

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 433**

51 Int. Cl.:

C07D 471/14 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2017 PCT/US2017/047479**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2018 WO18039051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017 E 17761381 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3504208**

54 Título: **Derivado de la triazolopirazinona útil como inhibidor de la pde1 humana**

30 Prioridad:

25.08.2016 US 201662379372 P

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

30.12.2020

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**REKHTER, MARK DAVID y
SHI, QING**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 800 433 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivado de la triazolopirazinona útil como inhibidor de la pde1 humana

La presente invención se refiere a un determinado inhibidor de la PDE1 en el ser humano, a las composiciones farmacéuticas que componen el compuesto, a los procedimientos de utilización del compuesto para tratar los trastornos fisiológicos y a los intermediarios y procesos útiles para la síntesis del compuesto.

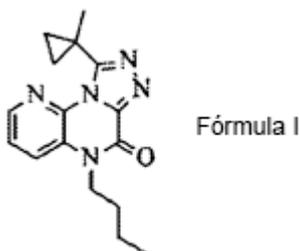
Las fosfodiesterasas (PDEs) son enzimas que regulan los niveles celulares de cAMP y cGMP controlando la velocidad de hidrolización de estos nucleótidos cíclicos. La PDE1, una PDE dependiente del calcio y la calmodulina, es una de las 11 familias de PDE conocidas. La PDE1 se expresa en muchos tejidos, incluidos el cerebro, el corazón, el pulmón, el riñón y el músculo liso. Además, la PDE1 está compuesta por una familia de tres isoformas conocidas, PDE1A, PDE1B y PDE1C.

Los pacientes que sufren de diabetes a menudo desarrollan una forma de enfermedad renal crónica conocida como enfermedad renal diabética (o nefropatía diabética). Se ha estimado que la enfermedad renal diabética puede afectar hasta el 40 por ciento de los pacientes diabéticos. Las opciones de tratamiento para la enfermedad renal diabética son limitadas e incluyen el uso de medicamentos que reducen la presión arterial, el control de los niveles de glucosa en la sangre, la dieta y el peso, y la realización de actividad física regular. Por lo tanto, es necesario contar con opciones de tratamiento adicionales para los pacientes que sufren de enfermedad renal crónica, en particular la enfermedad renal diabética.

La patente de los Estados Unidos No.8,299,080 revela ciertos derivados de la quinoxalina que tienen una actividad inhibidora de la PDE9, útil para el tratamiento de diversos trastornos, como la disuria y la hipertensión. Además, la Patente Europea No. 0 040 401 revela ciertos sustituidos triazolopirazin-4-onas que poseen actividad antihipertensiva.

La presente invención proporciona un cierto compuesto nuevo que es un inhibidor de la PDE1 humana. Además, la presente invención proporciona un cierto compuesto novedoso que es un inhibidor selectivo de la PDE1A, PDE1B y PDE1C humanas en relación con otras PDE humanas, como la PDE2A, PDE3A, PDE4D, PDE5A, PDE6AB, PDE7B, PDE8A, PDE9A, PDE10A y PDR11A. Además, la presente invención proporciona un cierto compuesto novedoso que puede tener efectos antihipertensivos y también puede mejorar el flujo sanguíneo renal. Además, el compuesto de la presente invención puede reducir la fibrosis renal.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad renal crónica en un paciente, que consiste en administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula I.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad renal diabética en un paciente, que consiste en administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula 1.

La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de la hipertensión en un paciente que consiste en administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula 1.

Además, la invención proporciona un compuesto de la Fórmula I para su uso en la terapia. La invención también proporciona un compuesto de la Fórmula I para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal crónica. Además, la invención proporciona un compuesto de la Fórmula I para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética. Además, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I para su uso en el tratamiento de la hipertensión. Además, la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica. Además, la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal diabética. La invención además

proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipertensión.

5 La invención proporciona además una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la Fórmula 1 con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La invención además proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende la mezcla de un compuesto de Fórmula 1 con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La presente invención también abarca nuevos intermediarios y procesos para la síntesis del compuesto de la Fórmula I.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "trato", "tratamiento" o "tratar" incluyen prohibir, restringir, ralentizar, detener o invertir la progresión o la gravedad de un síntoma o trastorno existente.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero, como un ratón, un conejillo de indias, una rata, un perro o un humano. Se entiende que el paciente preferido es un humano.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la invención, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, tras la administración de una dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

15 Una cantidad efectiva puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia utilizando técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad efectiva para un paciente, un experto en la materia considera una serie de factores, incluyendo, pero no limitándose a: el tamaño, edad y salud general del paciente; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de implicación o la severidad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad del preparado administrado; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

25 El compuesto de la Fórmula I es generalmente efectivo en un amplio rango de dosis. Por ejemplo, las dosis diarias normalmente están dentro del rango de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de la gama mencionada pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis aún mayores con efectos secundarios aceptables y, por lo tanto, la gama de dosificación mencionada no tiene por objeto limitar en modo alguno el ámbito de la invención.

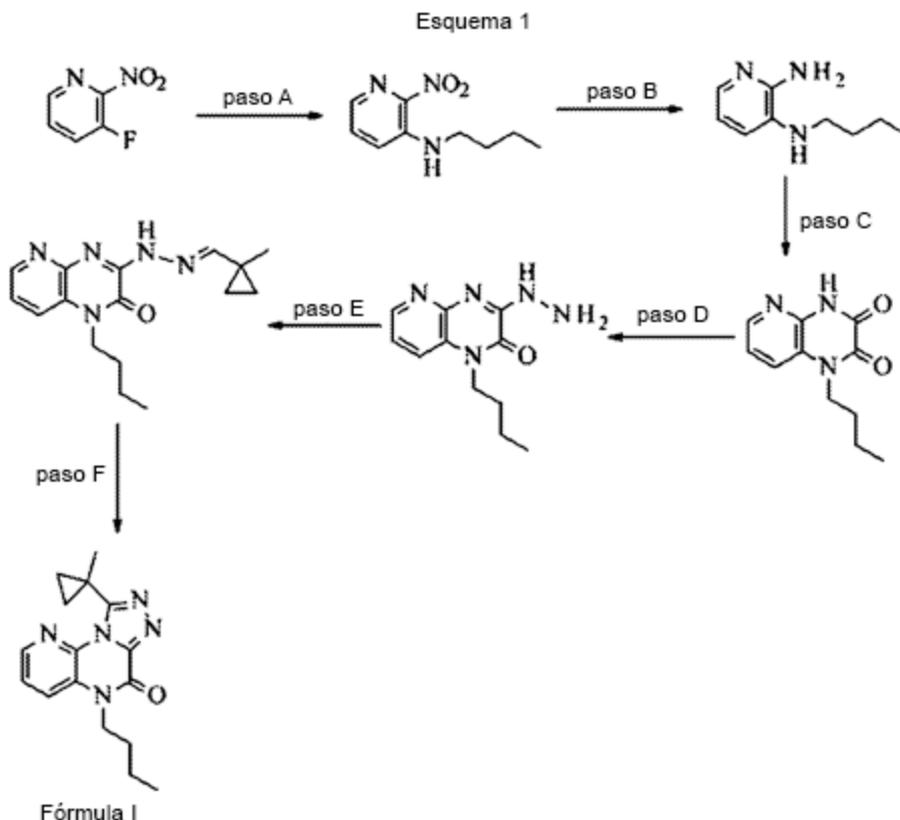
30 Los compuestos de la invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que haga que el compuesto sea biodisponible, incluidas las vías oral y parenteral. Preferentemente, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: La ciencia y la práctica de la farmacia. L.V. Allen, Editor, 22^a Edición. Pharmaceutical Press, 2012).

35 Una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la invención puede formarse, por ejemplo, mediante la reacción de una base libre apropiada del compuesto de la invención y un ácido apropiado farmacéuticamente aceptable en un disolvente adecuado en condiciones estándar bien conocidas en la técnica. La formación de tales sales es bien conocida y apreciada en la técnica. Véanse, por ejemplo, Gould, P.L., "Selección de sales para fármacos de base", International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., y otros, "Selección de sales y procedimientos de optimización de entidades novedosas farmaquímicas", Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); y Berge, S.M., y otros, "Sales farmacéuticas", Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977).

40 Ciertas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ACN" se refiere al acetonitrilo; "AcOH" se refiere al ácido acético glacial; "DBU" se refiere al 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno; "DCM" se refiere al diclorometano o al cloruro de metileno; "DIPEA" se refiere a la N,N-diisopropilamina; "DMF" se refiere a la N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere al dimetilsulfóxido; "EDCI" se refiere a la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; "ES/MS" se refiere a la Espectrometría de Masas por Electrospray; "EtOAc" se refiere al acetato de etilo; "Et₂O" se refiere al éter dietílico; "EtOH" se refiere al etanol; "HMDS" se refiere al hezametildisilazano; "HOBt" se refiere al hidroxibenzotriazol; "hr" se refiere a la hora u horas; "IC₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la máxima respuesta inhibitoria posible para ese agente; "μmol" se refiere a micromol o micromoles; "min" se refiere al minuto o minutos; "MeOH" se refiere al metanol o al alcohol metílico; "MTBE" se refiere al metil-terc-butil éter; "NiNTA" se refiere a la cromatografía con una fase estacionaria de agarosa funcionalizada con ácido nitrilotriacético como quelante; "POCl₃" se refiere al oxiclورو de fósforo; "RT" se refiere a la temperatura ambiente; "SNAr" se refiere a la sustitución aromática nucleófila; "TEA" se refiere a la trietilamina; "THF" se refiere al tetrahidrofurano; "Tris" se refiere al 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; "U/ml" se refiere a las unidades por mililitro; "wt" se refiere al peso.

55 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos por un experto en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas, preparaciones y ejemplos que figuran a continuación. El experto en la técnica reconocerá que los pasos sintéticos específicos para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras, o en conjunción con pasos de diferentes esquemas, para preparar los compuestos de la invención. Los productos de cada paso de los esquemas que figuran a continuación

5 pueden recuperarse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, entre ellos la extracción, la evaporación, la precipitación, la cromatografía, la filtración, la trituración y la cristalización. En los esquemas que figuran a continuación, todos los sustitutos, a menos que se indique otra cosa, son los definidos anteriormente. Los reactivos y los materiales de partida son fácilmente accesibles para un experto en la técnica. Sin limitar el ámbito de la invención, se proporcionan los siguientes esquemas, preparaciones y ejemplos para ilustrar mejor la invención:



10 El esquema 1 describe la síntesis del compuesto de la Fórmula I. En el esquema 1, el paso A. La reacción SNAr de la 3-fluoro-2-nitropiridina, lograda con varios nucleófilos, es muy apreciada en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 3-fluoro-2-nitropiridina se reacciona con aproximadamente 3 equivalentes de butano-1-amina en un disolvente polar adecuado como el EtOH. El producto puede entonces ser aislado utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la extracción. Por ejemplo, la mezcla de la reacción puede diluirse con agua y extraerse con un disolvente orgánico polar adecuado como el EtOAc. Los extractos orgánicos pueden combinarse, secarse sobre sulfato de sodio anhidro, filtrarse y concentrarse bajo presión reducida para proporcionar N-butil-2-nitro-piridina-3-amina, el producto del paso A, es de suficiente pureza para su uso en el siguiente paso sin purificación adicional.

15 La posterior reducción del grupo nitro es bien conocida en la técnica. En el Esquema 1, paso B, por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de N-butil-2-nitro-piridina-3-amina, el producto del paso A, puede ser hidrogenado en presencia de un catalizador de metal de transición apropiado, como el paladio sobre el carbono, en una variedad de solventes orgánicos, como el MeOH. El producto reducido puede entonces ser aislado utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la filtración y la evaporación. Por ejemplo, la mezcla de reacción cruda puede filtrarse a través de un lecho de tierra de diatomeas, y el filtrado puede concentrarse a presión reducida para obtener N3-butilpiridina-2,3-diamina, el producto del Esquema 1, paso B, es de suficiente pureza para su uso en el siguiente paso sin purificación adicional.

20 La ciclización al producto dieno del Esquema 1, paso C, puede lograrse en condiciones de acilación térmica con oxalato de dietilo en un disolvente orgánico apropiado como el EtOH. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de N3-butilpiridina-2,3-diamina puede tratarse con unos 5 equivalentes de oxalato de dietilo en un disolvente orgánico polar adecuado, como el EtOH, en un tubo sellado a unos 100 °C. El producto ciclado puede entonces aislarse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la precipitación y la filtración. Por ejemplo, la mezcla de la reacción puede enfriarse hasta unos -10 a 0 °C, y el precipitado subsiguiente puede recogerse mediante filtración y lavado con éter dietílico para obtener 1-butil-4H-pirido[2,3-b]pirazina-2,3-diona, el producto del Esquema 1, paso C, es de suficiente pureza para su uso en el siguiente paso sin purificación adicional.

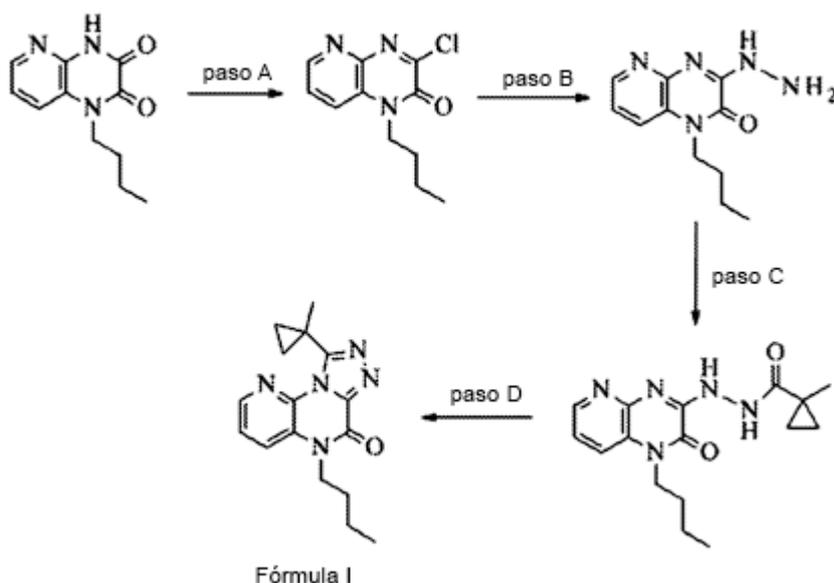
30 La deshidratación de un carbonilo activado con un nucleófilo como la hidracina es muy apreciada en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-butil-4H-pirido[2,3-b]pirazin-2,3-diona, el producto del Esquema 1, paso C, puede tratarse con aproximadamente 5 equivalentes de hidracina monohidratada a unos 100 °C en un tubo

presurizado. El producto puede entonces ser aislado utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la precipitación y la filtración. Por ejemplo, la mezcla de reacción cruda puede enfriarse hasta unos 0 °C, y el precipitado resultante puede recogerse mediante filtración y lavado con éter dietílico para obtener 1-butil-3-hidracino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, el producto del Esquema 1, paso D, es de suficiente pureza para su uso en el siguiente paso sin necesidad de purificación adicional.

La subsiguiente alquilación del producto de la hidracina del paso D puede lograrse mediante diversas técnicas de aminación reductora bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-butil-3-hidracino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, el producto del Esquema 1, paso D, puede ser tratado con aproximadamente 2 equivalentes de un alquilo aldehído sustituido apropiadamente, como 1-metilciclopropanocarbaldéhído (CAS # 4515-89-3, Enamine LLC, USA), en un solvente alcohólico apropiado como el MeOH que contiene una cantidad catalítica de un ácido apropiado, como el AcOH, a aproximadamente RT al reflujo. El producto puede entonces ser aislado utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la cristalización y la filtración. Por ejemplo, la mezcla de reacción cruda puede concentrarse a presión reducida, y el producto puede obtenerse por cristalización con un disolvente orgánico adecuado, como los hexanos, con filtración posterior para obtener 1-butil-3-[2-[(1-metilciclopropil)metileno]hidracino]pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, el producto del Esquema 1, paso E.

La preparación del compuesto de la Fórmula I puede lograrse utilizando un ciclo oxidativo hipervalente mediado por yodo (R. Aggarwal & G. Sumran, Synthetic Communications, 36: 1873-1876, 2006) en la imina sustituida 1-butil-3-[2-[(1-metilciclopropil)metileno]hidracino]pirido[2,3-b]pirazin-2-ona en un disolvente orgánico adecuado, como el DCM, a temperaturas que oscilan entre 0 °C y TA. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-butil-3-[2-[(1-metilciclopropil)metileno]hidracino]pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, el producto del Esquema I, paso E, puede disolverse en DCM y tratarse con aproximadamente 2 equivalentes de diacetato de yodosobenceno (CAS # 3240-34-4) a temperaturas que oscilan entre 0 °C y TA. El producto puede entonces ser aislado utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la extracción y la cromatografía. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede ser diluida con agua y extraída con DCM. Las capas pueden ser separadas y la capa orgánica es lavada secuencialmente con NaHCO₃ acuoso saturado, secada sobre Na₂SO₄, filtrada y concentrada bajo presión reducida. El residuo resultante puede ser purificado por cromatografía sobre sílice, utilizando un gradiente de una mezcla de disolventes apropiada como el EtOAc y hexanos, para obtener el compuesto de la Fórmula I, producto del Esquema I, paso F.

Esquema 2



El esquema 2 muestra una síntesis alternativa del compuesto de la Fórmula I. En el Esquema 2, paso A, 1-butil-4H-pirido[2,3-b]pirazin-2,3-diona, el producto del Esquema I, paso C, puede convertirse en el compuesto de cloro, como es bien conocido en la técnica, usando un agente de cloración adecuado, como POCl₃, SOCl₂, cloruro de oxalilo, o PCl₅, en un solvente orgánico apropiado como DCM o ACN que contiene una cantidad catalítica de DMF a temperaturas que van desde TA hasta el reflujo. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-butil-4H-pirido[2,3-b]pirazin-2,3-diona, el producto del Esquema 1, paso C, puede disolverse en ACN que contiene DMF, y la mezcla de reacción resultante puede tratarse con aproximadamente 3 equivalentes de cloruro de tionilo y calentarse hasta el reflujo durante unas 3 hr. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida después de enfriarse a temperatura ambiente para obtener el producto del Esquema 2, paso A, 1-butil-3-cloro-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, adecuado para su uso posterior sin adicional purificación.

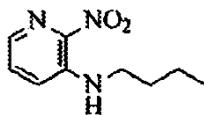
En el esquema 2, paso B, el desplazamiento del cloruro puede lograrse tratando aproximadamente 1 equivalente de 1-butil-3-cloro-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, el producto del esquema 2, paso A, con una solución de aproximadamente 4 equivalentes de hidracina acuosa monohidratada en un disolvente apto para polos como el THF en TA durante unas 8 a 24 horas. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede diluirse con agua y filtrarse, y la torta de filtro puede lavarse con un disolvente orgánico adecuado de alto punto de ebullición como el tolueno o el MTBE, y el agua resultante puede eliminarse de la mezcla bifásica mediante una simple destilación azeotrópica en un evaporador rotatorio a presión reducida con un disolvente adecuado de alto punto de ebullición, como el 2-metil-tetrahidrofurano, para obtener 1-butil-3-hidrazino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, producto del paso B del esquema 2.

La acilación del producto del paso B puede realizarse con un ácido carboxílico adecuado utilizando una variedad de técnicas de acoplamiento de amida bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 1 equivalente de 1-butil-3-hidracino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona, el producto del esquema 2, paso B, puede ser acoplado con aproximadamente 1,5 equivalentes de 1-metilciclopropano de ácido carboxílico en un solvente orgánico adecuado, como THF, DMF, o DMSO, conteniendo aproximadamente 1,5 equivalentes de EDCI y 1,5 equivalentes de HOBT con la adición subsiguiente de aproximadamente 3-5 equivalentes de una base orgánica no nucleófila como DIPEA o TEA. El producto puede entonces ser aislado utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la extracción. Por ejemplo, la mezcla de la reacción puede ser neutralizada con un ácido mineral adecuado como el HCl acuoso diluido con agua, y lavada con un solvente orgánico adecuado como el DCM, EtOAc, MTBE o Et₂O. Las capas pueden separarse y la capa acuosa resultante puede basificarse a pH ~ 7-8 con un sólido alcalino apropiado, como K₂CO₃, NaHCO₃, o Na₂SO₃, con extracción posterior con un disolvente orgánico adecuado como DCM, EtOAc, o Et₂O. Las capas orgánicas pueden lavarse secuencialmente con agua, NaCl acuoso saturado, secarse sobre Na₂SO₄, filtrarse, y el filtrado concentrarse bajo presión reducida para dar N'-(1-butil-2-oxo-pirido[2,3-b]pirazin-3-yl)-1-metil-ciclopropanecarbohidracida, el producto del Esquema 2, paso C.

En el esquema 2, paso D, el compuesto de la Fórmula 1 puede lograrse mediante ciclización en condiciones térmicas o de microondas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede calentarse aproximadamente 1 equivalente de N'-(1-butil-2-oxopirido[2,3-b]pirazin-3-il)-1-metil-ciclopropanecarbohidrato durante unas 2 a 12 horas bajo reflujo en un disolvente adecuado como el hexametildisilazano que contiene aproximadamente 0,2 equivalentes de una base orgánica no nucleófila adecuada como el 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno. El producto puede entonces aislarse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la dilución, la filtración, la trituración y la cromatografía. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede verterse en agua y el precipitado resultante puede recogerse por filtración, con la subsiguiente división del sólido recogido entre una mezcla adecuada no miscible de un disolvente orgánico, como el DCM, y agua. La capa orgánica puede separarse, lavarse secuencialmente con agua y NaCl acuoso saturado, secarse sobre Na₂SO₄, filtrarse y concentrarse a presión reducida. El residuo resultante puede ser triturado con un solvente orgánico caletar o hirviendo adecuado, como el EtOAc, durante aproximadamente 1 hora, y el sólido resultante puede ser recogido por filtración al enfriarse. El sólido puede purificarse más por cromatografía sobre sílice, utilizando un gradiente de una mezcla de disolventes adecuada como el EtOAc y el DCM, para obtener el compuesto de la Fórmula 1, producto del Esquema 2, paso D.

Preparación 1

N-butil-2-nitro-piridin-3-amina



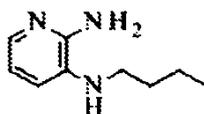
Esquema 1, paso A: Se disolvió 3-fluoro-2-nitropiridina (5,0 g, 35,2 mmol) en EtOH (30 mL) y se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió butan-1-amina (7,7 g, 105,6 mmol) a la mezcla, se dejó calentar la mezcla a TA y se agitó a TA durante 2 hr. Se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la capa orgánica con NaCl acuoso saturado, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y concentró a presión reducida para dar al compuesto del título (6,2 g, 90% de rendimiento) como aceite amarillo, apto para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 196.1 (M+1).

Procedimiento alternativo de preparación 1

Se añadió 3-fluoro-2-nitropiridina (92 g, 0,65 mol) en EtOH (552 mL) a ~20-25 °C. Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió butan-1-amina (118,4 g, 1.6187 mol) en ~ 0-5 °C durante 40 min. Se calentó a ~ 20-25 °C y se agitó durante 16 hr. Se añadió agua (800 mL) a la mezcla de reacción, se extrajo con EtOAc (2 x 600 mL), se separaron las capas y se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua (2 x 1L), NaCl acuoso saturado (2 x 500 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida a 35 °C para obtener el compuesto del título (120,00 g, rendimiento del 95%) como un aceite de color amarillo intenso, adecuado para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 196.1 (M+1).

Preparación 2

N3-butilpiridin-2,3-diamina



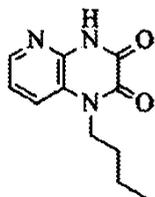
5 **Esquema 1**, paso B: Se añadió 5% de Pd/C (3,0 g, 1,4 mmol) a una solución de N-butil-2-nitro-piridin-3-amina (6,0 g, 30,7 mmol) se disolvió en el MeOH (50 mL) bajo N₂. Se agitó la mezcla en TA bajo un globo de H₂ durante 8 hr. Se filtró la mezcla a través de una almohadilla de tierra de diatomeas, se lavó con el MeOH, y se concentró el filtrado bajo presión reducida para dar al compuesto del título (5,0 g, 98% de rendimiento) como un sólido negro, adecuado para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 166,1 (M+1).

Procedimiento alternativo de preparación 2

10 Se añadió N-butil-2-nitro-piridina-3-amina (128,0 g, 0,7 mol) en el MeOH (1024 mL) a -20-25 °C. Se añadió un 5 % de Pd/C húmedo (64 g, 50% de carga) a -20-25 °C. Se agitó la mezcla resultante bajo 3 atm H₂ en ~20-25 °C durante 3 hr. Se filtró la mezcla de reacción a través de tierra de diatomeas, se lavó la torta de filtro con MeOH (5 x 500 mL), y se concentró el filtrado a presión reducida para obtener el compuesto del título (101,9 g, rendimiento del 94%) como un sólido negro, adecuado para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 166.1 (M+1).

Preparación 3

1-butil-4H-pirido[2,3-b]pirazin-2,3-diona



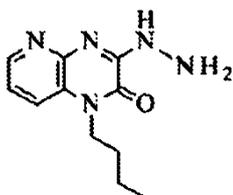
15 **Esquema 1**, paso C: Se añadió oxalato de dietilo (20,1 mL, 148,3 mmol) a una mezcla de N3-butilpiridin-2,3-diamina (4,9 g, 29,65 mmol) en EtOH (30 mL). Se calentó la mezcla en un tubo sellado a 100 °C durante 14 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 0 °C y se aisló el sólido resultante por filtración. Se lavó el sólido con Et₂O y se secó al vacío a 40 °C para obtener el compuesto del título (3,3 g, rendimiento del 51%) como un sólido de color verde, apto para ser utilizado sin purificación adicional. ES/MS m/z 219,8 (M+1).

Procedimiento alternativo de preparación 3

20 Se añadió N3-butilpiridina-2,3-diamina (81,4 g, 0,5 mol) en EtOH (550 mL) en ~20-25 °C. Se añadió 30 % en peso de NaOEt en EtOH (427,4 g, 1,0 mol) en una porción en ~20-25 °C. Se añadió oxalato de dietilo (87,1 g, 0,6 mol) gota a gota en ~20-30 °C y se agitó a TA durante 2,5 hr. Se vertió la mezcla de reacción en una mezcla de 0,5 M acuosa HCl/DCM (1600 mL/1200mL) en ~0-10 °C con agitación. Se separaron dos capas, se extrajo la capa acuosa con DCM (2 x 800 mL), se lavó con agua (2 x 1600 mL), NaCl acuoso saturado (1600 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. Se filtró y se concentró el filtrado a presión reducida. Se diluyó el residuo sólido resultante en NaCl (200 mL) a ~20-25 °C durante 30 min y se aisló el sólido resultante por filtración para dar al compuesto del título (70,0g, 65% de rendimiento) como un sólido verde, apto para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 220.1 (M+1).

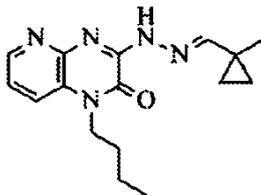
30 **Preparación 4**

1-butil-3-hidracino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona

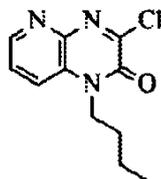


35 **Esquema 1**, paso D: Se añadió monohidrato de hidracina (3,55 mL, 73,0 mmol) a una mezcla de 1-butil-4H-pirido[2,3-b]pirazin-2,3-diona (3,2 g, 14,6 mmol) en EtOH (20 mL). Se calentó la mezcla en un tubo sellado a 100 °C durante 14 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 0 °C y se aisló el sólido por filtración. Se lavó el sólido con Et₂O y se secó al vacío a 45 °C para obtener el compuesto del título (2,8 g, rendimiento del 82%) como un sólido de color verde, apto para ser utilizado sin purificación adicional. ES/MS m/z 234,2 (M+1).

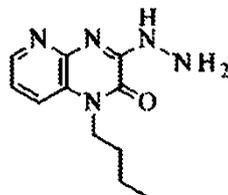
Preparación 5

1-butil-3-[2-[(1-metilciclopropil)metileno]hidracino]pirido[2,3-b]pirazin-2-ona

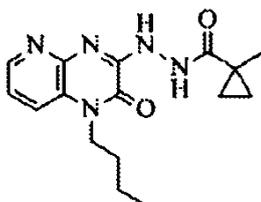
5 **Esquema 1**, paso E: Se añadió 1-metilciclopropanocarbaldéhidó (1,15 mL, 13,7 mmol) y AcOH (39,3 μ L) a una mezcla de 1-butil-3-hidrazino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona (1,6 g, 6,9 mmol) en el MeOH (20 mL). Se agitó la mezcla en TA durante 1 hr. Se concentró la mezcla a presión reducida y recristalizándose el producto a partir del hexano (50 mL). Se aisló el sólido por filtración y se lavó con hexano para obtener el compuesto del título (1,30 g, 63% de rendimiento) como un sólido negro, apto para ser utilizado sin purificación adicional. ES/MS m/z 300,2 (M+1).

Preparación 6**1-butil-3-cloro-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona**

10 **Esquema 2**, paso A: Se disolvió 1-butil-4H-pirido[2,3-b]pirazin-2,3-diona (60,8 g, 0,3 mol) en ACN (10 mL/g, 600 mL) en \sim 20-25 $^{\circ}$ C. Se añadió DMF (4,2 mL) y se añadió SOCl₂ (99,0g, 0,8 mol) en una porción. Se calentó la mezcla resultante al reflujo en \sim 75-80 $^{\circ}$ C durante 2,5 hr. Se concentró la mezcla de reacción a la sequedad bajo presión reducida para obtener el compuesto del título crudo (93,0g, >99% de rendimiento) como un sólido negro, apto para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 238,1 (M+1).

Preparación 7**1-butil-3-hidracino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona**

20 **Esquema 2**, paso B: Se añadió THF (900 mL) a una solución acuosa al 85% (peso/peso) de hidracina monohidratada (48 g, 1,5 mol,) a TA. Se añadió 1-butil-3-cloro-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona (90,0 g, 0,4 mol) para formar una pasta y remover a TA durante 16 hr. Se añadió agua (100 mL) a la mezcla de reacción y se agitó durante 20 min. Se filtró y se lavó la torta de filtro con agua (2 x 400 mL) y luego con MTBE (2 x 400 mL). Se eliminó el agua mediante azeotrópico con 2-metil-THF (3 x 600 mL) a presión reducida para obtener el compuesto del título (50,0g, 75% de rendimiento) como un sólido verde, apto para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 234.1 (M+1).

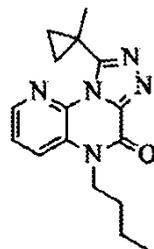
Preparación 8**N'-(1-butil-2-oxo-pirido[2,3-b]pirazin-3-il)-1-metil-ciclopropanocarbohidrato**

30 **Esquema 2**, paso C: Se añadió ácido 1-metilciclopropanocarboxílico (30,9 g, 0,3 mol) al DMF (350 mL) a temperatura ambiente y se enfrió la mezcla a 0 $^{\circ}$ C. En \sim -5-0 $^{\circ}$ C, se añadió EDCI (61,0 g, 0,3 mol) seguido de HOBt (41,75 g, 0,3 mol). A -10-0 $^{\circ}$ C, se añadió TEA (62,47 g, 0,6 mol) en gota durante 40 min y se agitó la mezcla resultante a \sim -5-0 $^{\circ}$ C

durante 20 min. Se añadió 1-butil-3-hidrazino-pirido[2,3-b]pirazin-2-ona (48,0 g, 0,2 mol.) en ~ 0-5 °C en una porción, se calentó a TA, y se agitó la mezcla resultante durante 16 hr. Se vertió la mezcla de reacción en HCl acuoso de 0,6 M (1600 mL) y se lavó con MTBE (3 x 500 mL); se separaron las capas, se desechó la capa de MTBE y se añadió DCM (1000 mL) a la capa acuosa. Se ajustó el pH ~ 7-8 con NaHCO₃ sólido (140 g), se separaron las capas, se extrajo la capa acuosa con DCM (3 x 600 mL), y se lavó las capas orgánicas combinadas secuencialmente con agua (3 x 1000 mL) y NaCl acuoso saturado (2 x 1000 mL). Se evaporó a presión reducida para dar al compuesto del título (45,0 g, 69% de rendimiento) como un sólido negro, apto para su uso sin purificación adicional. ES/MS m/z 316.2 (M+1).

Ejemplo 1

10 **5-butil-9-(1-metilciclopropil)pirido[3,2-e][1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-6(5H)-ona**



15 **Esquema 1**, paso F: Se añadió 1-butil-3-[2-[(1-metilciclopropil)metilen]-hidracino]pirido[2,3-b]pirazin-2-ona (1,3 g, 4,3 mmol) a DCM (15 mL) y se enfrió la solución a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió diacetato de yodosobenceno (2,9 g, 8,7 mmol) a la solución y se agitó la mezcla a TA durante 1 hr. Se enfrió la mezcla de reacción con agua y extrajo con DCM. Se lavó las capas orgánicas con NaHCO₃ saturado, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía sobre sílice, eluyendo con EtOAc:hexanos (3:1), para obtener el compuesto del título (1,1 g, rendimiento del 85%) como un sólido blanquecino. ES/MS m/z 298.2 (M+1).

Procedimiento alternativo del ejemplo 1

20 **Esquema 2**, paso D: Se diluyo N'-(1-butil-2-oxo-pirido[2,3-b]pirazin-3-yl)-1-metil-ciclopropanecarbohidracida (45,0 g, 0,1 mol) en HMDS (360 mL) en TA. Se añadió DBU (4,34 g, 28,5 mmol) y se calentó a 125 °C. Se agitó la solución resultante durante 6 horas bajo reflujo. Se enfrió la mezcla de la reacción a TA, se vertió la mezcla en agua (800 mL), y se filtró y se recogió el sólido resultante. Se disolvió el sólido en DCM (400 mL) / H₂O (100 mL), se separaron las capas resultantes, y se lavó la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (100 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró el filtrado bajo presión reducida para dar un residuo. Se trituró con EtOAc (200 mL) a 40-50 °C durante 1 h, y se aisló el sólido resultante (22,0 g, 98% de pureza determinada por LCMS) por filtración. Se combinó el lote de 22,0 g con otro lote de material (10,0 g, 100% de pureza determinada por LCMS) y se purificó adicionalmente por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con DCM:EtOAc (1:1), para obtener un residuo después de la evaporación del disolvente. Se trituró el residuo resultante con EtOAc caliente durante 30 min y se aisló el sólido resultante por filtración para obtener el compuesto del título (25,70 g, 42% de rendimiento) como un sólido blanco. ES/MS m/z 298.2 (M+1).

Generación de proteínas PDE

Las secuencias de nucleótidos que codifican los PDE1A (NP_001003683.1), PDE1C (NP_005011.1), PDE5A (NP_001074.2), PDE7B (NP_061818.1) y PDE9A (NP_002597.1) humanos de longitud completa se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con una etiqueta HIS de terminal N. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE4D humana de longitud completa (NP_006194.2) y el dominio catalítico (residuo 641-1141) de la PDE3A (NP_000912.3) se insertan en el vector pFastBac 1 (Invitrogen) con una etiqueta HIS de terminal C. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE8A (NP_002596.1) y la PDE11A (AA112394.1) humanas de longitud completa se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con una etiqueta de bandera N-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE10A humana de longitud completa (AAD32595.1) se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con una etiqueta de bandera C-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE6A (NP_000431.2) y la PDE6B (AAH00249.1) humanas de longitud completa se insertan en el vector pFastBacDual (Invitrogen) con una etiqueta HIS de terminal N y una etiqueta de bandera de terminal N, respectivamente, para la producción de dímeros de PDE6A/6B. La generación de baculovirus y la expresión de proteínas en las células Sf9 se llevan a cabo de acuerdo con el protocolo del sistema de Expresión de Baculovirus (Invitrogen) Bac-to-Bac. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE1B (NP_000915.1) y la PDE2A (NP_002590.1) humanas de longitud completa se insertan en el pLEX4 (Novagen) con una etiqueta HIS C-terminal, y ambas producciones de proteínas en células Sf9 se llevan a cabo según el protocolo del proveedor (Novagen). Las proteínas PDE marcadas con His se purifican utilizando agarosa Ni-NTA (Qiagen) seguida de cromatografía de exclusión de tamaño en una columna SUPERDEX® 200 (GE Healthcare) en tampón de almacenamiento (20 mM Tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 10% Glicerol). Las proteínas PDE marcadas con la bandera, incluidas las PDE6A/6B, se purifican utilizando agarosa M2 anti-bandera (Sigma), después de la purificación mediante cromatografía en columna de NiNTA y se eluyen en un tampón de almacenamiento (50 mM Tris-

HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 10% Glicerol 0,1 mg/ml Péptido de la bandera). Todas las proteínas purificadas se almacenan a -80°C en pequeñas alícuotas.

Ensayos de la enzima fosfodiesterasa

5 Todas las actividades enzimáticas de la fosfodiesterasa nucleotídica cíclica (PDE) de 3', 5' se miden con un ensayo enzimático radiométrico basado en el sistema de detección SPA (ensayo de proximidad de centelleo). Los compuestos que se van a analizar se diluyen en dimetilsulfóxido puro (DMSO) utilizando curvas de respuesta de concentración de diez puntos. La concentración máxima de compuestos en la mezcla de reacción es de 10 o 100 µM. Los compuestos a la concentración apropiada se preincuban con cualquiera de las enzimas PDE durante 30 minutos antes de que se inicie la reacción mediante la adición de sustrato. Las reacciones se dejan continuar durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las reacciones se detienen mediante la adición de perlas de SPA. Las muestras se leen 12 horas más tarde en un MICROBETA™ TRILUX® Counter. "IC₅₀" se refiere a la concentración del compuesto que produce el 50% de la máxima respuesta inhibitoria posible para ese compuesto. Los valores de IC₅₀ se calculan trazando los datos normalizados frente a log [compuesto] y ajustando los datos mediante una ecuación logística de cuatro parámetros.

15 Ensayos de enzimas PDE dependientes de Ca²⁺-calmodulina

PDE1B, PDE1A y PDE1C son clonados y purificados siguiendo los procedimientos estándar de generación de proteínas. El tampón de ensayo se prepara para dar una concentración final en el ensayo de 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de MgCl₂, 4 mM de CaCl₂, 0,1% de albúmina sérica bovina y 6 U/ml de calmodulina en agua, a pH 7,5. La concentración final de la enzima es de 0,25, 0,074 y 0,0012 nM, para PDE1A, PDE1B y PDE1C respectivamente. Las reacciones se inician con la adición del sustrato, [³H]cAMP, para dar una concentración final de 47 nM.

Tabla 1: Potencia *in vitro* del Ejemplo 1 contra la PDE1A, PDE1B y PDE1C humanas.

Enzimas PDE	IC ₅₀ (nM) del ejemplo 1
PDE 1A	10,9 ± 2,6
PDE 1B	16,3 ± 9,1
PDE 1C	2,65 ± 0,9

Los datos de la Tabla 1 demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la actividad de las enzimas PDE1A, PDE1B y PDE1C humanas *in vitro*.

25 Ensayos de enzimas PDE usando [³H]cAMP como sustrato

Las siguientes actividades de la fosfodiesterasa se miden utilizando [³H]cAMP como sustrato de reacción: PDE3A humana (dominio catalítico), PDE4D humana, PDE7B humana y PDE8A humana. Todas estas enzimas se clonan y purifican siguiendo procedimientos estándar. El tampón de ensayo se prepara para dar una concentración final en el ensayo de 50 mM de Tris-HCl, 8,3 mM de MgCl₂, 1,7 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 0,1% de albúmina sérica bovina a pH 7,5. Las concentraciones finales de las enzimas son de 0,008, 0,021, 0,5 y 0,06 nM para PDE3A, PDE4D, PDE7B y PDE8A respectivamente. Las reacciones se inician con la adición del sustrato, [³H]cAMP, para dar una concentración final de 47 nM.

Tabla 2: Potencia *in vitro* del ejemplo 1 frente a la PDE3A humana (dominio catalítico), PDE4D, PDE7B y PDE8A.

Enzimas PDE	IC ₅₀ (nM) del ejemplo 1
PDE3A	>100000
PDE4D	11900 ± 1580
PDE7B	4170
PDE8A	>10000

Ensayos de enzimas PDE usando [³H]cGMP como sustrato

Las siguientes actividades de la fosfodiesterasa se miden utilizando [³H]cGMP como sustrato de reacción: PDE2A humana, PDE5A humana, PDE6A/6B humana, PDE9A humana, PDE10A humana y PDE11A humana. La forma activa catalítica de la PDE6 humana es un dímero compuesto por una subunidad α (PDE6A humana) y β (PDE6B humana). El dímero de la PDE6A/6B humana se produce mediante la estrategia de expresión y purificación, utilizando dos pasos de purificación, a saber, la cromatografía de NiNTA y la cromatografía sefarótica anti-bandera. El resto de las enzimas se clonan y purifican en casa siguiendo procedimientos estándar. El tampón de ensayo se prepara para dar una concentración final en el ensayo de 50 mM de Tris-HCl, 8,3 mM de MgCl₂, 1,7 mM de EDTA y 0,1 % de albúmina sérica bovina a pH 7,5. Las concentraciones finales de las enzimas son de 0,2, 0,002, 5, 1, 0,03 y 0,03 nM para la PDE2A humana, la PDE5A humana, la PDE6AB humana, la PDE9A humana, la PDE10A humana y la PDE11A humana, respectivamente. Las reacciones se inician mediante la adición del sustrato, [³H]cGMP, para dar una concentración final de 80 nM en el caso de los ensayos de PDE2A, PDE10A, PDE5A, PDE6AB y PDE11A humanas, mientras que para la PDE9A humana se utilizan 20 nM de [³H]cGMP.

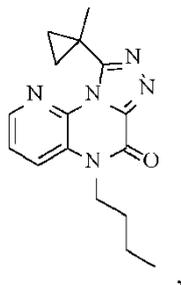
Tabla 3: Potencia *in vitro* del Ejemplo 1 frente a PDE2A, PDE5A, PDE6AB, PDE9A, PDE10A y PDE11A.

Enzimas PDE	IC ₅₀ (nM) del ejemplo 1
PDE2A	>10000
PDE5A	3130
PDE 6AB	2460 ± 247
PDE9A	>10000
PDE10A	9340
PDE 11A	389 ± 179

Los datos de las Tablas 1, 2 y 3 demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 es un inhibidor selectivo de la PDE1A, PDE1B y PDE1C humanas en relación con la PDE2A, PDE3A, PDE4D, PDE5A, PDE6AB, PDE7B, PDE8A, PDE9A, PDE10A y PDE11A humanas *in vitro*.

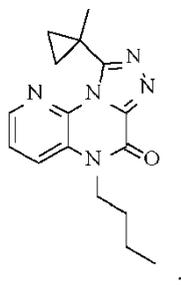
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



o una sal farmacéutica aceptable del mismo.

5 2. El compuesto según la reivindicación 1 que es:



3. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia.

10 4. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades renales crónicas.

5. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética.

6. Composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal farmacéutica del mismo según la reivindicación 1, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 7. Un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica que comprende la adición de un compuesto según la reivindicación 1, o de una sal del mismo que sea aceptable farmacéuticamente, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes aceptables farmacéuticamente.

8. Un compuesto según la reivindicación 2 para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

9. Un compuesto según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal diabética.

20 10. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 2, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.