

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Servicios Legales y Profesionales

211 
World Trade Center - Torre A
Calle 100 No. 8A-37, Piso 10
Bogotá D.C., Colombia
Tel +57 1 601-7700
Fax +57 1 601-7799
office@olarteraisbeck.com
www.olarteraisbeck.com

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04021032 00000003 folios: 100
Fecha (ADM): 2004-11-19 09:29:47
Tramite : 011 PCT-POTENI 379 FASE PACTI 229 COMPLEMEN
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Re: Expediente No. 04.021.032

Solicitud de patente titulada: "AGONISTAS MUSCARINICOS"

Solicitante: ELI LILLY

CORRECCION DE ERROR MATERIAL EN LA SOLICITUD

(ARTÍCULO 34 DECISIÓN 486)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente:

1. a- Debido a un error involuntario que surgió, me permito **MODIFICAR** la página 93, línea 21 y página 97, líneas 17 y 18, del Capítulo Descriptivo.

b- La anterior corrección se fundamenta en el hecho que mi representada encontró un error en el Capítulo Descriptivo, en particular en el formato del bio-ensayo para evaluar la selectividad del subtipo del receptor muscarínico. Se planteó en el Capítulo Descriptivo originalmente presentado que todos los compuestos se ensayaron para actividades funcionales agonista y antagonista sobre los cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 y M5) por cualquiera de los dos métodos. Los subtipos de receptores muscarínicos se ensayaron por medio de un monitoreo de movilización de calcio que expresaran establemente el receptor

recombinante humano en células totales (Y. Zhang et al (2003); J Biomol Screen 8: 571-577). Las células se pre-cargaron con la sonda fluorescente sensible a calcio, Fluo-3, en un instrumento FLIPR (Equipos moleculares, Sunnyvale, CA) y se midió la actividad como la liberación de calcio intracelular en el tiempo. Adicionalmente, se ensayaron los receptores muscarínicos midiendo la unión GTP—35S en membranas preparadas a partir de células que expresaran establemente el subtipo receptor recombinante humano (N DeLapp et al. (1999) JPET 289, 946-955).

c- El error específico yace en que solo se ensayaron los subtipos de receptor muscarínico M1, M3 y M5 por la técnica de FLIPR, tanto para el modo agonista como para el antagonista. Por otro lado, solo los subtipos de receptores muscarínicos M1, M2 y M4 se ensayaron por medio de la técnica de unión a GTP tanto para el modo agonista como para el antagonista. Sin embargo, no obstante estos errores, las conclusiones generales suministradas en la solicitud original no cambian. Es decir, los compuestos son funcionalmente selectivos como agonistas parciales para el receptor muscarínico M1 y se espera que sean útiles para el tratamiento de las mismas indicaciones terapéuticas tal como se planteó.

d- Finalmente, me permito adjuntar una copia del Capítulo Descriptivo Modificado con las páginas 93 y 97 modificadas según el punto 1a de este memorial, al igual que un recibo de pago correspondiente a la tasa de modificación de la solicitud en trámite.

2. Aprovecho la presente oportunidad poner en conocimiento del Despacho mi cambio de oficinas, por lo que de ahora en adelante, recibiré notificaciones en la Calle 100 No. 8A-55 Torre C, Piso 10, World Trade Center, o en la secretaría de ese Despacho.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
cc. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Adjunto: Capítulo Descriptivo.
Recibo de Modificación.

213


SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiacion : 04021032 00000003 Folios: 100
Fecha (MM): 2004-11-19 09:39:47
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 329 COMPLETEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 4 - 87,772
FECHA : NOVIEMBRE 10 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32717475	10/11/2004	722,000.

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	87,000.00
		TOTAL :	87,000.00

SON: OCHENTA Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

constituido por CR¹ y N, con tal que no más de dos de Q, X, Y, y Z sean N y al menos dos de Q, X, Y, y Z son CH; o Y es CH, Z es CH, y el resto "Q = X" representa "S" para formar una anillo tiofeno;

R¹ se selecciona independientemente en cada aparición entre el grupo
5 constituido por hidrógeno, halógeno, alcoxi C₁-C₄, y alquilo C₁-C₄;

R² se selecciona entre el grupo constituido por halógeno; alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄; cicloalquilo C₃-C₆; ciano; trifluorometilo; piridinilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄, y alquilo C₁-C₄; tienilo
10 opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionados entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄, y alquilo C₁-C₄; fenilo opcionalmente sustituido con entre uno y tres sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄, trifluorometilo y ciano; y pirrolilo opcionalmente sustituido con uno a dos
15 sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄, y alquilo C₁-C₄;

R³ se selecciona entre el grupo constituido por fenilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄,
20 trifluorometilo, ciano, y nitro; naftilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄, trifluorometilo, ciano y nitro; heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄ y
25 alquilo C₁-C₄; o 1,3-benzodioxolilo opcionalmente sustituido con un sustituyente

seleccionado entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C₁-C₄ y alquilo C₁-C₄;

R⁴ se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, hidroxí y fluoro;

5 R⁵ se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, halógeno, alcoxi C₁-C₄ y alquilo C₁-C₄;

R⁶ se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno y metilo;

t es uno, dos o tres; y

m es uno o dos;

10 o las sales de adición farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden un compuesto de fórmula I y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Debido a que los compuestos de fórmula I son agonistas del receptor
15 muscarínico M – 1, los compuestos de fórmula I son útiles para el tratamiento de una diversidad de trastornos asociados a receptores muscarínicos, incluyendo: trastornos cognitivos (incluyendo trastorno cognitivo relacionado con la edad, deterioro cognitivo suave, deterioro cognitivo asociado a esquizofrenia y deterioro cognitivo inducido por quimioterapia), ADHD,
20 trastornos de humor (incluyendo depresión, manía, trastornos bipolares), psicosis (esquizofrenia en particular), demencia (incluyendo enfermedad de Alzheimer, demencia inducida por SIDA, demencia vascular, y demencia sin histología distintiva), enfermedad de Parkinson y Corea de Huntington. También, los presentes compuestos son útiles para tratar colitis crónica,
25 incluyendo enfermedad de Crohn. Adicionalmente, los presentes compuestos

217

son útiles para el tratamiento de dolor (incluyendo dolor agudo y dolor crónico), xerostomía (boca seca), enfermedad de cuerpos de Lewy (incluyendo enfermedad de cuerpos de Lewy difusa), afasia (incluyendo afasia primaria síndromes de afasia primaria) y síndromes hipotensos.

- 5 En otra realización la presente invención proporciona procedimientos de tratamientos de trastornos asociados a receptores muscarínicos, comprendiendo: la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I. Es decir, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una composición
- 10 farmacéutica del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos asociados a receptores muscarínicos. La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula I para uso en terapia.

Como se usa en esta memoria descriptiva, los siguientes términos tienen los significados indicados:

- 15 El término "halógeno" se refiere a un átomo de cloro, fluoro, bromo o yodo.

- El término "alquilo C₁-C₄" se refiere a una cadena alquilo lineal o ramificada que tiene entre 1 y cuatro átomos de carbono, e incluye metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, y t-butilo. El término
- 20 "cicloalquilo C₃-C₈" se refiere a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

- El término "alcoxi C₁-C₄" se refiere a una cadena de alquilo lineal o ramificada que tiene entre 1 y cuatro átomos de carbono unidos a un átomo de oxígeno, e incluye metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-
- 25 butoxi y t-butoxi.

8218

El término "heteroarilo" se toma para significar un anillo estable no saturado de cinco o seis eslabones que contiene entre 1 y 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de heteroarilo incluyen piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirrolilo, oxazolilo, isoxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, piridazinilo, furilo, tienilo, y los similares. Los grupos heteroarilo preferidos son tienilo, piridinilo, y furilo.

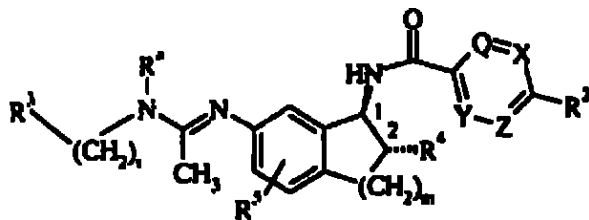
Los compuestos de la presente invención forman sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables con una amplia diversidad de ácidos orgánicos e inorgánicos e incluyen las sales fisiológicamente aceptables que se usan a menudo en la química farmacéutica. Dichas sales son también parte de esta invención. Una "sal de adición farmacéuticamente aceptable" se forma a partir de un ácido farmacéuticamente aceptable como se conoce bien en la técnica. Dichas sales incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 - 19 (1977) que conocen los expertos en la técnica. Los ácidos inorgánicos típicos usados para formar dichas sales incluyen clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, hipofosfórico, metafosfórico, pirofosfórico y los similares. También se pueden usar las sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como los ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanolcos fenil sustituidos, ácidos hidroxialcanoicos e hidroxialcandloicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Así, dichas sales farmacéuticamente aceptables incluyen cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, acetato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, ascorbato, benzoato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, isobutirato, fenilbutirato, α -hidroxibutirato, butino-1,4-dicarboxilato, hexino-1,4-

dicarboxilato, caprato, caprilato, cinamato, citrato, formiato, fumarato, glicolato, heptanoato, hipurato, lactato, malato, maleato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, isonicotinato, oxalato, ftalato, tereftalato, propiolato, propionato, fenilpropionato, salicilato, sebacato, succinato, suberato, bencenosulfonato, p-bromobencenosulfonato, clorobencenosulfonato, etilsulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, metilsulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, naftaleno-1,5-sulfonato, p-toluenosulfonato, xilenosulfonato, tartrato, y los similares.

La presente invención incluye los estereoisómeros y tautómeros de los compuestos de fórmula I. En esta memoria descriptiva, las designaciones Cahn-Prelog-Ingold de (R)- y (S)- y la designación cis y trans de estereoquímica relativa se usan para designar los isómeros específicos y la estereoquímica relativa.

Como con cualquier grupo de compuestos farmacéuticamente activos, se prefieren algunos grupos en su aplicación de uso final. Los siguientes párrafos definen clases preferidas.

- Cuando R^4 no es hidrógeno, se prefieren los compuestos que tienen estereoquímica trans en la posición 1 y 2.
- Cuando R^4 no es hidrógeno, se prefieren más los compuestos que tienen la estereoquímica trans en la posición 1 y 2 mostrados más adelante.



1020

- 5
- c) R^a es metilo.
 - d) R^5 es hidrógeno.
 - e) R^4 es hidroxi.
 - f) t es uno.
 - g) m es uno.
 - h) R^a es metilo, R^5 es hidrógeno, R^4 es hidroxi, t es uno, y m es uno.
- 10
- i) Q, X, Y y Z son cada uno CR^1 con tal que al menos dos de Q, X, Y y Z sean CH.
 - j) R^1 es hidrógeno.
 - k) R^1 es halógeno.
 - l) R^1 es fluoro.
 - m) Q, X, Y y Z son cada uno CH.
- 15
- n) Uno de Q, X, Y y Z es CF y los otros son CH.
 - o) Q es CF y X, Y y Z son cada uno CH.
 - q) R^2 es fenilo opcionalmente sustituido con entre uno y tres sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 , trifluorometilo y ciano.
- 20
- 25
- r) R^2 es fenilo.
 - s) R^3 es fenilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alcoxi C_1-C_4 , alquilo C_1-C_4 ,

11221

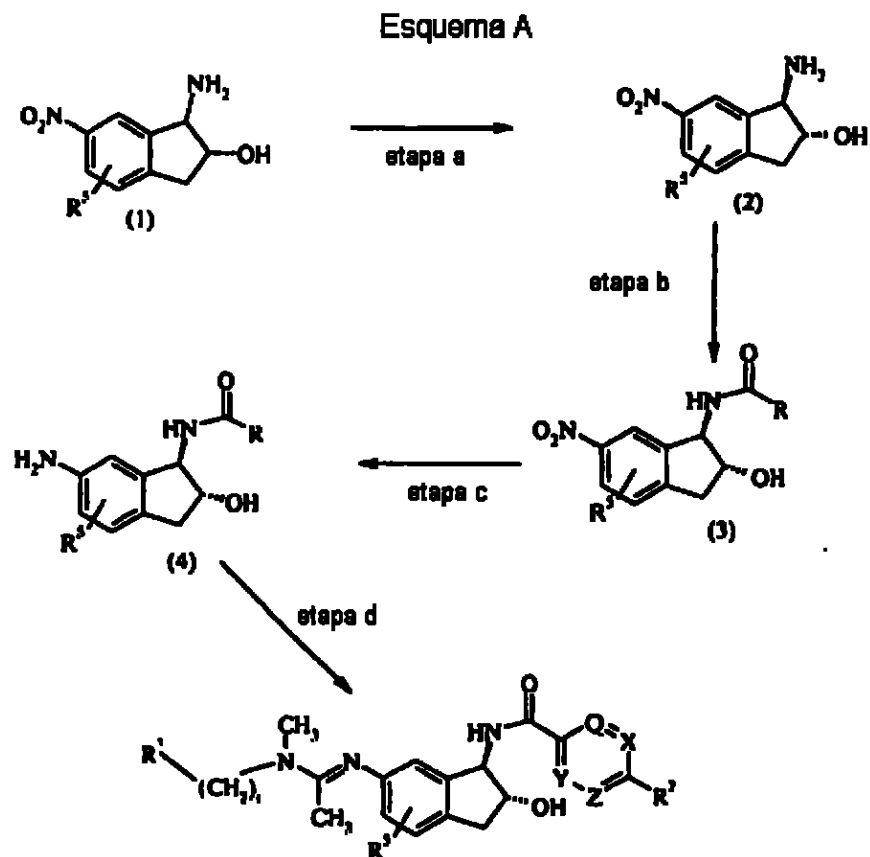
trifluorometilo, ciano y nitro.

- 5
- t) R^3 es fenilo sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo constituido por halógeno, trifluorometilo, ciano o nitro.
 - u) R^3 es fenilo sustituido una vez con halógeno.
 - v) R^3 es fenilo sustituido una vez con fluoro.
 - w) R^3 es fenilo sustituido una vez con fluoro en la posición para.
 - x) R^2 es fenilo, R^3 es fenilo sustituido una vez con fluoro en la posición para, y Q, X, Y y Z son cada uno CH.
 - y) R^2 es fenilo, R^3 es fenilo sustituido una vez con fluoro en la posición para, Q es CF y X, Y y Z son cada uno CH.
 - 10 z) R^6 es metilo, R^5 es hidrógeno, R^4 es hidroxí, t es uno, m es uno, R^2 es fenilo, y Q, X, Y y Z son cada uno CH.
 - aa) R^6 es metilo, R^5 es hidrógeno, R^4 es hidroxí, t es uno, m es uno, R^2 es fenilo, Q es CH y X, Y y Z son cada uno CH.
 - 15 bb) R^6 es metilo, R^5 es hidrógeno, R^4 es hidroxí, t es uno, m es uno y R^3 es fenilo sustituido una vez con fluoro en la posición para.

Los párrafos precedentes se pueden combinar para definir clases adicionales preferidas de compuestos.

Los compuestos de fórmula I en los que R^4 es hidroxí se preparan mediante los procedimientos descritos en el esquema A. En el esquema A todos los sustituyentes, salvo que se indique otra cosa, son como se ha definido anteriormente, y todos los reactivos se conocen y se aprecian bien en la técnica.

20



Fórmula I en la que R^4 es hidroxi y m es 1

En el esquema A, etapa a, el compuesto de fórmula (1) se resuelve para
 5 proporcionar un compuesto sustancialmente puro de fórmula (2). El compuesto
 de fórmula (1) se prepara fácilmente mediante procedimientos bien conocidos y
 apreciados en la técnica, tales como los encontrados en las publicaciones PCT
 números WO 97/25983, publicada el 24 de julio de 1997; y WO 99/04778,
 publicada el 4 de febrero de 1999. Como se usa en esta memoria descriptiva el
 10 término "sustancialmente puro" se refiere a pureza enantiomérica. La
 estereoquímica deseada en los compuestos finales de fórmula I se puede



introducir convenientemente en el esquema A, etapa a, mediante la resolución de los compuestos de fórmula (1). El procesamiento adicional de los compuestos resueltos de fórmula (1), mediante las etapas b, c, d y la etapa opcional e, descrito más adelante, dará como resultado compuestos

5 sustancialmente puros de fórmula I. Los compuestos sustancialmente puros de fórmula I se pueden preparar para que sean mayores que 80%, preferiblemente mayores que 90%, más preferiblemente mayores que 95%, lo más preferible mayor que 97% enantioméricamente puros. El compuesto de fórmula (1) se puede resolver mediante cromatografía quiral o mediante cristalización

10 fraccionada de las sales de adición de ácido diastereoméricas. Se espera que una amplia diversidad de tales sales sea adecuada para este propósito. En la práctica, los isómeros de ácido mandélico se han encontrado que son particularmente útiles.

Por ejemplo, el compuesto de fórmula (1) se pone en contacto con el

15 ácido seleccionado. Generalmente, entre aproximadamente 0,4 equivalentes molares a un gran exceso del ácido seleccionado se pueden usar prefiriéndose entre aproximadamente 0,4 y 1,5 equivalentes molares y prefiriéndose más entre aproximadamente 0,5 y 1,1 equivalentes molares. La resolución típicamente se lleva a cabo cristalizando la sal de adición de ácido a partir de

20 una solución. En particular, son útiles los disolventes, tales como alcoholes inferiores, incluyendo metanol. Puede ser ventajoso usar pequeñas cantidades de agua con el (los) disolvente (s) seleccionados con el fin de llevar a cabo la resolución en un volumen razonable. El uso de un antidisolvente también puede ser ventajoso. Como se usa en esta memoria descriptiva, el término

25 "antidisolvente" se refiere a un disolvente en el que la sal es significativamente

224
11

menos soluble comparado con el (los) otro (s) disolvente (s) seleccionado (s). Preferiblemente, cuando se usa un antidisolvente es miscible con el (los) otro (s) disolvente (s) seleccionado (s). Los antidisolventes adecuados incluyen éteres, tales como éter dietílico, metil *t*-butil éter y los similares, y acetatos de alquilo inferior, tal como acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de propilo, acetato de isobutilo, acetato de sec-butilo, acetato de butilo, acetato de amilo, acetato de isoamilo, y los similares, y alcanos, tales como pentano, hexano, heptano, ciclohexano, y los similares. Cuando se usa la mezcla racémica, se debe tener cuidado cuando se use un antidisolvente para evitar la cristalización de la sal diastereomérica no deseada.

Típicamente, la cristalización se lleva a cabo a temperaturas iniciales entre aproximadamente 40°C y temperatura de reflujo del (de los) disolvente (s) seleccionado (s). Después la mezcla se enfría para proporcionar la sal. La siembra puede ser ventajosa. Preferiblemente la solución de cristalización se enfría lentamente. Lo más conveniente es enfriar la cristalización hasta temperaturas de entre temperatura ambiente y aproximadamente -20°C. La sal se puede recoger usando técnicas que se conocen bien en la técnica, incluyendo filtración, decantación, centrifugación, evaporación, secado, y las similares. El compuesto de fórmula (2) se puede usar directamente en forma de la sal de adición de ácido del ácido seleccionado. Alternativamente, antes de usar el compuesto de fórmula (2) se puede aislar en forma de otra sal de adición de ácido después de intercambio de ácidos o se puede aislar en forma de base mediante la extracción en condiciones básicas como así se conoce y se aprecia bien en la técnica.

Como es fácilmente evidente por los expertos en la técnica el

225 / S

compuesto descrito de fórmula (2) es de configuración trans en las posiciones 1 y 2 del núcleo de indano. Los compuestos cis se preparan fácilmente a partir de dichos compuestos trans mediante protección de la amina, inversión del centro hidroxil, seguido de desprotección cuando sea necesario. Existen numerosos procedimientos que permiten inversión de centros hidroxil, tales como mediante la reacción de Mitsunobu con ácidos carboxílicos adecuados, incluyendo ácido acético y ácido benzoico, seguido de hidrólisis.

El esquema de reacción A, etapa b, describe la formación de un compuesto de fórmula (3). Se entiende que el compuesto de fórmula (3) puede ser uno en el que R es un grupo como se desea en el producto final de fórmula I como se ha definido anteriormente. R también se puede combinar con el carbonilo para formar un grupo protector tal como t-BOC, que se puede retirar posteriormente antes de la incorporación de un grupo R cuando se desee en el producto final de fórmula I. La selección y uso de grupos protectores adecuados se conoce y se aprecia bien en la técnica (Protecting Groups in Organic Synthesis, Theodora Greene (Wiley-Interscience)).

Por ejemplo, cuando R es un grupo como se desea en el producto final, la reacción de acoplamiento descrita en la etapa b se lleva a cabo usando el ácido adecuado o el haluro de ácido derivado del mismo. Los ácidos apropiados incluyen diversos ácidos benzoicos sustituidos y haluros de ácido, ácidos heteroarilícos y haluros de ácido, y diversos ácidos biarilcarboxílicos y haluros de ácido. Los ejemplos incluyen ácido bifenilcarboxílico y ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico.

Por ejemplo, el compuesto de fórmula (2) se pone en contacto con un ácido apropiado para proporcionar un compuesto de fórmula (3). Dichas

- reacciones de acoplamiento son comunes en síntesis de péptidos y se pueden emplear los procedimientos de síntesis usados a ese respecto. Por ejemplo, reactivos de acoplamiento bien conocidos, tales como reactivos unidos a resinas y carbodiimidas con o sin el uso de aditivos bien conocidos tales como
- 5 N-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol, etc., se pueden usar para facilitar esta acilación. La reacción se lleva a cabo convencionalmente en un diluyente aprótico polar inerte tal como la dimetilformamida (abreviadamente DMF), cloruro de metileno (diclorometano), cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano (abreviadamente THF) y los similares. Típicamente la reacción se lleva a cabo
- 10 a temperaturas de entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 60°C y típicamente requiere entre aproximadamente 1 y aproximadamente 24 horas. Después de la finalización de la reacción, el producto de fórmula (3) se recupera mediante procedimientos convencionales incluyendo extracción, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, cristalización y los similares.
- 15 Alternativamente, por ejemplo, el compuesto de fórmula (2) se pone en contacto con un haluro de ácido de un ácido apropiado para proporcionar un compuesto de fórmula (3). Dichos haluros de ácido están comercialmente disponibles o se preparan fácilmente a partir de los correspondientes ácidos mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como mediante la
- 20 acción de tricloruro de fósforo, tribromuro de fósforo, oxiclورو de fósforo, pentacloruro de fósforo, cloruro de tionilo, bromuro de tionilo, o cloruro de oxalilo, con o sin una pequeña cantidad de dimetilformamida, en un disolvente inerte tal como tolueno, cloruro de metileno, o cloroformo; a temperaturas entre aproximadamente 0 y 80°C. Típicamente la reacción se lleva a cabo durante un
- 25 período de tiempo que varía entre 1 y 24 horas. El haluro de ácido se puede

227
X X

aislar y purificar o se puede usar a menudo directamente, es decir, con o sin aislamiento y/o purificación. Las reacciones de acoplamiento generalmente usan una base adecuada para depurar el ácido generado durante la reacción. Las bases adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico, piridina, trietilamina, N,N-dilisopropiletilamina, N-metilmorfolina, y similares. La reacción se lleva a cabo convencionalmente en un disolvente tal como cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano y los similares, o en condiciones de Schotten – Baumann en una mezcla de disolventes tal como cloruro de metileno, acetato de etilo, tolueno y agua. Típicamente la reacción de acoplamiento se lleva a cabo a temperaturas entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 80°C y típicamente requiere entre aproximadamente 1 y aproximadamente 24 horas. Después de la finalización de la reacción, el producto de fórmula (3) se recupera mediante procedimientos convencionales incluyendo extracción, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, cristalización y los similares.

El esquema de reacción A, etapa c, describe la reducción de un grupo nitro para proporcionar un compuesto de fórmula (4). Dichas reducciones se pueden llevar a cabo mediante una diversidad de procedimientos que se conocen bien en la técnica.

Por ejemplo, un compuesto de fórmula (3) se puede hidrogenar sobre un catalizador, tal como paladio sobre carbono, para proporcionar un compuesto de fórmula (4). Dichas hidrogenaciones generalmente se llevan a cabo en un disolvente y una diversidad de disolventes son adecuados, por ejemplo metanol, etanol, isopropanol, tetrahidrofurano, o acetato de etilo o mezclas de los mismos. La hidrogenación se puede realizar a una presión de hidrógeno

228
XO

inicial entre 20 y 180 psi (137 y 1241 kPa). Típicamente la reacción se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 60°C. Típicamente la reacción requiere entre 1 hora y 3 días. El producto se puede aislar y purificar mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como
5 filtración, extracción, evaporación, trituración, precipitación, cromatografía y recristalización.

En el esquema A, etapa d, un compuesto de fórmula (4) se pone en contacto con un agente formador de amidina adecuado para proporcionar un compuesto de fórmula I. Los agentes formadores de amidina adecuados
10 incluyen triflato de 1-metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilmonio y yoduro de 1-metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilmonio. Los expertos en la técnica reconocerán que los agentes formadores de amidina apropiados se pueden preparar por adelantado o *in situ* si se desea.

Por ejemplo, un compuesto de fórmula (4) se pone en contacto con entre
15 aproximadamente 1 y 3 equivalentes de un agente formador de amidina apropiado. Generalmente la reacción se lleva a cabo en un disolvente seco tal como cloruro de metileno, tolueno, o tetrahidrofurano a temperaturas entre aproximadamente -20°C y 50°C. La reacción se lleva a cabo usando una base apropiada tal como piridina, colidina o trietilamina. Típicamente la reacción
20 requiere entre 1 y 18 horas. El producto se puede aislar y purificar mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como inactivación, filtración, extracción, evaporación, trituración, precipitación, cromatografía y recristalización.

Como se apreciará fácilmente, cuando R es un grupo protector
25 introducido en la etapa b, el grupo protector se puede retirar después de la

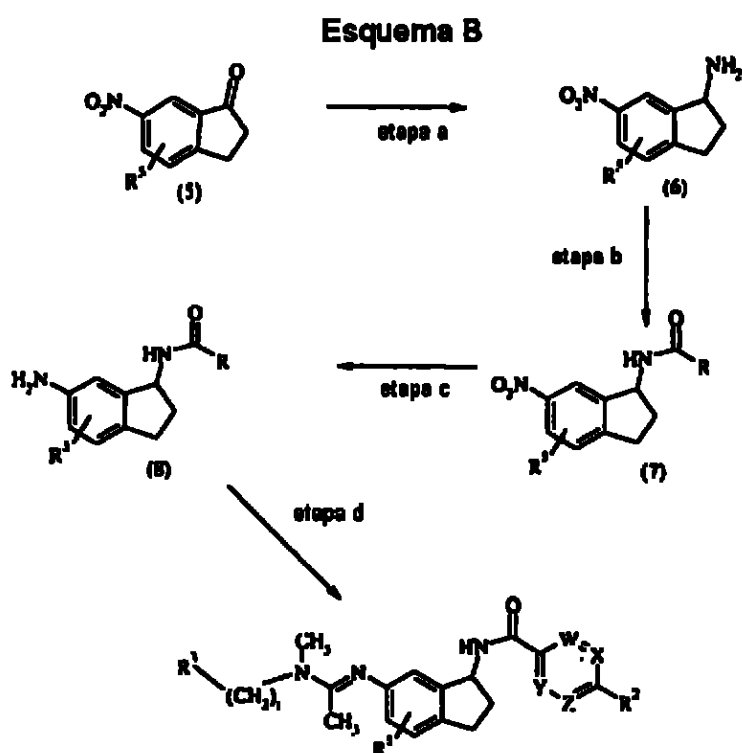
229
19

etapa d y la amina resultante acoplada a un ácido apropiado o haluro de ácido como también se ha descrito anteriormente en la etapa b para proporcionar un compuesto de fórmula I.

Algunos compuestos de fórmula I son intermedios para otros
5 compuestos finales de fórmula I. Por ejemplo, cuando R^2 es yodo, otro reactivo, por ejemplo, 2-(tributilestannil)tiofeno o 2-(tributilestannil)piridina, se puede usar para desplazar el yodo en forma de un grupo saliente y sustituir un grupo R^2 diferente según se desee en el producto final.

En el esquema A, la etapa opcional e, no mostrada, una sal de adición
10 de ácido de un compuesto de fórmula I se forma usando un ácido farmacéuticamente aceptable. La formación de sales de adición de ácido se conoce y se aprecia bien en la técnica.

Los compuestos de fórmula I en los que R^4 es hidrógeno se preparan a partir de compuestos de fórmula (3) o a partir de compuestos protegidos en el
15 grupo amina de fórmula (2) mediante desoxigenación. Tales reacciones de desoxigenación se llevan a cabo fácilmente usando procedimientos bien conocidos en la técnica, descritos, por ejemplo, por Larock, Comprehensive Organic Transformations, pg. 44 – 52 (1999). Alternativamente, los compuestos de fórmula I en los que R^4 es hidrógeno se preparan mediante procedimientos
20 descritos en el esquema B. En el esquema B todos los sustituyentes, salvo que se indique lo contrario, son como se ha descrito previamente, y todos los reactivos se conocen y se aprecian bien en la técnica.



El esquema de reacción B, etapa a, describe la aminación reductora de un compuesto de fórmula (5) para proporcionar un compuesto de fórmula (6). Dichas aminaciones reductoras se llevan a cabo en una diversidad de condiciones. La reacción descrita en el esquema B, etapa a, se puede llevar a cabo usando amoníaco o una amina protegida, tal como bencilamina, dibencilamina y las similares seguido de desprotección para proporcionar el compuesto de fórmula (6).

Por ejemplo, un compuesto de fórmula (5) se hace reaccionar con un exceso de amoníaco y cianoborohidruro de sodio para proporcionar un compuesto de fórmula (6). Como se conoce bien en la técnica, puede ser

5 ventajoso controlar y ajustar el pH durante dichas reacciones. La reacción se lleva a cabo en un disolvente, tal como metanol, etanol, isopropanol y agua o mezclas de los mismos. Típicamente la reacción se lleva a cabo a temperaturas entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 60°C y típicamente requiere entre aproximadamente 1 y aproximadamente 24 horas. Tras la finalización de la reacción, el producto de fórmula (6) se recupera mediante procedimientos convencionales incluyendo extracción, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, cristalización y los similares.

10 El esquema B de reacción, etapas b, c, d y etapa opcional e, se llevan a cabo mediante los procedimientos descritos en el esquema A, etapas b, c, d y etapa opcional e, para proporcionar un compuesto de fórmula I.

15 Los compuestos de fórmula I en los que R⁴ es fluoro se preparan a partir de compuestos de fórmula (3) o a partir de compuestos protegidos en el grupo amina de fórmula (2) mediante procedimientos de halogenación bien conocidos en la técnica, descritos, por ejemplo, por Larock, Comprehensive Organic Transformations, pg. 689 – 701 (1999).

La presente invención además se ilustra mediante los ejemplos y preparaciones siguientes. Estos ejemplos y preparaciones son ilustrativos solamente y no se pretende que limiten la invención en ningún modo.

20 Los términos usados en los ejemplos y preparaciones tienen sus significados normales salvo que se indique otra cosa. Por ejemplo, "°C" se refiere a grados Celsius; "M" se refiere a molar o molaridad; "mmol" se refiere a milimol o milimoles; "g" se refiere a gramo o gramos; "ml" se refiere a mililitro o mililitros; "p. f." se refiere a punto de fusión; "salmuera" se refiere a una solución acuosa saturada de cloruro sódico; etc. En la RMN de ¹H, todos los

25

232 22

desplazamientos químicos se proporcionan en δ , salvo que se indique otra cosa.

Procedimientos de acoplamiento

5 Procedimiento A

Ácido 2'-clorobifenil-4-carboxílico

Combinar 4-bromobenzoato de metilo (1,0 g, 4,65 mmoles), ácido 2-clorofenilbórico (799 mg, 5,1 mmoles), Pd(OAc)₂ (51 mg, 0,46 mmoles) y carbonato sódico (1,5 g, 13,9 mmoles) en DMF (20 ml) y agua (2,0 ml) mientras se agita. Purgar la mezcla de reacción con argón, añadir trifenilfosfina (61 mg, 0,23 mmoles) y purgar de nuevo con argón. Situar la reacción cerrada herméticamente en un baño de aceite mantenido a 80°C y dejar en agitación durante 1 hora. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, diluir con acetato de etilo y filtrar a través de un corto lecho de celita con acetato de etilo adicional. Lavar los compuestos orgánicos con agua, secar sobre MgSO₄, filtrar y evaporar. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida produce éster metílico del ácido 2'-clorobifenil-4-carboxílico en forma de un sólido amarillo. Disolver el éster purificado en THF (0,25 M) y añadir un volumen igual de NaOH 1 M. Agitar vigorosamente a temperatura ambiente 15 horas. Tras la finalización, acidificar la reacción con HCl concentrado y extraer con acetato de etilo. La evaporación del disolvente produce 762 mg (67%) del compuesto del título. EM (m/e): 231,1 (M⁺).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se ha descrito anteriormente.

233 29

Acido 6-(2-clorofenil)piridina-3-carboxílico	EM 233,9 (MH ⁺)
Acido 6-(2,4-difluorofenil)piridina-3-carboxílico	EM 235,9 (MH ⁺)
Ester metílico del ácido 6-fenilpiridina-3-carboxílico	EM 214,1 (MH ⁺)
Acido 6-(2-metilfenil)piridina-3-carboxílico	EM 214,0 (MH ⁺)
Acido 2'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	EM 265,2 (M ⁺)
Acido 2-metilbifenil-4-carboxílico	EM 211,3 (M ⁺)
Acido 3-fluorobifenil-4-carboxílico	EM 215,1 (M ⁺)
Acido 2',6'-diclorobifenil-4-carboxílico	EM 264,9 (M ⁺)
Acido 2',6'-difluorobifenil-4-carboxílico	EM 233,1 (M ⁺)
Acido 2'-metoxibifenil-4-carboxílico	EM 227,0 (M ⁺)
Acido 3,4'-difluorobifenil-4-carboxílico	EM 233,1 (M ⁺)
Acido 3,2'-difluorobifenil-4-carboxílico	EM 233,1 (M ⁺)
Acido 3-clorobifenil-4-carboxílico	EM 231,1 (M ⁺)
Acido 4-(tien-2-il)fenil-1-carboxílico	EM 203,1 (M ⁺)
Acido 4'-fluorobifenil-4-carboxílico (Hidrólisis en dioxano a 60°C)	EM 214,9 (M ⁺)
Acido 3'-fluorobifenil-4-carboxílico (Hidrólisis en dioxano)	EM 215,0 (M ⁺)
Acido 3'-cianobifenil-4-carboxílico (Hidrólisis con LiOH en dioxano)	EM 222,0 (M ⁺)

Procedimiento B

Ácido 5-fenilpirazina-2-carboxílico

Combinar el éster metílico del ácido 5-cloropirazina-2-carboxílico (626 mg, 3,64 mmoles), ácido fenilbórico (666 mg, 5,45 mmoles), fluoruro de cesio

234
24

(55 mg, 0,36 mmoles) y Na₂CO₃ (964 mg, 9,09 mmoles) en DMF (5 ml) y agua (5 ml) con agitación. Situar la mezcla de reacción heterogénea, expuesta al aire, en un baño de aceite mantenido a 80°C. Después de 5 minutos de calentamiento, añadir Pd(OAc)₂ (81 mg, 0,36 mmoles) de una vez y agitar hasta que la reacción se vuelve negra. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, diluir con acetato de etilo, y filtrar a través de un corto lecho de celita con acetato de etilo adicional. Lavar los compuestos orgánicos con agua, secar sobre MgSO₄, filtrar y evaporar. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida produce éster metílico del ácido 2-fenilpirimidina-5-carboxílico en forma de un sólido amarillo. Disolver el éster purificado en THF (0,25 M) y añadir un volumen igual de NaOH 1 M. Agitar vigorosamente a temperatura ambiente 15 horas. Tras la finalización, acidificar la reacción con HCl concentrado y extraer con acetato de etilo. La evaporación del disolvente produce 63 mg (8%) del compuesto del título. RMN de ¹H (DMSO): 9,37 (s, 1H), 9,21 (s, 1H), 8,23 – 8,21 (m, 2H), 7,57 – 7,77 (m, 3H).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se ha descrito anteriormente.

Ácido 2'-fluoro-6'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	EM 283,1 (M ⁻)
Ácido 3,2',4'-trifluorobifenil-4-carboxílico	EM 251,1 (M ⁻)
Ácido 4'-fluoro-2'-metoxibifenil-4-carboxílico	EM 245,1 (MH ⁻)
Ácido 3-cloro-2',4'-difluorobifenil-4-carboxílico	EM 267,1 (M ⁻)
Ácido 4'-fluoro-2'-metilbifenil-4-carboxílico	EM 229,0 (M ⁻)
Ácido 4'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	EM 285,1 (M ⁻)
Ácido 2-fluoro-4-(tien-2-il)fenil-1-carboxílico	EM 221,1 (M ⁻)

235
295

Procedimiento C

Ácido 3',4'-difluorobifenil-4-carboxílico

Combinar ácido 3,4-difluorobencenobórico (1,0 g, 5,2 mmoles), 4-bromobenzoato de metilo (0,241 g, 1,73 mmoles), Pd(OAc)₂ (0,019 g, 0,086 mmoles), bromuro de tetrabutilamonio (0,111 g, 0,345 mmoles) y fosfato potásico (0,733 g, 3,454 mmoles). Purgar el recipiente de reacción con argón y añadir DMF anhidra (20 ml) a la mezcla de reacción. Calentar el recipiente de reacción cerrado herméticamente hasta 120°C con agitación hasta la finalización. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, diluir con acetato de etilo y filtrar a través de un corto lecho de celita con acetato de etilo adicional. Lavar los compuestos orgánicos con agua, secar sobre MgSO₄, filtrar y evaporar. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida produce el éster metílico del ácido 3',4'-difluorobifenil-4-carboxílico en forma de un sólido amarillo. Disolver el éster purificado en dioxano (45 ml) y añadir un volumen igual de NaOH acuoso 1 M. Calentar el recipiente de reacción hasta 60°C con agitación hasta la finalización. Retirar el disolvente mediante evaporación. Disolver el residuo en diclorometano y lavar con ácido clorhídrico acuoso 1 N. Secar los compuestos orgánicos sobre MgSO₄, filtrar y evaporar para producir 0,048 g (12%) del compuesto del título. EM (m/e): 235 (M⁺).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se ha descrito anteriormente.

Ácido 6-(2-fluorofenil)piridina-3-carboxílico	EM 218,0 (MH ⁺)
Ácido 3',5'-dimetilbifenil-4-carboxílico	EM 225,0 (M ⁺)
Ácido 3',5'-difluorobifenil-4-carboxílico	EM 233,0 (M ⁺)
Ácido 3',5'-diclorobifenil-4-carboxílico	EM 267,1 (M ⁺)

236
26

Ácido 3'-clorobifenil-4-carboxílico	EM 230,9 (M ⁻)
Ácido 2',3'-difluorobifenil-4-carboxílico	EM 264,9 (M ⁻)
Ácido 4'-clorobifenil-4-carboxílico	EM 230,9 (M ⁻)

Procedimiento D

Ácido 2',4',6'-trimetilbifenil-4-carboxílico

Combinar 1-yodo-2,4,6-trimetilbenceno (2,966 g, 12,05 mmoles), ácido
5 4-carboxifenilbórico (1,0 g, 6,026 mmoles), Pd(OAc)₂ (0,0067 g, 0,005 mmoles),
bromuro de tetrabutilamonio (0,388 g, 1,2055 mmoles) y fosfato potásico (2,557
g, 12,05 mmoles). Purgar el recipiente de reacción con argón y añadir DMF
anhidra (20 ml) a la mezcla de reacción. Calentar el recipiente de reacción
cerrado herméticamente hasta 120°C con agitación hasta la finalización según
10 se determina mediante HPLC. Enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura
ambiente. Añadir yoduro de metilo (1,0 ml, 36,63 mmoles) a la mezcla de
reacción con agitación continuada hasta la finalización. Diluir la reacción con
acetato de etilo y filtrar a través de un corto lecho de celita con acetato de etilo
adicional. Lavar los compuestos orgánicos con agua, secar sobre MgSO₄, filtrar
15 y evaporar. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida
produce el éster metílico del ácido 2',4',6'-trimetilbifenil-4-carboxílico en forma
de un sólido amarillo. Disolver el éster purificado en dioxano (45 ml) y agua (5
ml) conteniendo 5 eq de LiOH con agitación a 60°C. Tras la finalización retirar
el disolvente, acidificar la mezcla de reacción con ácido clorhídrico, y extraer
20 con acetato de etilo. Secar los compuestos orgánicos sobre MgSO₄, filtrar y
evaporar para producir 0,023 g (16%) del compuesto del título. EM (m/e): 239,1
(M⁻).

237
27

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se ha descrito anteriormente.

Ácido 2',4',6'-trifluorobifenil-4-carboxílico	EM 251,0 (M)
Ácido 2'-fluoro-4'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	EM 283,0 (M)

Procedimiento E

5 Ácido 2',4'-difluorobifenil-4-carboxílico

Combinar ácido 4-carbometoxifenilbórico (1,021 g, 5,67 mmoles), 1-bromo-2,4-difluorobenceno (1,000 g, 5,181 mmoles), Pd(OAc)₂ (0,113 g, 0,50 mmoles), trifenilfosfina (0,149 g, 0,505 mmoles) y carbonato sódico (1,664 g, 0,568 mmoles). Purgar el recipiente de reacción con argón. Añadir DMF (20 ml) y agua (2,0 ml) con agitación. Situar la reacción cerrada herméticamente en un baño de aceite a 80°C y dejar en agitación durante 24 horas. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, diluir con acetato de etilo, y filtrar través de un corto lecho de celita con acetato de etilo adicional. Lavar los compuestos orgánicos con agua, secar sobre MgSO₄, filtrar y evaporar. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida produce éster metílico del ácido 2',4'-difluorobifenil-4-carboxílico en forma de un sólido amarillo. Disolver el éster purificado en dioxano (5 ml) y añadir NaOH 5 M (1 ml). Agitar vigorosamente a 50°C durante 15 horas. Tras la finalización acidificar la reacción con HCl concentrado y extraer con acetato de etilo. La evaporación del disolvente produce 300 mg (24,7%) del compuesto del título. EM (m/e): 233,0 (M).

Procedimiento F

Ácido 6-(2,6-difluorofenil)piridina-3-carboxílico

258

- Disolver el éster metílico del ácido 6-cloropiridina-3-carboxílico (6,86 g, 40 mmoles) en tolueno (100 ml) y calentar hasta 90°C. Añadir oxibromuro de fósforo (25 g, 87 mmoles) en varias porciones y continuar calentando durante 3 horas. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente y verter sobre agua con hielo. Extraer la reacción con acetato de etilo y lavar los compuestos orgánicos otra vez con agua, después con NaHCO₃. Combinar los compuestos orgánicos, secar sobre MgSO₄, filtrar y evaporar hasta un sólido naranja (8,1 g, 94%) que es una mezcla 8:1 del éster metílico del ácido 6-bromopiridina-3-carboxílico: éster metílico del ácido 6-cloropiridina-3-carboxílico mediante RMN de ¹H.
- 10 Combinar la mezcla como se ha obtenido anteriormente (0,225 g, 1,04 mmoles) con hexametildiestaño (0,375 g, 1,15 mmoles), Pd(OAc)₂ (21 mg, 0,09 mmoles) y trifenilfosfina (25 mg, 0,09 mmoles) en tolueno (5 ml). Purgar con N₂ y agitar a 80°C durante 18 horas. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente. Añadir una solución de 1-bromo-2,6-difluorobenceno (250 mg, 1,29
- 15 mmoles) en tolueno (1 ml) seguido de Pd(OAc)₂ (21 mg, 0,09 mmoles) y trifenilfosfina (25 mg, 0,09 mmoles). Purgar con N₂ y agitar a 80°C durante 18 horas adicionales. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente. Evaporar el disolvente y purificar mediante cromatografía de columna (sílice, 10% de acetato de etilo en hexano) para proporcionar 50 mg (20% de rendimiento) de
- 20 éster etílico del ácido 6-(2,6-difluorofenil)piridina-3-carboxílico. Hidrolizar el éster con solución de hidróxido sódico 1 N (0,22 ml, 0,22 mmoles) en metanol (3 ml) a temperatura ambiente durante 3 días. Retirar los compuestos volátiles a vacío y combinar el residuo con solución de ácido clorhídrico 1 N. Recoger el sólido blanco mediante filtración, lavar con agua y secar a vacío para
- 25 proporcionar 30 mg (63% de rendimiento) del compuesto del título. ES (m/e):

239
29

235,9 (MH⁺).

Procedimiento G

Ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico

- Combinar 2-fluoro-4-bromobenzoato de metilo (1,25 g, 5,36 mmoles),
- 5 ácido fenilbórico (1,30 g, 10,72 mmoles) y CsF (2,02 g, 13,40 mmoles) en DMF (25 ml) y agua (3,0 ml) con agitación. Situar la mezcla de reacción heterogénea expuesta al aire en un baño de aceite mantenido a 80°C. Después de 5 minutos de calentamiento, añadir Pd(OAc)₂ (120 mg, 0,536 mmoles) de una vez y agitar hasta que la reacción se vuelve negra. Enfriar la reacción hasta
- 10 temperatura ambiente, diluir con acetato de etilo, y filtrar través de un corto lecho de celita con acetato de etilo adicional. Lavar los compuestos orgánicos con agua, secar sobre MgSO₄, filtrar y evaporar. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida produce éster metílico del ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico en forma de un sólido. Disolver el éster purificado en
- 15 THF (0,25 M) y añadir un volumen igual de NaOH 1 M. Agitar vigorosamente a temperatura ambiente durante 15 horas. Tras la finalización acidificar la reacción con HCl concentrado y extraer con acetato de etilo. La evaporación del disolvente produce 965 mg (84%) del compuesto del título. EM (m/e): 214,9 (M⁺).
- 20 Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se ha descrito anteriormente.

Ácido 3-fluoro-2'-metilbifenil-4-carboxílico	EM 229,0 (M ⁺)
Ácido 2'-cloro-3-fluorobifenil-4-carboxílico	EM 205,1 (M ⁺)
Ácido 3-fluoro-2'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	EM 283,1 (M ⁺)

240
30

Procedimiento H

Ácido 2-fluoro-6-fenilpiridina-3-carboxílico

Disolver 2,6-difluoropiridina (5,0 ml, 5,51 mmoles) en THF anhidro (30 ml) y enfriar hasta -40°C . Añadir una solución de fenilitio (1,8 M hexanos, 30,6 ml) gota a gota durante 5 minutos. Agitar la reacción púrpura resultante a -40°C durante 30 minutos y llevar hasta temperatura ambiente. Inactivar la reacción con agua y extraer la solución con acetato de etilo varias veces. Combinar los extractos orgánicos, secar sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar sobre gel de sílice. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida produce 2-fluoro-6-fenilpiridina 1,0 g (12%) en forma de un aceite amarillo.

Enfriar una solución de LDA (3,46 mmoles) en THF anhidro (6 ml) hasta -78°C . Canular el 2-fluoro-6-fenilpiridina en THF anhidro (6 ml) a la solución de LDA enfriada. Agitar a -78°C durante 30 minutos, después burbujear gas de dióxido de carbono a través de la solución durante 10 minutos. Dejar que la reacción llegue hasta temperatura ambiente y purgar con argón. Extraer la reacción con NaOH 1 M y descartar los compuestos orgánicos. Acidificar la fase acuosa con HCl concentrado y extraer con acetato de etilo. Secar la fase orgánica sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar para producir el compuesto del título en forma de un sólido amarillo claro (405 mg, 65%). EM (m/e): 216,1 (M⁺).

Procedimiento J

Ácido 3,5-difluorobifenil-4-carboxílico

Combinar 1-bromo-3,5-difluorobenceno (0,863 ml, 7,50 mmoles) y ácido fenilbórico (1,22 g, 10,00 mmoles) y someter a las condiciones descritas en el procedimiento G para producir 1,3 g de 3,5-difluorobifenilo.

Disolver 3,5-difluorobifenilo bruto (1,3 g, 6,83 mmoles) en THF (14 ml) y

241
51

enfriar hasta -78°C . Preparar LTMP a partir de la adición de BuLi (1,6 M solución en hexanos, 5,33 ml) a tetrametilpiperidina (1,4 ml, 1,25 equivalentes) a -78°C en THF (14 ml). Canular el LTMP enfriado en el 3,5-difluorobifenilo enfriado y agitar la reacción a -78°C durante 1 hora. Burbujear gas de dióxido de carbono a través de la solución durante 5 minutos, calentar la reacción hasta temperatura ambiente, verter en 50 ml de NaOH 1 M y extraer con 50 ml de EtOAc. Descartar la fase orgánica. Acidificar la fase acuosa restante con HCl concentrado y extraer dos veces con EtOAc. Secar los compuestos orgánicos sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar para proporcionar 1,22 g del compuesto del título en forma de un sólido blanco (77%). EM (m/e): 233,1 (M⁺).

Procedimiento K

Ácido 3,2',6'-trifluorobifenil-4-carboxílico

Combinar 4-bromo-2-fluorobenzoato de metilo (3,66 g, 15,75 mmoles), 4,4,5,5,4',4',5',5'-octametil-2,2'-bi-1,3,2-dioxaborolanillo (5,0 g, 19,68 mmoles) y acetato potásico (4,63 g, 47,19 mmoles) en DMSO (40 ml) y purgar la solución con argón. Añadir $\text{PdCl}_2(1,1'\text{-bis(difenilfosfino)ferroceno})_2$ (10 % mol, 1,35 g) y purgar la solución con argón otra vez. Calentar la reacción hasta 80°C durante 3 horas y enfriar hasta temperatura ambiente. Lavar la reacción con agua y extraer con acetato de etilo y concentrar. El aceite negro resultante se redisuelve en 1:2 de acetato de etilo:hexanos, filtrar a través de un corto lecho de gel de sílice y concentrar. Se obtiene éster metílico del ácido 2-fluoro-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzoico en forma de un aceite amarillo.

Disolver el aceite amarillo resultante en acetona (100 ml) y combinar con NaIO_4 (10,1 g, 47,25 mmoles), NH_4OAc (3,63 g, 47,25 mmoles) y agua (50 ml)

742
52

a temperatura ambiente. Agitar a temperatura ambiente durante 18 horas, transferir a un embudo de decantación y extraer con acetato de etilo varias veces. Secar los compuestos orgánicos combinados sobre MgSO_4 , filtrar y concentrar para producir 3,0 g de ácido 3-fluoro-4-carbometoxibencenobórico en forma de un sólido blanquecino.

El ácido bórico obtenido anteriormente (800 mg, 4,04 mmoles) y 2,6-difluorobromobenceno (1,17 g, 6,06 mmoles) se acoplan según el procedimiento descrito en el procedimiento G para proporcionar 380 mg del compuesto del título. EM (m/e): 251,1 (M⁺).

10 Procedimiento I

Ácido 6-fenilpiridazina-3-carboxílico

6-Fenilpiridazin-3-ol (5,0 g, 29,06 mmoles) se disuelve en tolueno (100 ml) y se calienta hasta 90°C. Se añade oxibromuro de fósforo (25 g, 87,19 mmoles) en varias porciones y la reacción se calienta durante 30 minutos. La solución amarilla resultante se enfría hasta temperatura ambiente, se vierte en agua con hielo y se extrae con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavan adicionalmente con agua y NaOH 1 M, se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora hasta un sólido amarillo. La recristalización con CHCl_3 proporciona 2,17 g de 3-bromo-6-fenilpiridazina.

20 3-Bromo-6-fenilpiridazina (1,0 g, 4,25 mmoles) se combina con DMF (5 ml), MeOH (5 ml), trietilamina (1,18 ml, 8,50 mmoles) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (76 mg, 0,33 mmoles) y se evacua la mezcla. Se añade 1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno (235 mg, 0,42 mmoles) y la reacción se evacua otra vez. Se burbujea gas de dióxido de carbono a través de la solución durante 5 minutos, y la reacción se sitúa en 25 50 psi (345 kPa) de dióxido de carbono. La solución resultante se calienta a

243
47

50°C durante 18 horas. La reacción se enfría hasta temperatura ambiente, se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. Los compuestos orgánicos se secan sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora sobre gel de sílice y se somete a cromatografía en columna ultrarrápida.

- 5 La hidrólisis usando condiciones indicadas en el procedimiento A proporciona 80 mg del compuesto del título. RMN de ^1H (CDCl_3): 8,24 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,18 – 8,15 (m, 2H), 8,0 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 7,56 – 7,55 (m, 3H).

Procedimiento M

Ácido 6-(4-fluorofenil)piridina-3-carboxílico

- 10 Combinar el éster metílico del ácido 6-bromopiridina-3-carboxílico (1,03 g, 4,78 mmoles), ácido 4-fluorofenilbórico (1,88 g, 13,41 mmoles) y fluoruro de cesio (2,55 g, 16,78 mmoles) en DMF (25 ml) y agua (4 ml) con agitación. Situar la mezcla de reacción heterogénea expuesta al aire en un baño de aceite mantenido a 80°C. Después de 5 minutos de calentamiento, añadir $\text{Pd}(\text{OAc})_2$
- 15 (150 mg, 0,67 mmoles) de una vez. Después de 17 horas, enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, diluir con acetato de etilo, y filtrar través de un corto lecho de celita con acetato de etilo adicional. Lavar los compuestos orgánicos con agua, secar sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida produce éster metílico del
- 20 ácido 6-(4-fluorofenil)piridina-3-carboxílico en forma de un sólido amarillo. Disolver el éster purificado en THF (0,25 M) y añadir un volumen igual de NaOH 1 M. Agitar vigorosamente a temperatura ambiente durante 15 horas. Tras la finalización acidificar la reacción con HCl concentrado y recoger el precipitado blanco mediante filtración. El secado a vacío produce 385 mg (37%)
- 25 del compuesto del título. EM (m/e): 218,1 (MH^+).

244
64

El siguiente compuesto se prepara esencialmente como se ha descrito anteriormente.

Ácido 6-(tien-2-il)piridina-3-carboxílico	EM 205,9 (M ⁺)
---	----------------------------

Procedimiento N

5 Ácido 6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridina-3-carboxílico

Combinar el éster metílico del ácido 6-bromopiridina-3-carboxílico (387 mg, 1,79 mmoles), ácido 4-fluoro-2-metilfenilbórico (338 mg, 2,19 mmoles), Pd(OAc)₂ (40 mg, 0,18 mmoles), fluoruro de cesio (27 mg, 0,18 mmoles) y carbonato de sodio (570 mg, 5,38 mmoles) en DMF (6 ml) y agua (6 ml) con
10 agitación. Purgar la mezcla de reacción con N₂, añadir trifenilfosfina (47 mg, 0,18 mmoles) y purgar otra vez con N₂. Situar la reacción cerrada herméticamente en un baño de aceite mantenido a 80°C y dejar en agitación durante 17 horas. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente y pasar a través de un lecho corto de gel de sílice. Lavar la columna con diclorometano
15 (100 ml) seguido de metanol acuoso (100 ml, 3 metanol/ 1 agua). Reducir las fracciones combinadas a vacío y suspender el sólido residual en agua (10 ml). Filtrar para retirar un sólido negro y acidificar con una solución de ácido clorhídrico 1 N hasta pH 4. Se forma un precipitado blanco que se recoge mediante filtración y se seca para proporcionar 306 mg (74%) del compuesto
20 del título. EM (m/e): 231,9 (MH⁺).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se ha descrito anteriormente.

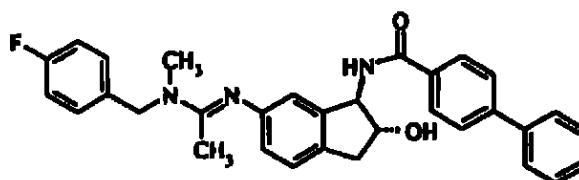
Ácido 6-(2,4-difluorofenil)piridina-3-carboxílico	EM 236,0 (MH ⁺)
Ácido 6-(2-fluorofenil)piridina-3-carboxílico	EM 218,0 (MH ⁺)

245
~~95~~

Acido 2'-fluorobifenil-4-carboxílico	EM 215,1 (M ⁻)
Acido 2'-metilbifenil-4-carboxílico	EM 211,2 (M ⁻)

Ejemplo 1 – 1(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxindan-1-
II)amida del ácido bifenil-4-carboxílico

5



- Lentamente añadir una solución de 375 g (5,13 moles, 1,12 equivalentes) de N-metilacetamida en THF (1,76 l) a 224 g (5,55 moles, 1,2 equivalentes) de hidruro sódico (60% de dispersión en aceite mineral) en forma de una suspensión en THF (8,75 l). Después de 30 minutos cuando se ha añadido el 25% de la solución, añadir 875 g (4,63 moles, 1 equivalentes) de bromuro de 4-fluorobencilo y el resto de las soluciones de N-metilacetamida y bromuro de 4-fluorobencilo al mismo tiempo durante las siguientes 3 horas.
- 15 Usar un baño de agua para mantener la temperatura por debajo de 40°C. Agitar la mezcla resultante durante una noche y verter en una mezcla de 20% de NH₄Cl (2,5 l), agua (6,5 l) y acetato de etilo (9 l). Separar las fases y volver a extraer la fase acuosa con acetato de etilo (4,5 l, después 2 l). Combinar las fases orgánicas y lavar con agua (4 l) y después salmuera (7 l). Secar la fase
- 20 orgánica (Na₂SO₄) y retirar el disolvente para producir un residuo. Disolver el

246
96

residuo en acetonitrilo (7 l) y heptano (1,75 l). Separar las fases y lavar la fase de acetonitrilo otra vez con heptano (1,75 l). Combinar las fases de heptano y volver a extraer con acetinitrilo (0,5 l). Combinar las fases de acetonitrilo y evaporar para producir 0,814 kg de N-metil-N-(4-fluorobencil)acetamida.

- 5 Disolver N-metil-N-(4-fluorobencil)acetamida (0,500 kg, 2,76 moles) en THF (11,5 l). Añadir pentasulfuro de fósforo (0,737 kg, 1,65 moles, 0,6 equivalentes) y calentar la mezcla a reflujo durante 1 – 2 horas. Después de 5 horas a reflujo, dejar que la mezcla se enfríe hasta temperatura ambiente, retirar por filtración los sólidos y lavar con 12,5 l de THF. Combinar el filtrado
- 10 con un filtrado idéntico de una reacción separada y concentrar hasta 0,978 kg de un residuo. Disolver el residuo y cromatografiar sobre 2,7 kg de gel de sílice usando CH_2Cl_2 para producir 1,01 kg de sólido. Suspender el sólido con cloruro de metileno (1 l) durante 15 – 30 minutos, añadir heptano (5 l), enfriar la mezcla hasta 0 – 5°C y agitar durante 2 horas. Recoger el sólido mediante filtración y
- 15 secar para producir 0,814 kg de N-metil-N-(4-fluorobencil)tioacetamida.

- Añadir 11,5 l de acetonitrilo y 2,52 kg (17,7 moles , 1,5 equivalentes) de yoduro de metilo a 2,30 kg (11,6 moles) de N-metil-N-(4-fluorobencil)acetamida. Calentar la mezcla hasta 35°C durante 21 horas. Reducir el volumen a la mitad en un rotavapor y añadir 14 l de MTBE. Reducir el volumen otra vez a la mitad
- 20 y añadir otros 14 l de MTBE. Enfriar la suspensión resultante hasta 0°C, recoger el sólido mediante filtración y secar para producir 3,92 kg de yoduro de 1-metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilimonio en forma de un sólido blanco.

- Añadir 85 l de NH_4OH concentrado y 28 l de agua a 6,20 kg (35,0 moles) de 1,2-epoxi-6-nitroindano. Calentar la mezcla a 36°C durante 21 horas y dejar
- 25 que se enfríe hasta temperatura ambiente. Filtrar la mezcla de reacción sobre

247
57

un lecho de celita húmeda (10 kg) y enjuagar la torta con agua. Añadir a la torta húmeda 155 l de metanol, 1,3 l de agua, y 5,80 kg (38,1 moles, 1,09 equivalentes) de ácido (S)-(+)-mandélico. Calentar la mezcla durante 2 horas a 55°C y filtrar a través de un cartucho de filtro impregnado con carbono. Reducir el volumen filtrado mediante destilación a vacío hasta aproximadamente 35 l y añadir 130 l de EtOAc. Reducir el volumen mediante destilación a vacío hasta 65 l. Enfriar la mezcla hasta -8°C y agitar durante 8 horas. Filtrar la suspensión y secar el sólido para producir 7,6 kg de un sólido. Suspende este sólido en 30 l de metanol y 0,3 l de agua, y calentar la mezcla a reflujo durante 0,5 horas. 10 Enfriar la mezcla hasta 45°C durante 0,5 horas y agitar durante 12 horas, seguido de enfriamiento hasta 22°C y agitar durante 10 horas. Recoger el sólido mediante filtración y secar para producir 2,7 kg de (S)-mandelato de 1(R)-amino-2(R)-hidroxi-6-nitroindano.

Añadir (S)-mandelato de 1(R)-amino-2(R)-hidroxi-6-nitroindano (0,64 kg, 1,85 moles) a una mezcla de tolueno (9,6 l) y NaOH 1 N acuoso (4,8 l, 4,8 moles, 2,6 equivalentes). Después de 1 hora, añadir cloruro de 4-bifenilcarbonilo (0,44 kg, 2,0 moles, 1,1 equivalentes) por partes durante 20 – 30 minutos. Después de 22 horas, filtrar los sólidos a vacío y enjuagar secuencialmente con 0,5 l de tolueno, 2 l de agua y 2 l de tolueno. Secar la 20 torta para producir 0,74 kg (R)-(6-nitro-2-hidroxiindano-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico. Añadir 38,2 l de acetato de etilo a 1,914 kg (R)-(6-nitro-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico preparada de una manera similar. Agitar la suspensión durante 18 horas, recoger el sólido mediante filtración, secar para producir 1,76 kg de (R)-(6-nitro-2(R)- 25 hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico en forma de un sólido

248
29
5

blanco.

Combinar una suspensión de 0,176 kg de 10% de Pd – C (humedecido en 50% en agua) y 1,7 kg de (R)-(6-nitro-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico en 17,5 l de DMF con hidrógeno (50 psi, 345 kPa) Después
5 de 19 h, filtrar la mezcla de reacción, añadir una porción de la solución de DMF (5 l) a agua (10 l) y agitar la suspensión durante 2 horas – repetir dos veces para el tratamiento complementario del volumen entero de la reacción. Filtrar las suspensiones juntas y lavar la torta del filtro resultante con agua (3 x 7 l). Secar la torta del filtro para producir 1,42 kg de (R)-(6-amino-2(R)-hidroxiindan-
10 1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico.

Suspender (R)-(6-amino-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico (0,969 kg, 2,81 moles) en THF (9,7 l) y añadir yoduro de 1-metil-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilmonio (0,954 kg, 2,81 moles) y 4-dimetilaminopiridina (34,5 g, 0,281 moles). Agitar la mezcla durante 24 horas y
15 retirar el disolvente a vacío. Disolver la espuma resultante en CH₂Cl₂ (12,5 l) y lavar la fase orgánica con HCl 1,0 N (1 x 4 l y 1 x 3 l), NaOH 1,0 M (1 x 2,4 l) y NaCl saturado (1 x 4 l). Separar la fase orgánica, secar (Na₂SO₄), filtrar y retirar el disolvente para producir un sólido. Disolver el sólido en acetonitrilo (9 l) mientras se calienta hasta 35 – 40°C. Después de aproximadamente 30
20 minutos añadir cristales de siembra, que da como resultado una suspensión blanca, espesa. Enfriar la mezcla hasta -15°C y agitar a esta temperatura durante 1 – 2 horas. Filtrar la suspensión y secar para proporcionar 1,10 kg del compuesto del título en forma de un solvato de acetonitrilo parcial.

RMN de ¹H (CDCl₃): δ 7,90 (d, 2, J = 8,6), 7,69 (d, 2, J = 8,6), 7,63 (d, 2, J =
25 8,2), 7,48 (d, 2, J = 8,2, 7,6), 7,41 (d, 1, J = 7,3), 7,24 (dd, 2, J = 8,5, 5,2), 7,14

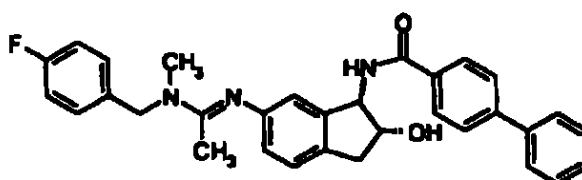
249
200

(d, 1, J = 7,9), 7,04 (t, 2, J = 8,7), 6,72 – 6,63 (m, 3), 5,31 (t, 1, J = 5,6), 4,84 (s, 1), 4,64 (dd, 2, J = 21,4, 15,6), 4,54 (dd, 1, J = 14,0, 7,9), 3,32 (dd, 1, J = 15,6, 7,9), 3,01 (s, 3), 2,95 (dd, 1, J = 15,7, 8,0), 1,97 (s, 3). EM (m/z): 508,2 (M+1).

5

Ejemplo 2 – 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico



Combinar trans-1-amino-2-hidroxi-6-nitroindano (20,2 g, 0,10 moles) y
10 ácido S-mandélico (16,7 g, 0,11 moles, 1,1 equivalentes) en 173 ml de metanol
y 3,6 ml de agua. Calentar a reflujo y después añadir 200 ml de acetato de
etilo. Sembrar y dejar enfriar hasta 23°C. Después de agitar durante 4 horas a
23°C, enfriar durante 3 horas a -3°C, después filtrar y enjuagar con 40% de
metanol y 60% de acetato de etilo fríos para proporcionar un sólido. Secar el
15 sólido en una estufa de vacío a 45°C durante 16 horas para producir una
mezcla 59:41 de sales diastereoméricas favoreciendo 1(R)-amino-2(R)-hidroxi-
6-nitroindano.

Combinar la mezcla 59:41 de sales diastereoméricas con 35 ml de
metanol y 0,32 g de agua. Calentar hasta aproximadamente 64°C, dejar enfriar
20 hasta aproximadamente 45°C, y agitar durante 14 horas y después a 23°C
durante 14 horas para proporcionar un sólido. Recoger el sólido mediante
filtración, enjuagar con metanol y secar en una estufa de vacío a 45°C durante

250
710

26 horas para producir 2,64 g de S-mandelato de 1(R)-amino-2(R)-hidroxi-6-nitroindano de alta pureza enantiómerica, EMAR (m/z): 194,0691. IR (CHCl₃) 1347,1074 cm⁻¹.

- Combinar S-mandelato de 1(R)-amino-2(R)-hidroxi-6-nitroindano 40,2 g (116,1 mmoles), 320 ml de agua, 650 ml de acetato de etilo, 26,6 g de di-terc-butildicarbonato (121,9 mmoles, 1,05 equivalentes) y 200 ml adicionales de acetato de etilo. Añadir 120 ml de hidróxido sódico acuoso 1 N (120 mmoles, 1,03 equivalentes) gota a gota. Después de 15 horas, se forma un sólido. Recoger el sólido y enjuagar con agua (3 veces) y acetato de etilo (3 veces).
- 10 Secar para proporcionar 1(R)-(t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-nitroindano en forma de un sólido blanco 19,4 g (57%): EM (m/z): 295 (M + 1). [α]_D = -111 (c = 1, MeOH).

- Combinar 1(R)-(t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-nitroindano 30,5 g (0,11 moles), 800 ml de THF, 800 ml de acetato de etilo y 6,3 g de 5% de paladio sobre carbono. Hidrogenar a 50 psi (345 kPa) de hidrógeno durante 2 horas. Retirar el catalizador mediante filtración y evaporar el disolvente para proporcionar 29,5 g de 1(R)-(t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-aminoindano: EM (m/z): 265 (M+ 1): IR (KBr) 1699, 1625, 1535 cm⁻¹. [α]_D = -122 (c = 1, MeOH).

- 20 A una solución de NaH (6,86 g, 0,172 moles, 60% en aceite mineral, 1,3 equivalentes) en THF (250 ml), añadir gota a gota una solución de N-metilacetamida (11,6 g, 0,159 moles, 1,2 equivalentes) en THF (90 ml). Después de aproximadamente 20 minutos, añadir bromuro de 4-fluorobencilo (25 g, 0,132 moles). Agitar durante aproximadamente 62 horas, después verter sobre agua con hielo (300 ml) y extraer con acetato de etilo (400 ml y 200 ml).

251

Combinar las fases orgánicas y lavar con agua (300 ml), secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar hasta un aceite. Disolver el aceite en acetonitrilo y extraer con hexano para retirar el aceite mineral para proporcionar 22,79 g de N-metil-N-(4-fluorobencil)acetamida: p. f. = 48 – 54°C; R_f = 0,45 (4% de MeOH/cloruro de metileno); RMN de ^1H (CDCl_3) 7,27 – 6,93 (m, 4), 4,5 (d, 2), 2,91 (s, 3), 2,14 (s, 3).

Combinar N-metil-N-(4-fluorobencil)acetamida (364,8 g, 2,01 moles) y THF (9 l). Agitar para producir una solución, después añadir pentasulfuro de fósforo (537,7 g, 1,21 moles). Después de 45 minutos, calentar hasta reflujo.

10 Después de 3 horas, dejar enfriar y agitar durante una noche para proporcionar un sólido. Retirar el sólido mediante filtración y enjuagar la torta del filtro con THF (4 l). Evaporar el filtrado para proporcionar un residuo, disolver en cloruro de metileno (500 ml) y pasar sobre una columna corta de gel de sílice 60 (1,2 kg) preconditionada con heptano. Eluir con 4 l de heptano/cloruro de metileno

15 (1:1) seguido de 100% de cloruro de metileno para producir, después de la recogida y secado, 217,98 g de N-metil-N-(4-fluorobencil)tioacetamida: p. f. = 99 – 104°C; R_f = 0,42 (cloruro de metileno); RMN de ^1H (CDCl_3) 7,35 – 7,26 (m, 1), 7,14 – 6,96 (m, 3), 5,28 (s, 1,2) y 4,79 (s, 0,8), 3,42 (s, 1,2) y 3,15 (s, 1,8), 2,72 (s, 1,2) y 2,69 (s, 1,8). Nota: se cree que los protones parciales se deben a

20 los rotámeros.

Combinar N-metil-N-(4-fluorobencil)tioacetamida (14,03 g, 0,0711 moles) y cloruro de metileno (140 ml) en nitrógeno y enfriar en un baño de agua con hielo. Añadir gota a gota trifluorometanosulfonato de metilo (9,66 ml, 0,085 moles, 1,2 equivalentes). Después de 15 minutos, retirar el baño de hielo y

25 agitar durante 2 horas. Retirar el disolvente a vacío para obtener 25,89 g

(100%) de triflato de 1- metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilimonio.

Combinar triflato de 1-metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilimonio (5 g, 13,8 mmoles), cloruro de metileno (50 ml) y 1(R)-(t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-aminoindano (3,65 g, 13,8 mmoles) en nitrógeno. Añadir piridina (0,15 ml). Después de 2,5 horas se formó un sólido. La recogida del sólido fue mediante filtración, enjuagar con una cantidad mínima de cloruro de metileno y secar en una estufa de vacío para proporcionar 6,29 g (79%) de triflato de 1(R)- (t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-(1-metil-N'-(4-fluorobencil)-N'-metilamidino)indano en forma de un sólido blanco. p. f. = 123 – 132°C.

10 Enfriar ácido trifluoroacético (abreviadamente en inglés TFA, 66 ml) en una baño de hielo y añadir triflato de 1(R)- (t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-(1-metil-N'-(4-fluorobencil)-N'-metilamidino)indano (29,65 g, 0,051 moles) por partes junto con 3 ml de cloruro de metileno. Agitar en el baño de hielo durante 10 minutos y después dejar calentar a temperatura ambiente y agitar durante 15 1,5 horas. Repartir la mezcla de reacción entre cloruro de metileno (500 ml) y agua de hielo (500 ml). Añadir hidróxido sódico acuoso 2 M (450 ml) y separar las fases. Extraer la fase acuosa con cloruro de metileno (250 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (300 ml). Enfriar la fase orgánica, añadir hidróxido sódico acuoso 1 N (76 ml) y agua (76 ml) y agitar para 20 proporcionar.

Al N'-(3-amino-2-hidroxiindan-5-il)-N-(4-fluorobencil)-N-metilacetamidina producida mediante los procedimientos anteriores, añadir cloruro de 4-bifenilcarbonilo (11,05 g, 0,051 moles, 1 equivalente) por partes. Añadir 50 ml adicionales de agua. Después de 2 h, separar las fases, extraer la fase 25 orgánica con agua (300 ml), secar sobre Na₂SO₄, filtrar y evaporar para

253
JLB

proporcionar 27,06 del compuesto del título en forma de una espuma blanca.

Cristalizar una porción de 10 gramos del compuesto del título con 10 ml/g de acetonitrilo para producir 5,96 g del compuesto del título: p. f. 103 – 111°C. EM (m/z): 508 (M + 1).

- 5 Suspender el compuesto del título obtenido mediante la recristalización anterior en una mezcla de 45 ml de acetato de etilo y 45 ml de hexano durante 16 horas para producir el compuesto del título p. f. 139 – 142°C.

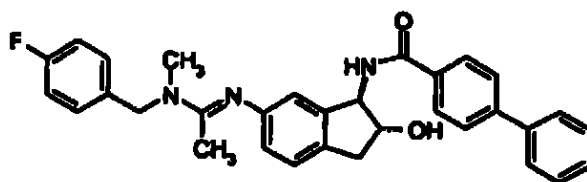
- Combinar el compuesto del título que tiene un p. f. 139 – 142°C (1 g) y etanol absoluto (12 ml). Calentar hasta aproximadamente 50°C hasta que se
10 disuelven los sólidos. Añadir agua desionizada (4,5 ml) gota a gota seguido de la adición de cristales de siembra del polimorfo que funde aproximadamente a 150 – 152°C. Enfriar hasta aproximadamente 23°C durante 1,5 horas, para proporcionar una suspensión espesa. Enfriar la suspensión en un baño de hielo, filtrar, y secar en una estufa de vacío a 50 – 60°C para producir 0,76 g
15 del compuesto del título: p. f. 150 – 152°C.

Como entenderá un experto en la técnica, un nombre alternativo para el compuesto del título es 6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2-hidroxi-1-bifenilamidoindano.

Ejemplo 2 – 2

- 20 (R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico

257
HM



Combinar (S)-mandelato de 1(R)-amino-2(R)-hidroxi-6-nitroindano 50,0 g (0,144 moles) y 750 ml de tolueno. Añadir 375 ml (0,375 moles, 2,6
5 equivalentes) de hidróxido sódico acuoso 1 N seguido de 470 ml de agua. Agitar durante aproximadamente 22 minutos, después añadir 35,5 g (0,159 moles, 1,1 equivalentes) de cloruro de 4-bifenilcarbonilo por partes durante aproximadamente 6 minutos. Después de 3,5 horas, filtrar la suspensión resultante, enjuagar la torta del filtro con tolueno, secar a vacío a 50°C durante
10 18 horas para proporcionar 56,1 g de 1(R)-(4-bifenilcarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-nitroindano: IR (KBr, cm^{-1}): 3293, 1640, 1549, 1528, 1345, 1329, 1086, 739; EMAR calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$: 374,1267, encontrado: 374,1266.

Combinar 1(R)-(4-bifenilcarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-nitroindano 55,7 g, 550 ml de DMF y 2,8 g de catalizador de 10% de Pd/C. Hidrogenar a 50 psi
15 (345 kPa) de hidrógeno a temperatura ambiente durante 4,75 horas. Filtrar la mezcla de reacción y diluir el filtrado con 1200 ml de agua para proporcionar una suspensión. Agitar la suspensión durante 30 minutos, filtrar, lavar con agua y secar a vacío a 50°C. Combinar el producto seco y aproximadamente 1 l de agua y suspender durante 30 minutos, filtrar, lavar con agua y secar a vacío a
20 50°C para producir 45,4 g (90%) de 1(R)-(4-bifenilcarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-aminoindano: IR (KBr, cm^{-1}) 3584, 3364, 3277, 1632, 1543, 1326, 1073, 743; EMAR calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$: 344,4120; encontrado: 344,1525.

255
X/5

Combinar N-metil-N-(4-fluorobencil)acetamida (364,8 g, 2,01 moles) y THF (9 l). Agitar para disolver y después añadir pentasulfuro de fósforo (537,7 g, 1,21 moles). Después de 45 minutos, calentar hasta reflujo durante 3 horas, después enfriar y agitar durante una noche para proporcionar un sólido.

- 5 Recoger el sólido mediante filtración y enjuagar la torta con THF (4 l), evaporar el filtrado a vacío para proporcionar un residuo, disolver el residuo en cloruro de metileno (aproximadamente 500 ml) y pasar sobre una torta de gel de sílice 60 (1,2 kg) preacondicionado con heptano. Eluir con 4 l de heptano/cloruro de metileno (1:1) seguido de 100% de cloruro de metileno para proporcionar
- 10 217,98 g de N-metil-N-(4-fluorobencil)tioacetamida (55%) p. f. = 99 – 104°C; R_f = 0,42 (cloruro de metileno); RMN de ^1H (CDCl_3) 7,35 – 7,26 (m, 1), 7,14 – 6,96 (m, 3), 5,28 (s, 1,2) y 4,79 (s, 0,8), 3,42 (s, 1,2) y 3,15 (s, 1,8), 2,72 (s, 1,2) y 2,69 (s, 1,8). Nota: los protones parciales se cree que se deben a rotámeros.

- Añadir yoduro de metilo (10,76, 75,8 mmoles) de una vez a una
- 15 suspensión de N-metil-N-(4-fluorobencil)tioacetamida (10 g, 50,6 mmoles) en acetonitrilo (50 ml). Calentar a 35°C durante 46 horas, después enfriar hasta aproximadamente 23°C. Reducir el volumen de la mezcla de reacción hasta aproximadamente 25 ml mediante evaporación y después añadir metil *t*-butil éter (50 ml). Reducir otra vez el volumen mediante evaporación hasta 25 ml
- 20 otra vez y después diluir con otros 50 ml de metil *t*-butil éter para proporcionar un sólido. Enfriar hasta 0°C, filtrar, enjuagar con 15 ml de metil *t*-butil éter frío y secar para producir 16,89 g de yoduro de 1-metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilimonio en forma de un sólido amarillo, p. f. 142 – 150°C. EM (electropulverización): teórico para la porción iminio $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FNS}$: 212
- 25 encontrado 212.

256
Flb

Combinar 1(R)-(4-bifenilcarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-aminoindano 10,0 g (0,029 moles), 4-dimetilaminopiridina (abreviadamente en inglés DMAP) 0,4 g (0,0032 moles, 0,011 equivalentes), 200 ml de acetona y yoduro de 1-metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilmonio 10,8 g (96% de eficacia, 0,0305 moles, 1,05 equivalentes). Después de 6 horas, concentrar la mezcla de reacción hasta una espuma. Combinar la espuma y 120 ml de tolueno, agitar a temperatura ambiente durante 19,5 horas, filtrar, secar a vacío a 50°C para proporcionar un residuo, la sal yodhidrato del compuesto del título, caracterizada por la siguiente RMN: RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8,02 (d, J = 9,0 Hz, 2H); 7,82 – 7,93 (m, 1H); 6,90 – 7,69 (m, 14H); 4,85 – 5,25 (m, 2H); 4,60 – 4,80 (m, 2H); 3,45 (s, 2H); 3,00 – 3,20 (m, 2H); 2,60 – 2,75 (m, 1H); 2,10 – 2,35 (m, 4H).

Disolver el residuo de en 200 ml de cloruro de metileno y extraer con 200 ml de hidróxido sódico acuoso 1,0 M seguido de 200 ml de salmuera. Secar la fase orgánica sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar a vacío para producir 15 g del producto del título.

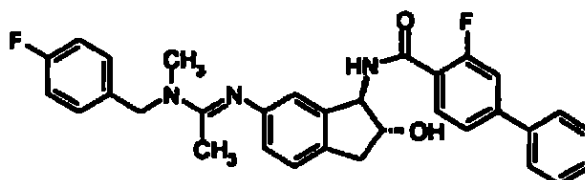
Combinar 5,0 g del compuesto obtenido y 200 ml de cloruro de metileno. Añadir 1,00 g de carbón activado DARCO, agitar durante 1 hora y después filtrar a través de un lecho de Hyflo. Evaporar a vacío para proporcionar 4,0 g de un residuo. Disolver el residuo en etanol absoluto (aproximadamente 40 ml) y añadir agua desionizada (12 ml) para proporcionar un sólido. Calentar el sólido suspendido hasta 55°C durante 30 minutos, dejar enfriar hasta temperatura ambiente y agitar. Después de 24 h, filtrar, enjuagar con 10 ml de una mezcla 10:3 de EtOH:agua, secar a vacío para proporcionar 1,5 g del compuesto del título: p. f. 108 – 112°C.

257
X

Los expertos en la técnica reconocerán que un nombre alternativo para el compuesto del título es 6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2-hidroxi-1-bifenilamidoindano.

Ejemplo 3 – 1

5 (R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico



- Combinar ácido 4-bromo-2-fluorobenzoico (10 g, 45,7 mmoles), metanol (100 ml), y ácido sulfúrico concentrado (5,0 ml). Calentar hasta reflujo. Después
- 10 de 16 horas, enfriar hasta temperatura ambiente y evaporar a vacío para producir un sólido blanco. Disolver el sólido en acetato de etilo (aproximadamente 40 ml), extraer con 2 x 80 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y 1 x 80 ml de salmuera, secar sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar a vacío para producir 9,32 g (88%) de 4-bromo-2-fluorobenzoato de metilo en forma de
- 15 un sólido blanco. RMN de ^1H (d_6 -DMSO, 300 MHz) 8,80 (t, $J=8,4$ Hz, 1H), 7,72 (dd, $J=10,8$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 7,54 (ddd, $J=8,4$ Hz, 1,8 Hz, 0,6 Hz, 1H), 3,83 (s, 3H); IR (cm^{-1} , KBr): 3010, 2895, 1723, 1603, 1484, 1438, 1406, 1294, 1277, 1095, 885; Anal calculado para $\text{C}_9\text{H}_6\text{BrFO}_2$: C, 41,23; H, 2,60; encontrado: C, 40,97; H, 2,61.
- 20 Combinar 4-bromo-2-fluorobenzoato de metilo (9,3 g, 40,0 mmoles), ácido fenilbórico (9,75 g, 80,0 mmoles) y fluoruro de cesio (32,6 g, 100,1 mmoles), DMF (190 ml) y agua desionizada (50 ml). Calentar hasta 80°C y añadir $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (303 g, 4,0 mmoles). Después de 20 minutos, enfriar hasta

258
~~108~~

- temperatura ambiente, filtrar a través de HyFlo con la ayuda de 100 ml de acetato de etilo, extraer el filtrado con 2 x 100 ml de 5% de cloruro de litio acuoso, 2 x 50 ml de hidróxido sódico acuoso 1,0 M y 2 x 100 ml de salmuera. Separar la fase orgánica, secar sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar a vacío para
- 5 producir 8,85 g (96%) de 3-fluorobifenil-4-carboxilato de metilo en forma de un sólido blanco. RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 8,01 (t, $J=7,8$ Hz, 1H), 7,58 - 7,62 (m, 2H), 7,41 - 7,51 (m, 4H), 7,37 (m, 1H), 3,96 (s, 3H); IR (cm^{-1} , KBr): 3033, 2954, 1721, 1622, 1437, 1409, 1298, 1289, 1266, 1097; Anal calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FO}_2$: C 73,03, H 4,82; encontrado: C 73,06, H 4,86.
- 10 Combinar 3-fluorobifenil-4-carboxilato de metilo (8,18 g, 35,5 mmoles), THF (225 ml) e hidróxido sódico acuoso 1,0 M (225 ml). Calentar a 50°C durante 8 horas. Enfriar hasta temperatura ambiente, añadir ácido clorhídrico acuoso 1,0 M (300 ml) y extraer con 2 x 200 ml de acetato de etilo. Separar la fase orgánica, secar sobre MgSO_4 , filtrar y evaporar a vacío para producir 7,12
- 15 g (93%) de ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico en forma de un sólido blanco. RMN de ^1H (d_6 -DMSO, 300 MHz) 13,22 (s a, 1H), 7,93 (t, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,74 - 7,78 (m, 2H), 7,60 - 7,66 (m, 2H), 7,40 - 7,52 (m, 3H); IR (cm^{-1} , KBr): 3035, 2666, 2575, 1699, 1621, 1563, 1408, 1298, 1265, 1193, 904; Anal calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_2$: C 72,22, H 4,20; encontrado: C 72,18, H 4,35.
- 20 Combinar ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico 10,46 g (0,048 moles), 432 ml de cloruro de metileno, 7 gotas de dimetilformamida y 5,44 ml (0,062 moles, 1,3 equivalentes) de cloruro de oxalilo. Después de 2 horas, evaporar el disolvente para producir cloruro de 3-fluorobifenil-4-carbonilo en forma de un sólido.
- 25 Combinar triflato de 1-metiltio-1-metil-N-(4-fluorobencil)-N-metilmonio

259
JX

20,96 g (0,58 moles), 53 ml de piridina y 1(R)-(t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-aminoindano 15,33 g (0,58 moles, 1 equivalente). Después de 4,2 horas, evaporar mediante rotavapor para retirar la mayoría de la piridina, añadir acetato de etilo y retirar mediante rotavapor para proporcionar un residuo.

- 5 Almacenar el residuo durante una noche a 0°C, añadir acetato de etilo (400 ml), y extraer con 200 ml de hidróxido sódico acuoso 1 N seguido de 200 ml de agua. Secar la fase orgánica sobre Na₂SO₄, filtrar y evaporar a vacío para proporcionar un residuo. Cromatografiar el residuo sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 3 – 10% de metanol en cloruro de metileno para producir
- 10 18,85 g (76%) de 1(R)-(t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-(1-metil-N'-(4-fluorobencil)-N'-metilamidino)indano: EM m/z 428 (M + 1), p. f. 123 – 132°C.

- Combinar 1(R)-(t-butoxicarbonilamino)-2(R)-hidroxi-6-(1-metil-N'-(4-fluorobencil)-N'-metilamidino)indano 18,86 g (0,044 moles) y 110 ml de ácido trifluoroacético en un baño de hielo. Cuando la adición se ha completado retirar
- 15 el baño de hielo y agitar a temperatura ambiente durante 2,5 h. Evaporar la mezcla de reacción mediante rotavapor para producir un residuo. Disolver el residuo en 100 ml de cloruro de metileno y enfriar en un baño de hielo hasta aproximadamente 13°C, añadir hidróxido sódico acuoso 1 N (272 ml), seguido cloruro de 3-fluorobifenil-4-carbonilo 11,26 g (0,048 moles, 1,1 equivalente)
- 20 disuelto en 120 ml de cloruro de metileno. Añadir 30 ml adicionales de hidróxido sódico acuoso 1 N y agitar a aproximadamente 10°C durante 40 minutos. Repartir la mezcla de reacción entre agua y cloruro de metileno. Separar las fases y extraer la fase orgánica con agua, secar y concentrar con rotavapor para producir 20,67 g de residuo. Cromatografiar el residuo sobre gel
- 25 de sílice eluyendo con un gradiente de 3 – 10% de metanol en cloruro de

260
40

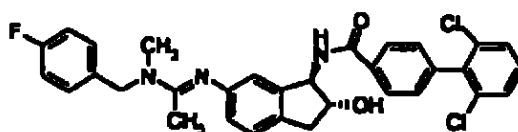
metileno, seguido de una segunda cromatografía sobre gel de sílice usando un Prep 2000 eluyendo con un gradiente de 3 – 10% de metanol en cloruro de metileno, para proporcionar 11,34 g (49%) del compuesto del título: EM m/z = 526 (M + 1).

- 5 Como entenderán los expertos en la técnica, un nombre alternativo para el compuesto del título es 6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2-hidroxi-1-(2-fluorobifenilamido)indano.

Ejemplo 4 – 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-

- 10 il)amida del ácido 2',6'-diclorobifenil-4-carboxílico



- Añadir DMF (1,6 ml) a una mezcla de resina de N-ciclohexilcarbodiimida-N-metilpoliestireno (Novobiochem, 2,0 mmoles/g) (150 mg, 0,30 mmoles) y ácido 2',6'-diclorobifenil-4-carboxílico (14 mg, 0,05 mmoles) seguido de una solución de N-hidroxisuccinimida (2,3 mg, 0,02 mmoles) en DMF (0,2 ml) y después una solución de N'-(3-amino-2-hidroxiindan-5-il)-N-(4-fluorobencil)-N-metilacetamidina (6,6 mg, 0,2 mmoles) en DMF (0,2 ml). Agitar la mezcla durante 16 horas, después añadir resina trisamina de poliestireno (Argonaut Technologies, 3,7 mmoles/g) (100 mg, 0,37 mmoles) y agitar durante 24 horas adicionales. Filtrar la mezcla para conseguir una solución 0,01 M del compuesto del título. EM (m/e): 577 (M⁺).

Los ejemplos 4 – 2 a 4 – 37 se preparan esencialmente como el ejemplo 4 – 1.

261
/

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
4 – 2	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2',6'-diclorobifenil-4-carboxílico	542 (M ⁺)
4 – 3	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2-metilbifenil-4-carboxílico	522 (M ⁺)
4 – 4	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2'-clorobifenil-4-carboxílico	542 (M ⁺)
4 – 5	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	576 (M ⁺)
4 – 6	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3-cloro-2',4'-difluorobifenil-4-carboxílico	578 (M ⁺)
4 – 7	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	576 (M ⁺)
4 – 8	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4'-metilbifenil-4-carboxílico	522 (M ⁺)
4 – 9	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-	545 (M ⁺)

262
52

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
	2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-(2,6-difluorofenil)piridina-3-carboxílico	
4 – 10	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-(2-metilfenil)piridina-3- carboxílico	523 (M ⁺)
4 – 11	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3',4'-difluorobifenil-4- carboxílico	544 (M ⁺)
4 – 12	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3',5'-dimetilbifenil-4- carboxílico	536 (M ⁺)
4 – 13	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-ciclohexilfenil-1-carboxílico	514 (M ⁺)
4 – 14	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3'-cianobifenil-4-carboxílico	533 (M ⁺)
4 – 15	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3',5'-difluorobifenil-4-carboxílico	544 (M ⁺)
4 – 16	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3'-fluorobifenil-4-carboxílico	526 (M ⁺)

263
57

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
4 – 17	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2',4'-difluorobifenil-4-carboxílico	544 (M ⁺)
4 – 18	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2',3'-diclorobifenil-4-carboxílico	576 (M ⁺)
4 – 19	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4'-clorobifenil-4-carboxílico	542 (M ⁺)
4 – 20	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3'-clorobifenil-4-carboxílico	542 (M ⁺)
4 – 21	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-trifluorometilfenil-1-carboxílico	500 (M ⁺)
4 – 22	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-metilfenil-1-carboxílico	446 (M ⁺)
4 – 23	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3',5'-diclorobifenil- 4-carboxílico	576 (M ⁺)
4 – 24	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2',4',6'-	550 (M ⁺)

264
S

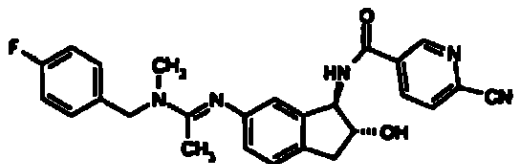
Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
	trimetilbifenil-4-carboxílico	
4 - 25	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridina-3-carboxílico	541 (M ⁺)
4 - 26	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 5-(2,4-difluorofenil)piridina-2-carboxílico	545 (M ⁺)
4 - 27	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2'-fluoro-4'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	594 (M ⁺)
4 - 28	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-(pirrol-1-il)fenil-1-carboxílico	597 (M ⁺)
4 - 29	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-metilpiridina-3-carboxílico	447 (M ⁺)
4 - 30	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-cianofenil-1-carboxílico	457 (M ⁺)
4 - 31	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3,2',6'-trifluorobifenil-4-carboxílico	562 (M ⁺)
4 - 32	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-	541 (M ⁺)

265
54

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
	2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3,2',6'-trifluorobifenil-4-carboxílico	
4 - 33	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2'-metilbifenil-4-carboxílico	522 (M ⁺)
4 - 34	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2'-metoxibifenil-4-carboxílico	538 (MH ⁺)
4 - 35	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3,2'-difluorobifenil-4-carboxílico	544 (MH ⁺)
4 - 36	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6'-fluoro-2'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	594 (MH ⁺)

Ejemplo 5 - 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-cianopiridina-3-carboxílico



266
~~56~~

Disolver cantidades equimolares de N'-(3-amino-2-hidroxiindan-5-il)- N-(4-fluorobencil)-N-metilacetamida (229 mg, 0,70 mmoles) y 6-ciano-3-carboxipiridina (0,70 mmoles, 103 mg) en DMF anhidra (4,0 ml). Añadir trietilamina (0,487 ml, 3,50 mmoles), seguido de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris-dimetilaminofosfonio (296 mg, 0,70 mmoles). Dejar la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 0,5 horas. Diluir la reacción con agua (100 ml) y extraer con EtOAc (3 x 50 ml). Secar las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, filtrar y concentrar. Disolver el producto de reacción bruto en THF (5,0 ml). Añadir resina de hidróxido (resina BIO – RAD AG 1 – X8), malla 20 – 50 – lavada con agua), NaOH 1 M, MeOH, éter y secar a vacío hasta que la solución sea básica y agitar a temperatura ambiente durante 24 horas. Filtrar la reacción, lavar con THF adicional, evaporar sobre gel de sílice y purificar mediante cromatografía en columna ultrarrápida con EtOAc/Hexanos para proporcionar 253 mg (79%) del compuesto del título en forma de un sólido blanco. EM (m/e): 458 (M⁺).

Los ejemplos 5 – 2 a 5 – 8 se preparan esencialmente como el ejemplo 5 – 1.

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
5 – 2	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3,5-difluorobifenil-4-carboxílico	544,2 (M ⁺)
5 – 3	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-	514,1 (M ⁺)

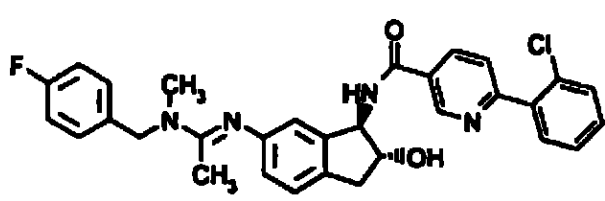
267
57

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
	2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-(tien-3-il)fenil-1-carboxílico	
5 – 4	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-trifluorometilpiridina-3-carboxílico	501,1 (M ⁺)
5 – 5	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3-fluoro-2'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico	594,1 (M ⁺)
5 – 6	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2-fluoro-4-trifluorometilfenil-1-carboxílico	518,4 (M ⁺)
5 – 7	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2'-cloro-3-fluorobifenil-4-carboxílico	560,2 (M ⁺)
5 – 8	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 5-fenilpirazina-2-carboxílico	510,3 (M ⁺)

Ejemplo 6 – 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-(2-clorofenil)piridina-3-carboxílico

268



Disolver N'-(3(R)-amino-2(R)-hidroxiindan-5-il)-N-(4-fluorobencil)-N-metilacetamidina (42 mg, 0,13 mmoles) y ácido 6-(2-clorofenil)piridina-3-carboxílico (103 mg, 0,70 mmoles) en DMF anhidra (2,5 ml). Añadir trietilamina
5 (0,178 ml) seguido de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitrisdimetilaminofosfonio (54 mg, 0,13 mmoles). Dejar la reacción en agitación a temperatura ambiente hasta la finalización. Diluir la reacción con agua (100 ml) y extraer con EtOAc. Secar las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, filtrar y concentrar. Purificar mediante cromatografía en columna ultrarrápida
10 con mezclas de CHCl₃/MeOH para producir 276 mg (35,7 %) del compuesto del título sólido aislado. EM (m/e): 543,0 (M⁺).

Los ejemplos 6 – 2 a 6 – 4 se preparan esencialmente como el ejemplo 6 – 1.

15

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
6 – 2	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-(2,4-difluorofenil)piridina-3-carboxílico	545,1 (M ⁺)
6 – 3	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-yodofenil-1-	558,0 (M ⁺)

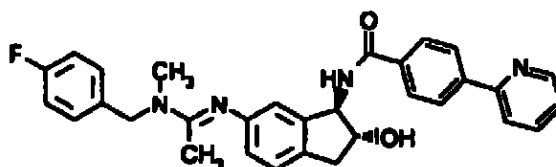
269
SA

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
	carboxílico	
6 - 4	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 6-(tien-3-il)piridina-3-carboxílico	515,4 (MH ⁺)

Ejemplo 7 - 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-(piridin-3-il)fenil-1-carboxílico

5



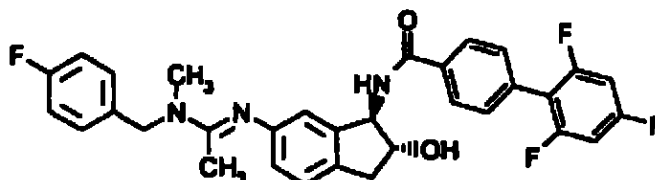
Combinar (R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-yodofenil-1-carboxílico (0,131 g, 0,235 mmoles), 2-(tributylestannil)piridina (0,129 g, 0,352 mmoles) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,406 g, 0,352 mmoles) en dioxano a 80°C. Calentar con agitación hasta la finalización. Retirar el disolvente mediante evaporación. Diluir el residuo con acetato de etilo y agitar con un volumen igual de fluoruro potásico saturado durante 3 horas. Filtrar la solución a través de una almohadilla de celita. Separar la fase orgánica de la fase acuosa y secar sobre sulfato de magnesio. Retirar el disolvente orgánico mediante evaporación y purificar mediante cromatografía ultrarrápida con diclorometano y metanol

270

para producir 0,035 g (30%) del compuesto del título en forma de un material sólido. EM (m/e): 509,2 (M⁺).

Ejemplo 8 – 1

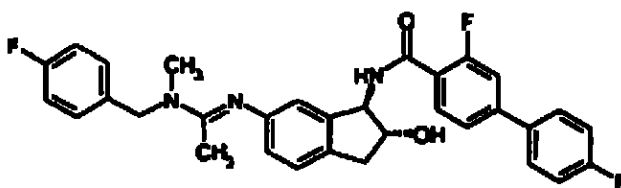
(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2',4',6'-trifluorobifenil-4-carboxílico



Combinar el ácido 2',4',6'-trifluorobifenil-4-carboxílico (86 mg, 0,26 mmoles), EDC (53 mg, 0,28 mmoles) y N-hidroxisuccinimida (0,33 mg, 0,28 mmoles) en diclorometano y agitar hasta la finalización. Lavar la solución con ácido clorhídrico 1 N. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se concentra. El residuo se combina con N'-(3(R)-amino-2(R)-hidroxiindan-5-il)-N-(4-fluorobencil)-N-metilacetamidina (42 mg, 0,13 mmoles) en diclorometano y se agita hasta la finalización de la reacción. El disolvente se retira mediante evaporación y el residuo se purifica mediante cromatografía ultrarrápida con diclorometano y metanol para producir 37 mg del compuesto del título. EM (m/e): 562,0 (M⁺).

Ejemplo 9 – 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3,4'-difluorobifenil-4-carboxílico



RMN de ^1H (CDCl_3) δ 8,21 (1 H, t, $J = 8,4$ Hz), 7,58 (2 H, dd, $J = 8,8$ y $4,8$ Hz), 7,32 (1 H, d, $J = 13,2$ Hz), 7,26 - 7,23 (2 H, m), 7,19 - 7,12 (3 H, m), 7,04 (2 H, t, $J = 8,8$ Hz), 6,68 (1 H, s), 6,66 (1 H, s), 5,32 (1 H, t, $J = 5,2$ Hz), 4,82 - 4,72 (1 H, m), 4,64 (2 H, s), 4,56 (1 H, c, $J = 6,4$ Hz), 3,32 (1 H, dd, $J = 15,6$ y $8,0$ Hz), 3,00 (3 H, s), 2,96 (1 H, dd, $J = 15,2$ y $8,4$ Hz), 1,96 (3 H, s), EM 544 (MH $^+$).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ 8,21 (1 H, t, $J = 8,4$ Hz), 7,58 (2 H, dd, $J = 8,8$ y $4,8$ Hz), 7,32 (1 H, d, $J = 13,2$ Hz), 7,26 - 7,23 (2 H, m), 7,19 - 7,12 (3 H, m), 7,04 (2 H, t, $J = 8,8$ Hz), 6,68 (1 H, s), 6,66 (1 H, s), 5,32 (1 H, t, $J = 5,2$ Hz), 4,82 - 4,72 (1 H, m), 4,64 (2 H, s), 4,56 (1 H, c, $J = 6,4$ Hz), 3,32 (1 H, dd, $J = 15,6$ y $8,0$ Hz), 3,00 (3 H, s), 2,96 (1 H, dd, $J = 15,2$ y $8,4$ Hz), 1,96 (3 H, s), EM 544 (MH $^+$).

272
62

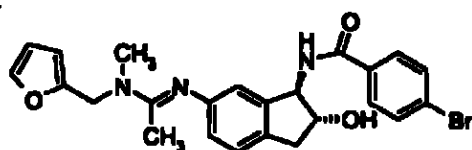
Los ejemplos 9 – 2 a 9 – 6 se preparan esencialmente como el ejemplo 9 – 1.

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
9 – 2	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4'-fluorobifenil-4-carboxílico	526 (MH ⁺)
9 – 3	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4'-fluoro-2'-metoxibifenil-4-carboxílico	556 (MH ⁺)
9 – 4	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2',6'-difluorobifenil-4-carboxílico	544 (MH ⁺)
9 – 5	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 2'-fluorobifenil-4-carboxílico	526,1 (MH ⁺)
9 – 6	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3,2',4'-trifluorobifenil-4-carboxílico	562 (M + 1)

5

Ejemplo 10 – 1

(R)-(6-(1-((Furan-2-ilmetil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico

273
~~69~~

A una mezcla de tioacetamida (10,04 g, 133,64 mmoles) y K_2CO_3 (45,80 g, 331,38 mmoles) en 100 ml de THF a 0°C añadir cloruro de ftaloilo (28,49 g, 140,32 mmoles) gota a gota. Elevar la temperatura de reacción hasta 25°C
5 después de 2 horas y dejarla en agitación durante 2 horas adicionales antes de enfriar la mezcla de reacción hasta 0°C otra vez. Inactivar la reacción añadiendo 125 ml de agua con hielo gota a gota. Extraer la mezcla de reacción con EtOAc (2 x). Secar la fase orgánica con $MgSO_4$ y retirar el disolvente a vacío para producir 3,7 g de N-tioacetilisoindol-1,3-diona en forma de un sólido
10 bruto rojizo.

Disolver N-metilfurfurilamina (117,2 mg, 1,05 mmoles) en 20 ml de Et_2O a 25 °C. A esto añadir N-tioacetilisoindol-1,3-diona (294,4 mg, 1,43 mmoles) y dejar en agitación durante 24 horas. Añadir MeOTf (181,7 mg, 1,11 mmoles) a la mezcla de reacción y dejar en agitación durante 23 horas adicionales.
15 Decantar el Et_2O del aceite y triturar el aceite con Et_2O , repetir esto tres veces. Retirar cualquier exceso de Et_2O del residuo del aceite a vacío para obtener 320,4 mg de tioimidato bruto en forma de un aceite. Disolver este producto bruto (161,1 mg, 0,483 mmoles) en 10 ml de piridina y añadir N-(6-amino-2-hidroxiindan-1-il)-4-bromobenzamida (107,5 mg, 0,310 mmoles). Dejar la
20 reacción en agitación a 25°C durante 22 horas. Retirar el disolvente a vacío y repartir el residuo entre CH_2Cl_2 y $NaHCO_3$ acuoso saturado. Secar la fase orgánica con $MgSO_4$. Filtrar y retirar el disolvente a vacío para proporcionar 146,2 mg de producto bruto. Purificar mediante cromatografía de Biotage (1%

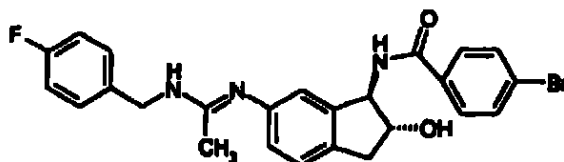
274
bl

de MeOH/EtOAc) para producir 63,6 mg del compuesto del título en forma de un sólido blanquecino (43%). EM (m/e): 483 (M + 1).

Ejemplo 11 – 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-

5 il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico



Etapa a) Combinar el éster *terc*-butílico del ácido (6-amino-2-hidroxiindan-1-il)carbámico (3,7 g, 14,0 mmoles) con 10 ml de TFA a 0°C.

- 10 Agitar la mezcla durante 1 hora y evaporar hasta sequedad. Añadir al residuo 6,5 ml de trietilamina y 30 ml de cloruro de metileno. Combinar esta mezcla lentamente con una solución de éster benzotriazol-1-ílico del ácido 4-bromobenzoico en 15 ml de cloruro de metileno a 0°C. Agitar la mezcla de reacción durante 12 horas a temperatura ambiente. Filtrar para proporcionar
- 15 3,4 g (70% de rendimiento) de N-(6-amino-2-hidroxiindan-1-il)-4-bromobenzamida en forma de un sólido blanco. EM 348 (MH+).

- Etapa b) Añadir cloruro de acetilo (9,28 g, 118 mmoles) a una mezcla de trietilamina (16,0 g, 158 mmoles) y 4-fluorobencilamina (9,90 g, 78,8 mmoles) en 200 ml de acetato de etilo a 0°C y agitar durante 12 horas. Añadir 100 ml de
- 20 agua a la mezcla. Extraer la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 100 ml). Combinar las fases orgánicas y lavar con salmuera, después secar sobre Na₂SO₄ anhidro. Retirar el disolvente a presión reducida para proporcionar N-(4-fluorobencil)acetamida (13,5 gm) con 100% de rendimiento en forma de un

275
65

aceite amarillo. Añadir NaH (6,5 g, 162 mmoles) a N-(4-fluorobencil)acetamida (13,5 g, 80,8 mmoles) en 200 ml de tetrahidrofurano a 0°C y agitar durante 4 horas. Después añadir yoduro de metilo (22,9 g, 161,6 mmoles) a la mezcla anterior y agitar durante 12 horas. Verter la mezcla en 200 ml de agua. Extraer la fase acuosa con cloruro de metileno (3 x 200 ml). Combinar las fases orgánicas y lavar con salmuera, después secar sobre Na₂SO₄ anhidro. Retirar el disolvente a presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 5% de acetona en hexanos, 50% de acetona en hexanos) para proporcionar N-(4-fluorobencil)-N-metilacetamida (9,1 gm) con 64% de rendimiento en forma de un aceite amarillo. Añadir reactivo de Lawesson (20,3 g, 50,3 mmoles) a N-(4-fluorobencil)-N-metilacetamida (9,1 g, 50,3 mmoles) en 200 ml de tolueno y calentar hasta 100°C durante tres horas. Retirar el disolvente a presión reducida. Purificar el residuo con una cromatografía en columna (gel de sílice, 2% de cloruro de metileno en hexanos, 100% de cloruro de metileno) para proporcionar N-(4-fluorobencil)-N-metiltioacetamida (5,6 g) 56,5% en forma de un sólido amarillo: EM 198 (MH⁺).

Etapa c) Añadir reactivo de Lawesson (1,8 g, 3,6 mmoles) a N-(4-fluorobencil)acetamida (0,9 g, 5,4 mmoles) en 50 ml de tolueno y calentar hasta 80°C durante 12 horas. Retirar el disolvente a presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, acetona : hexano = 20 : 80) para proporcionar una mezcla. Lavar con éter y descartar las impurezas sólidas insolubles mediante filtración. Retirar el disolvente a presión reducida para proporcionar N-(4-fluorobencil)tioacetamida (0,7 gm) con 71% en forma de un sólido amarillo: EM 184 (MH⁺).

Etapa d) Añadir trifluorometanosulfonato de metilo (0,190 g, 1,16

276

mnoles) a una solución de N-(3-fluorobencil)tioacetamida (0,108 g, 0,580 mmoles) en 10 ml de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Agitar la mezcla durante 30 minutos y retirar el disolvente a presión reducida. Disolver el residuo en 5 ml de piridina. Después añadir la sal ácido trifluoroacético de N-(6-amino-2-5 hidroxindan-1-il)-4-bromobenzamida a la solución. Agitar durante tres horas. Retirar la piridina a presión reducida. Purificar el residuo con cromatografía en columna (gel de sílice/hexanos:acetona = 7:3, 1:1) para proporcionar 40 mg del compuesto del título con 14% de rendimiento en forma de un sólido blanco: EM 496 (MH⁺).

10

Los ejemplos 11 – 2 a 11 – 17 se preparan esencialmente como el ejemplo 11 – 1.

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
11 – 2	(R)-(6-(1-((3-Fluorobencil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	496 (MH ⁺)
11 – 3	(R)-(6-(1-((1,3-Benzodioxol-5-ilmetil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	522 (MH ⁺)
11 – 4	(R)-(6-(1-((4-Metoxibencil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	508 (MH ⁺)

277
62

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
11 – 5	(R)-(6-(1-((3-Metoxibencil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	508 (MH ⁺)
11 – 6	(R)-(6-(1-((2-Metoxibencil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	508 (MH ⁺)
11 – 7	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	510 (MH ⁺)
11 – 8	(R)-(6-(1-((2-(4-Fluorofenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	510 (MH ⁺)
11 – 9	(R)-(6-(1-((2-(2-Fluorofenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	510 (MH ⁺)
11 – 10	(R)-(6-(1-((2-(4-Metoxifenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	EM 522 (MH ⁺)
11 – 11	(R)-(6-(1-((2-(3-Fluorofenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	510 (MH ⁺)
11 – 12	(R)-(6-(1-((2-(2-Metoxifenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-	522 (MH ⁺)

278
6

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
	carboxílico	
11 – 13	(R)-(6-(1-((2-(3-Metoxifenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	522 (MH ⁺)
11 – 14	(R)-(6-(1-((2-(2,3-Dimetoxifenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	522 (MH ⁺)
11 – 15	(R)-(6-(1-((2-(1,3-Benzodioxol-5-il)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	536 (MH ⁺)
11 – 16	(R)-(6-(1-((2-(4-Fluorofenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	524 (MH ⁺)
11 – 17	(R)-(6-(1-((2-(2-Metoxifenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 4-bromofenil-1-carboxílico	536 (MH ⁺)

Ejemplo 12 – 1

(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico

5 Combinar éster *terc*-butílico del ácido (6-amino-2-hidroxiindan-1-il)carbámico (1,5 g, 5,68 mmoles) con 5 ml de TFA a 0°C. Agitar la mezcla

279
69

durante 1 hora y después evaporar hasta sequedad. Añadir 3,0 ml de trietilamina y 30 ml de cloruro de metileno al residuo. A esta mezcla, añadir una solución de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido bifenil-4-carboxílico (1,76 g, 5,96 mmoles) en 15 ml de cloruro de metileno. Agitar la mezcla resultante
5 durante 12 horas. Evaporar el disolvente y purificar el residuo mediante una cromatografía en columna (gel de sílice/MeOH:CH₂Cl₂ = 9:1) para proporcionar 1,88 g (96% de rendimiento) (6-amino-2-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico; EM 345 (MH⁺).

Añadir trifluorometanosulfonato de metilo (0,290 g, 1,76 mmoles) a una
10 solución de N-(4-fluorobencil)tioacetamida (0,2 gm, 1,0 mmoles) en 5 ml de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Agitar la mezcla durante 30 minutos y retirar el disolvente a presión reducida. Disolver el residuo en 5 ml de piridina. Después añadir (6-amino-2-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico a la solución. Agitar durante 12 horas. Retirar la piridina a presión reducida.
15 Purificar el residuo con cromatografía en columna (gel de sílice/hexanos:acetona = 7:3, 1:1) para proporcionar 78 mg del compuesto del título con 35% de rendimiento en forma de un sólido blanco: RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 8,78 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,04 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,79 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,74 (2H, dd, J = 7,4, 1,6 Hz), 7,50 (2H, t, J = 8,0 Hz), 7,41 (1H, t, J =
20 7,2 Hz), 7,28 (2H, dd, J = 8,8, 6,6 Hz), 7,14 (2H, t, J = 8,8 Hz), 7,04 (1H, t, J = 7,6 Hz), 6,78 (1H, d, J = 7,2 Hz), 6,37 (1H, s), 5,33 (1H, d, J = 5,6 Hz), 5,27 (1H, t, J = 7,6 Hz), 4,59 (2H, s), 4,45 (1H, c, J = 6,0 Hz), 3,10 (1H, dd, J = 14,8, 7,2 Hz), 2,90 (3H, s), 2,68 (1H, dd, J = 14,8, 7,2 Hz), 1,88 (3H, s); EM 508 (MH⁺).

25 Los ejemplos 12 - 2 a 12 - 7 se preparan esencialmente como el

280
9/10

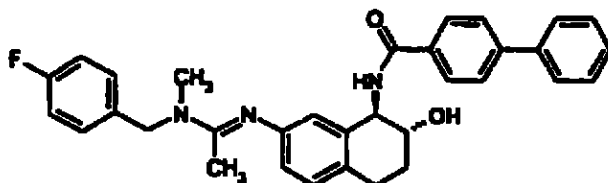
ejemplo 12 – 1.

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
12 – 2	(R)-(6-(1-((3-Metoxibencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico	520 (MH ⁺)
12 – 3	(R)-(6-(1-((3,4-Difluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico	526 (MH ⁺)
12 – 4	(R)-(6-(1-((2-(4-Fluorofenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico	508 (MH ⁺)
12 – 5	(R)-(6-(1-((2-(2-Metoxifenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico	520 (MH ⁺)
12 – 6	(R)-(6-(1-((2-(2-Fluorofenil)etil)amino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico	508 (MH ⁺)
12 – 7	(R)-(6-(1-((2-(4-Fluorofenil)etil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico	522 (MH ⁺)

Ejemplo 13 – 1

5 (R)-(7-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxi-1.2.3.4-

tetrahidronaftalen-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico



- 5 Agitar una mezcla de 1-amino-7-nitro-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol (500 mg, 2,40 mmoles) y NaOH 1 N (4,8 ml, 4,8 mmoles) en una mezcla de 50 ml de tolueno y 50 ml de agua durante 30 minutos. Añadir cloruro de bifenil-4-carbonilo (570 mg, 2,64 mmoles) lentamente y agitar durante cuatro horas a temperatura ambiente. Retirar el sólido mediante filtración y lavar con tolueno.
- 10 Evaporar el disolvente a presión reducida. Se obtiene (2-hidroxi-7-nitro-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico con 54% de rendimiento en forma de un sólido blanco: RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 8,87 (1H, d, J = 8,4 Hz), 8,03 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,99 (2H, d, J = 7,6 Hz), 7,79 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,74 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,50 (2H, t, J = 7,2 Hz), 7,43 (2H, t, J = 6,8 Hz), 5,22 (1H, d, J = 4,4 Hz), 5,11 (1H, t, J = 7,6 Hz), 3,95 - 4,01 (1H, m), 2,87 - 3,07 (2H, m), 2,08 - 2,15 (1H, m), 1,81 - 1,94 (1H, m); EM 389 (MH $^+$). El compuesto anterior (0,25 g, 0,64 mmoles) se reduce en 10 ml de DMF con 48 mg de 10% de Pd - C a temperatura ambiente a 60 psi (414 kPa) durante una noche para formar (7-amino-2-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)amida del
- 20 ácido bifenil-4-carboxílico, obtenida con 96% de rendimiento en forma de un aceite amarillo. EM 359 (MH $^+$).

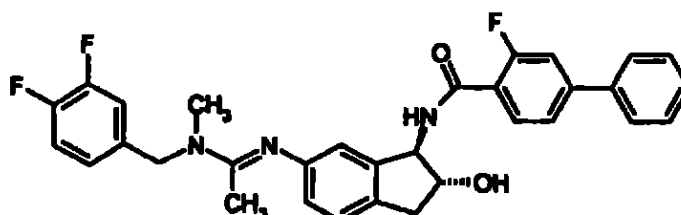
Añadir trifluorometanosulfonato de metilo (0,150 g, 0,915 mmoles) a una

252
72

- solución de N-4-fluorobencil-N-metilacetamida (0,145 g, 0,736 mmoles) en 10 ml de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Agitar la mezcla durante 30 minutos y retirar el disolvente a presión reducida. Después añadir (7-amino-2-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico (0,22 g, 0,61 mmoles) seguido de 5 ml de piridina. Agitar la mezcla de reacción durante 12 horas. Después de evaporar la piridina, purificar el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 5% de MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar 10 mg del compuesto del título con 2,6% de rendimiento en forma de un sólido amarillo claro.
- 10 RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,89 (2H, d, J = 8,0 Hz), 8,66 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,61 (2H, d, J = 7,2 Hz), 7,47 (2H, t, J = 7,6 Hz), 7,39 (1H, t, J 7,6 Hz), 7,21 (1H, dd, J = 6,0, 8,8 Hz), 6,98 - 7,05 (3H, m), 6,72 (1H, s), 6,62 (1H, dd, J = 2,0, 8,4 Hz), 6,56 (1H, d, J = 7,2 Hz), 5,22 (1H, t, J = 7,6 Hz), 4,60 (2H, s), 3,98 - 4,04 (2H, m), 3,41 (1 H, t, J= 6,0 Hz), 2,96 (3H, s), 2,85 (2H, t, J = 4,8 Hz), 2,15 - 2,21
- 15 (2H, m), 1,87 - 1,95 (1H, m), 1,92 (3H, s), 1,60 - 1,64 (1H, m); EM 522 (MH⁺).

Ejemplo 14 – 1

(R)-(6-(1-((3,4-Difluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico



20

Comenzando con 3,4-difluorobencilamina, la N-(3,4-difluorobencil)-N-metilacetamida se prepara esencialmente como en la etapa b, ejemplo 11 –

283
2/4

1, y se obtiene con 66% de rendimiento en forma de un sólido amarillo: EM 216 (MH⁺).

Añadir trifluorometanosulfonato de metilo (0,750 g, 3,49 mmoles) a una solución de N-(3,4-difluorobencil)-N-metiltioacetamida (0,145 g, 0,736 mmoles) en 10 ml de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Agitar la mezcla durante 30 minutos y retirar el disolvente a presión reducida. Después añadir el éster *terc*-butílico del ácido (6-amino-2-hidroxiindan-1-il)carbámico (0,78 g, 2,97 mmoles) seguido de 5 ml de piridina. La mezcla resultante se agita durante 12 horas. Después se evapora la piridina, el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 3% de MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar 0,98 g del éster *terc*-butílico del ácido (6-(1-((3,4-difluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2-hidroxiindan-1-il)carbámico en forma de un sólido blanco: EM 446 (MH⁺).

Añadir 5 ml de ácido trifluoroacético al éster *terc*-butílico del ácido (R)-(6-(1-((3,4-difluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxindan-1-il)carbámico (180 mg, 4,04 mmoles) y agitar durante 30 minutos. Retirar el disolvente a presión reducida. Disolver el residuo en 15 ml de CH₂Cl₂. Después añadir éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico (150 mg, 4,79 mmoles) y trietilamina (0,6 ml, 4,0 mmoles) a la solución y agitar durante 12 horas. Verter la mezcla en cloruro de metileno, lavar con agua, secar con Na₂SO₄ y después concentrar. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 3% de MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar 35 mg del compuesto del título en forma de un sólido blanco con 16% de rendimiento: RMN de ¹H (CD₃OD) δ 7,88 (2H, t, J = 8,0 Hz), 7,7 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,60 (2H, dd, J = 8,0, 1,2 Hz), 7,47 - 7,55 (3H, m), 7,43 - 7,47 (1H,

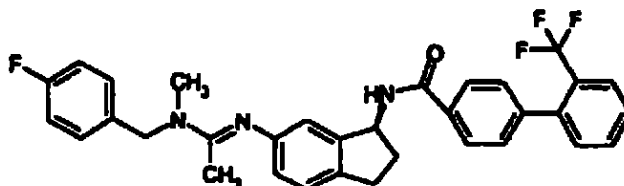
257
9/1

m), 7,21 - 7,32 (2H, m), 7,18 (1H, d, J = 8,0 Hz), 7,11 - 7,14 (1H, m), 6,71 (2H, dd, J = 10,0, 1,2 Hz), 5,47 (1H, d, J = 6,8 Hz), 4,69 (2H, s), 4,54 (1H, c, J = 7,2 Hz), 4,54 (1H, c, J = 6,4 Hz), 3,29 (1H, c, J = 7,2 Hz), 3,07 (3H, s), 2,88 (1H, c, J = 7,8 Hz), 1,99 (3H, s); EM 544 (MH⁺)

5

Ejemplo 15 – 1

(R)-6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-indan-1-il)amida del
ácido 2'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico



- 10 Combinar 1-aminoindano (1,0 g, 8,1 mmoles) con 6,6 ml de HNO₃ fumante a -10°C. Agitar la mezcla resultante durante 30 minutos, verter en hielo y después agitar durante 30 minutos. Recoger el sólido, lavar con agua y secar para producir 0,614 g (42%) de producto. Mezclar con di-*terc*-butildicarbonato (0,929 g, 4,26 mmoles) en THF. Combinar la mezcla con solución acuosa
- 15 saturada de K₂CO₃ para ajustar a pH 11. Agitar durante 8 horas, verter en CH₂Cl₂, lavar con agua, secar y concentrar. Disolver el residuo en una mezcla 1:1 de éter y hexano, después mantener a -10°C durante una noche. Recoger el sólido y secar para proporcionar 0,57 g (59%) del éster *terc*-butílico del ácido (6-nitroindan-1-il)carbámico. RMN de ¹H (CDCl₃) δ 8,16 (1 H, s a), 8,11 (1 H,
- 20 dd, J = 8,4 y 2,0 Hz), 7,34 (1 H, d, J = 8,4 Hz), 5,25 (1 H, c, J = 8,8 Hz), 4,78 (1 H, d a, J = 6,4 Hz), 3,08 - 2,00 (1 H, m), 2,96 - 2,78 (1 H, m), 2,72 - 2,62 (1 H, m), 1,93 - 1,83 (1H, m), 1,51 (9 H, s).

285
X

Añadir KBH_4 (1,59 g, 29,4 mmoles) lentamente a una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido (6-nitroindan-1-il)carbámico (1,17 g, 4,2 mmoles) y CuCl (1,25 g, 12,6 mmoles) en 50 ml de metanol a 0°C durante 15 minutos. Agitar la mezcla durante 1 hora y después pasar a través de una almohadilla de Florisil.

- 5 Evaporar el THF y disolver el sólido en EtOAc. Lavar la mezcla con agua, secar y concentrar para producir 0,76 g (73%) de éster *terc*-butílico del ácido (6-aminoindan-1-il)carbámico. RMN de ^1H (CDCl_3) δ 6,99 (1 H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,65 (1 H, s), 6,56 (1 H, dd, $J = 8,0$ y $2,0$ Hz), 5,09 (1 H, c, $J = 8,0$ Hz), 4,70 (1 H, d a, $J = 7,2$ Hz), 3,60 (2 H, s), 2,86 - 2,79 (1 H, m), 2,75 - 2,67 (1 H, m), 2,58 - 2,47
10 (1 H, m), 1,78 - 1,69 (1 H, m), 1,48 (3 H, s).

- Añadir MeI (0,623 g, 4,4 mmoles) a una solución de N-4-fluorobencil-N-metiltioacetamida (0,662 g, 3,4 mmoles) en 10 ml de éter a temperatura ambiente. Agitar la mezcla durante 3 horas y evaporar el éter a vacío. Añadir éster *terc*-butílico del ácido (6-aminoindan-1-il)carbámico (0,7 g, 2,28 mmoles)
15 seguido de 5 ml de piridina. Agitar la mezcla resultante durante 12 horas. Evaporar la piridina y purificar el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 3% de MeOH en CH_2Cl_2) para proporcionar 1,26 g del éster *terc*-butílico del ácido (6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)indan-1-il)carbámico en forma de un sólido amarillo claro; EM 412 (MH^+); RMN de ^1H
20 (CD_3OD) δ 7,35 - 7,29 (2 H, m), 7,18 - 7,10 (3H, m), 6,70 (1 H, s), 6,65 (1 H, d, $J = 7,6$ Hz), 5,06 (1 H, t, $J = 6,8$ Hz), 4,69 (2 H, s), 3,05 (3 H, s), 2,97 - 2,91 (1 H, m), 2,84 - 2,77 (1 H, m), 2,55 - 2,48 (1 H, m), 1,97 (3 H, s), 1,52 (9 H, s),

- Agitar una mezcla del ácido 2'-trifluorometilbifenil-4-carboxílico (100 mg, 0,376 mmoles), N-hidroxisuccinimida (43 mg, 0,376 mmoles) y DCC (77 mg,
25 0,376 mmoles) en 15 ml de cloruro de metileno a temperatura ambiente

286
46

durante 2 horas. Combinar el éster *terc*-butílico del ácido (6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)indan-1-il)carbámico (129 mg, 0,313 mmoles) con TFA (2 ml) a 0°C y agitar durante 2 horas. Evaporar el TFA a presión reducida. Disolver el residuo en cloruro de metileno y evaporar hasta sequedad; repetir esto tres veces. Añadir 5 ml de cloruro de metileno y 1 ml de trietilamina. Añadir esta solución resultante a la mezcla anterior y agitar a temperatura ambiente durante 12 horas. Verter la mezcla en cloruro de metileno, lavar con agua, secar con Na₂SO₄ y concentrar. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 3% de MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar 82 mg del compuesto del título en forma de un sólido blanco. (47% de rendimiento). EM 560 (MH⁺);

RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,83 (2 H, d, J = 8,0 Hz), 7,75 (1 H, d, = 7,6 Hz), 7,56 (1 H, t, J = 7,2 Hz), 7,49 (1 H, t, J = 8,0 Hz), 7,40 (2 H, d, J = 8,0 Hz), 7,31 (1H, d, J = 8,0 Hz), 7,26 - 7,21 (3 H, m), 7,15 (1 H, d, J = 7,6 Hz), 7,02 (2 H, t, J = 8,8 Hz), 6,75 (1 H, s), 6,64 (1 H, d, J = 7,2 Hz), 5,67 (1 H, c, J = 7,6 Hz), 4,61 (2 H, c, J = 10,0 Hz), 2,97 (3 H, s), 2,94 - 2,83 (1 H, m), 2,75 - 2,68 (1 H, m), 2,00 - 1,70 (4 H, s a), 1,69 - 1,58 (1 H, m).

Los ejemplos 15 – 2 a 15 – 7 se preparan esencialmente como el ejemplo 15 – 1.

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
15 – 2	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-indan-1-il)amida del ácido 3,5-difluorobifenil-4-carboxílico	528 (MH ⁺)
15 – 3	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-	510 (MH ⁺)

287
X

Nº de ejemplo	Nombre del compuesto	EM (m/e)
	indan-1-il)amida del ácido 2'-fluorobifenil-4-carboxílico	
15 – 4	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-indan-1-il)amida del ácido 2',6'-difluorometilbifenil-4-carboxílico	528 (MH ⁺)
15 – 5	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-indan-1-il)amida del ácido bifenil-4- carboxílico	492 (MH ⁺)
15 – 6	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-indan-1-il)amida del ácido 3-fluorobifenil-4-carboxílico	510 (MH ⁺)
15 – 7	(R)-(6-(1-((4-Fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-indan-1-il)amida del ácido 3,2'-difluorobifenil-4-carboxílico	528 (MH ⁺)

Ejemplo P – 1

Hemihidrato de (R)-(6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico

- 5 Añadir 21,8 l de metanol a 2,86 kg de solvato de (R)-(6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico. Pasar la solución a través de un filtro impregnado en carbono y enjuagar el filtro con 24 l de metanol. Añadir 5,7 kg de agua a la solución durante 35 minutos seguido de 15 g de cristales de siembra de
- 10 hemihidrato de (R)-(6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico. Después de 20 minutos,

288
9/1

añadir 1,15 kg de agua seguido de 15 g de cristales de siembra. Después de 1 h, añadir otros 1,15 kg de agua durante 30 minutos seguidos de 15 g de cristales de siembra. Después de 10 minutos, añadir 3,4 kg de agua durante 1 hora y agitar la suspensión a temperatura ambiente durante 1 hora y a 0°C durante 45 minutos. Recoger el sólido mediante filtración, enjuagar con una solución fría de 11,4 l de metanol y 2,9 l de agua, y secar para producir 2,19 kg del compuesto del título en forma de un sólido blanco.

Ejemplo P – 2

Hemihidrato de (R)-(6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico

10

Disolver solvato de (R)-(6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico (2,0 g) en metanol (24 ml) a 20 – 23°C. Añadir agua (5 ml) a la solución, seguido de cristales de siembra de hemihidrato (20 mg). Agitar la mezcla durante 2 horas a 20 – 23°C, después enfriar hasta 0 – 5°C. Filtrar la mezcla, lavar con una solución de metanol (8 ml) y agua (2 ml), y secar a 50 – 60°C a vacío durante 16 horas para proporcionar 1,66 g del compuesto del título.

15

Ejemplo P – 3

Hemihidrato de (R)-(6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2(R)-hidroxiindan-1-il)amida del ácido bifenil-4-carboxílico

20

Combinar una solución de solvato de acetonitrilo de (6-(1-((4-fluorobencil)metilamino)etilidenamino)-2-hidroxi-1-bifenilaminoindano (101 g) y metanol (1,2 l) con Darco G-60 (5 g). Después de agitar durante 15 – 30 minutos a 15 – 25°C, filtrar la mezcla y enjuagar los sólidos filtrados con

25

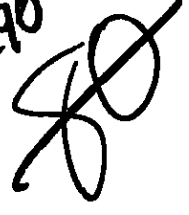
289
A

metanol (0,4 l). Añadir agua (0,4 l) al filtrado combinado, enjuagar, y añadir cristales de siembra de hemihidrato (1,5 g). Agitar la mezcla 2 – 3 horas a 15 – 25°C, después enfriar hasta 0 – 5°C y agitar otros 90 minutos. Filtrar la mezcla, lavar con una solución a 0 – 5°C de metanol (0,8 l) y agua (0,2 l), y secar a 47 – 53°C a vacío durante 20 horas para proporcionar 88,7 g del compuesto del título.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar bien solos o en forma de una composición farmacéutica, es decir, combinados con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, la proporción y naturaleza de los cuales se determinan mediante la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto seleccionado, la vía elegida de administración, y la práctica farmacéutica habitual. Los compuestos de la presente invención, aunque son eficaces por ellos mismos, se pueden formular y administrar en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, para propósitos de estabilidad, conveniencia, solubilidad y similares. En la práctica, los compuestos de fórmula I se administran usualmente en la forma de composiciones farmacéuticas, es decir, en mezcla con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Así la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I y un diluyente farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona un envase adecuado, que incluye una etiqueta, conteniendo las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I.

Los compuestos de fórmula I se pueden administrar mediante una

290


diversidad de vías. Al efectuar el tratamiento de un paciente aquejado con trastornos descritos en esta memoria descriptiva, un compuesto de fórmula I se puede administrar en cualquier forma o manera que hace al compuesto biodisponible en una cantidad eficaz, incluyendo vías orales y parenterales. Por ejemplo, los compuestos de fórmula I se pueden administrar oralmente, mediante inhalación, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, transdérmicamente, intranasalmente, rectalmente, ocularmente, tópicamente, sublingualmente, bucalmente y similares. Generalmente se prefiere la administración oral para el tratamiento de los

Los expertos en la técnica de preparación de las formulaciones pueden seleccionar fácilmente la forma y manera apropiadas de administración dependiendo de las características particulares del compuesto seleccionado, el trastorno o afección a tratar, la fase del trastorno o afección, y otras circunstancias relevantes. (Remington's Pharmaceutical Sciences, Edición 18, Mack Publishing Co. (1990)).

Las composiciones farmacéuticas se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. El vehículo o excipiente puede ser un material sólido, semisólido, o líquido que puede servir como vehículo o medio para el ingrediente activo. Los vehículos o excipientes adecuados se conocen bien en la técnica. La composición farmacéutica se puede adaptar para uso oral, inhalación, parenteral, o tópico y se puede administrar al paciente en forma de comprimidos, cápsulas, aerosoles, inhaladores, supositorios, soluciones, suspensiones o similares.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar

291
81

oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o en cápsulas o en comprimidos. Para el propósito de administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obieas,
5 gomas de mascar y similares. Estas preparaciones deben contener al menos 4% del compuesto de la presente invención, el ingrediente activo, pero pueden variar dependiendo de la forma particular y puede estar convenientemente entre 4% y aproximadamente 70% del peso de la unidad. La cantidad del compuesto presente en las composiciones es tal que se obtendrá una
10 dosificación adecuada. Las composiciones y preparaciones preferidas según la presente invención se pueden determinar por las personas expertas en la técnica.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos, y similares también pueden contener uno o más de los adyuvantes siguientes: aglutinantes tales
15 como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa, agentes disgregantes tales como ácido algínico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; agentes deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; y se pueden añadir agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina o un
20 agente aromatizante tal como pipermin, sacililato metilo o aromatizante de naranja. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol o un ácido graso. Otras formas de dosificación unitaria pueden contener otros materiales diversos que modifican la forma física de la
25 unidad de dosificación, por ejemplo, como recubrimientos. Así que, los

292/62

comprimidos o píldoras se pueden recubrir con azúcar, goma de laca, u otros agentes de recubrimiento. Un jarabe puede contener, además de los presentes compuestos, sacarosa como un agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes, y colorantes y aromatizantes. Los materiales usados en la preparación de estas diversas composiciones deben ser farmacéuticamente puros y no tóxicos en las cantidades usadas.

Para el propósito de administración terapéutica oral y parenteral, los compuestos de la presente invención se pueden incorporar en una solución o suspensión. Estas preparaciones típicamente contienen al menos 0,1% de un compuesto de la invención, pero se pueden variar entre 0,1 y aproximadamente 90% del peso de las mismas. La cantidad del compuesto de fórmula I presente en dichas composiciones es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las soluciones o suspensiones también pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites estables, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparaben; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico. Las composiciones y preparaciones preferidas son capaces de determinarse por los expertos en la técnica.

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar tópicamente, y cuando se hace así el vehículo puede comprender

293
63

adecuadamente una solución, pomada, o base de gel. La base por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abejas, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes, y estabilizantes. Las formulaciones tópicas pueden
5 contener una concentración de la fórmula I o su sal farmacéutica entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10% p/v (peso por unidad de volumen).

Los compuestos de la fórmula I son agonistas de los receptores muscarínicos M – 1. Además los compuestos de la fórmula I son los agonistas
10 selectivos de ese receptor muscarínico particular. Los compuestos de la presente invención poseen propiedades particularmente útiles relativas a su biodisponibilidad, farmacocinética, seguridad y eficacia. Los agonistas muscarínicos, incluyendo su subtipo de perfil de unión, se pueden identificar mediante los procedimientos que se conocen bien en la técnica.

15 En una realización, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de trastornos asociados a receptores muscarínicos, comprendiendo: la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I. Así que, la presente invención contempla los diversos trastornos descritos a tratar en esta memoria
20 descriptiva y otros que se pueden tratar mediante dichos agonistas como aprecian los expertos en la técnica.

Se conocen numerosos trastornos que se pueden tratar mediante los agentes muscarínicos según las clasificaciones establecidas y aceptadas, mientras que otros no lo son. Por ejemplo, la cognición es un fenómeno
25 complicado y a veces escasamente definido. Sin embargo, se reconoce

294
SJK

ampliamente que la cognición incluye diversos "dominios". Estos dominios incluyen la memoria a corto plazo, la memoria a largo plazo, la memoria funcional, la función ejecutiva y la atención.

Se entiende que los compuestos de la presente invención son útiles para
5 el tratamiento de trastornos caracterizados por un déficit de cualquiera de los dominios cognitivos enumerados anteriormente o en otros aspectos de cognición. De este modo el término "trastornos cognitivos" quiere decir que comprende cualquier trastorno caracterizado por un déficit de uno o más dominios cognitivos, incluyendo pero no limitados a la memoria a corto plazo, la
10 memoria a largo plazo, la memoria funcional, la función ejecutiva y la atención.

Un trastorno cognitivo a tratar mediante la presente invención es el deterioro cognitivo relacionado con la edad. Este trastorno no está bien definido en la técnica, pero incluye el deterioro de los dominios cognitivos, particularmente los dominios de atención y memoria, que acompañan al
15 envejecimiento. Otro trastorno cognitivo es el deterioro cognitivo suave. De nuevo, este trastorno no está bien definido en la técnica, pero implica el deterioro de los dominios cognitivos, y se cree que representa un grupo de pacientes, la mayoría de los cuales tienen enfermedad de Alzheimer incipiente. Otro trastorno cognitivo es el deterioro cognitivo asociado a la esquizofrenia. La
20 relación entre las perturbaciones cognitivas y otros síntomas de esquizofrenia no se entiende con claridad en la actualidad. Se ha observado que algunas personas experimentan problemas cognitivos mucho antes de que desarrollen síntomas positivos, mientras otras adquieren deterioro cognitivo después del primer episodio y con recaídas posteriores. Todavía otro trastorno cognitivo es
25 un deterioro cognitivo inducido por quimioterapia. Las personas que están

295
GS

sometidas a quimioterapia para cáncer pueden experimentar un deterioro en la función cognitiva y este deterioro puede ser de larga duración. También, una amplia diversidad de lesiones, incluyendo accidente cerebrovascular, isquemia, hipoxia, inflamación, procesos infecciosos y déficits cognitivos posteriores a

5 cirugía de derivación cardíaca y trasplante cardíaco, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, traumatismo de la médula espinal, traumatismo craneal, hipoxia perinatal, síndrome de alcohol fetal, parada cardíaca, y lesión neuronal hipoglucémica, demencia vascular, demencia multiinfarto, esclerosis lateral amiotrófica, quimioterapia, y esclerosis múltiple puede dar como resultado

10 déficits cognitivos como una secuela que se puede tratar según la presente invención.

Cuando los trastornos que se pueden tratar mediante los agonistas muscarínicos se conocen según las clasificaciones establecidas y aceptadas, estas clasificaciones se pueden encontrar en diversas fuentes. Por ejemplo,

15 actualmente, la cuarta edición del Manual de diagnóstico y estadístico de trastornos mentales (abreviadamente en inglés DSM-IV™) (1994, American Psychiatric Association, Washington, D.C.), proporciona una herramienta de diagnóstico para identificar muchos de los trastornos descritos en esta memoria descriptiva. También, la clasificación internacional de enfermedades, revisión

20 décima (abreviadamente en inglés ICD-10), proporciona las clasificaciones para muchos de los trastornos descritos en esta memoria descriptiva. Los expertos en la técnica reconocerán que existen nomenclaturas, nosologías y sistemas de clasificación alternativos para los trastornos descritos en esta memoria descriptiva, incluyendo los descritos en DSM-IV e ICD-10, y que la

25 terminología y sistemas de clasificación evolucionan con el progreso científico

médico.

En las realizaciones particularmente preferidas, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de trastornos seleccionados entre el grupo constituido por: trastornos cognitivos (incluyendo trastorno cognitivo
5 relacionado con la edad, deterioro cognitivo suave, deterioro cognitivo asociado a la esquizofrenia, y deterioro cognitivo inducido por la quimioterapia), ADHD, trastornos de humor (incluyendo depresión, manía, trastornos bipolares), psicosis (en particular esquizofrenia y trastorno de esquizofrenia), demencia (incluyendo enfermedad de Alzheimer, demencia inducida por SIDA, demencia
10 vascular, y demencia carente de histología distintiva), enfermedad de Parkinson, Corea de Huntington, dolor (incluyendo dolor agudo y dolor crónico), xerostomía (boca seca), enfermedad de cuerpos de Lewy (incluyendo enfermedad difusa de cuerpos de Lewy), afasia (incluyendo afasia primaria y síndromes de afasia primaria), síndromes hipotensos y colitis crónica
15 (incluyendo la enfermedad de Crohn), que comprende: la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I. Es decir, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica del mismo para el tratamiento de trastornos asociados a receptores muscarínicos.

20 Se reconoce que los términos "tratamiento" y "tratando" tienen la intención de incluir mejoría de la sintomatología asociada a cada uno de los trastornos asociados a los receptores muscarínicos descritos en esta memoria descriptiva. También, se reconoce que los expertos en la técnica pueden influir en los trastornos tratando a un paciente aquejado con los trastornos o tratando
25 profilácticamente a un paciente que se cree que es susceptible a tales

297
26X

trastornos con una cantidad eficaz del compuesto de fórmula I. Así que, los términos "tratamiento" y "tratando" tienen la intención de referirse a todos los procedimientos en los que puede haber una ralentización, interrupción, parada, control o detención de la progresión de los trastornos descritos en esta memoria descriptiva, pero no indican necesariamente una eliminación total de todos los síntomas, y se tiene la intención de incluir el tratamiento profiláctico de tales trastornos.

Se entiende que la presente invención incluye tratamiento adjunto de los trastornos descritos en esta memoria descriptiva. Más específicamente, los compuestos de fórmula I son útiles para tratar trastornos en los que un déficit cognitivo es uno de los síntomas en combinación con una amplia diversidad de otros agentes terapéuticos, en particular, en combinación con potenciadores de AMPA; con antipsicóticos típicos y atípicos, incluyendo olanzapina; con una diversidad de agentes tales como agonistas de mGluR, con antagonistas de NMDA, con inhibidores de IL 1-6, con otros colinérgicos, incluyendo inhibidores de la colinesterasa, tales como tacrina y donepezil, y los compuestos que inhiben el procesamiento de proteínas amiloides, incluyendo los inhibidores de procesamiento de proteínas precursoras amiloides y antibióticos dirigidos contra las proteínas amiloides; con antidepresivos, incluyendo los SSRI y los SNRI tales como fluoxetina, paroxetina y venlafaxina; y con agentes ansiolíticos; etc. Se cree que las combinaciones anteriores son beneficiosas sinérgicamente proporcionando eficacia a dosis que son una pequeña fracción de las requeridas para producir el mismo efecto con los componentes individuales.

De acuerdo con los tratamientos adjuntos descritos anteriormente, la

298



presente invención también proporciona un producto que contiene un compuesto de fórmula I y uno o más agentes terapéuticos seleccionados entre el grupo constituido por potenciadores de AMPA; antipsicóticos típicos y atípicos, incluyendo olanzapina; agonistas de mGluR; antagonistas de NMDA;

5 inhibidores de IL 1-6; inhibidores de la colinesterasa, tales como tacrina y donepezil; los compuestos que inhiben el procesamiento de proteínas amiloides, incluyendo los inhibidores de procesamiento de proteínas precursoras amiloides y los anticuerpos dirigidos contra las proteínas amiloides; los antidepresivos, incluyendo los SSRI y los SNRI tales como

10 fluoxetina, paroxetina y venlafaxina; y los agentes ansiolíticos en forma de una preparación combinada para la administración simultánea, separada o secuencial en el tratamiento de trastornos en los que un déficit cognitivo es uno de los síntomas. En otra realización la presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I junto con uno o más agentes terapéuticos

15 seleccionados entre potenciadores de AMPA; antipsicóticos típicos y atípicos, incluyendo olanzapina; agonistas de mGluR; antagonistas de NMDA; inhibidores de IL 1-6; inhibidores de la colinesterasa, tales como tacrina y donepezil; los compuestos que inhiben el procesamiento de proteínas amiloides, incluyendo los inhibidores de procesamiento de las proteínas precursoras amiloides y los anticuerpos dirigidos contra las proteínas amiloides; los antidepresivos, incluyendo los SSRI y los SNRI tales como

20 fluoxetina, paroxetina y venlafaxina; y los agentes ansiolíticos para la fabricación de un medicamento en forma de una preparación combinada para la administración simultánea, separada o secuencial en el tratamiento de

25 trastornos en los que un déficit cognitivo es uno de los síntomas.

299

Como se usa en esta memoria descriptiva, el término "administración simultánea, separada o secuencial" significa que los dos o más agentes terapéuticos se administran en una fase del tiempo que asegura que todos los agentes terapéuticos proporcionarán alguna actividad terapéutica en un momento particular. Esto quiere decir que las actividades terapéuticas deben al menos superponerse en algún grado aunque no necesiten ser términos coincidentes.

Como se usa en esta memoria descriptiva, el término "paciente" incluye un mamífero que está aquejado de uno o más trastornos asociados a receptores muscarínicos. Se entiende que los cobayas, perros, gatos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, ovejas, cerdos y seres humanos son ejemplos de animales dentro del alcance del significado del término.

Como se usa en esta memoria descriptiva, el término "cantidad eficaz" de un compuesto de fórmula I se refiere a una cantidad, es decir, la dosificación que es eficaz en el tratamiento de los trastornos descritos en esta memoria descriptiva.

Una cantidad eficaz se puede determinar fácilmente por el médico de diagnosis, como experto en la técnica, mediante el uso de técnicas convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz, la dosis de un compuesto de fórmula I, el médico de diagnosis considera numerosos factores, que incluyen, pero no se limitan a: el compuesto de fórmula I a administrar; la coadministración de otras terapias, si se usa; la especie del mamífero; su tamaño, edad, y salud general; el trastorno específico implicado; el grado de implicación o la gravedad del trastorno; la respuesta del paciente individual; la

300

forma de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de otra medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I se espera que varíe entre aproximadamente 0,01 miligramo por kilogramo de peso corporal al día (mg/kg/día) y aproximadamente 50 mg/kg/día, y preferiblemente entre 0,1 miligramo por kilogramo de peso corporal al día (mg/kg/día) y aproximadamente 20 mg/kg/día. Las cantidades más preferidas se pueden determinar por los expertos en la técnica.

De los trastornos a tratar según la presente invención se prefieren particularmente varios. Los trastornos particularmente preferidos incluyen el tratamiento de trastornos cognitivos (particularmente deterioro cognitivo suave y deterioro cognitivo asociado a esquizofrenia), enfermedad de Alzheimer y psicosis, incluyendo esquizofrenia.

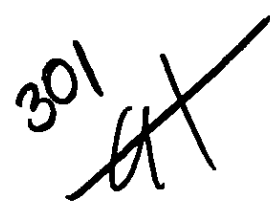
Se han descrito numerosos modelos animales de laboratorio preclínicos para los trastornos descritos en esta memoria descriptiva.

Ejemplo A

Laberinto de brazo radial

La tarea retardada no emparejada a la muestra se ha usado para estudiar el efecto de los fármacos en la retención de memoria (Pussinen, R. y Sirvio, J. *J of Psychopharm* 13: 171-179 (1999); Staubli, U., et al. *Proc Natl Acad Sci* 91: 777 - 781(1994)) en el laberinto radial de ocho brazos.

Ratas bien entrenadas se dejaron que recuperaran gratificaciones de alimento de cuatro brazos del laberinto seleccionados aleatoriamente (fase de muestreo). Algún tiempo más tarde, las ratas se expusieron a ocho brazos

301


abiertos y se ensayó por su capacidad para recordar y evitar los brazos a los que previamente habían entrado para obtener alimento. La reentrada en un brazo que estaba cebado durante la sesión de muestreo se contó como un error de referencia, mientras la entrada en el mismo brazo más de una vez durante la sesión de retención se contó como un error de trabajo. El número total (referencia + trabajo) de errores realizados durante el ensayo de retención incrementa con el aumento de los períodos de retraso. Por ejemplo, machos de rata jóvenes realizaron 0,66 (+ 0,4) errores en un retraso de 1 minuto, 2 (+ 0,5) errores a un retraso de una hora, y 3,95 (+ 0,2) errores a un retraso de siete horas (observaciones de este laboratorio).

Machos de ratas Sprague – Dawley se enjaularon individualmente y se mantuvieron en un ciclo de luz – oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 6 am). A las ratas se les proporcionó acceso libre al agua y se mantuvieron a 85% de su peso con alimentación libre mediante alimentación suplementaria con el pienso de laboratorios Purina.

Las ratas inicialmente se entrenaron para que buscaran alimento al final de cada uno de los ocho brazos. Una vez que las ratas habían alcanzado el criterio de no más de dos errores (es decir, entrando en el mismo brazo más de una vez durante una sesión) durante tres días consecutivos, un retraso de un minuto se impuso entre las elecciones del cuarto y quinto brazo. Este entrenamiento aseguraba que las ratas estaban completamente familiarizadas con los aspectos de los procedimientos de la tarea antes de que se administrara cualquiera de los fármacos. Una vez se hubo obtenido una realización estable en la tarea de retraso (es decir, no se realizó más de un error en tres días consecutivos), los ensayos de fármacos y vehículos

302 

comenzaron usando un período de retraso de siete horas. Un conjunto novedoso de brazos se cebó cada día para cada rata y el laberinto se limpió completamente durante el período de retraso.

5 Durante la sesión de muestreo, cada rata se situó en la plataforma central con acceso bloqueado a los ocho brazos del laberinto. Cuatro de los ocho brazos se seleccionaron aleatoriamente y se cebaron con alimento. Las puertas de los brazos cebados se elevaron y se dejó que la rata obtuviera alimento durante cinco minutos al final de cada uno de los cuatro brazos. Tan pronto como la rata obtuvo el alimento, se retiró, se le administró vehículo o
10 diversas dosis de los compuestos, y se volvieron a situar en su jaula. Siete horas más tarde (sesión de retención), la rata se volvió a situar en la plataforma central con el acceso a los ocho brazos bloqueado. Los cuatro brazos que se habían cebado previamente durante la sesión de muestra, se cebaron y se levantaron las puertas de los ocho brazos. Se dejó que la rata obtuviera
15 durante cinco minutos las cuatro piezas restantes de alimento. Una entrada en un brazo no cebado o reentrada en un brazo previamente visitado se contó como un error. La significación ($p < 0,05$) se determinó usando una medición repetida por ANOVA seguida de un ensayo de Dunnett para comparación con el control.

20 Con el fin de comparar los compuestos de ensayo con los patrones, se administraron escopolamina y tacrina, s. c. inmediatamente después de la fase de muestreo. Los efectos de escopolamina, un amnésico conocido, se ensayaron después de un retraso de tres horas, mientras que el efecto de la tacrina, un inhibidor de la colinesterasa usado en el tratamiento de la
25 enfermedad de Alzheimer se ensayó después de un retraso de seis horas. La

escopolamina interrumpía la retención después de un retraso de tres horas de una manera relacionada con la dosis. La tacrina mejoraba significativamente la retención después de un retraso de seis horas a 10, pero no a 3 mg/kg.

5

Ejemplo B

Adquisición en el laberinto radial. Adquisición en el laberinto radial de 8 brazos

Una característica temprana prominente de la sintomatología de la enfermedad de Alzheimer (abreviadamente en inglés AD) es un déficit pronunciado en la memoria declarativa (R.W. Parks, R.F. Zec & R.S. Wilson
10 (Eds.), *Neuropsychology of Alzheimer's disease and other dementias*. NY: Oxford University Press pp. 3 - 80 (1993).

A medida que la enfermedad progresa, también se verán afectados gravemente otros dominios de cognición. Entre las regiones del cerebro afectadas de forma temprana en la progresión de la enfermedad de Alzheimer
15 está el hipocampo, que es un sustrato neural crítico para la memoria declarativa. Las diferencias en el patrón de la pérdida neuronal del hipocampo en el envejecimiento normal y enfermedad de Alzheimer. *Lancet*, 344: 769 - 772(1994). Un ensayo conductual que se usa a menudo para valorar la función del hipocampo en modelos animales es el laberinto radial de 8 brazos (Olton
20 D.S. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology & Behavior*, 40: 793-797 (1986)).

Las lesiones o bloqueo farmacológico del hipocampo desestabilizan la realización de esta tarea. Además, los animales viejos muestran generalmente déficits en esta tarea (Porsolt R.D., Roux S. & Wettstein J.G. Animal models of
25 dementia. *Drug Development Research*, 35: 214 - 229(1995)).



En este ensayo de aprendizaje y memoria espacial, una rata hambrienta se sitúa en el centro del laberinto y se deja que atraviese el laberinto en busca del alimento localizado al final de cada brazo de la pista. En esta versión del laberinto, la rata aprende una estrategia de desplazamiento-victoria en la que un brazo visitado no se reemplaza. Por lo tanto, la estrategia más eficaz de la búsqueda de alimento es visitar cada brazo una vez. La versión del laberinto también afecta ligeramente a los procedimientos de aprendizaje generales ya que la rata es ingenua respecto al laberinto en el día uno del experimento de cuatro días.

- 10 Tras la llegada, machos de ratas Sprague Dawley ® se enjaularon individualmente en una habitación de colonias de ciclo regular de luz y se permitió que se aclimataran durante al menos 4 días antes del ensayo. Se adelgazó cada rata y se mantuvo al 85% de su peso corporal diana durante todo el experimento. El peso apropiado corporal se mantuvo ajustando la
- 15 asignación del pienso del laboratorio basándose en una combinación de la edad y la lectura del peso corporal diario de la rata.

- Una sesión comenzaba situando una rata individual en el centro del laberinto y después todas las puertas de guillotina se levantaban, dejando acceso libre a todas las áreas del laberinto. Una tolva de alimento se localizaba al final de cada uno de los 8 brazos de la pista y un solo gránulo de alimento se situaba en cada tolva de alimento. Cada una de las sesiones terminaba cuando cualquiera de las 8 tolvas de alimento se había visitado o cuando la rata estaba fuera de tiempo (15 minutos el día 1: 5 minutos los días 2 – 4). Se registraban el número de entradas a brazo. Los errores se contaban como
- 25 entradas repetidas a un brazo o no efectuar visitas un brazo en el período de

305

sesión. Se excluía un animal del estudio si no visitaba al menos un brazo el día 1, 2 brazos el día 2, y al menos 4 brazos los días 3 y 4.

Cada rata era asignada pseudoaleatoriamente a cualquier grupo de vehículo o de fármaco y recibía el mismo tratamiento durante todo el período del experimento. El vehículo consistía en 5% de goma arábiga en agua estéril. Las inyecciones se administraban subcutáneamente 20 – 30 minutos antes de cada sesión diaria.

En esta tarea de adquisición, los animales tratados con vehículo no muestran consistentemente adquisición significativa de aprendizaje de laberinto comparados con el número de errores cometidos el día 1. Los autores han encontrado que en los compuestos que facilitan la adquisición de aprendizaje de laberinto, a menudo los efectos no se observan hasta el cuarto día de entrenamiento. Por lo tanto, los resultados estaban constituidos por el total de errores el día 4 entre los grupos de tratamiento.

15

Ejemplo C

Movilización funcional de calcio intracelular

Células CHO que expresan los subtipos muscarínicos (M1 – M5) se desarrollan en forma de monocapas en DMEM: F-12 (3:1), 10% FBSnz, HEPES 20 mM, 1% de pen/strep, 250 µg/ml de G418 (GibcoBRL nº 10131 – 027). Las células se mantienen en 95%/5% de O₂/CO₂ y se subcultivan las células por cultivo cada 3 – 4 días. Las células se siembran 24 horas antes del ensayo a una densidad de 50.000/pocillo y 48 horas antes a una densidad de 25.000/pocillo (100 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos, de paredes negras, de fondo transparente Costar (Costar nº 3603). Después las células se incuban en un medio esencial mínimo que contenía el indicador de Ca²⁺ citoplásmico, Fluo-

25

3 (Fluo 1 mM mezclado 1:1 con ácido plurónico al 20%, después se dilúan hasta 5 μ M de concentración final en crecimiento y suplementado con 2,5 mM, 50 μ l/pocillo) a 37°C en un ambiente que contenía 5% de CO₂ durante 60 minutos. Las células se lavan dos veces con 100 μ l/pocillo de tampón de lavado conteniendo solución salina equilibrada de Hanks (abreviadamente en inglés HBSS) sin rojo fenol (1 X) (GibcoBRL n° 14065 - 056), HEPES 20 mM (Sigma n° P8761), y Probenecid (2,5 mM) (100 x: 1:100). Para el ensayo, se añaden 100 μ l a cada pocillo (100 μ l de 2 X fármaco se añadirán mediante FLIPR). Las placas se lavan tres veces usando un multigoteo de LabSystems y se retira el tampón residual. También las placas se transfieren sobre toallas de papel para retirar el compuesto sobrante.

Los compuestos se preparan por duplicado (100 μ l de fármaco añadido a 100 μ l de tampón de ensayo presente en el pocillo) en tampón de ensayo conteniendo 2% de DMSO, HBSS sin rojo fenol (1X) (GibcoBRL n° 14065 - 056), HEPES 20 mM (Sigma n° P8761), y Probenecid (2,5 mM) (100X: 1:100).

Después las placas se sitúan en un instrumento FLIPR (sistema lector de placas por formación de imágenes fluorométricas, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para controlar la fluorescencia celular (λ_{EX} = 488 nm, λ_{EX} = 540 nm) antes y después de la adición de los compuestos.

La selectividad de los agonistas M1 se valora mediante evaluación a través de otros subtipos de receptores muscarínicos (M3 y M5) de una manera similar tanto en el modo antagonista como en el agonista. Los compuestos también se evalúan a través de un número de dianas de proteínas así como las dianas de los receptores acoplados a proteínas G relacionados estructuralmente (abreviadamente en inglés (GPCR)) para asegurar la

307

selectividad para el receptor M1.

Ejemplo D

Unión a GTP funcional

5 Cultivo celular: las células CHO transfectadas con receptores M1 – M5 humanos se desarrollaron bien en suspensión o en monocapa. Para los cultivos en suspensión se desarrollaron las células en botellas rotatorias con agitación constante a 37°C y 5% de CO₂ usando medio de Dulbecco modificado por Eagles / medio de cultivo F-12 (3:1) suplementado con 5% de
10 suero fetal bovino, 50 µg/ml de tobramicina, y HEPES 20 mM. Los cultivos de monocapa se desarrollaron en matraces T-225 a 37°C y 5% de CO₂ en medio de Dulbecco modificado por Eagles suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100.000 U/litro de penicilina/estreptomicina. Las células se recogieron usando medios de disociación exentos de tripsina al 95% de confluencia y se
15 recogieron mediante centrifugación y se almacenaban a 80°C. Se obtuvieron células que expresaban establemente los receptores muscarínicos humanos de los Institutos nacionales de salud.

Preparación de membranas: los sedimentos celulares se descongelaron y se resuspendieron en 20 volúmenes de tampón fosfato sódico 20 mM, pH
20 7,4, y se homogenizaron dos veces durante 30 segundos a alta velocidad usando un Tissuemizer. Los productos homogeneizados se centrifugaron a 200 g durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se reservó sobre hielo. Este procedimiento se repitió dos veces y después los sobrenadantes combinados se centrifugaron a 40.000 g durante 45 minutos a 4°C. Las
25 membranas se suspendieron a 5 mg de proteína/ml y se almacenaron a 80°C.

306/06

Salvo que se indique otra cosa en las leyendas de las figuras, las membranas de las células de M1, M2 y M4 se preparaban a partir de las células desarrolladas en suspensión, mientras que las preparadas a partir de las células M3 y M5 lo eran a partir de las células desarrolladas en monocapa. Las densidades de los receptores (pmoles mg⁻¹ de proteína de membrana) eran 9,3, 0,7, 0,6, 0,9 y 4,8 para los receptores M1 – M5, respectivamente.

El tejido estriado de machos de ratas Sprague – Dawley se homogeneizaba a mano en 10 volúmenes de HEPES 10 mM y EGTA 1 mM, pH 7,4, conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas completo, ditioneitol 1 mM, y 10% de sacarosa. El homogeneizado se diluyó 6 veces y se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se guardaba y el sedimento se rehomogeneizaba y se centrifugaba como se ha indicado anteriormente. Los sobrenadantes combinados se centrifugaban a 11.000 g durante 20 minutos. El sedimento resultante se homogeneizaba en 40 volúmenes de HEPES 10 mM y EGTA 1 mM, pH 7,4, conteniendo ditioneitol 1 mM y MgCl₂ 1 mM, y se centrifugaba a 27.000 g durante 20 minutos. El sedimento resultante se suspendía en el mismo tampón a una concentración de proteína de 1,5 mg/ml y se congelaban las alícuotas y se almacenaban a 80°C.

Unión a GTPγ³⁵S: los ensayos se llevaban a cabo en HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, y MgCl₂ 5 mM a pH 7,4 en un volumen final de 200 µl en placas de 96 pocillos Costar a 25°C. Se añadían cien microlitros de preparación de membranas (25 µg de proteína por pocillo para las membranas celulares y 9 – 15 µg por pocillo para membranas de cerebro) conteniendo la concentración apropiada de GDP seguido de la adición de 50 µl de tampón ± agonistas y antagonistas ensayados seguido de 50 µl de GTPγ³⁵S para proporcionar una

309
~~309~~

concentración final en el ensayo de 200 pM para las membranas de CHO y 500 pM para las membranas del cerebro. Para las membranas de CHO, se usaba GDP 0,1 μ M para los ensayos de los receptores M1, M3 y M5, mientras que GDP 1 μ M se usaba para los ensayos de M2 y M4. Para las membranas del

5 cerebro se usaba GDP 0,1 μ M en los ensayos llevados a cabo con anti-Gaq/11, mientras GDP 50 μ M se usaba para los ensayos anti-Gai (1 – 3) y anti-Gao. Las membranas de las células CHO se incubaron durante 30 minutos a 25°C con agonistas y antagonistas seguido de adición de GTP γ ³⁵S e incubación durante 30 minutos adicionales. Las membranas del cerebro se incubaron

10 durante 20 minutos a 25°C con agonistas y antagonistas seguido de la adición de GTP γ ³⁵S e incubación durante 60 minutos adicionales. Se empleó preincubación para asegurar que los agonistas y antagonistas estaban en equilibrio durante el período de marcaje.

Para determinar la unión total de membranas, se añadían 50 μ l de perlas

15 suspendidas de SPA recubiertas con aglutinina de germen de trigo (abreviadamente en inglés WGA). Después de 15 minutos, se centrifugaban las placas a 1000 g durante 15 minutos y se determinaba la radiactividad usando un contador de placas Wallac. Para determinar la unión específica a proteínas G específicas, las membranas marcadas con ³⁵S se solubilizaban durante 30

20 minutos con 0,27% de Nonidet P-40 (20 μ l/pocillo de una solución que contenía 1,5 ml de 10% de Nonidet P-40 por cada 3,5 ml de tampón de ensayo) seguido de la adición del anticuerpo deseado (10 μ l/pocillo) para proporcionar una dilución final de 1/400 a 1/100 y la incubación durante 60 minutos adicionales. Se añadieron cincuenta microlitros por pocillo de perlas suspendidas de SPA

25 recubiertas con anti-IgG, las placas se incubaban durante 3 horas, y después

310
~~102~~

se centrifugaban y se determinaba la radiactividad como se ha descrito anteriormente. Cada botella de perlas de SPA recubiertas con WGA se suspendía en 10 ml de tampón de ensayo y cada botella de perlas de SPA recubiertas con anti-IgG se suspendía en 20 ml de tampón de ensayo. La

5 proteína se determinaba usando el ensayo de ácido bicinconínico.

Materiales: ^{35}S -GTPyS (1000 – 1200 Ci/mmol), perlas de SPA recubiertas con anti-conejo-IgG y anti-ratón-IgG, perlas de SPA recubiertas con WGA se obtuvieron de Amersham (Arlington Heights, IL). Conejo anti-G α q/11 y anti conejo anti-G α i (1 -3) eran de Santa Cruz Biotechnologies, (Santa Cruz,

10 CA). Anti- G α o monoclonal de ratón era de Chemicon (Temecula, CA). Oxotremorina M y pirenzepina eran de Research Biochemicals Inc. (Natick, MA).

11-[2-((diethylamino)metil)-1-piperidinil]acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido[2,3b][1,4]benzodiazepin-6-ona (AFDX 116) se sintetizó en Eli Lilly. El cóctel de inhibidores de proteasas completo y 10% de Nonidet P-40 eran de

15 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN).

La selectividad de los agonistas M1 se valoraba mediante la evaluación a través de los otros subtipos de receptores muscarínicos (M2 y M4) tanto en el modo agonista como en el antagonista. Los compuestos también se seleccionan a través de numerosas dianas de proteínas así como las dianas de

20 los receptores acoplados a proteínas G relacionados estructuralmente (abreviadamente en inglés GPCR) para asegurar la selectividad para el receptor M1.