecido con elastasa de neutrófilos.
- 10 Preparación de la solución de trabajo de zimosán:
Se mezcla zimosán (100 mg) con solución salina (al 0,9 %, 10 ml) y la mezcla se almacena a 4 °C durante hasta una semana (nota: el zimosán no se disuelve en la solución salina y se usa como suspensión).
- 15 Estimulación de sangre completa:
- Una única muestra de sangre de 45 ml se toma en un tubo de 50 ml que contiene citrato (al 3,13 %, 5 ml) y el tubo se invierte suavemente 4 veces.
 - Inmediatamente después del muestreo de sangre, se añade solución de trabajo de zimosán (5 ml).
- 20
- Después de la adición de solución de trabajo de zimosán, los tubos se tapan, se mezclan suavemente y se incuban a 22 °C durante 15 min en un agitador a 20 rpm.
 - Hacer alícuotas de 10 ml después del tiempo de incubación.
 - Centrifugar los tubos de 15 ml a 800g durante 15 min a 4 °C en una centrífuga Jouan.

- Recolectar el plasma y hacer alícuotas de 1-5 ml.
- Almacenar el plasma a -80 °C.

5 Se incuban varias concentraciones del inhibidor de la elastasa de neutrófilos con plasma. Posteriormente, la actividad de la enzima se mide usando el sustrato fluorógeno MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (N.º de Cat. de Bachem 1-1270, concentración de sustrato: 250 µM, pH 7,5, tampón TRIS 25 mM, NaCl 250 mM) de manera análoga a la descrita para el ensayo de neutrófilos humanos. Se genera una curva de respuesta a la dosis para calcular la CE₅₀ del inhibidor. El análisis de los datos se realiza mediante el cálculo del porcentaje de fluorescencia en presencia del compuesto de ensayo en comparación con la fluorescencia del control de vehículo después de restar la fluorescencia de fondo: un inhibidor de la enzima elastasa de neutrófilos proporcionará valores entre el control del 100 % (sin inhibición) y el control del 0 % (inhibición completa).

10 Los valores de CE₅₀ de los compuestos seleccionados en el ensayo de plasma humano descritos anteriormente se enumeran en la Tabla 9.

15

Tabla 9

Ejemplo o ejemplo de referencia	CE ₅₀ [µM]
A.1A	0,002
A.2	0,001
A.3	0,001
B.1.2B	0,001
B.1.3A	0,001
C.1B	0,001
C.2A	0,002
C.5.1	0,002
C.5.2	0,001
D.1A	0,001
D.3B	0,001
D.4.1A	<0,001
D.4.4	0,002
D.4.5	0,001
D.5A	0,001

20 ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD METABÓLICA CON MICROSOMAS HEPÁTICOS HUMANOS

20

La degradación metabólica del compuesto de ensayo se somete a ensayo a 37 °C con microsomas hepáticos humanos agrupados. El volumen de incubación final de 100 µl por punto temporal contiene tampón TRIS de pH 7,6 (0,1 M), cloruro de magnesio (5 mM), proteína microsómica (1 mg/ml) y el compuesto de ensayo a una concentración final de 1 µM. Después de un corto período de preincubación a 37 °C, las reacciones se inician mediante la adición de beta-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH, 1 mM) y se terminan transfiriendo una alícuota en acetonitrilo después de diferentes puntos temporales. Adicionalmente, la degradación independiente de NADPH se controla en incubaciones sin NADPH, se termina en el último punto temporal. El [%] de compuesto de ensayo restante después de la incubación independiente de NADPH se refleja en el parámetro c(control) (estabilidad metabólica). Las incubaciones interrumpidas se sedimentan mediante centrifugación (10.000 g, 5 min). Una alícuota del sobrenadante se somete a ensayo mediante CL-EM/EM para determinar la cantidad de compuesto parental.

25

30

La semivida (t_{1/2} INVITRO) está determinada mediante la pendiente de la gráfica semilogarítmica del perfil de concentración-tiempo. El aclaramiento intrínseco (CL_INTRÍNSECO) se calcula teniendo en cuenta la cantidad de proteína en la incubación:

35

$$CL_INTRÍNSECO \text{ [µl/min/mg de proteína]} = (\ln 2 / (\text{semivida [min]} * \text{contenido de proteína [mg/ml]})) * 1.000.$$

Los valores de semivida (t_{1/2} INVITRO) de los compuestos seleccionados en el ensayo de estabilidad metabólica descritos anteriormente se enumeran en la Tabla 10.

40

Tabla 10

Ejemplo o ejemplo de referencia	t _{1/2} INVITRO [mín]
A.2	>130
A.3	>130
B.1.2B	>130
B.1.3A	91
C.1B	93

(continuación)

Ejemplo o ejemplo de referencia	t _{1/2} INVITRO [mín]
C.2A	>130
C.5.1	110
C.5.2	>130
D.1A	>130
D.3B	120
D.4.1A	>130
D.4.4	>130
D.4.5	>130
D.5A	>130

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD METABÓLICA CON HEPATOCITAS HUMANOS

5 La degradación metabólica del compuesto de ensayo se somete a ensayo en una suspensión de hepatocitos humanos. Se incuban hepatocitos humanos (normalmente criopreservados) en un sistema de tampón apropiado (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco más 3,5 µg de glucagón/500 ml, 2,5 mg de insulina/500 ml y 3,75 mg/500 ml de hidrocortisona) que contiene suero de especies al 5 %. Después de una preincubación de (normalmente) 30 min en una incubadora (37 °C, CO₂ al 10 %), se añaden 5 µl de solución de compuesto de ensayo (80 µM; de solución madre 2 mM en DMSO diluido 1:25 con medio) en 395 µl de suspensión de hepatocitos (densidad celular en el intervalo de 0,25-5*10⁶ células/ml, normalmente 1*10⁶ células/ml; concentración final de compuesto de ensayo 1 µM, concentración final de DMSO del 0,05 %). Las células se incuban durante seis horas (incubadora, agitador orbital) y se toman muestras (25 µl) a 0, 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas. Las muestras se transfieren a acetoneitrilo y se sedimentan mediante centrifugación (5 min). El sobrenadante se transfiere a una nueva placa de 96 pocillos profundos, se evapora con nitrógeno y se resuspende. La disminución de compuesto parental se analiza mediante CL-EM/EM.

El aclaramiento intrínseco CL_INTRÍNSECO se calcula como se indica a continuación:

$$20 \quad CL_INTRÍNSECO = Dosis / ABC = (C_0/DC) / (ABD + C_{última}/k) * 1.000/60$$

(C₀: concentración inicial en la incubación [µM], DC: densidad celular de células vitales [10⁶ células/ml], ABD: área bajo los datos [µM * h], C_{última}: concentración del último punto de datos [µM], k: pendiente de la línea de regresión para determinar la disminución de compuesto parental [h⁻¹])

25 El aclaramiento intrínseco hepático calculado in vitro se puede aumentar a escala hasta el aclaramiento hepático intrínseco in vivo y se usa para predecir el aclaramiento sanguíneo hepático in vivo (CL) mediante el uso de un modelo de hígado (modelo bien agitado):

$$30 \quad CL_INTRÍNSECO_INVIVO [ml/min/kg] = (CL_INTRÍNSECO [µl/min/10^6 \text{ células}] * \text{hepatocelularidad} [10^6 \text{ células/g de hígado}] * \text{factor hepático} [g/kg \text{ de peso corporal}]) / 1.000$$

$$35 \quad CL [ml/min/kg] = CL_INTRÍNSECO_INVIVO [ml/min/kg] * \text{flujo sanguíneo hepático} [ml/min/kg] / (CL_INTRÍNSECO_INVIVO [ml/min/kg] + \text{flujo sanguíneo hepático} [ml/min/kg])$$

$$Q_h [\%] = CL [ml/min/kg] / \text{flujo sanguíneo hepático} [ml/min/kg]$$

(Hepatocelularidad, humana: 120*10⁶ células / g de hígado; factor hepático, humano: 25,7 g / kg de peso corporal; flujo sanguíneo, humano: 21 ml/(min * kg))

40 Basándose en este ensayo, el Ejemplo C.2A presenta un aclaramiento sanguíneo hepático previsto in vivo de flujo sanguíneo hepático humano al 3 %.

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE FÁRMACOS EN CÉLULAS CACO-2 HUMANAS

45 El ensayo proporciona información acerca del potencial de un compuesto para pasar a través de la membrana celular, acerca del grado de absorción oral, así como acerca de si el compuesto se transporta activamente mediante captación y/o transportadores de flujo de salida. Para la medición de la permeabilidad a través de células de carcinoma de cáncer de colon humanas confluentes 2 (Caco-2) se usan monocapas de células cultivadas sobre soportes de filtros permeables como modelo de absorción in vitro.

50 Los coeficientes de permeabilidad aparente (PE) de los compuestos a través de las monocapas de Caco-2 se miden (pH 7,2, 37 °C) en apical-a-basal (AB) (absorbente) y basal-a-apical (BA) en dirección de transporte (secretor). La permeabilidad AB (PEAB) representa la absorción del fármaco desde el intestino hacia la sangre y la secreción del fármaco por permeabilidad BA (PEBA) desde la sangre de vuelta hacia el intestino a través de permeabilidad pasiva, así como mecanismos de transporte activo mediados por transportadores de eflujo y captación que se expresan en

las células Caco-2. Los compuestos se asignan a las clases de permeabilidad/absorción mediante la comparación de las permeabilidades AB con las permeabilidades AB de compuestos de referencia con las permeabilidades AB de compuestos de referencia con permeabilidad in vitro y absorción oral conocidas en seres humanos. Permeabilidades idénticas o similares en ambas direcciones de transporte indican permeación pasiva, la permeabilidad vectorial apunta a mecanismos adicionales de transporte activo. Un PEBA más alto que el PEAB sugiere la implicación de un transportador de eflujo apical (como Pgp) y/o un transportador de captación basolateral; una permeabilidad PEAB más alta que la PEBA sugiere la implicación de un transportador de captación apical (como PepT1) y/o un transportador de eflujo basolateral (como MRP3). El transporte activo es saturable en función de la concentración.

Se siembran células Caco-2 ($1-2 \times 10^5$ células/cm² de área) en insertos de filtro (filtros de policarbonato Costar Transwell o PET, tamaño de poro de 0,4 µm) y se cultivan (DMEM) durante 10 a 25 días. Los compuestos se disuelven en un disolvente apropiado (como DMSO, soluciones madre de 1-20 mM). Se diluyen soluciones madre con tampón HTP-4 (NaCl 128,13 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 1,8 mM, NaHCO₃ 4,17 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 1,19 mM, NaH₂PO₄·H₂O 0,41 mM, HEPES 15 mM, glucosa 20 mM, pH 7,2) para preparar las soluciones de transporte (normalmente compuesto 10 µM, DMSO final ≤ 0,5 %). La solución de transporte (TL) se aplica al lado del donante apical o basolateral para medir la permeabilidad AB o BA (repeticiones en 3 filtros), respectivamente. El lado del receptor contiene tampón HTP-4 complementado con BSA al 2 %. Las muestras se recogen al inicio y al final del experimento del donante y en diversos intervalos de tiempo durante hasta 2 horas, también del lado del receptor para la medición de la concentración mediante CL-EM/EM o recuento de centelleo. Los volúmenes de receptor muestreados se reemplazan con solución de receptor recién preparada.

Los coeficientes de permeabilidad aparente (PEAB y PEBA) de los compuestos seleccionados en el ensayo de transporte de fármacos en Caco-2 descritos anteriormente se enumeran en la Tabla 11.

25

TABLA 11

Ejemplo o ejemplo de referencia	PEAB [cm/s]	PEBA [cm/s]
A.1A	0,000053	0,000098
A.2	0,000092	0,000080
A.3	0,000067	0,000087
B.1.2B	0,000012	0,000120
B.1.3A	0,0000099	0,000130
C.1B	0,0000037	0,000041
C.2A	0,000013	0,000073
C.5.1	0,0000071	0,000057
C.5.2	0,000016	0,000082
D.1A	0,000019	0,000081
D.3B	0,000021	0,000085
D.4.1A	0,0000036	0,000061
D.4.4	0,0000031	0,000060
D.4.5	0,0000073	0,000067
D.5A	0,0000075	0,000078

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA ("método de alto rendimiento")

La solubilidad acuosa de un compuesto se determina comparando la cantidad disuelta en tampón acuoso (que contiene DMSO al 2,5 %) con la cantidad disuelta en una solución de acetonitrilo/agua (1/1). Partiendo de una solución madre de DMSO 10 mM, las alícuotas se diluyen con acetonitrilo/agua (1/1) y tampón McIlvaine pH 6,8, respectivamente. Después de 24 h de agitación, las soluciones o suspensiones se filtran y se analizan mediante LC-UV. La cantidad disuelta en tampón se compara con la cantidad disuelta en la solución de acetonitrilo/agua (1/1). La solubilidad se mide de 0,001 a 0,125 mg/ml a una concentración de DMSO del 2,5 %. Si se disuelve más del 90 % del compuesto en un tampón, el valor se marca con ">".

40

TABLA 12

Ejemplo o ejemplo de referencia	Solubilidad acuosa [mg/ml]
A.1a	0,058
A.3	0,065
B.1.2B	0,073
B.1.3A	0,093
C.1B	0,061
C.2A	0,058
C.5.1	0,086

(continuación)

Ejemplo o ejemplo de referencia	Solubilidad acuosa [mg/ml]
C.5.2	0,069
D.4.1A	0,081
D.4.5	0,078
D.5A	0,067

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA ("Método del matraz agitado")

- 5 Se preparan soluciones saturadas en placas de pocillos mediante la adición de un volumen apropiado de medios acuosos seleccionados (normalmente en el intervalo de 0,25 - 1,5 ml) en cada pocillo que contiene una cantidad conocida de sustancia farmacológica sólida (normalmente en el intervalo de 0,5 a 5,0 mg). Los pocillos se agitan o se baten durante un período de tiempo predefinido (normalmente en un intervalo de 2 - 24 h) y después se filtran usando membranas de filtro apropiadas (normalmente filtros de PTFE con de tamaño de poro de 0,45 µm). La absorción del filtro se evita descartando las primeras gotas de filtrado. La cantidad de sustancia farmacológica disuelta se determina mediante espectroscopia UV o HPLC con detección UV. Además, el pH de la solución acuosa saturada se mide usando un medidor de pH de electrodo de vidrio. Los ejemplos de la Tabla 12 presentan una solubilidad de >0,01 mg/ml a pH 6,8 (tampón McIlvaine) en este ensayo de solubilidad.

15 ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CITOCROMO P450 2C9

- La inhibición de la hidroxilación catalizada por isoenzima citocromo P450 2C9 de diclofenaco mediante el compuesto de ensayo se analiza a 37 °C con microsomas hepáticos humanos. Todos los ensayos se realizan en un sistema robótico en placas de 96 pocillos. El volumen de incubación final contiene tampón TRIS (0,1 M), MgCl₂ (5 mM), microsomas hepáticos humanos (0,1 mg/ml), diclofenaco (10 µM) y el compuesto de ensayo a cinco concentraciones diferentes o sin compuesto (control alto) por duplicado (por ejemplo, la concentración más alta 10-50 µM con diluciones 1:4 posteriores en serie). Después de un corto período de preincubación, las reacciones se inician con el cofactor (NADPH, 1 mM) y se detienen enfriando la incubación hasta 8 °C y, posteriormente, mediante la adición de un volumen de acetonitrilo. Una solución patrón interna, por lo general el isótopo estable del metabolito formado, se añade después de la interrupción de las incubaciones. El analito de área de pico (= metabolito formado) y el patrón interno se determinan mediante CL-EM/EM. El analito de relación de área de pico resultante con respecto al patrón interno en estas incubaciones se compara con una actividad de control que no contiene ningún compuesto de ensayo. Dentro de cada una de las ejecuciones del ensayo, se determina la IC₅₀ de un inhibidor de control positivo (sulfafenazol). Los valores experimentales de CI₅₀ se calculan mediante regresión por mínimos cuadrados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de actividad del control} = (100 \% \text{ de actividad del control} / (1 + (I/CI_{50})^S)) - B$$

(I = concentración de inhibidor, S = factor de pendiente, B = actividad de fondo)

- 35 Si la inhibición de la reacción ya es >50 % a la concentración más baja del compuesto de ensayo, la CI₅₀ se asigna como "<concentración más baja sometida a ensayo" (por lo general <0,4 µM). Si la inhibición de la reacción sigue siendo <50 % a la concentración más alta del compuesto de ensayo, la CI₅₀ se asigna como "> concentración más alta sometida a ensayo" (por lo general >50 µM). El Ejemplo A.1A, el Ejemplo B.1.2B y el Ejemplo C.2A presentan valores de CI₅₀ > 50 µM en este ensayo.

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CITOCROMO P450 2C19

- 45 La inhibición de la hidroxilación catalizada por isoenzima citocromo P450 2C19 de mefentoína mediante el compuesto de ensayo se analiza a 37 °C con microsomas hepáticos humanos. Todos los ensayos se realizan en un sistema robótico en placas de 96 pocillos. El volumen de incubación final contiene tampón TRIS (0,1 M), MgCl₂ (5 mM), microsomas hepáticos humanos (0,5 mg/ml), (S)-Mefentoína (70 µM) y el compuesto de ensayo a cinco concentraciones diferentes o sin compuesto (control alto) por duplicado (por ejemplo, la concentración más alta 10-50 µM con diluciones 1:4 posteriores en serie). Después de un corto período de preincubación, las reacciones se inician con el cofactor (NADPH, 1 mM) y se detienen enfriando la incubación hasta 8 °C y, posteriormente, mediante la adición de un volumen de acetonitrilo. Una solución patrón interna, por lo general el isótopo estable del metabolito formado, se añade después de la interrupción de las incubaciones. El analito de área de pico (= metabolito formado) y el patrón interno se determinan mediante CL-EM/EM. El analito de relación de área de pico resultante con respecto al patrón interno en estas incubaciones se compara con una actividad de control que no contiene ningún compuesto de ensayo. Dentro de cada una de las ejecuciones del ensayo, se determina la IC₅₀ de un inhibidor de control positivo (tranilcipromina). Los valores experimentales de CI₅₀ se calculan mediante regresión por mínimos cuadrados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de actividad del control} = (100 \% \text{ de actividad del control} / (1 + (I/CI_{50})^S)) - B$$

60

(I = concentración de inhibidor, S = factor de pendiente, B = actividad de fondo)

Si la inhibición de la reacción ya es >50 % a la concentración más baja del compuesto de ensayo, la Cl_{50} se asigna como "<concentración más baja sometida a ensayo" (por lo general <0,4 μ M). Si la inhibición de la reacción sigue siendo <50 % a la concentración más alta del compuesto de ensayo, la Cl_{50} se asigna como "> concentración más alta sometida a ensayo" (por lo general >50 μ M). El Ejemplo A.1A, el Ejemplo B.1.2B y el Ejemplo C.2A presentan valores de Cl_{50} > 50 μ M en este ensayo.

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CITOCROMO P450 2C8

La inhibición de la desetilación catalizada por isoenzima citocromo P450 2C8 de Amodiaquina mediante el compuesto de ensayo se analiza a 37 °C con microsomas hepáticos humanos. Todos los ensayos se realizan en un sistema robótico en placas de 96 pocillos. El volumen de incubación final contiene tampón TRIS (0,1 M), $MgCl_2$ (5 mM), microsomas hepáticos humanos (0,5 mg/ml), Amodiaquina (1 μ M) y el compuesto de ensayo a cinco concentraciones diferentes o sin compuesto (control alto) por duplicado (por ejemplo, la concentración más alta 10-50 μ M con diluciones 1:4 posteriores en serie). Después de un corto período de preincubación, las reacciones se inician con el cofactor (NADPH, 1 mM) y se detienen enfriando la incubación hasta 8 °C y, posteriormente, mediante la adición de un volumen de acetonitrilo. Una solución patrón interna, por lo general el isótopo estable del metabolito formado, se añade después de la interrupción de las incubaciones. El analito de área de pico (= metabolito formado) y el patrón interno se determinan mediante CL-EM/EM. El analito de relación de área de pico resultante con respecto al patrón interno en estas incubaciones se compara con una actividad de control que no contiene ningún compuesto de ensayo. Dentro de cada una de las ejecuciones del ensayo, se determina la IC_{50} de un inhibidor de control positivo (Montelukast). Los valores experimentales de Cl_{50} se calculan mediante regresión por mínimos cuadrados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de actividad del control} = (100 \% \text{ de actividad del control} / (1 + (I/Cl_{50}) * S)) - B$$

(I = concentración de inhibidor, S = factor de pendiente, B = actividad de fondo)

Si la inhibición de la reacción ya es >50 % a la concentración más baja del compuesto de ensayo, la Cl_{50} se asigna como "<concentración más baja sometida a ensayo" (por lo general <0,4 μ M). Si la inhibición de la reacción sigue siendo <50 % a la concentración más alta del compuesto de ensayo, la Cl_{50} se asigna como "> concentración más alta sometida a ensayo" (por lo general >50 μ M). El Ejemplo A.1A, el Ejemplo B.1.2B y el Ejemplo C.2A presentan valores de Cl_{50} > 50 μ M en este ensayo.

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INDUCCIÓN DEL CITOCROMO P450

Para evaluar la inducción de la enzima CYP3A4 metabolizadora, se siembran células HepaRG® criopreservadas a una densidad de 1,0 x 10⁵ por 96 pocillos. Se deja que las células se equilibren durante 72 horas antes de la exposición del artículo de ensayo 10 μ M durante 48 horas con la renovación del artículo de ensayo cada 24 horas. Se usa un inductor prototípico conocido del CYP3A4, la rifampicina, como control positivo, a una concentración de 25 μ M. Después de 48 horas de exposición, el medio que contenía el artículo de ensayo se retiró y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes del aislamiento del ARNm.

Cálculos:

$$\text{Múltiplo de inducción} = (\text{Compuesto de ARNm de enzima}) / (\text{Control de disolvente de ARNm de enzima})$$

$$\text{Potencia del inductor} = (\text{múltiplo del Compuesto}) / (\text{múltiplo de Rifampicina}) * 100$$

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE hERG

La inhibición del canal de potasio hERG (gen humano relacionado con éter-a-go-go) puede determinarse como se describe en Rast, G. y Guth, B.D., *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2014.08.001>.

La inhibición de hERG de compuestos seleccionados en este ensayo de pinzamiento zonal se enumera en la Tabla 13.

TABLA 13

Ejemplo o ejemplo de referencia	Inhibición de hERG
A.1A	Cl_{50} > 30 μ M (7 % a 10 μ M)
B.1.2B	Cl_{50} > 30 μ M (12 % a 10 μ M)
C.2A	Cl_{50} > 30 μ M (7 % a 10 μ M)
D.1A	Cl_{50} > 30 μ M (8 % a 10 μ M)

COMBINACIONES

Los compuestos de fórmula general 1 pueden usarse solos o combinados con otras sustancias activas de fórmula 1 de acuerdo con la invención. Los compuestos de fórmula general 1 también pueden combinarse opcionalmente con otras sustancias farmacológicamente activas. Estas incluyen, agonistas de adrenorreceptor $\beta 2$ (de acción de corta y larga duración), anticolinérgicos (de acción de corta y larga duración), esteroides antiinflamatorios (corticoesteroides orales y tópicos), cromoglicato, metilxantina, miméticos de glucocorticoides disociados, inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4, inhibidores de PDE7, antagonistas de LTD4, inhibidores de EGFR, agonistas de dopamina, antagonistas de PAF, derivados de lipoxina A4, moduladores de FPRL1, antagonistas del receptor LTB4 (BLT1, BLT2), antagonistas de los receptores de histamina H1, antagonistas de los receptores de histamina H4, antagonistas duales de los receptores de histamina H1/H3, inhibidores de la PI3-cinasa, inhibidores de tirosina cinasas no receptoras como, por ejemplo, LYN, LCK, SYK, ZAP-70, FYN, BTK o ITK, inhibidores de cinasas MAP como, por ejemplo, p38, ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3 o SAP, inhibidores de la vía de señalización de NF- κ B como, por ejemplo, inhibidores de la cinasa IKK2, inhibidores de iNOS, inhibidores de MRP4, inhibidores de leucotrieno biosintasa como, por ejemplo, inhibidores de 5-Lipooxigenasa (5-LO), inhibidores de cPLA2, inhibidores de la leucotrieno A4 hidrolasa o inhibidores de FLAP, inhibidores de MMP9, inhibidores de MMP12, agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de catepsina C (o DPPI/dipeptidilaminopeptidasa I), antagonistas de CRTH2, moduladores de receptores de DPI, antagonistas de receptores de tromboxano, antagonistas de CCR3, antagonistas de CCR1, antagonistas de CCR5, antagonistas de CCR6, antagonistas de CCR7, antagonistas de CCR8, antagonistas de CCR9, antagonistas de CCR30, antagonistas de CXCR3, antagonistas de CXCR4, antagonistas de CXCR2, antagonistas de CXCR1, antagonistas de CXCR5, antagonistas de CXCR6, antagonistas de CX3CR3, antagonistas de neurocinina (NK1, NK2), moduladores de los receptores de la esfingosina 1-fosfato, inhibidores de la esfingosina 1-fosfato liasa, moduladores de los receptores de adenosina, por ejemplo, agonistas A2a, moduladores de receptores purinérgicos como, por ejemplo, inhibidores de P2X7, activadores de histona desacetilasa (HDAC), antagonistas de bradicinina (BK1, BK2), inhibidores de TACE, moduladores de PPAR gamma, inhibidores de la Rho-cinasa, inhibidores de la enzima convertidora de la interleucina 1-beta (ICE), moduladores de tipo Toll (TLR), inhibidores de la HMG-CoA reductasa, antagonistas de VLA-4, inhibidores de I-CAM-1, agonistas de SHIP, antagonista de los receptor de GABAa, inhibidores de ENaC, inhibidores de Prostatina, moduladores de los receptores de Melanocortina (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R), antagonistas de CGRP, antagonistas de endotelina, antagonistas de TNF α , anticuerpos anti-TNF, anticuerpos anti-GM-CSF, anticuerpos anti-CD46, anticuerpos anti-IL-1, anticuerpos anti-IL-2, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-5, anticuerpos anti-IL-13, anticuerpos anti-IL-4/IL-13, anticuerpos anti-TSLP, anticuerpos anti-OX40, mucorreguladores, agentes inmunoterápicos, compuestos contra la hinchazón de las vías respiratorias, compuestos contra la tos, inhibidores de VEGF, pero también combinaciones de dos o tres sustancias activas.

Se prefieren los betamiméticos, anticolinérgicos, corticoesteroides, inhibidores de PDE4, antagonistas de LTD4, inhibidores de EGFR, inhibidores de catepsina C, inhibidores de CRTH2, inhibidores de 5-LO, antagonistas de los receptores de histamina e inhibidores de SYK, especialmente inhibidores de la Catepsina C, pero también combinaciones de dos o tres sustancias activas, es decir:

- betamiméticos con corticoesteroides, inhibidores de PDE4, inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4,
- anticolinérgicos con betamiméticos, corticoesteroides, inhibidores de PDE4, inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4,
- corticoesteroides con inhibidores de PDE4, inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4
- inhibidores de PDE4 con inhibidores de CRTH2 o antagonistas de LTD4
- inhibidores de CRTH2 con antagonistas de LTD4.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las preparaciones adecuadas para administrar los compuestos de fórmula serán evidentes para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, pastillas para chupar, trociscos, soluciones, jarabes, elixires, sobres, inyectables, inhalables y polvos, etc.

Pueden obtenerse comprimidos adecuados, por ejemplo, mezclando uno o más compuestos de acuerdo con la fórmula I con excipientes conocidos, por ejemplo, diluyentes inertes, vehículos, disgregantes, adyuvantes, tensioactivos, aglutinantes y/o lubricantes. Los comprimidos también pueden consistir en varias capas.

INDICACIONES

Los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables tienen actividad como productos farmacéuticos, en particular como inhibidores de la elastasa de neutrófilos y, por tanto, pueden usarse en el tratamiento de:

1. tracto respiratorio: enfermedades obstructivas de las vías respiratorias incluyendo: asma, incluyendo asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca, inducida por el ejercicio, inducida por fármacos (incluyendo la inducida

- 5 por aspirina y AINE) e inducida por polvo, tanto intermitente como persistente y de todas las gravedades, y otras causas de hipersensibilidad de las vías respiratorias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); bronquitis, incluyendo bronquitis infecciosa y eosinofílica; enfisema; deficiencia de alfa-antitripsina; bronquiectasias; fibrosis quística; sarcoidosis; pulmón del granjero y enfermedades relacionadas; neumonitis por hipersensibilidad; fibrosis pulmonar, incluyendo alveolitis criptogénica fibrosa, neumonías intersticiales idiopáticas, fibrosis que complica la terapia antineoplásica e infección crónica, incluyendo tuberculosis y aspergilosis y otras infecciones micóticas; complicaciones del trasplante de pulmón; trastornos vasculíticos y trombóticos de la vasculatura pulmonar e hipertensión pulmonar; actividad antitusiva incluyendo tratamiento de la tos crónica asociada a afecciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias y tos iatrogénica; rinitis aguda y crónica incluyendo rinitis medicamentosa y rinitis vasomotora; rinitis alérgica perenne y estacional incluyendo rinitis nerviosa (fiebre del heno); poliposis nasal; infección vírica aguda incluyendo resfriado común e infección por virus sincitial respiratorio, gripe, coronavirus (incluyendo SRAG) y adenovirus; lesión pulmonar aguda; síndrome de dificultad respiratoria aguda;
- 10
- 15 2. piel: psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto u otras dermatosis eccematosas, y reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada; fito y fotodermatitis; dermatitis seborreica, dermatitis herpetiforme, liquen plano, liquen escleroatrófico, pioderma gangrenoso, piel sarcoide, lupus eritematoso discoide, pénfigo, penfigoide, epidermolisis bullosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritemas tóxicos, eosinofilia cutánea, alopecia areata, alopecia de patrón masculino, síndrome de Sweet, síndrome de Weber-Christian, eritema multiforme; celulitis, tanto infecciosas como no infecciosas; paniculitis; linfomas cutáneos, cáncer de piel no melanoma y otras lesiones displásicas; trastornos inducidos por fármacos incluyendo erupciones fijas de fármacos;
- 20
- 25 3. ojos: blefaritis; conjuntivitis, incluyendo conjuntivitis alérgica perenne y vernal; iritis; uveítis anterior y posterior; coroiditis; trastornos autoinmunitarios, degenerativos o inflamatorios que afectan a la retina; oftalmitis incluyendo oftalmitis simpática; sarcoidosis; infecciones incluyendo víricas, fúngicas y bacterianas;
- 30 4. aparato genitourinario: nefritis incluyendo intersticial y glomerulonefritis; síndrome nefrótico; cistitis incluyendo cistitis aguda y crónica (intersticial) y úlcera de Hunner; uretritis aguda y crónica, prostatitis, epididimitis, ooforitis y salpingitis; vulvovaginitis; enfermedad de Peyronie; disfunción eréctil (masculina y femenina);
- 35 5. rechazo de aloinjerto: agudo y crónico después del trasplante de riñón, corazón, hígado, pulmón, médula ósea, piel o córnea o después de una transfusión de sangre; o enfermedad crónica de injerto contra hospedador;
- 40 6. otros trastornos autoinmunitarios y alérgicos incluyendo artritis reumatoide, síndrome del intestino irritable, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, diabetes mellitus, púrpura trombocitopénica idiopática, fascitis eosinofílica, síndrome hiper-IgE, síndrome antifosfolípido y síndrome de Szary;
- 45 7. oncología: tratamiento de cánceres comunes incluyendo tumores de próstata, mama, pulmón, ovario, páncreas, intestino y colon, estómago, piel y cerebro y malignidades que afectan a la médula ósea (incluyendo las leucemias) y sistemas linfoproliferativos, tales como linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; incluyendo la prevención y el tratamiento de la enfermedad metastásica y las recidivas tumorales, y síndromes paraneoplásicos; y,
- 50 8. enfermedades infecciosas: enfermedades víricas como verrugas genitales, verrugas comunes, verrugas plantares, hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes simple, molusco contagioso, viruela, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), citomegalovirus (CMV), virus de la varicela zoster (VZV), rinovirus, adenovirus, coronavirus, gripe, para-gripe; enfermedades bacterianas tales como tuberculosis y *Mycobacterium avium*, lepra; otras enfermedades infecciosas, tales como enfermedades fúngicas, clamidia, cándida, *Aspergillus*, meningitis criptocócica, *Pneumocystis carinii*, criptosporidiosis, histoplasmosis, toxoplasmosis, infección por tripanosoma y leishmaniasis y,
- 55 9. otras enfermedades: traumatismo craneoencefálico, aneurisma aórtico abdominal

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general 1 que son útiles en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad y/o afección en la que la actividad de los inhibidores de la elastasa de neutrófilos tiene un beneficio terapéutico, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento y/o la prevención del asma y enfermedades alérgicas, enfermedades gastrointestinales inflamatorias, glomerulonefritis, enfermedades eosinofílicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección por microbios patógenos, artritis reumatoide, enfermedades neutrofílicas, fibrosis quística (FQ), fibrosis no quística, fibrosis pulmonar idiopática, bronquiectasia, vasculitis asociada a ACAN, cáncer de pulmón, bronquiectasia por fibrosis no quística, enfisema, bronquitis crónica, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), hipertensión pulmonar, hipertensión arterial pulmonar (HAP), deficiencia de alfa-1-antitripsina (DAAT), obesidad e inflamación relacionada, por ejemplo, inflamación crónica del tejido adiposo, inflamación adiposa, inflamación inducida por una dieta rica en grasas, resistencia a la insulina, diabetes, hígado graso y esteatosis hepática.

Una correlación entre la actividad biológica y las indicaciones médicas se describe en la bibliografía, por ejemplo, "Henriksen, P. A. *Current Opinion in Hematology* (2014), 21 (1), 23-28". En consecuencia, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general 1 como medicamento.

5 Para el tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas anteriormente, una dosis terapéuticamente eficaz estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por dosis de un compuesto de la invención; preferentemente, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. Por ejemplo, para la administración a una persona de 70 kg, el intervalo de dosificación sería de aproximadamente 0,7 mg a aproximadamente 7000 mg por dosis de un compuesto de la invención, preferentemente de aproximadamente 7,0 mg a aproximadamente 1400 mg por dosis. Puede necesitarse cierto grado de optimización de la dosis de rutina para determinar un nivel y un patrón de dosificación óptimos. El principio activo puede administrarse de 1 a 6 veces al día.

15 La cantidad farmacéuticamente eficaz o la dosis terapéutica reales dependerán, por supuesto, de factores conocidos por los expertos en la materia, tales como la edad y el peso del paciente, la vía de administración y la gravedad de la enfermedad. En cualquier caso, el principio activo se administrará en dosis y de una manera que permitan que se administre una cantidad farmacéuticamente eficaz en función de las condiciones singulares del paciente.

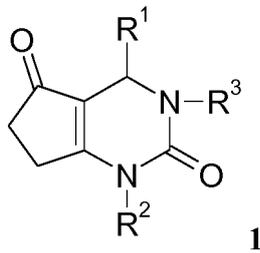
LISTA DE ABREVIATURAS

20

ACN	acetonitrilo
ac.	acuoso
BOC	<i>terc</i> -butiloxicarbonil-
d	día
DCM	diclorometano
DEA	dietilamina
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DIPE	diisopropil éter
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EA	acetato de etilo
FA	ácido fórmico
h	hora
HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
LiOH	hidróxido de litio
MeOH	metanol
MeTHF	2-metiltetrahydro furano
NaH	hidruro de sodio
PE	éter de petróleo
T.A., t.a.	temperatura ambiente
tr	tiempo de retención
TBME	<i>terc</i> -butil metil éter
TBTU	tetrafluoroborato de o-(1H-benzo-1,2,3-triazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
TEA	trietilamina
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahydrofurano
TSA	ácido tolueno sulfónico

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1

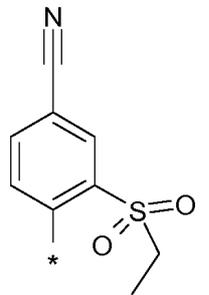


5

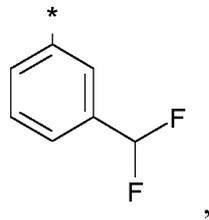
en la que

R¹ es

10

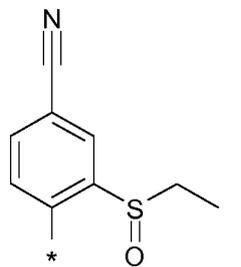


R² es



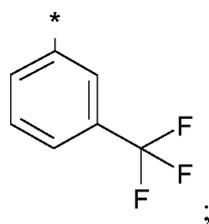
15

y R³ es H;
o
R¹ es

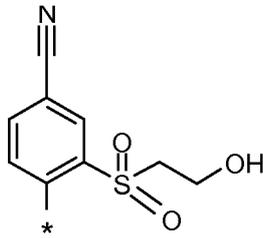


20

R² es

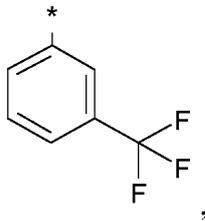


y R³ es CH₃;
o
R¹ es



5

R² es

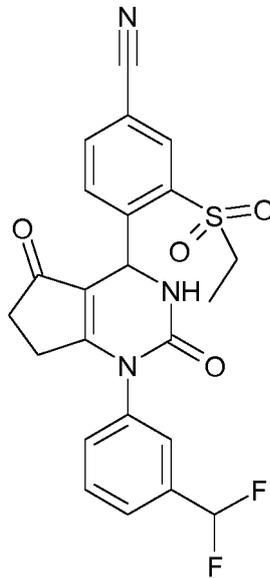


10

y R³ es CH₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de fórmula 1.a

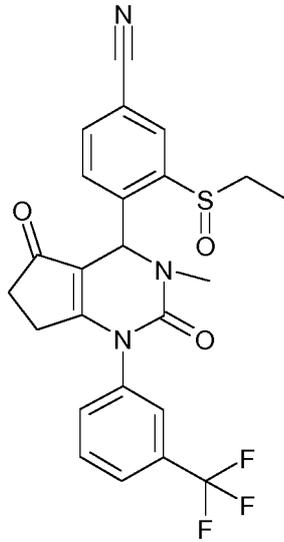


1.a

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

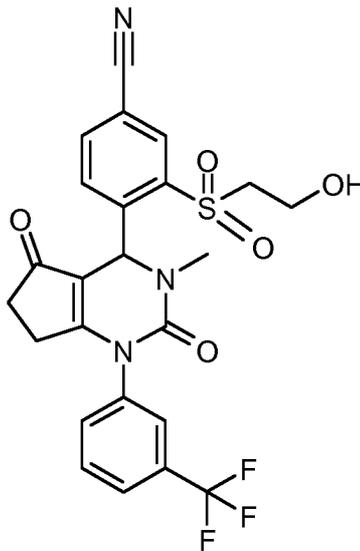
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de fórmula 1.b



1.b

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

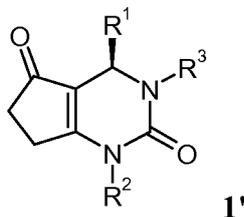
- 5 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de fórmula 1.c



1.c

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

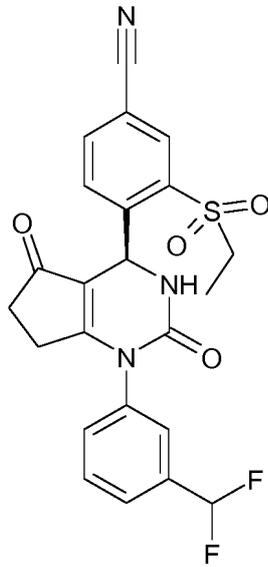
- 10 5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la configuración de fórmula 1 es la fórmula 1'



1'

- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

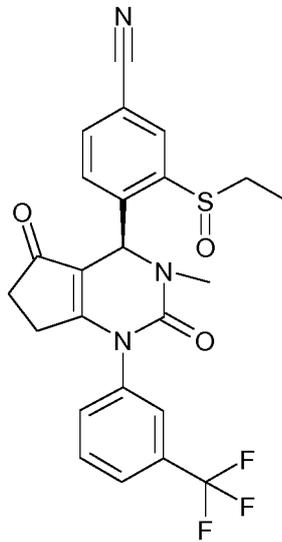
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, de fórmula 1.a'



1.a'

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, de fórmula 1.b'

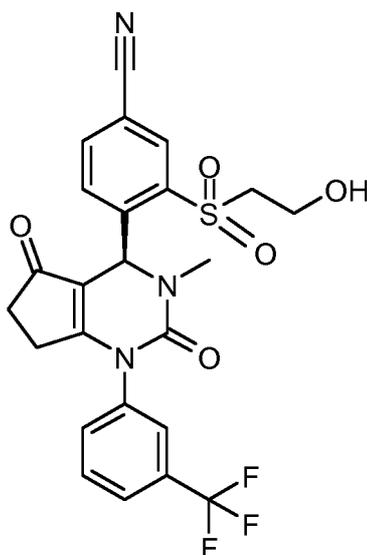


1.b'

10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, de fórmula 1.c'



1.c'

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 9. Un compuesto de fórmula 1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento.
- 10 10. Un compuesto de fórmula 1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento para el tratamiento del asma y enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias gastrointestinales, glomerulonefritis, enfermedades eosinofílicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección por microbios patógenos y artritis reumatoide.
- 15 11. Un compuesto de fórmula 1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades neutrofílicas, fibrosis quística (FQ), fibrosis no quística, fibrosis pulmonar idiopática, bronquiectasia, vasculitis asociada a ACAN, cáncer de pulmón, bronquiectasia por fibrosis no quística, enfisema, bronquitis crónica, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), hipertensión pulmonar, hipertensión arterial pulmonar (HAP) y deficiencia de alfa-1-antitripsina (DAAT).
- 20 12. Un compuesto de fórmula 1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento para el tratamiento de la obesidad y la inflamación relacionada, la resistencia a la insulina, la diabetes, el hígado graso y la esteatosis hepática.
- 25 13. Un compuesto de fórmula 1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento para el tratamiento del traumatismo craneoencefálico, el aneurisma aórtico abdominal y la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH).
14. Composición farmacéutica, caracterizada por que contiene uno o más compuestos de fórmula 1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente activa de los mismos.
- 30 15. Una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un compuesto de fórmula 1, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un compuesto farmacéuticamente activo seleccionado entre el grupo que consiste en betamiméticos, anticolinérgicos, corticoesteroides, inhibidores de PDE4, antagonistas de LTD4, inhibidores de EGFR, inhibidores de la Catepsina C, inhibidores de CRTH2, inhibidores de 5-LO, antagonistas de los receptores de histamina e inhibidores de SYK, pero también combinaciones de dos o tres sustancias activas.