



No. 13-209781- -00000-0000

Fecha: 2013-09-04 16:20:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 12-060326- -00004-0000

Fecha: 2013-09-04 16:20:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 5

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____

DOMICILIO _____

74. APODERADO _____

22. BOGOTA, D. C., _____



No. 13-209781-00000-0000

Fecha: 2013-09-04 16:20:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



No. 12-060326-00004-0000

Fecha: 2013-09-04 16:20:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 5

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐

Conversión

☒

División

☐

Fusión

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

☐

Persona Natural

☒

Persona Jurídica

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

☐

Micro

☐

Pequeña

☐

Mediana

☒

Otra

Documento de Identificación

☐

C.C.

☐

C.E.

☐

NIT

☐

Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	Route 206 and Province Line Road Princeton, New Jersey 08543-4000	Princeton
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
alvaro.correa@bakermckenzie.com	3762211	6341500

☐

Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Correa Ordoñez, Alvaro

79.143.366

20.281

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Av. 82 No. 10 62 Piso 5	Route 206 and Province Line Road Princeton, New Jersey 08543-4000	Princeton
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
alvaro.correa@bakermckenzie.com	3762211	6341500

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

2

4. Datos del trámite:

CONVERSION

Expediente No.

De:
A:

DIVISION

Expediente No.
12.060.326
No. de divisionales
1

FUSION

Expediente No.

Expediente No.

5. Comprobante de Pago No13-0011196Fecha952013

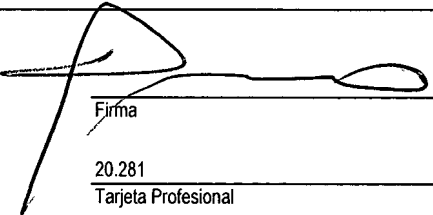
6. Anexos

☒	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
☒	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
☒	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☒	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

Alvaro Correa Ordoñez
Nombre y apellidos

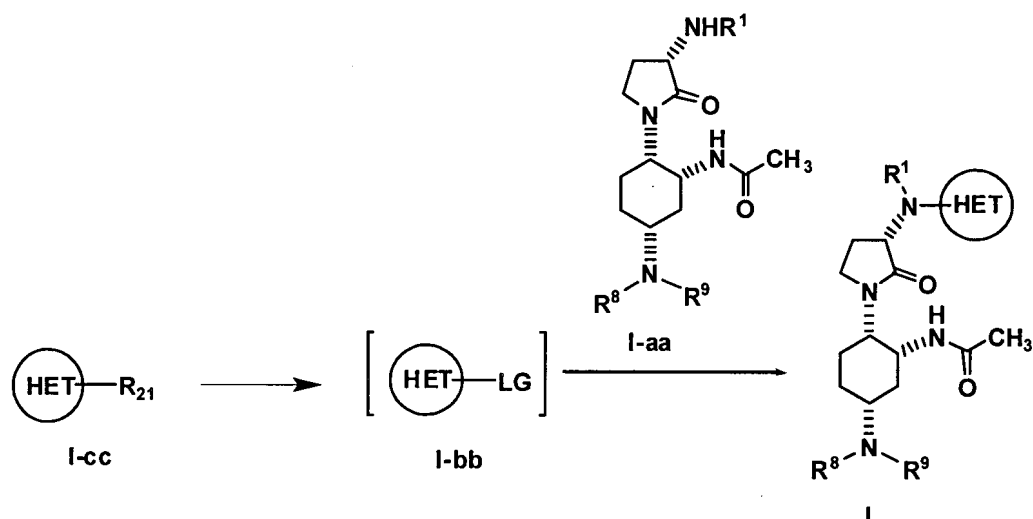
79.143.366
C.C.


Firma

20.281
Tarjeta Profesional

REIVINDICACIONES (Divisional)

1. Un proceso de preparación de un compuesto de Fórmula I, o una forma de sal del mismo:



caracterizados porque comprende:

1) convertir un compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc en un compuesto de Fórmula I-bb; y

2) acoplar compuesto de Fórmula I-bb con un compuesto de Fórmula I-aa; en la que:

R_1 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de amina seleccionado entre un grupo carbobenciloxi, un tert-butiloxicarbonilo, un grupo fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo bencilo, y un grupo p-metoxibencilo;

R_8 y R_9 son independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-6} ;

R_{21} es = O;

HET es un anillo heterociclo o heteroarilo bicíclico de 3 a 14 miembros opcionalmente sustituido que tiene al menos un heteroátomo de nitrógeno; y

LG es $-OR_{16}$, en el que R_{16} es alquilo C_{1-6} , fenilo, un heteroarilo de 5 a 7 miembros que tiene uno o más átomos seleccionados entre N, S, u O, o un cicloalquilo de 3 a 7 miembros, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos seleccionados entre halógeno, CF_3 o alquilo C_{1-6} .

BM_RAC/BOGDMS-#1661444-V1-P2012_000016-CAPÍTULO_REIVINDICATORIO_SOLICITUD_DIVISIONAL.DOCX

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0044507
	Bogotá D.C., Mayo 09 de 2013 - 09:06:11	

RECIBIDO DE : BAKER	NI 900.532.339
---------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	44433	09/05/2013		79.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1603 INVOCAR LA NOTORIEDAD DENTRO DE UN TRAMITE DE OPOSICION	450.000.00	450.000.00
			\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
 Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-209781- -00000-0000
 Fecha: 2013-09-04 16:20:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060326- -00004-0000
 Fecha: 2013-09-04 16:20:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 851 DIVISIONAL Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 9 de 2013 - 09:06:31



Fecha: 13 / 9 / 4
AAAA MM DD

7020

Radicador:

Planilla:

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

anexan cd



Fecha: 2013 / 09 / 05 /
AAAA MM DD

2020

Tipo de Radicación:	Entrada: ☒	Salida: ☐	Traslado: ☐	Convenio: ☐
---------------------	--	----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------

Planilla:

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>	
1	Bolsa	
2	Caja	
3	Libro	
4	Sobre	
5	Tomo	
6	Otro	
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>	
~~7~~ X	CD	
8	Disquete	
9	DVD	
10	Folleto	
11	Foto	
12	Periódico	
13	Plano	
14	Publicación Periódica	
15	USB	
16	Otro	

Observaciones:
El CD. onexo contiene en total 4 archivos:

4. en formato Pdf el cual fueron procesados

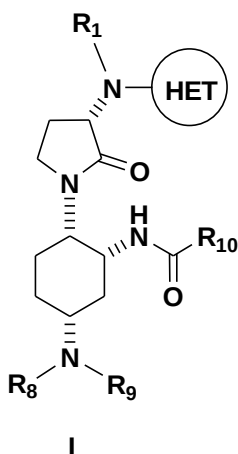
Penny Artobolaga

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, UN MODULADOR DUAL DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINAS, FORMAS CRISTALINAS Y PROCESOS

Campo de la Invención

La presente invención proporciona N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil) acetamida, o una sal, solvato o profármaco, de la misma farmacéuticamente aceptable, que tiene actividad dual deseable inesperada. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas que contienen la misma y procesos de uso de la misma como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares es también un objetivo de la presente invención. La presente descripción también proporciona un proceso para preparar compuestos de Fórmula (I), incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil) acetamida:

5



en la que R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , y HET son como se describen en el presente documento. Los compuestos que son intermedios útiles del proceso también se proporcionan en el presente documento. Metabolitos de compuestos activos, composiciones farmacéuticas, y su uso también se proporcionan en el presente documento.

Antecedentes de la Invención

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas, de peso molecular 6-15 kDa, que se liberan mediante una amplia diversidad de células para atraer y activar, entre otros tipos de células, macrófagos, linfocitos T y B, eosinófilos, basófilos y neutrófilos (revisión en: Charo et al., New Eng. J. Med., 354:610 - 621 (2006); Luster, New Eng. J. Med., 338:436 - 445 (1998); y Rollins, Blood, 90:909 - 928 (1997)). Existen dos clases principales de quimiocinas, CXC y CC, dependiendo de si las dos primeras cisteínas en la secuencia de aminoácidos están separados por un único aminoácido (CXC) o son adyacentes (CC). Las quimiocinas CXC, tales como

interleucina-8 (IL-8), proteína-2 activadora de neutrófilos (NAP-2) y proteína de actividad estimuladora del crecimiento de melanoma (MGSA, por sus siglas en ingles) son principalmente quimiotácticas para neutrófilos y linfocitos T, mientras que las quimiocinas CC, tales como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, y MCP-5) y las eotaxinas (-1 y -2) son quimiotácticas para, entre otros tipos de células, macrófagos, linfocitos T, eosinófilos, células dendríticas, y basófilos. También existen quimiocinas limfotactina-1, limfotactina-2 (ambas quimiocinas C), y fractalcina (una quimiocina CX₃C) que no está en ninguna de las subfamilias de quimiocinas principales.

Las quimiocinas se unen a receptores de superficie de células específicos que pertenecen a la familia de proteínas de siete dominios transmembrana acopladas a la proteína G (revisión en: Horuk, Trends Pharm. Sci., 15:159 - 165 (1994)) que se denominan "receptores de quimiocinas" Tras la unión de sus ligandos afines, los receptores de quimiocinas traducen una señal intracelular a través de las proteínas G triméricas asociadas, que dan como resultado, entre otras respuestas, un incremento rápido de la concentración de calcio intracelular, cambios en la forma de la células, incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, desgranulación, y promoción de migración de

células. Existen al menos diez receptores de quimiocinas humanos que se unen o responden a las quimiocinas CC con los siguientes patrones característicos (revisión en Zlotnik et al., *Immunity*, 12:121 (2000)): CCR-1 (o "CKR-1" o "CC-CKR-1")

5 [MIP-1 α , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch et al., *Cell*, 72:415 - 425 (1993), y Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436 - 445 (1998)); CCR-2A y CCR-2B (o "CKR-2A"/"CKR-2B" o "CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B") [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2752 - 2756 (1994), y

10 Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436 - 445 (1998)); CCR-3 (o "CKR-3" o "CC-CKR-3") [eotaxin-1, eotaxin-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere et al., *J. Biol. Chem.*, 270:16491 - 16494 (1995), y Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436 - 445 (1998));

15 CCR-4 (o "CKR-4" o "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 19495 - 19500 (1995), y Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998)); CCR-5 (o "CKR-5" o "CC-CKR-5") [MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β] (Samson et al., *Biochemistry*, 35:3362 - 3367 (1996)); CCR-6 (o "CKR-6" o "CC-CKR-6") [LARC] (Baba et al., *J. Biol. Chem.*, 272:14893 - 14898 (1997)); CCR-

20 7 (o "CKR-7" o "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie et al., *J. Leukoc. Biol.*, 62:634-644 (1997)); CCR-8 (o "CKR-8" o "CC-CKR-8") [I-309] (Napolitano et al., *J. Immunol.*, 157: 2759 - 2763 (1996)); CCR-10 (o "CKR-10" o "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini et al., *DNA Cell Biol.*, 16: 1249 - 1256 (1997)); y

25 CCR-11 [MCP-1, MCP-2, y MCP-4] (Schweickart et al., *J. Biol.*

Chem., 275: 9550 (2000)).

Además de los receptores de quimiocinas de mamífero, citomegalovirus de mamífero, herpesvirus y poxvirus se ha mostrado que se expresan, en células infectadas, proteínas con las propiedades de unión de los receptores de quimiocinas (revisión en: Wells et al., Curr. Opin. Biotech., 8: 741 - 748 (1997)). Las quimiocinas humanas, tales como RANTES y MCP-3, pueden provocar una movilización rápida de calcio mediante estos receptores codificados viralmente. La expresión del receptor puede ser permisiva para la infección permitiendo la subversión de la vigilancia de sistema inmune normal y respuesta a infección. De manera adicional, los receptores de quimiocinas humanos, tales como CXCR4, CCR-2, CCR-3, CCR-5 y CCR-8, pueden actuar como co-receptores para la infección de células de mamíferos por microbios como con, por ejemplo, los virus de inmunodeficiencia humanos (VIH).

Las quimiocinas y sus receptores afines han estado implicados por ser mediadores importantes de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas, e inmunorreguladoras, incluyendo asma y enfermedades alérgicas; así como patologías autoinmunes, tales como artritis reumatoide y esclerosis múltiple; y enfermedades metabólicas, tales como aterosclerosis y diabetes (revisión en: Charo et al., New Eng. J. Med., 354: 610 - 621 (2006); Gao, Z. et al., Chem. Rev., 103: 3733 (2003); Carter, P.H., Curr. Opin. Chem.

Biol., 6:510 (2002); Trivedi et al., Ann. Reports Med. Chem., 35:191 (2000); Saunders et al., Drug Disc. Today, 4:80 (1999); Premack et al., Nature Medicine, 2: 1174 (1996)). Por ejemplo, el quimioatrayente-1 (MCP-1) de monocitos de quimiocina y su receptor Receptor 2 de Quimiocina CC (CCR-2) juegan un papel central en los leucocitos de atracción a los sitios de inflamación y posteriormente activando estas células. Cuando la quimiocina MCP-1 se une a CCR-2, induce un incremento rápido en la concentración de calcio intracelular, aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular, y la promoción de migración de leucocitos. La demostración de la importancia de la interacción MCP-1/CCR-2 se ha proporcionado mediante experimentos con ratones modificados genéticamente. Los ratones MCP-1 -/- eran incapaces de reclutar monocitos en los sitios de inflamación después de varios tipos diferentes de exposición inmune (Lu, B. et al., J. Exp. Med., 187: 601 (1998)). Del mismo modo, ratones CCR-2 -/- eran incapaces de reclutar monocitos o producir interferón y cuando se exponen con diversos agentes exógenos; además, los leucocitos de ratones sin CCR-2 no migraron en respuesta a MCP-1 (Boring, L. et al., J. Clin. Invest., 100:2552 (1997)), demostrando por lo tanto la especificidad de la interacción MCP-1/CCR-2. Otros dos grupos han reseñado independientemente resultados equivalentes con diferentes cepas de ratones CCR-2 -/-

(Kuziel, W.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12053 (1997), y Kurihara, T. et al., J. Exp. Med., 186:1757 (1997)). La viabilidad salud normal en general de los animales MCP-1 -/- y CCR-2 -/- es notable, en esa

5 interrupción de la interacción MCP-1/CCR-2 no inducen crisis fisiológica. Tomados conjuntamente, estos datos conducen a la conclusión de que las moléculas que bloquean las acciones de MCP-1/CCR-2 serían útiles en el tratamiento de un número de un número de trastornos inflamatorios y autoinmunes

10 (revisión en: Fera, M. et al., Exp. Opin. Ther. Patents, 16: 49 (2006); y Dawson, J. et al., Exp. Opin. Ther. Targets, 7:35 (2003)). Esta hipótesis se ha validado en numerosos modelos de enfermedad diferentes, como se describe más adelante.

15 Se sabe que MCP-1 se regula hacia niveles más altos en los pacientes con artritis reumatoide (Koch, A. et al., J. Clin. Invest., 90:772 - 779 (1992)). Además, varios estudios preclínicos han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento

20 de artritis reumatoide. Una vacuna de ADN que codifica MCP-1 se ha mostrado recientemente que mejora la artritis crónica inducida por poliadyuvantes en ratas (Youssef, S. et al., J. Clin. Invest., 106:361 (2000)). Del mismo modo, los síntomas de enfermedad se pueden controlar mediante la administración

25 directa de anticuerpos para MCP-1 a ratas con artritis

inducida por colágeno (Ogata, H. et al., J. Pathol., 182:106 (1997)), o artritis inducida por la pared celular de estreptococos (Schimmer, R.C. et al., J. Immunol., 160: 1466 (1998)). Quizás de manera más significativa, un antagonista

5 de péptidos de MCP-1, MCP-1(9-76), se mostró que evitan tanto la aparición de enfermedades como reducen los síntomas de enfermedad (dependiendo del tiempo de administración) en el modelo de ratones MRL-lpr de artritis (Gong, J.-H. et al., J. Exp. Med., 186:131 (1997)). Además, se ha demostrado que

10 la administración de antagonistas de CCR-2 de pequeña molécula redujeron la evaluación clínica en modelos de roedor de artritis (Brodmerkel, C.M. et al., J. Immunol., 175: 5370 (2005); y Xia, M. et al., U.S. Publication No. 2006/0069123). La administración de un anticuerpo anti-CCR-2 tenía efectos

15 variables sobre CIA de tipo murino, dependiendo del tipo de administración (Bruhl, H. et al., J. Immunol., 172 890 (2004)).han sugerido que la supresión: Recientes estudios con ratones CCR-2 -/- han sugerido que la supresión de CCR-2 puede incrementar la artritis en modelos de roedores en

20 circunstancias experimentales (Quinones, M.P. et al., J. Clin. Invest., 113:856 (2004); Quinones, M.P. et al., J. Mol. Med., 84:503 (2006)).

Se sabe que MCP-1 se regula hacia niveles más altos en las lesiones ateroscleróticas, y se ha mostrado que los

25 niveles de circulación de MCP-1 se reducen mediante

tratamiento con agentes terapéuticos (Rezaie-Majd, A. et al.,
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 22:1194 - 1199 (2002)).
Varios estudio clave han demostrado el valor terapéutico
potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el
5 tratamiento de aterosclerosis. Por ejemplo, cuando los
ratones MCP-1 -/- se cruzan con ratones deficientes en
receptores de LDL, se observó una reducción de 83% en la
deposición de lípidos en la aorta in (Gu, L. et al., Mol.
Cell, 2:275 (1998)). De manera similar, cuando0 MCP-1 estaba
10 genéticamente extirpado de los ratones que ya han
sobreexpresado apolipoproteína B humana, los ratones
resultantes se protegieron de la formación de lesión
aterosclerótica con relación a los ratones de control MCP-1
+/+ apoB (Gosling, J. et al., J. Clin. Invest., 103: 773
15 (1999)). Del mismo modo, cuando lo ratones CCR-2 -/- se
cruzaban con ratones apolipoproteína E -/-, se observó una
disminución significativa en la incidencia de lesiones
ateroscleróticas (Boring, L. et al., Nature, 394: 894 (1998);
Dawson, T.C. et al., Atherosclerosis, 143:205 (1999)).
20 Finalmente, cuando a ratones apolipoproteína E -/- se les
administra un gen que codifica un antagonista peptídico de
CCR-2, el tamaño de la lesión disminuye y la estabilidad de
la placa aumenta (Ni, W. et al., Circulation, 103: 2096 -
2101 (2001)). El transplante de médula ósea de ratones CCR-2
25 -/- en ratones ApoE3-Leiden inhibía la aterogénesis temprana

(Guo, J. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 23:447 (2003)), pero tenía efectos mínimos en lesiones avanzadas (Guo, J. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 25:1014 (2005)).

5 Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 típicamente muestran resistencia a insulina como una de las características de marca de contraste de la enfermedad. La resistencia a insulina también está asociada a agrupación de anormalidades conocidas como "síndrome metabólico" o

10 "síndrome X," que incluye obesidad, aterosclerosis, hipertensión, y dislipidemia (revisión en: Eckel et al., Lancet, 365:1415 (2005)). Se reconoce bien que la inflamación juega un papel en la exacerbación del proceso de enfermedad en las patología de diabetes de tipo 2 y el

15 "síndrome X" (revisión en: Chen, H., Pharmacological Research, 53:469 (2006); Neels et al., J. Clin. Invest., 116:33 (2006); Danadona et al., Am. J. Cardiol., 90:27G-33G (2002); Pickup et al., Diabetologia, 41:1241 (1998)). MCP-1 se reconoce que juega un papel en la resistencia a insulina

20 inducida por obesidad. En cultivo, preadipocitos humanos expresaron de manera constitutiva MCP-1 (Gerhardt, Mol. Cell. Endocrinology, 175:81 (2001)). CCR-2 se expresa en adipocitos; La adición de MCP-1 a adipositos diferenciados *in vitro* disminuye la captación de glucosa estimulada por

25 insulina y la expresión de varios genes adipogénicos (LpL,

adipsin, GLU-4), α P2, receptor adrenérgico β 3, y PPAR γ) (Sartipy, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 6902 (1999)). Pacientes con diabetes de tipo 2 tenía mayores niveles de MCP-1 circulantes que los controles no diabéticos (Nomura, S. et al., Clin. Exp. Immunol., 121:437 (2000)), y liberación de MCP-1 del tejido adiposo se puede reducir mediante tratamiento con terapias antidiabéticas tales como metformina o tiazolidinadionas (Bruun, J.M. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 90: 2282 (2005)). Del mismo modo, MCP-1 también se sobreexpresó en modelos experimentales murinos de obesidad, y se produjo principalmente por el tejido adiposo (Sartipy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 7265 (2003)). En ratones obesos, la expresión de MCP-1 tanto precedía como se producía de manera simultánea con la aparición de resistencia a insulina (Xu, H. et al., J. Clin. Invest., 112: 1821 (2003)). Otro estudio mostró que la expresión de MCP-1 estaba correlacionada de manera positiva con la masa corporal en el tejido adiposo perigonadal de ratones (Weisberg et al., J. Clin. Invest., 112:1796 (2003)). Consistente con estos datos, el desarrollo de resistencia a insulina en ratones db/db se mejoró o bien mediante supresión genética de MCP-1 o mediante la expresión inducida por genes de un péptido negativo dominante (Kanda, H. et al., J. Clin. Invest., 116:1494 (2006)). La inversa lógica también se demuestra: sobreexpresión de MCP-1 en tejido adiposo promovía

resistencia a insulina (Kamei, N. et al., J. Biol. Chem., 281: 26602 (2006)). Un resultado conflictivo que muestra que la supresión genética de MCP-1 no afecta a la resistencia a insulina en el ratón db/db también aparece (Chow, F.Y. et al., Diabetologia, 50:471 (2007)). Consistente con los datos de MCP-1, estudios directos con CCR-2 (el receptor de MCP-1) han mostrado que juegan un papel en la formación de obesidad y resistencia a insulina inducida por obesidad. El mantenimiento de una dieta alta en grasa incrementó los números de monocitos inflamatorios CCR-2⁺ circulantes en tanto los ratones de tipo salvaje (Tsou, C.L. et al., J. Clin. Invest., 117:902 (2007)) como ApoE -/- (Tacke, F. et al., J. Clin. Invest., 117:185 (2007)). La supresión genética de CCR-2 redujo los números de macrófagos activados en tejido adiposo de murinos (Lumeng, C.N. et al., Diabetes, 56:16 (2007)), pero no afectaban a la población de macrófagos adiposos de M2 aunque mantienen el estado "delgado" (Lumeng, C.N. et al., J. Clin. Invest., 117: 175 (2007)). La supresión genética de CCR-2 redujo la obesidad inducida por la dieta y mejoró la sensibilidad a insulina en modelo de obesidad inducida por la dieta (Weisberg, S.P. et al., J. Clin. Invest., 116: 115 (2006); Cornelius, P. et al., Publicación PCT N° WO 2006/013427 A2), dependiendo de las condiciones experimentales (Chen, A. et al., Obes. Res., 13: 1311 (2005)). La administración de un antagonista de

CCR-2 de pequeña molécula también mejoró la sensibilidad a insulina en este mismo modelo (Weisberg, S.P. et al., J. Clin. Invest., 116: 115 (2006)).

Dos estudios describían el papel importante de CCR-
5 2 en la inflamación vascular inducida por hipertensión, remodelación, e hipertrofia (Bush, E. et al., Hipertensión, 36: 360 (2000); Ishibashi, M. et al., Circ. Res., 94: 1203 (2004)).

Se sabe que MCP-1 está regulada hacia niveles más
10 altos en esclerosis múltiple humana, y se ha mostrado que la terapia eficaz con interferón β -1b reduce la expresión de MCP-1 en células mononucleares de sangre periférica, sugiriendo que MCP-1 juega un papel en la progresión de la enfermedad (Iarlori, C. et al., J. Neuroimmunol., 123: 170
15 - 179 (2002)). Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de esclerosis múltiple; todos estos estudios se han demostrado en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal experimental para
20 esclerosis múltiple. La administración de anticuerpos para MCP-1 a animales con EAE disminuyó de manera significativa la reincidencia de la enfermedad (Kennedy, K.J. et al., J. Neuroimmunol., 92: 98 (1998)). Además, dos informes han mostrado que los ratones CCR-2 $-/-$ son resistentes a EAE
25 (Fife, B.T. et al., J. Exp. Med., 192:899 (2000); Izikson, L.

et al., J. Exp. Med., 192: 1075 (2000)). Un informe posterior extendió estas observaciones iniciales mediante el examen de los efectos de supresión de CCR-2 en ratones de diferentes razas (Gaupp, S. et al., Am. J. Pathol., 162: 139
5 (2003)). De manera notable, la administración de un antagonista de CCR-2 de pequeña molécula también mitigaba la progresión de la enfermedad en ratones C57BL/6 (Brodmerkel, C.M. et al., J. Immunol., 175: 5370 (2005)).

Se sabe que MCP-1 está regulada hacia niveles más
10 altos en pacientes que desarrollan síndrome de bronquiolitis obliterans después de transplante de pulmón (Reynaud-Gaubert, M. et al., J. Heart Lung Transplant., 21: 721 - 730 (2002); Belperio, J. et al., J. Clin. Invest., 108: 547 - 556 (2001)). En un modelo murino de síndrome de bronquiolitis
15 obliterans, la administración de un anticuerpo para MCP-1 condujo a la atenuación de la oclusión de las vías respiratorias; del mismo modo, ratones CCR-2 -/- eran resistentes a la oclusión de las vías respiratorias en este mismo modelo (Belperio, J. et al., J. Clin. Invest., 108: 547
20 - 556 (2001)). Estos datos sugieren que el antagonismo de MCP-1/CCR-2 puede ser beneficioso en el tratamiento de rechazo de órganos después de transplante. Además, estudios han mostrado que la interrupción del eje MCP-1/CCR-2 era capaz de prolongar la supervivencia del transplante de
25 islotes (Lee, I. et al., J. Immunol., 171:6929 (2003); Abdi,

R. et al., J. Immunol., 172: 767 (2004)). En modelos de injerto de ratas, CCR-2 y MCP-1 se mostró que están regulados hacia niveles más altos en injertos que desarrollan vasculopatía de injerto (Horiguchi, K. et al., J. Heart Lung Transplant., 21: 1090 (2002)). En otro estudio, terapia génica anti-MCP-1 atenuaba la vasculopatía de injerto (Saiura, A. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 24: 1886 (2004)). Un estudio describió la inhibición de formación neointimal de injerto de vena experimental mediante bloqueo de MCP-1 (Tatewaki, H. et al., J. Vasc. Surg., 45: 1236 (2007)).

Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de asma. El secuestro de MCP-1 con un anticuerpo neutralizante en ratones expuestos a ovoalbúmina dio como resultado una disminución notable en la hipersensibilidad e inflamación bronquial (Gonzalo, J.-A. et al., J. Exp. Med., 188:157 (1998)). Se ha probado que es posible reducir la inflamación alérgica de vías respiratorias en ratones expuestos a huevos de *Schistosoma mansoni* mediante la administración de anticuerpos para MCP-1 (Lukacs, N.W. et al., J. Immunol., 158: 4398 (1997)). Consistente con esto, ratones MCP-1 -/- mostraron una respuesta reducida a la exposición con huevos de *Schistosoma mansoni* (Lu, B. et al., J. Exp. Med., 187: 601 (1998)).

Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de enfermedad renal. La administración de anticuerpos para MCP-1 en un modelo murino de glomerularnefritis dio como resultado una disminución notable de la formación y deposición glomerular creciente de colágeno de tipo I (Lloyd, C.M. et al., J. Exp. Med., 185:1371 (1997)). Además, ratones MCP-1 -/- con nefritis de suero nefrotóxica inducida mostró de manera significativa menos daño tubular que sus homólogos MCP-1 +/+ (Tesch, G.H. et al., J. Clin. Invest., 103:73 (1999)).

Varios estudios han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de lupus sistémico eritematoso. Ratones CCR-2 -/- mostraron una supervivencia prolongada y enfermedad renal reducida con relación a sus homólogos de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés) en un modelo murino de lupus sistémico eritematoso (Pérez de Lema, G. et al., J. Am. Soc. Neph., 16:3592 (2005)). Estos datos son consistentes con la actividad modificadora de la enfermedad encontrada en estudios recientes en la supresión genética de MCP-1 (Shimizu, S. et al., Rheumatology (Oxford), 43: 1121 (2004); Tesch, G.H. et al., J. Exp. Med., 190:1813 (1999)) o administración de un antagonista peptídico de CCR-2 (Hasegawa, H. et al., Arthritis Rheum., 48:2555 (2003)) en

modelos de roedores de lupus.

Se observó un incremento notable de 30 veces en los linfocitos de lámina propia de CCR-2⁺ en los intestinos delgados de pacientes de Crohn con relación a íleo no enfermo (Connor, S.J. et al., Gut, 53:1287 (2004)). También hay que indicar, que existía una expansión en el subconjunto de monocitos de CCR-2⁺/CD14⁺/CD56⁺ circulantes en pacientes con enfermedad de Crohn con relación a los controles. Varios estudios en roedores el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de enfermedad de Crohn/colitis. Ratones CCR-2 -/- se protegieron de los efectos de colitis inducida por sulfato sódico dextrano (Andres, P.G. et al., J. Immunol., 164: 6303 (2000)). La administración de un antagonista de pequeña molécula de CCR-2, CCR-5, y CXCR3 (afinidades de unión de tipo murino = 24, 236, y 369 nM, respectivamente) también protegía contra colitis inducida por sulfato sódico dextrano (Tokuyama, H. et al., Int. Immunol., 17:1023 (2005)). Finalmente, ratones MCP-1 -/- mostraban daño colónico sustancialmente reducido (tanto macroscópico como histológico) en un modelo inducido por hapteno de colitis (Khan, W.I. et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 291:G803 (2006)).

Dos informes describieron la sobreexpresión de MCP-1 en las células epiteliales intestinales y mucosa intestinal

de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (Reinecker, H.C. et al., *Gastroenterology*, 108: 40 (1995), y Grimm, M.C. et al., *J. Leukoc. Biol.*, 59: 804 (1996)).

Un estudio describió la asociación de polimorfismo
 5 promotor en el gen de MCP-1 con escleroderma (esclerosis
 sistémica) (Karrer, S. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 124: 92
 (2005)). En modelos relacionados de fibrosis de tejidos,
 inhibición del eje CCR-2/MCP-1 redujo la fibrosis en la piel
 (Yamamoto, T. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 121: 510 (2003);
 10 Ferreira, A.M. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 126: 1900
 (2006)), lung (Okuma, T. et al., *J. Pathol.*, 204: 594 (2004);
 Gharaee-Kermani, M. et al., *Cytokine*, 24: 266 (2003)), riñón
 (Kitagawa, K. et al., *Am. J. Pathol.*, 165:237 (2004); Wada,
 T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15:940 (2004)), corazón
 15 (Hayashidani, S. et al., *Circulation*, 108: 2134 (2003)), e
 hígado (Tsuruta, S. et al., *Int. J. Mol. Med.*, 14: 837
 (2004)).

Un estudio ha demostrado el valor terapéutico
 potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el
 20 tratamiento de alveolitis. Cuando las ratas con lesión de
 pulmón compleja IgA inmune se trataron por vía intravenosa
 con anticuerpos inducidos contra MCP-1 (JE) de rata, los
 síntomas de alveolitis se aliviaron parcialmente (Jones, M.L.
 et al., *J. Immunol.*, 149:2147 (1992)).

25 Varios estudios han demostrado el valor terapéutico

potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de cáncer (revisión en: Craig, M.J. et al., Cancer Metastasis Rev., 25 : 611 (2006); Conti, I. et al., Seminars in Cancer Biology, 14:149 (2004); Giles, R. et al., Curr. Cancer Drug Targets, 6:659 (2006)). Cuando roedores inmunodeficientes que llevan células de carcinoma de mama humano se trataron por vía intravenosa con anticuerpo anti-MCP-1, se observaron inhibición de micrometástasis de pulmón e incrementos en la supervivencia (Salcedo, R. et al., Blood, 96:34-40 (2000)). Usando especímenes de tumor clínico humano, la expresión de CCR-2 estaba asociado la progresión de cáncer de próstata (Lu, Y. et al., J. Cell. Biochem., 101: 676 (2007)). La expresión MCP-1 *in vitro*, se ha mostrado que muestra crecimientos e invasión de células de cáncer de próstata (Lu, Y. et al., Prostate, 66: 1311 (2006)); además, MCP-1 expresado por células de cáncer de próstata indujo progenitores de médula ósea humana para la resorción de hueso (Lu, Y. et al., Cancer Res., 67: 3646 (2007)).

Estudios múltiples han descrito el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de reestenosis. En seres humanos, los niveles de MCP-1 están correlaciones directamente con el riesgo de reestenosis (Cipollone, F. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 21: 327 (2001)). Ratones deficientes en CCR-2 o en MCP-1 mostraron reducciones en el área intimal y

en la relación íntima/media (con relación a los hermanos de la misma camada de tipo salvaje) después de la lesión arterial (Roque, M. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22: 554 (2002); Schober, A. et al., *Circ. Res.*, 95:1125 (2004); Kim, W.J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310: 936 (2003)). En ratones, la transfección de un inhibidor negativo dominante de MCP-1 en el músculo esquelético (Egashira, K. et al., *Circ. Res.*, 90:1167 (2002)) también redujo la hiperplasia intimal después de la lesión arterial. El bloqueo de CCR-2 usando un anticuerpo neutralizante redujo la hiperplasia intimal después de la aplicación en primates (Horvath, C. et al., *Circ. Res.*, 90:488 (2002)).

Dos informes describen la sobreexpresión de ratas MCP-1 con trauma cerebral inducido (King, J.S. et al., *J. Neuroimmunol.*, 56:127 (1994), y Berman, J.W. et al., *J. Immunol.*, 156:3017 (1996)). Además, estudios han mostrado que tanto ratones CCR-2 $-/-$ (Dimitrijevic, O.B. et al., *Apoplejía*, 38:1345 (2007)) como MCP-1 $-/-$ (Hughes, P.M. et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22:308 (2002)) están protegidos parcialmente de la lesión de isquemia/reperfusión.

Se sabe que los monocitos/macrófagos juegan un papel importante en el desarrollo de dolor neuropático (Liu, T. et al., *Pain*, 86:25 (2000)). Consistente con esta percepción, un papel potencial para CCR-2 en el tratamiento

de tanto dolor inflamatorios como neuropático se ha descrito recientemente. Ratones CCR-2 $-/-$ mostraron respuestas alteradas a dolor inflamatorio con relación a sus homólogos WT, incluyendo comportamiento de dolor reducido después de la
5 inyección de formalina intraplantar y alodinia mecánica ligeramente reducida después de la inyección de CFA intraplantar (Abbadie, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:7947 (2003)). Además, ratones CCR-2 $-/-$ no mostraron alodinia mecánica significativa después de la lesión del
10 nervio ciático. Del mismo modo, un antagonista de CCR-2 de pequeña molécula redujo la alodinia mecánica hasta ~ 80% de niveles de lesión previa después de la administración oral (Abbadie, C. et al., Publicación PCT N° WO 2004/110376).

Un estudio describió el papel crítico de MCP-1 en
15 cardiomiopatía isquémica (Frangogiannis, N.G. et al., Circulation, 115: 584 (2007)). Otro estudio describió la atenuación de insuficiencia cardiaca experimental después de la inhibición de MCP-1 (Hayashidani, S. et al., Circulation, 108: 2134 (2003)).

20 Otros estudios han proporcionado evidencia de que MCP-1 se sobreexpresa en diversos estados patológicos no mencionados anteriormente. Estos informes proporcionan evidencia correlativa de antagonistas de MCP-1 podrían ser agentes terapéuticos útiles para tales enfermedades. Otro
25 estudio ha demostrado la sobreexpresión de MCP-1 en

transplantes homólogos cardíacos de roedores, sugiriendo un papel para MCP-1 en la patogénesis de arteriosclerosis de transplante (Russell, M.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6086 (1993)). La sobreexpresión de MCP-1 se ha

5 advertido en las células endoteliales de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Antoniades, H.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5371 (1992)). De manera similar, la sobreexpresión de MCP-1 se ha notado en la piel de pacientes con psoriasis (Deleuran, M. et al., J. Dermatol.

10 Sci., 13: 228 (1996), y Gillitzer, R. et al., J. Invest. Dermatol., 101: 127 (1993)); hallazgos relacionados con la predominancia de células CCR-2+ también se han reseñado (Vestergaard, C. et al., Acta Derm. Venerol., 84: 353 (2004)). Finalmente, un informe reciente ha mostrado que

15 MCP-1 se sobreexpresa en los cerebros y fluido cerebroespinal de pacientes con demencia asociada a VIH-1 (Garzino-Demo, A., Publicación PCT N° WO 99/46991).

Además, se ha mostrado que el polimorfismo CCR-2 está asociado con sarcoidosis al menos en un subconjunto de

20 pacientes (Spagnolo, P. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 168: 1162 (2003)).

También se debe indicar que CCR-2 ha estado implicado como un co-receptor para algunas cepas de VIH (Doranz, B.J. et al., Cell, 85: 1149 (1996)). También se ha

25 determinado que el uso de CCR-2 como un co-receptor de VIH

puede estar correlacionado con la progresión de enfermedad (Connor, R.I. et al., J. Exp. Med., 185: 621 (1997)). Este hallazgo es consistente con el hallazgo reciente que la presencia de un mutante de CCR-2, CCR-2-64I, está correlacionado de manera positiva con la aparición retrasada de VIH en la población humana (Smith, M.W. et al., Science, 277:959 (1997)). Aunque MCP-1 no ha estado implicada en estos procesos, puede ser que antagonistas de MCP-1 que actúan mediante la unión a CCR-2 puede tener efectos terapéuticos beneficiosos en el retraso de la progresión de la enfermedad a SIDA en pacientes infectados con VIH.

Se debe indicar que CCR-2 también es el receptor para las quimiocinas humanas MCP-2, MCP-3, y MCP-4 (Luster, New Eng. J. Med., 338: 436 - 445 (1998)). Dado que los nuevos compuestos de Fórmula (I) descritos en el presente documento antagonizan MCP-1 mediante la unión al receptor CCR-2, puede ser que estos compuestos de Fórmula (I) son también antagonistas eficaces de las acciones de MCP-2, MCP-3, y MCP-4 que están mediadas por CCR-2. De acuerdo con lo anterior, cuando se hace referencia en el presente documento a "antagonismo de MCP-1," también se asume que es equivalente a "antagonismo de estimulación de quimiocina de CCR-2."

De acuerdo con lo anterior, los compuestos que modulan la actividad de quimiocina puede demostrar un amplio intervalo de utilidades en el tratamiento de enfermedades

inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares. Las Publicaciones PCT números WO 2005/021500 A1 (incorporada en el presente documento por referencia y asignada al presente solicitante), WO 5 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 y WO 2008/014361 A1, divulgan compuestos que modulan la actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4 mediante CCR-2. Las referencias también divulgan diversos procesos para preparar estos compuestos incluyendo las síntesis de múltiples etapas que incluyen la 10 introducción y retirada posterior de grupos de protección.

Es deseable encontrar nuevos compuestos con características farmacológicas mejoradas en comparación con los moduladores de quimiocina conocidos. Por ejemplo, es deseable encontrar nuevos compuestos con actividad inhibidora 15 dual de la misma potencia de CCR-2/5 en comparación con las efectividad para CCR-2 sola, predominantemente CCR-2 contra CCR-5, predominantemente CCR-5 contra CCR-2, u otros receptores acoplados a la proteína G (es decir, receptor de 5HT2A receptor). También es deseable encontrar compuestos 20 con actividad inhibidora dual de la misma potencia de CCR-2/5 y características ventajosas en una o más de las siguientes categorías:

(a) propiedades farmacéuticas (es decir, solubilidad, permeabilidad, adaptable a las formulaciones de 25 liberación sostenida);

(b) requerimientos de dosificación (por ejemplo, dosificaciones inferiores y/o dosificación una vez al día);

(c) factores que disminuyen las características de concentración en sangre máximas a mínimas (es decir, eliminación y/o volumen de distribución);

(d) factores que aumentan la concentración de fármaco activo en el receptor (es decir, unión de proteína, volumen de distribución);

e) factores que disminuyen la responsabilidad clínica de interacciones fármaco - fármaco (inhibición o inducción de la enzima P450 de citocromo, tal como la inhibición de CYP 2D6, véase Dresser, G.K. et al., Clin. Pharmacokinet., 38: 41 - 57 (2000), que se incorpora en el presente documento por referencia); y

(f) factores que disminuyen el potencial de efectos secundarios adversos (por ejemplo, selectividad farmacológica más allá de los receptores acoplados a la proteína G, reactividad química o metabólica potencial, penetración limitada en el SNC, selectividad de canales de ion). Se desea especialmente encontrar compuestos que tengan una combinación deseable de las características farmacológicas anteriormente mencionadas.

También es deseable en la técnica proporcionar procesos nuevos y/o mejorados para preparar tales compuestos. Estos procesos pueden estar caracterizados, sin limitación,

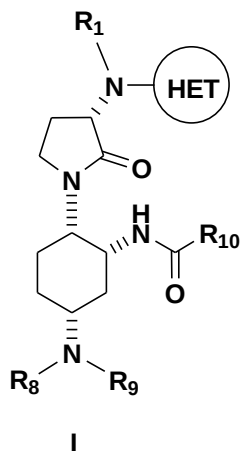
mediante a) adaptación fácil para una producción a mayor escala, tales como planta piloto o escalas de fabricación; b) etapas de proceso y/o técnicas que permiten mejoras en la pureza (incluyendo pureza quiral), estabilidad y/o facilidad
 5 de manipulación de intermedios y/o compuestos finales; y/o c) menores etapas de proceso.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona un antagonista novedoso: N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-
 10 butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal, solvato o profármaco, farmacéuticamente aceptable de la misma, que tiene actividad inhibidora dual del receptor de la misma potencia no esperada de CCR-2 y CCR-5. Además, la presente
 15 invención presenta una combinación novedosa y no esperada de actividad dual de la misma potencia de CCR-2/5 y características farmacológicas deseables. También se proporcionan las formas cristalinas y metabolitos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que
 20 contienen las mismas y procesos de uso de las mismas como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o enfermedades cardiovasculares también es un objetivo de la presente invención. La presente descripción también proporciona un
 25 proceso para preparar compuestos de Fórmula (I), incluyendo

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:

5



10

en la que R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , y HET son como se describen en el presente documento. Los compuestos que son intermedios útiles del proceso también se proporcionan en el presente documento.

15

La presente descripción también proporciona el uso de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)pirazol[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil) acetamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer

25

y/o enfermedades cardiovasculares.

La presente descripción también proporciona metabolitos de compuestos activos, o sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, sus composiciones farmacéuticas y procesos de uso de los metabolitos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, particularmente diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y/o aterosclerosis.

De acuerdo con lo anterior, se divulgan en el presente documento moduladores novedosos de la actividad de quimiocina, o su sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, que tienen una combinación no esperada de características farmacéuticas deseables.

La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente invención o su forma de sal o profármaco farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también proporciona procesos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares, particularmente diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn enfermedad y/o aterosclerosis, que comprende la administración a un huésped en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los

compuestos de la presente invención, o su forma de sal o profármaco farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción proporciona un proceso para preparar compuestos descritos en el presente documento y sus
5 intermedios útiles.

La presente descripción proporciona el uso de los compuestos de la presente invención en terapia.

La presente descripción proporciona el uso de los compuestos de la presente invención para la fabricación de un
10 medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra los patrones de polvo
15 experimentales y simulados de la N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida.

La Figura 2 muestra el análisis de calorimetría de
20 barrido diferencial de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, forma N-1 de base libre.

La Figura 3 muestra el análisis termogravimétrico
25 de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-

butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, forma N-1 de base libre.

Descripción Detallada de la Invención

5 La presente invención proporciona un antagonista novedoso: N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o su sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable, que

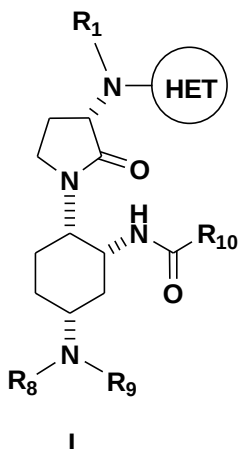
10 tiene actividad de receptor CCR-2 y CCR-5 dual de la misma potencia. De manera adicional, la presente invención proporciona una combinación novedosa de características farmacológicas deseables. También se proporcionan formas cristalinas y metabolitos de la

15 presente invención. Las composiciones farmacéuticas que contienen la misma y procesos de uso de los mismos agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o enfermedades cardiovasculares también es un

20 objetivo de la presente invención. La presente descripción también proporciona un proceso para preparar compuestos de Fórmula (I), incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-

25 il)ciclohexil)acetamida:

5



en la que R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , y HET son como se describen en el presente documento. Compuestos que son intermedios útiles del proceso también se proporcionan en el presente documento.

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-Butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, demuestra de manera inesperada actividad inhibidora dual de la misma potencia del receptor CCR-2/5.

De manera adicional, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida demuestra una combinación deseable de actividad inhibidora dual de la misma potencia del receptor CCR-2/5 y características farmacológicas incluyendo un grado altamente sorprendente de biodisponibilidad oral en combinación con las indicaciones que es altamente eficaz y

tiene criterios de seguridad excelentes.

Los moduladores conocidos de receptores de quimiocinas, tales como los descritos en Publicación PCT números WO 2004/071460 A1 y WO 2005/021500 A1 (Patente de Estados Unidos N° 7,163,937, emitida no son suficientemente eficaces, como se mide por su capacidad de unión a CCR-2 o CCR-5 (una medida de eficacia), y/o carecen de criterios apropiados para seguridad como se indica mediante selectividad de canal de ion y se mide mediante estudios de hERG y canal de ion de Na+.

Otros moduladores conocidos de receptores de quimiocinas, tales como los descritos en las Publicaciones PCT Números. WO 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 y WO 2008/014361 A1, son selectivos como antagonista o parcial agonista/antagonista de la actividad del receptor CCR-2. Sin embargo, estos moduladores conocidos demuestran predominantemente la actividad de CCR-2 y no son antagonistas duales de la misma potencia, como se mide por su capacidad de unión de CCR-2 y CCR-5-.

Otros moduladores de receptores de quimiocinas conocidos, tales como los descritos por Carter et al. (American Chemical Society, 17 de agosto de 2008) son moduladores duales de CCR-2/5 pero carecen de criterios apropiados para seguridad como se indica por la selectividad de canal de ion como se mide por estudios de hERG y de canal

de ion Na⁺.

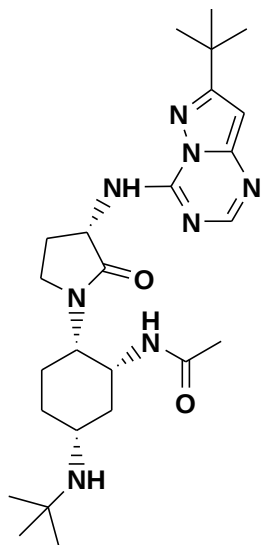
Por el contrario, como se ilustra por los datos presentados en el presente documento en la sección titulada "Características farmacológicas comparativas", infra, N-
 5 ((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida sorprendente muestran capacidad de unión de CCR-5 y CCR-2 de la misma potencia. Además, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-
 10 butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida demuestra un grado sorprendentemente alto de permeabilidad de membrana, y todavía mantiene capacidad de unión de de CCR-2/5 de la misma potencia junto con excelente selectividad de canal de ion.

15 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona nuevos moduladores de quimiocina que tienen capacidad de unión de CCR-2 y CCR-5 de la misma potencia y mejora las características farmacológicas que se espera que sean útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias,
 20 alérgicas, metabólicas, cáncer y/o cardiovascular.

Modalidades

En una modalidad, la descripción se refiere a N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-
 25 oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:

5



10 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopirrolidin-1-yl)ciclohexil) acetamida.

15 Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopirrolidin-1-yl)ciclohexil)acetamida, en la que la forma cristalina comprende la Forma N-1 y/o P-1.

20 Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopirrolidin-1-yl)ciclohexil)acetamida, en la que la forma cristalina comprende la Forma N-1.

25 Otra modalidad es una forma cristalina de N-

((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, en la que la forma cristalina comprende la Forma N-1 o P-1 en forma
 5 sustancialmente pura.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil) acetamida, en la que la forma
 10 cristalina comprende la Forma N-1 en forma sustancialmente pura.

Otra modalidad es la Forma N-1 caracterizada por parámetros de celdas unitarias sustancialmente iguales a los siguientes:

15 Dimensiones de la celda:

$$a = 7.3085(6)$$

$$b = 16.257(1)$$

$$c = 22.688(2)$$

$$\alpha^\circ = 90$$

20 $\beta^\circ = 90$

$$\gamma^\circ = 90$$

Grupo de espacio $P2_12_12_1$

Moléculas/celda unitaria (Z): 1

Densidad, calc g-cm^{-3} : 1.194

25 En la que el cristal está a una temperatura de

aproximadamente - 70°C.

Otra modalidad es la Forma N-2 caracterizada por (o que tiene) un patrón de difracción de rayos x sustancialmente de acuerdo con la Figura 1.

5 Otra modalidad es la Forma N-2 caracterizada por (o que tiene) un termograma de calorimetría de barrido diferencial sustancialmente de acuerdo con lo mostrado en la Figura 2, que tiene una transición endotérmica superior a aproximadamente 205°C.

10 Otra modalidad se caracteriza por (o que tiene) una curva de análisis gravimétrico térmico de acuerdo con la mostrada en la Figura 3.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-
15 butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, que comprende la Forma N-1, caracterizada por los parámetros de celdas unitarias encontrados en la Tabla 1; y/o patrón de difracción de rayos x sustancialmente de acuerdo con la Figura 1.

20 Otra modalidad es una composición farmacéutica constituida por N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

25 Otra modalidad es una composición farmacéutica

constituida por N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente
5 aceptable.

Otra modalidad es una composición farmacéutica constituida por N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, sus sales
10 farmacéuticamente aceptables, y al menos un agente terapéutico adicional.

Otra modalidad es un proceso para modular quimiocina o la actividad del receptor de quimiocina que comprende la administración a un paciente en necesidad del
15 mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de modulación de la actividad del receptor CCR-2 y CCR-5 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-
25 a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-

il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de modulación de la actividad de MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1a, MIP-
 5 1b y RANTES que está mediada por el receptor CCR-2 y CCR-5 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.
 10

Otra modalidad es un proceso de modulación de la actividad de MCP-1 que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad
 15 terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de un
 20 trastorno, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables, el trastorno se selecciona
 25

entre diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, escleroderma, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia

5 cardiaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada a VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis de trasplante, trauma cerebral inducido de manera física o química, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus sistémico

10 eritematoso, nefritis de suero nefrotóxica, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, hiperplasia intimal de

15 derivación arterio venosa, trasplante de órganos, nefropatía de trasplante homólogo crónico, y cáncer.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de un trastorno, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz

20 de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que el trastorno se selecciona entre diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn,

25 psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis de

transplante, trauma cerebral inducido de manera física o química, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus sistémico eritematoso, nefritis de suero nefrotóxica, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, 5 aterosclerosis, and artritis reumatoide, reestenosis, trasplante de órganos, cáncer, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, e hiperplasia intimal de derivación arterio venosa.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de un 10 trastorno, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales 15 farmacéuticamente aceptables, en el que el trastorno se selecciona entre diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, reestenosis, trasplante de órganos, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de 20 injerto - diálisis, e hiperplasia neointimal de derivación arterio venosa.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de un trastorno, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz 25 de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-

butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que el trastorno se selecciona entre esclerosis múltiple, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, diabetes, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, e hiperplasia neointimal de derivación arterio venosa.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de un trastorno, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que el trastorno se selecciona entre reestenosis, trasplante de órganos, cáncer, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, e hiperplasia neointimal de derivación arterio venosa.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de diabetes, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de enfermedad de Crohn, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de t N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de esclerosis múltiple, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de aterosclerosis, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de reestenosis, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz

de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 Otra modalidad es un proceso de tratamiento de trasplante de órganos, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata y melanoma, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 Otra modalidad es un proceso de tratamiento de hiperplasia neointimal venosa, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-

il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, que comprende
 5 la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente
 10 aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de hiperplasia neointimal de derivación arterio venosa, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-
 15 ((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de una
 20 enfermedad inflamatoria, alérgica, autoinmune, metabólica, y/o enfermedades cardiovasculares que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-
 25 a)[1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-

il)ciclohexil)acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra modalidad es un proceso de tratamiento de una enfermedad que está al menos parcialmente mediada por CCR-2 y
 5 CCR-5, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de
 N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida y sus sales
 10 farmacéuticamente aceptables.

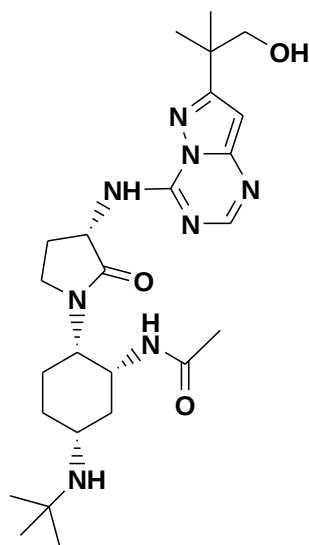
Otra modalidad es un proceso de uso de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, y sus sales
 15 farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, escleroderma, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad
 20 cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada a VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arteriosclerosis de transplante, trauma cerebral inducido de manera física o química, enfermedad inflamatoria
 25 del intestino, alveolitis, colitis, lupus sistémico eritematoso,

nefritis de suero nefrotóxica, glomerulonefritis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, reestenosis, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, hiperplasia intimal de derivación arterio venosa, trasplante de órganos, nefropatía de trasplante homólogo crónico, cáncer, hiperplasia neointimal venosa, hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, e hiperplasia neointimal de derivación arterio venosa.

En otra modalidad más, la descripción se refiere a N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)pirazol[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:

15

20



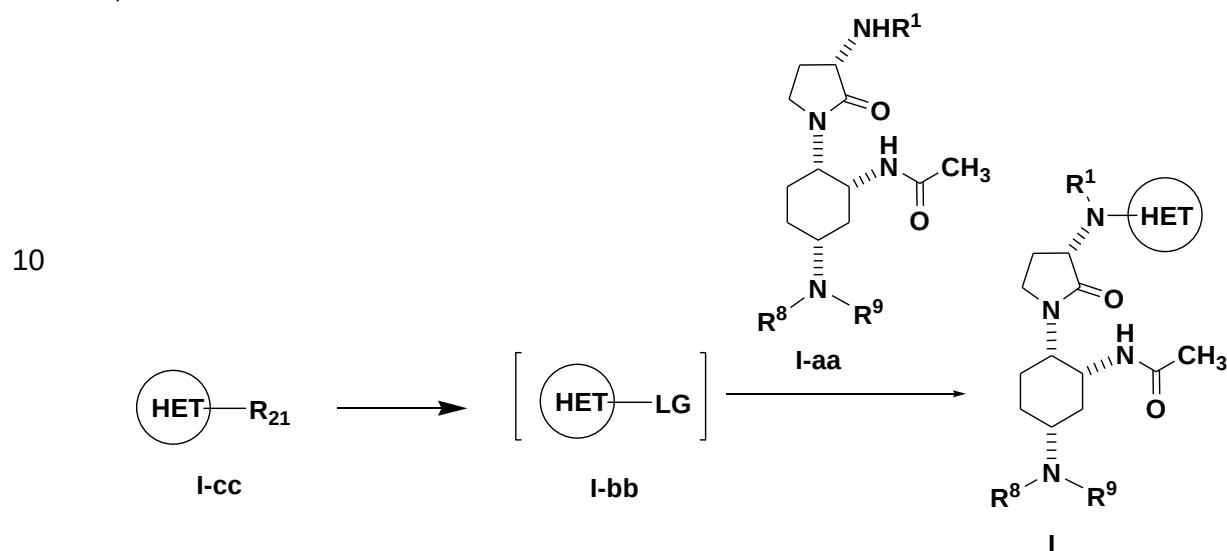
y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Composiciones farmacéuticas que contiene la misma y procesos de uso de la misma como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o

enfermedades cardiovasculares también es una modalidad de la presente invención.

Modalidades de proceso

En una primera modalidad, la descripción
5 proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I, o su sal



15 que comprende:

1) convertir un compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc en un compuesto de Fórmula I-bb; y

2) acoplar compuesto de Fórmula I-bb con un compuesto de Fórmula I-aa; en la que:

20 R_1 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de amina seleccionado entre un grupo carbobenciloxi, un tert-butiloxycarbonilo, un grupo fluorenilmetiloxycarbonilo, un grupo bencilo, y un grupo p-metoxibencilo;

25 R_8 y R_9 son independientemente hidrógeno o

alquilo C₁₋₆;

R₂₁ es = O;

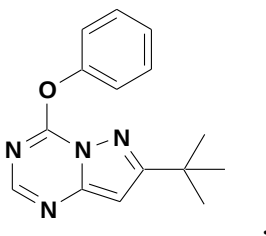
HET es un anillo heterociclo o heteroarilo
bicíclico de 3 a 14 miembros opcionalmente sustituido que
5 tiene al menos un heteroátomo de nitrógeno; y

LG es -OR₁₆, en el que R₁₆ es alquilo C₁₋₆,
fenilo, un heteroarilo de 5 a 7 miembros que tiene uno o más
átomos seleccionados entre N, S, u O, o un cicloalquilo de 3
a 7 miembros, todos los cuales están opcionalmente
10 sustituidos con 1 a 3 grupos seleccionados entre halógeno,
CF₃ o alquilo C₁₋₆.

En una segunda modalidad, la descripción proporciona un
proceso en el que el compuesto de Fórmula I es N-((1R,2S,5R)-5-(tert-
butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-
15 ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida.

En una tercera modalidad, la descripción proporciona un
proceso para preparar un compuesto de Fórmula I en el que el compuesto
de Fórmula I-bb es un compuesto de la fórmula:

20



En una cuarta modalidad, la descripción proporciona
un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I en el que
25 el acoplamiento se produce mediante un tratamiento ácido

seguido de la adición de una base.

En una quinta modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I en el que el ácido en el tratamiento ácido se selecciona entre ácido
5 cítrico, ácido tartárico, ácido glicólico, y ácido clorhídrico.

En una sexta modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I en el que la base se selecciona entre K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , $NaHCO_3$ y $KHCO_3$.

10 En una séptima modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I en el que la conversión del compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc en el compuesto de Fórmula I-bb comprende hacer reaccionar el compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc con un
15 agente acilante, un nucleófilo, y/o una base de amina terciaria en un disolvente seguido de intercepción con o bien (i) un alcohol en la presencia de una segunda base de amina terciaria o (ii) un alcóxido para formar el compuesto de Fórmula I-bb.

20 En una octava modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el agente acilante se selecciona entre oxicloruro de fósforo, cloruro de oxalilo, cloruro de tionilo y fosgeno, preferiblemente oxicloruro de fósforo.

En una novena modalidad, la descripción proporciona
25 un proceso en el que la base de amina terciaria se selecciona

entre trietilamina, N-N-diisopropil-N-etil amina, tri-n-propilamina, N-metil morfolina y 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, preferiblemente N-N-diisopropil-N-etil amina.

5 En una décima modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el nucleófilo se selecciona entre dimetil 4-aminopiridina, dimetilanilina, piridina y lutidina, preferiblemente dimetil 4-aminopiridina.

10 En una undécima modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que la cantidad de nucleófilo usado en la reacción es 2.0 a 4.0 equivalentes, preferiblemente, 3.0 equivalentes.

15 En una duodécima modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el alcohol o alcóxido se selecciona entre fenol, pentafluorofenol, metanol, etanol, metóxido de sodio y de fenolato sodio, preferiblemente, fenol.

20 En una decimotercera modalidad, la presente descripción proporciona un proceso en el que la segunda base de amina terciaria se selecciona entre trietilamina, N-N-diisopropil-N-etil amina, tri-n-propilamina, N-metil morfolina, y 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, preferiblemente, N-N-diisopropil-N-etil amina.

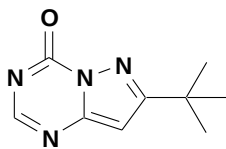
25 En una decimocuarta modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el disolvente se selecciona

entre acetonitrilo, diclorometano y oxiclórico de fósforo puro.

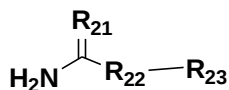
En una decimoquinta modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que la reacción e intercepción
5 se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de temperatura ambiente y 70°C.

En una decimosexta modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el compuesto de Fórmula I-cc es un compuesto de la fórmula:

10



En una decimoséptima modalidad, la presente invención proporciona un proceso en el que el compuesto de
15 hidrazona de fórmula I-cc se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de hidrazona de Fórmula I-dd



20

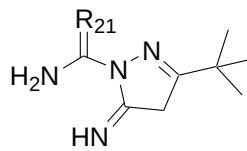
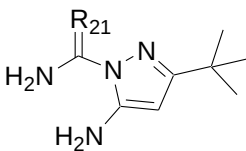
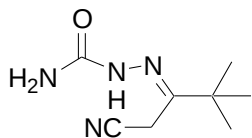
I-dd

con ortoformiato en la presencia de un ácido a temperatura elevada para producir el compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc; en la que R₂₁ es =O; R₂₂ es -NH-NH₂; y R₂₃ es cianoalquilo; o R₂₂ y R₂₃ se pueden tomar conjuntamente para
25 formar un anillo de 5- a 8- miembros, en la que el anillo

10 En una decimonovena modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el ácido se selecciona entre ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico y ácido metanosulfónico, preferiblemente, ácido acético.

En una vigésima modalidad, la descripción
15 proporciona un proceso en el que la reacción se lleva a cabo
a una temperatura en el intervalo de 40 - 90°C,
preferiblemente, 40 - 75°C.

En una vigésimo primera modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el compuesto de Fórmula I-dd se selecciona entre un compuesto de la fórmula:

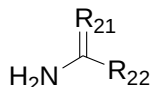


•

25 En una vigésimo segunda modalidad, la descripción

proporciona un proceso en el que el compuesto de hidrazona formula I-dd se prepara mediante un proceso que comprende la condensación de un compuesto de Fórmula I-ee, $R_{23}=O$, con un compuesto carbazida de Fórmula I-ff:

5



I-ff

en un disolvente en la presencia de una base para producir el compuesto de hidrazona de Fórmula I-dd; en la que
10 R_{21} es $=O$ y R_{22} y R_{23} son como se han establecido anteriormente.

En una vigésimo tercera modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que el disolvente se selecciona entre etanol, 2-propanol, 1-propanol y metanol,
15 preferiblemente, etanol.

En una vigésimo cuarta modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que la base se selecciona entre acetato de sodio, acetato de potasio, trietilamina y N-N-diisopropil-N-etil amina, preferiblemente, acetato de sodio.

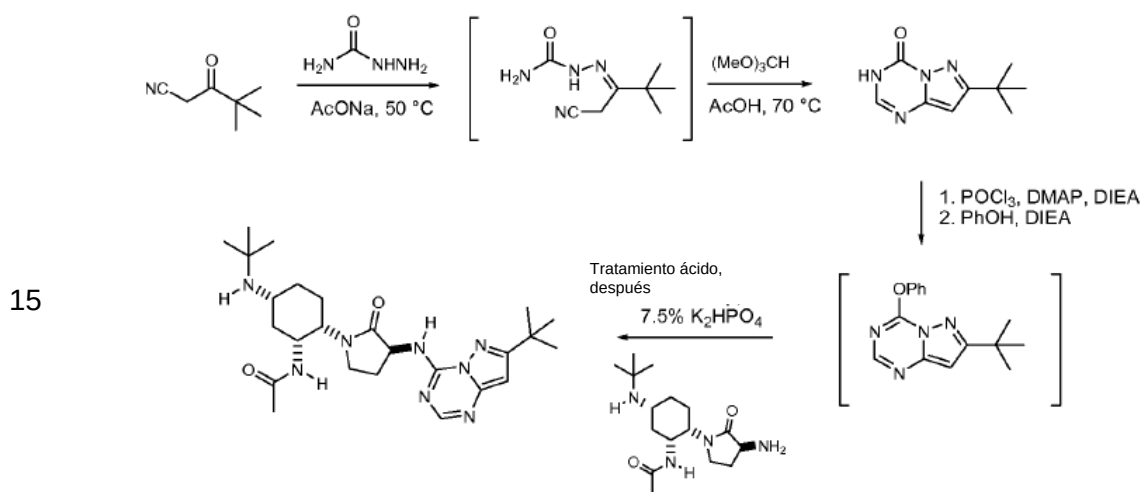
20 En una vigésimo quinta modalidad, la descripción proporciona un proceso en el que la condensación se produce a una temperatura en el intervalo de 20 - 60°C, preferiblemente, 25 - 55°C.

En una vigésimo sexta modalidad, la presente
25 invención proporciona un proceso en el que el compuesto de

carbazida de Fórmula I-ff es clorhidrato de semicarbazida.

En una vigésimo séptima modalidad, la presente invención proporciona un proceso en el que el compuesto de Fórmula I-ee es pivaloil acetonitrilo.

5 En una vigésimo octava modalidad, la presente invención proporciona un proceso para preparar N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida que comprende el proceso establecido en el siguiente Esquema de
10 reacción:



20 La presente invención se puede realizar en otras formas específicas sin salirse de su espíritu o atributos esenciales. De este modo, las modalidades anteriores no se deben considerar limitantes. Cualquiera y todas las modalidades de la presente invención se pueden tomar
25 conjuntamente con cualquier otra modalidad o modalidades para

describir modalidades adicionales. Cada elemento individual (por ejemplo, aspectos preferibles o especiales) de las modalidades es su propia modalidad independiente. Además, cualquier elemento de una modalidad significa que se combina
5 con cualquiera y todos elementos diferentes de cualquier modalidad para describir una modalidad adicional. Además, la presente invención abarca combinaciones de modalidad diferente, partes de modalidades, definiciones, descripciones, y ejemplos de la invención indicadas en el
10 presente documento.

Definiciones

Las siguientes son definiciones de términos usados en esta descripción y reivindicaciones anexas. La definición inicial proporcionada para un grupo o término en el presente
15 documento se aplica a ese grupo o término a lo largo de la descripción y reivindicaciones, individualmente o como parte de otro grupo, salvo que se indique de otra manera.

El término "alquilo" se refiere a grupos de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen 1 a 12
20 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono. Cuando aparecen números en un subíndice después del símbolo "C", el subíndice define con más especificidad el número de átomos de carbono que un grupo particular puede contener. Por ejemplo, "alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos alquilo de
25 cadena lineal o ramificada que tienen 1 a 6 átomos de

carbono, tales como as metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, y así sucesivamente. El subíndice "0" se refiere a un enlace. De este modo, el término hidroxi alquilo (C_{0-2}) o hidroxialquilo (C_{0-2}) incluye

5 hidroxi, hidroximetilo y hidroxietilo. Alquilo grupos pueden estar sustituidos con 1 a 3 grupos seleccionados entre alquilo (C_{1-6}), alqueno (C_{2-6}), hidroxi, halógeno, ciano, nitro, CF_3 , $O(\text{alquilo } C_{1-6})$, OCF_3 , $C(=O)H$, $C(=O)(\text{alquilo } C_{1-6})$, CO_2H , $CO_2(\text{alquilo } C_{1-6})$, $NHCO_2(\text{alquilo } C_{1-6})$, $-S(\text{alquilo } C_{1-6})$,

10 NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_{1-6})$, $N(\text{alquilo } C_{1-6})_2$, $N(CH_3)_3^+$, $SO_2(\text{alquilo } C_{1-6})$, $C(=O)(\text{alqueno } C_{1-4})NH_2$, $C(=O)(\text{alqueno } C_{1-4})NH(\text{alquilo})$, $C(=O)(\text{alqueno } C_{1-4})N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$, cicloalquilo C_{3-7} , fenilo, bencilo, feniletilo, feniloxi, benciloxi, naftilo, un heterociclo de 4 a 7 miembros, y/o un heteroarilo de 5 a 6

15 miembros. Cuando un alquilo sustituido está sustituido con un grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo, o heteroarilo, los sistemas de anillo son como se definen más adelante y de este modo pueden tener 0, 1, 2, o 3 sustituyentes, también como se definen más adelante.

20 Cuando el término "alquilo" se usa conjuntamente con otro grupo, tal como en "alrilalquilo", esta unión define con más especificidad al menos uno de los sustituyentes que el alquilo sustituido contendrá. Por ejemplo, "arilalquilo" se refiere a un alquilo sustituido como se ha definido

25 anteriormente donde al menos uno de los sustituyentes es un

arilo, tal como bencilo. De este modo, el término arilalquilo(C₀₋₄) incluye un alquilo inferior sustituido que tiene al menos un sustituyente arilo y también incluye un arilo directamente unido a otro grupo, es decir, aril
5 alquilo(C₀).

El término "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen 2 a 12 átomos de carbono y al menos un doble enlace. Los grupos alquenilo de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen un doble
10 enlace son los más preferidos. Los grupos alquenilo también pueden estar sustituidos como se ha descrito anteriormente para los grupos alquilo.

El término "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen 2 a 12 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los grupos alquinilo de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen un triple
15 enlace son los más preferidos. Los grupos alquinilo pueden estar sustituidos como se ha descrito anteriormente para los grupos alquilo.

El término "alquilenio" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, {-CH₂-}_n, en el que n es 1 a 12, preferiblemente 1 a 8. Los grupos alquilenio inferior, esto es, grupos
20 alquilenio de 1 a 2 átomos de carbono, son los más preferidos.

Los términos "alquenileno" y "alquinileno" se refiere a radicales bivalentes de grupos alquenilo y alquinilo, respectivamente, como se ha definido anteriormente. Los grupos alquenileno pueden estar sustituidos como se ha
 5 descrito anteriormente para los grupos alquilo.

El término "alcoxi" se refiere a un átomo de oxígeno sustituido por alquilo, como se ha definido en el presente documento. Por ejemplo, el término "alcoxi" incluye el grupo -O-alquilo C₁₋₆.

10 Cuando se usa un subíndice con referencia a un alcoxi, tioalquilo o aminoalquilo, el subíndice se refiere al número de átomos de carbono que el grupo puede contener además de heteroátomos.

Se debe entender que las selecciones para todos los
 15 grupos, incluyendo por ejemplos, alcoxi, tioalquilo, y aminoalquilo, se prepararán por los expertos en la técnica para proporcionar compuestos estables.

El término "carbonilo" se refiere a un grupo carbonilo bivalente -C(=O)-.

20 El término "acilo" se refiere a un grupo carbonilo unido a un radical orgánico, más particularmente, el grupo C(=O)R_e, así como el grupo bivalente -C(=O)R_e-, que están unidos a radicales orgánicos. El grupo R_e cse puede seleccionar entre alquilo, alquenilo, alquinilo,
 25 cicloalquilo, heterociclo, arilo, o heteroarilo como se ha

definido en el presente documento, o cuando sea apropiado, el grupo bivalente correspondiente, por ejemplo, alquilenos.

El término "cicloalquilo" se refiere a anillos de hidrocarburo totalmente saturados y parcialmente insaturados (y por lo tanto incluye "anillos cicloalqueno") de 3 a 9, preferiblemente 3 a 7 átomos de carbono. El término "cicloalquilo" incluye los anillos que tienen 0, 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados entre alquilo (C_{1-4}), alqueno (C_{2-4}), halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, CF_3 , $O(\text{alquilo } C_{1-4})$, OCF_3 , $C(=O)H$, $C(=O)(\text{alquilo } C_{1-4})$, CO_2H , $CO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $NHCO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $S(\text{alquilo } C_{1-4})$, NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_{1-4})$, $N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$, $N(\text{alquilo } C_{1-4})_3^+$, $SO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $C(=O)(\text{alquilenos } C_{1-4})NH_2$, $C(=O)(\text{alquilenos } C_{1-4})NH(\text{alquilo})$, y/o $C(=O)(\text{alquilenos } C_{1-4})N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$. El término "cicloalquilo" también incluye los anillos que tienen un segundo anillo condensado al mismo (por ejemplo, incluyendo anillos benzo, heterociclo, o heteroarilo) o que tienen un puente carbono - carbono de 3 a 4 átomos de carbono.

El término "halo" o "halógeno" se refiere a cloro, bromo, fluoro y yodo.

El término "haloalquilo" significa un alquilo sustituido que tiene uno o más sustituyentes halo. Por ejemplo, "haloalquilo" incluye mono, bi, y trifluorometilo.

El término "haloalcoxi" significa un grupo alcoxi que tiene uno o más sustituyentes halo. Por ejemplo,

"haloalcoxi" incluye OCF_3 .

El término "heteroátomos" incluirá oxígeno, azufre y nitrógeno.

El término "arilo" se refiere a fenilo, bifenilo, fluorenilo, 1-naftilo y 2-naftilo. El término "arilo" incluye los anillos que tienen 0, 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados entre alquilo (C_{1-4}), alqueno (C_{2-4}), halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, CF_3 , $\text{O}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, OCF_3 , $\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $\text{C}(=\text{O})(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, CO_2H , $\text{CO}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, $\text{NHCO}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, $\text{S}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, NH_2 , $\text{NH}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, $\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})_2$, $\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})_3^+$, $\text{SO}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, $\text{C}(=\text{O})(\text{alqueno } \text{C}_{1-4})\text{NH}_2$, $\text{C}(=\text{O})(\text{alqueno } \text{C}_{1-4})\text{NH}(\text{alquilo})$, y/o $\text{C}(=\text{O})(\text{alqueno } \text{C}_{1-4})\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})_2$.

Los términos "heterociclo" o "heterocíclico" se refiere a anillos de 3- a 15- miembros no aromáticos sustituidos o no sustituidos (que puede estar parcialmente o completamente saturado) que tiene 1 a 4 heteroátomos. Tales anillos pueden ser grupos monocíclicos de 3- a 7- miembros, grupos bicíclicos de 7- a 11- miembros, y grupos tricíclicos de 10- a 15- miembros. Cada anillo del grupo heterociclo que contiene un heteroátomo puede contener uno o dos átomos de oxígeno o azufre y/o de 1 a 4 átomos de nitrógeno siempre que el número total de heteroátomos en cada anillo sea cuatro o menos, y además siempre que el anillo contenga al menos un átomo de carbono. Los anillos condensados que completan los

grupos bicíclicos y tricíclicos pueden contener solamente átomos de carbono y pueden estar saturados, parcialmente saturados o no saturados. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden opcionalmente estar oxidados y los átomos de nitrógeno

5 pueden opcionalmente estar cuaternizados. El grupo heterociclo pueden estar unidos a cualquier átomo de nitrógeno o carbono disponible. El anillo heterociclo puede contener 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados entre alquilo (C_{1-4}), alquenilo (C_{2-4}), halógeno, hidroxilo, ciano,

10 nitro, CF_3 , $O(\text{alquilo } C_{1-4})$, OCF_3 , $C(=O)H$, $C(=O)(\text{alquilo } C_{1-4})$, CO_2H , $CO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $NHCO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $S(\text{alquilo } C_{1-4})$, NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_{1-4})$, $N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$, $N(\text{alquilo } C_{1-4})_3^+$, $SO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $C(=O)(\text{alquilenilo } C_{1-4})NH_2$, $C(=O)(\text{alquilenilo } C_{1-4})NH(\text{alquilo})$, y/o $C(=O)(\text{alquilenilo } C_{1-4})N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$.

15 Los grupos heterocíclicos ejemplares incluyen azetidino, pirrolidino, oxetano, imidazolinilo, oxazolidinilo, isoxazolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, tetrahidrofuranilo, piperidilo, piperazino, 2-oxopiperazino, 2-oxopiperidilo, 2-oxopirrolidino, 2-

20 oxoazepino, azepino, 4-piperidono, tetrahidropirano, morfolino, tiamorfolino, sulfóxido de tiamorfolino, tiamorfolinil sulfona, 1,3-dioxolano, quinuclidino, tetrahidro-1,1-dioxotieno y similares.

El término "heteroarilo" se refiere a anillos

25 aromáticos sustituidos y no sustituidos de 3- a 14- miembros

que tienen 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre O, S, o N en al menos uno de los anillos. Los anillos pueden ser grupos monocíclicos de 5- o 6- miembros, grupos bicíclicos de 9- o 10- miembros, y grupos tricíclicos de 11- a 14- miembros. Cada anillo del grupo heteroarilo que contiene un heteroátomo puede contener uno o dos átomos de oxígeno o azufre y/o de 1 a 4 átomos de nitrógeno siempre que el número total de heteroátomos en cada anillo es cuatro o menos y cada anillo tiene al menos un átomo de carbono. Los anillos condensados que completan los grupos bicíclicos o tricíclicos pueden contener solamente átomos de carbono y pueden estar saturados, parcialmente saturados, o no saturados. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados. Los grupos heteroarilo que son bicíclicos o tricíclicos deben incluir al menos un anillo completamente aromático pero el otros anillo o anillos pueden ser aromáticos o no aromáticos. El grupo heteroarilo puede estar unido a cualquier átomo de nitrógeno o carbono disponible de cualquier anillo. El sistema de anillo de heteroarilo puede contener 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados entre alquilo (C_{1-4}), alquenilo (C_{2-4}), halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, CF_3 , $O(\text{alquilo } C_{1-4})$, OCF_3 , $C(=O)H$, $C(=O)(\text{alquilo } C_{1-4})$, CO_2H , $CO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $NHCO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $S(\text{alquilo } C_{1-4})$, NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_{1-4})$, $N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$, $N(\text{alquilo } C_{1-4})_3^+$,

$\text{SO}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})$, $\text{C}(=\text{O})(\text{alquilenos } \text{C}_{1-4})\text{NH}_2$, $\text{C}(=\text{O})(\text{alquilenos } \text{C}_{1-4})\text{NH}(\text{alquilo})$, y/o $\text{C}(=\text{O})(\text{alquilenos } \text{C}_{1-4})\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})_2$.

Los grupos heteroarilo ejemplares incluyen pirrolilo, pirazolilo, pirazolinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, furanilo, tienilo, oxadiazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo, indolilo, benzotiazolilo, benzodioxolilo, benzoxazolilo, benzotienilo, quinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, benzopirranilo, indolizínilo, benzofuranilo, cromonilo, cumarinilo, benzopirranilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridilo, dihidroisoindolilo, tetrahidroquinolinilo y similares. Los grupos heteroarilo particulares incluyen, por ejemplo, quinazolin-4-ilo 6-sustituido y 6-trifluorometil-quinazolin-4-ilo.

Cuando un grupo está opcionalmente sustituido, incluirá grupos sustituidos y no sustituidos.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo sustituido asimétricamente se pueden aislar en formas ópticamente activas o racémicas. Se conoce bien en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante la síntesis de

materiales de partida ópticamente activa. Muchos isómeros geométricos de olefinas, doble enlaces C=N, y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en el presente documento, y todos estos isómeros estables están
5 contemplados en la presente invención. Los isómeros geométricos cis y trans de los compuestos de la presente invención se describen y se pueden aislar en forma de una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas. Se proponen todas las formas quirales, diastereoméricas
10 racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, salvo que se indique específicamente la forma estereoquímica o isomérica específica.

Un enantiómero de los compuestos descritos en el presente documento puede mostrar actividad superior comparado
15 con el otro. De este modo, todas las estereoquímicas se consideran parte de la presente invención. Cuando se requiere, la separación del material racémico se puede lograr mediante HPLC usando una columna quiral o mediante resolución usando un agente de resolución tal como cloruro canfónico
20 como en Young, S.D. et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2602 - 2605 (1995).

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a los compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que
25 están, dentro del ámbito del juicio médico razonables

adecuado para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, correspondiente con una relación beneficio / riesgo
5 razonable.

Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto precursor se modifica preparando sus sales de ácido o básicas. Los
10 ejemplos de sales farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, sales de ácido mineral u orgánico de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen
15 las sales convencionales no tóxicas de las sales de amonio cuaternario del compuesto formado, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales convencionales no tóxicas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, benceno sulfónico,
20 bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético,
25 glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-

acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetionico, y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del
5 compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido mediante procesos químicos convencionales. En general, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido libre o básicas de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en un disolvente
10 orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo se prefieren. La lista de las sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985), la
15 descripción de la cual se incorpora en el presente documento por referencia.

Dado que se sabe que los profármacos potencian numerosas calidades deseables de los compuestos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación,
20 etc.) los compuestos de la presente invención se pueden administrar en forma de profármaco. De este modo, la presente invención pretende cubrir los profármacos de los compuestos reivindicados actualmente, procesos de administración de los mismos y composiciones que los
25 contienen. "Profármacos" pretende incluir cualesquiera

vehículos unidos de manera covalente que liberan un fármaco precursor activo de la presente invención *in vivo* cuando tal profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos en la presente invención se preparan modificando

5 los grupos funcionales presentes en el compuesto de tal forma que las modificaciones están escindidas, o bien en la manipulación de rutina o *in vivo*, al compuesto precursor. Los profármacos incluyen compuestos de la presente invención en los que un grupo hidroxilo, amino, o sulfidrilo está unido a

10 cualquier grupo que, cuando el profármaco de la presente invención se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre, o sulfidrilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados de acetato,

15 formiato y benzoato de alcohol y grupos funcionales amina en los compuestos de la presente invención.

"Compuesto estable" y "estructura estable" significan que indican un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de

20 pureza de una mezcla de reacción, y formulación en un agente terapéutico eficaz. La presente invención pretende incluir compuestos estables.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" pretende incluir una cantidad de un compuesto de la presente invención solo o

25 en una cantidad de la combinación de los compuestos

reivindicados o una cantidad de un compuesto de la presente invención en combinación con otros ingredientes activos eficaces para inhibir tanto CCR-2 como CCR-5 o eficaz para tratar o prevenir trastornos como se describe en el presente
5 documento.

Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" cubren el tratamiento de un estado patológico estado patológico en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluyen: (a) prevenir que el estado patológico se
10 produzca en un mamífero, en particular, cuando tal mamífero está predispuesto al estado patológico pero todavía no se ha diagnosticado por tenerlo; (b) inhibir el estado patológico, es decir, detener el desarrollo; y/o (c) aliviar el estado patológico, es decir, provocar la remisión del estado
15 patológico.

Los nombres usados en el presente documento designan una forma específica, por ejemplo, "N-1" o "P-1", no se deben considerar limitantes con respecto a cualquier otra sustancia que posee características similares o idénticas
20 físicas y químicas, sino que en su lugar se debe entender que estas designaciones son meros identificadores que se deben interpretar de acuerdo con la información de caracterización también presentada en el presente documento.

La presente invención proporciona las formas
25 cristalinas de la base libre de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-

butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida como un material novedoso, en particular, en una forma farmacéuticamente aceptable. En
5 ciertas modalidades, las formas cristalinas de la base libre están en forma sustancialmente puras. Las modalidades preferidas de la base libre se divulgan en los ejemplos como la forma N-1. De manera adicional, se cree que la base libre puede existir como la forma P-1 y/o una combinación de las
10 formas N-1 y P-1.

Como se usa en el presente documento "polimorfo" se refiere a formas cristalinas que tienen la misma composición química pero diferentes disposiciones espaciales de las moléculas, átomos, y/o iones que forman el cristal.

15 Como se usa en el presente documento "solvato" se refiere a una forma cristalina de una molécula, átomo, y/o iones que además contiene moléculas de un disolvente o disolventes incorporados en la estructura cristalina. Las moléculas de disolvente en el solvato pueden estar presentes
20 en una disposición regular y/o a disposición no ordenada. El solvato puede comprender o bien una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de las moléculas del disolvente. Por ejemplo, un solvato con una cantidad no estequiométrica de moléculas de disolvente se pueden producir a partir de la
25 pérdida parcial de disolvente del solvato.

La presente invención pretende incluir todos los isótopos de átomos se produzca en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo
5 general sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . Los compuestos marcados de manera isotópica de la invención se pueden en general preparar mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o
10 mediante procesos análogos a los descritos en el presente documento, usando un reactivo marcado de manera isotópica apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado de otra manera.

Como se usa en el presente documento "amorfo" se
15 refiere a una forma sólida de una molécula, átomo, y/o iones que no es cristalina. Un sólido amorfo no muestra un patrón de difracción de rayos X definitivo.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro," cuando se usa en referencia a una
20 forma cristalina, significa un compuesto que tiene una pureza mayor de 90 % en peso, incluyendo mayor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y 99 % en peso, y también incluyendo igual a aproximadamente 100 % en peso de Compuesto I, basándose en el peso del compuesto. El material restante comprende otra
25 (s) forma (s) del compuesto, y/o impurezas de reacción y/o

impurezas de procesamiento que surgen de su preparación. Por ejemplo, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, se puede considerar sustancialmente pura dado que tiene una pureza mayor de 90 % en peso, medida por medios que son en este momento conocidos y en general aceptados en la técnica, donde el remanente menor de 10 % en peso de material comprende otra (s) forma (s) de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, y/o impurezas de reacción y/o impurezas de procesamiento.

Las muestras de la formas cristalinas se pueden proporcionar con homogeneidad de fase sustancialmente pura, lo que indica la presencia de una cantidad dominante de una única forma cristalina y opcionalmente cantidades menores de una o más de la otras formas cristalinas. La presencia de más de una forma cristalina en una muestra se puede determinar mediante técnicas tales como difracción de rayos X en polvo (PXRD, por sus siglas en ingles) o espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR, por sus siglas en ingles). Por ejemplo, la presencia de máximos extra en la comparación de un patrón de PXRD medido experimentalmente con un patrón de PXRD simulado puede

indicar más de una forma cristalina en la muestra. El PXRD simulado se puede calcular a partir de datos de rayos X de cristal único. Véase Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns," Lawrence
5 Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (abril de 1963).

Preferiblemente, la forma cristalina tiene sustancialmente homogeneidad de fase pura como se indica por menos de 10%, preferiblemente menos de 5%, y más
10 preferiblemente menos de 2% del área del máximo total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los máximos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado. Los más preferido es una forma cristalina que tiene sustancialmente homogeneidad de fase pura con menos de 1% del
15 área del máximo total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los máximos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado.

Procesos para la preparación de las formas cristalinas se conocen en la técnica. Las formas cristalinas
20 se pueden preparar mediante una diversidad de procesos, incluyendo por ejemplo, cristalización o recristalización en un disolvente adecuado, sublimación, crecimiento en estado fundido, transformación de estado sólido desde otra fase, cristalización en un fluido supercrítico, y pulverización de
25 inyección. Técnicas para la cristalización o

recristalización de formas cristalinas en una mezcla de disolventes, por ejemplo, evaporación del disolvente, disminuyendo la temperatura de la mezcla del disolvente, siembra de cristal en una mezcla de disolvente supersaturado de la molécula y/o sal, secado por congelación de la mezcla del disolvente, y adición de antidisolventes (contra disolventes) a la mezcla de disolventes.

Las formas se pueden caracterizar y distinguir usando difracción de rayos X de cristal único, que se basa en las mediciones de celda unitaria de un único cristal de una forma a una temperatura analítica fija. Una descripción detallada de celdas unitarias se proporciona en Stout et al., Capítulo 3, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968). Como alternativa, la disposición única de átomos en relación espacial dentro de la red cristalina se puede caracterizar de acuerdo con las coordenadas atómicas fraccionales observadas. Otros medios de caracterización de la estructura cristalina es mediante análisis de difracción de rayos X en polvo en el que el perfil de difracción experimental u observado se compara con un perfil simulado que representa material en polvo puro, ambos desarrolladas a la misma temperatura analítica, y las mediciones para la forma sujeto caracterizada como una serie de valores 2θ .

Otros medios de caracterización de la forma se

pueden usar, tales como resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR), calorimetría de barrido diferencial y análisis termogravimétrico. Estos parámetros también se pueden usar en combinación para caracterizar la forma sujeta.

5 El término "pérdida de peso insignificante," como se emplea en el presente documento, como se caracteriza por TGA indica la presencia de una forma cristalina pura (no solvatada).

10 En una modalidad de la invención, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, se proporciona en forma sustancialmente pura. Esta forma cristalina se puede emplear en composiciones farmacéuticas

15 que puede incluir opcionalmente uno o más de los componentes diferentes seleccionados, por ejemplo, a partir del grupo constituido por excipientes, vehículos, y uno de los ingredientes farmacéuticamente activos o entidades químicas activas diferentes de diferentes estructuras moleculares.

20 Preferiblemente, la forma cristalina tiene sustancialmente homogeneidad de fase pura como se indica en menos de 10%, preferiblemente menos de 5%, y más preferiblemente menos de 2% del área del máximo total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los

25 máximos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado.

Los más preferido es una forma cristalina que tiene sustancialmente homogeneidad de fase pura con menos de 1% del área del máximo total en el patrón de PXRD medido experimentalmente que surge de los máximos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado.

En otra modalidad, se proporciona una composición que consta esencialmente de las formas cristalinas de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal. La composición de esta modalidad puede comprender al menos 90 % en peso de la forma, basándose en el peso de la composición.

La presencia de impurezas de reacción y/o impurezas de procesamiento se puede determinar mediante técnicas analíticas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas o espectroscopía infrarroja.

Las formas cristalinas se pueden preparar mediante una diversidad de procesos, incluyendo por ejemplo, cristalización o recristalización en un disolvente adecuado, sublimación, crecimiento en un estado fundido, transformación de estado sólido de otra fase, cristalización en un fluido supercrítico, y pulverización de chorro. Técnicas para la cristalización o recristalización de formas

cristalinas en una mezcla de disolventes incluyen, por ejemplo, evaporación del disolvente, disminución de la temperatura de mezcla de disolventes, siembra de cristal en una mezcla de disolvente supersaturado de la molécula y/o
5 sal, secado por congelación de la mezcla del disolvente, y adición de antidisolventes (contra disolventes) a la mezcla de disolventes. Las técnicas de cristalización de alto rendimiento se pueden emplear para preparar formas cristalinas incluyendo polimorfos.

10 Los cristales de fármacos, incluyendo polimorfos, procesos de preparación, y caracterización de cristales de fármacos se describen en Byrn, S.R. et al., Solid-State Chemistry of Drugs, 2ª Edición, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

15 Para las técnicas de cristalización que emplean disolvente, la elección de disolvente o disolventes depende típicamente de uno o más factores, tales como solubilidad del compuesto, técnica de cristalización, y presión de vapor del disolvente. Las combinaciones de disolventes se pueden
20 emplear; por ejemplo, el compuesto se puede solubilizar en un primer disolvente para producir la solución, seguido de la adición de un antidisolvente para disminuir la solubilidad del compuesto en la solución y para producir la formación de cristales. Un "antidisolvente" es un disolvente en el que el
25 compuesto tiene baja solubilidad. Los disolventes adecuados

para preparar cristales incluyen disolventes polares y no polares.

En un proceso para preparar cristales, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, se suspende y/o se agita en un disolvente adecuado para producir una suspensión, que se puede calentar para promover la disolución. El término "suspensión," como se usa en el presente documento, significa una solución saturada, que también puede contener una cantidad adicional del sólido para producir una mezcla heterogénea a una temperatura dada. Los disolventes adecuados a este respecto incluyen, por ejemplo, disolventes polares apróticos y disolventes polares próticos disolventes, y las mezclas de dos o más de éstos, como se divulga en el presente documento.

Se pueden añadir cristales de siembra a cualquier mezcla de cristalización para promover la cristalización. Como estará claro para los expertos en la técnica, la siembra se usa como un medio de control de crecimiento de una forma cristalina particular o como un medio de control de la distribución del tamaño de partícula del producto cristalino. De acuerdo con lo anterior, el cálculo de la cantidad de semillas necesaria depende del tamaño de la semilla disponible y el tamaño deseado de una media de partícula de

producto como se ha descrito, por ejemplo, en Mullin, J.W. et al., "Programmed cooling of batch crystallizers," Chemical Engineering Science, 26:369 - 377 (1971). en general, las semillas de tamaño pequeño son necesarias para controlar de
5 manera eficaz el crecimiento de cristales en el lote. Se pueden semillas de pequeño tamaño, tamizando, moliendo o micronizando los cristales más grandes, o mediante microcristalización de soluciones. Se debe tener cuidado en la molienda o micronización de cristales de los cristales no
10 dé cómo resultado ningún cambio en la cristalinidad de la forma de cristal deseada (es decir, cambio a amorfo o a otro polimorfo).

Se puede filtrar una mezcla enfriada bajo vacío, y los sólidos aislados se pueden lavar con un disolvente
15 adecuado, tal como disolvente de recristalización frío, y secar en una purga de nitrógeno para producir la forma cristalina deseada. Los sólidos aislados se pueden analizar mediante una técnica espectroscópica o analítica adecuada, tales como SSNMR, DSC, PXRD, o similares, para asegurar la
20 formación de la forma cristalina preparada del producto. La forma cristalina resultante se produce típicamente en una cantidad mayor de aproximadamente 70 % en peso de rendimiento aislado, pero preferiblemente mayor de 90 % en peso basado en el peso de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-
25 tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-

oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, empleada originalmente en el proceso de cristalización. El producto se puede moler conjuntamente o pasar a través de una tamiz de malla para quitar los grumos del producto, si es
5 necesario.

Las formas cristalinas se pueden preparar directamente a partir del medio de reacción de la etapa de proceso final para preparar N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-
10 a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal. Esto se puede lograr, por ejemplo, empleando en la etapa de proceso final un disolvente o mezcla de disolventes a partir de los cuales el compuesto se puede cristalizar. Como alternativa, formas
15 cristalinas se pueden obtener mediante técnicas de destilación o de adición de disolvente. Los disolventes adecuados para este propósito incluyen cualquiera de esos disolventes descritos en el presente documento, incluyendo disolventes próticos polares, tales como alcoholes, y
20 disolventes polares apróticos, tales como cetonas.

A modo de guía general, la mezcla de reacción se puede filtrar para retirar cualesquiera impurezas no deseadas, sales inorgánicas, y similares, seguido de lavado con disolvente de reacción o cristalización. La solución
25 resultante se puede concentrar para eliminar el exceso de

disolvente o constituyentes gaseosos. Si se emplea destilación, la cantidad última de destilado recogido puede variar, dependiendo de los factores de proceso que incluyen, por ejemplo, tamaño de recipiente, capacidad de agitación, y
5 similares. A modo de guía general, la solución de reacción se puede destilar hasta aproximadamente 1/10 del volumen original antes de que se lleve a cabo el reemplazo del disolvente. La reacción se puede muestrear y ensayar para determinar el grado de la reacción y el % en peso de producto
10 de acuerdo con técnicas de proceso convencionales. Si se desea, el disolvente de reacción adicional se puede añadir o retirar para optimizar la concentración de reacción. Preferiblemente, la concentración final se ajusta hasta aproximadamente el 50 % en peso momento en el que se produce
15 típicamente una suspensión.

Puede ser preferible añadir disolventes directamente al recipiente de reacción sin destilar la mezcla de reacción. Los disolventes preferidos para este propósito son los que pueden participar por último en la retícula
20 cristalina, como se ha divulgado conjuntamente junto con el cambio de disolvente. Aunque la concentración final puede variar dependiendo de la pureza deseada, recuperación y similares, la concentración final de la base libre en solución es preferiblemente aproximadamente 4% y
25 aproximadamente 7%. La mezcla de reacción se puede agitar

después de la adición de disolvente y calentarse de manera simultánea. A modo de ilustración, la mezcla de reacción se puede agitar durante aproximadamente 1 hora mientras se calienta hasta aproximadamente 70°C. La reacción
5 preferiblemente se filtra en caliente y se lava con o bien el disolvente de reacción, el disolvente añadido o su combinación. Los cristales de siembra añadidos a cualquier solución de cristalización para iniciar la cristalización.

Las diversas formas divulgadas en el presente
10 documento pueden ser distinguibles entre sí mediante el uso de diversas técnicas analíticas conocidas por los expertos en la técnica. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, difracción de rayos X en polvo (PXRD), calorimetría de barrido diferencial (DSC) y/o análisis termogravimétrico
15 (TGA, por sus siglas en ingles). Como alternativa, las formas se pueden caracterizar y distinguir usando difracción de rayos X de cristal único, que se basa en mediciones de celda unitaria de un único cristal de una forma dada a una temperatura analítica fija. Una descripción detallada de
20 celdas unitarias se proporciona en Stout et al., Chapter 3, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., Nueva York (1968). Específicamente, la única disposición de átomos en relación espacial dentro de la red cristalina se puede caracterizar de acuerdo con las
25 coordenadas atómicas fraccionales observadas. Otros medios

de caracterización de la estructura cristalina es mediante análisis de difracción de rayos X en polvo en el que el perfil de difracción observada se compara con un perfil simulado generado a partir de los datos de estructura de cristal único.

- 5 Mediciones de difracción de rayos X en polvo para la forma sujeto se caracterizan como una serie de valores 2θ (usualmente cuatro o más).

Otros medios de caracterización de la forma se pueden usar, tales como espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR, por sus siglas en ingles), calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en ingles), termografía y examen en bruto de la morfología cristalina y amorfa. Estos parámetros también se pueden usar en combinación para caracterizar la forma sujeto.

- 15 Los expertos en la técnica apreciarán que un patrón de difracción de rayos X se puede obtener con una error de medición que depende de las condiciones de medición empleadas. En particular, en general se sabe que las intensidades en un patrón de difracción de rayos X puede fluctuar dependiendo de las condiciones de medición empleadas y la forma o morfología del cristal. Además se debe entender que las intensidades relativas también pueden variar dependiendo de las condiciones experimentales y, de acuerdo con lo anterior, el orden exacto de intensidad no se debe tomar en cuenta. De manera adicional,
- 20 un error de medida del ángulo de difracción para un patrón de
- 25

difracción de rayos X convencional es típicamente aproximadamente 0.2° de los valores 2θ o menos, preferiblemente aproximadamente 0.1° de los valores 2θ (como se describe en el presente documento más adelante), y tal grado de error de

5 medida se debe tener en cuenta como perteneciente a los ángulos de difracción anteriormente mencionados. Por consiguiente, se debe entender que las formas cristalinas de la presente invención no se limitan a las formas cristalinas que proporcionan patrones de difracción de rayos X completamente

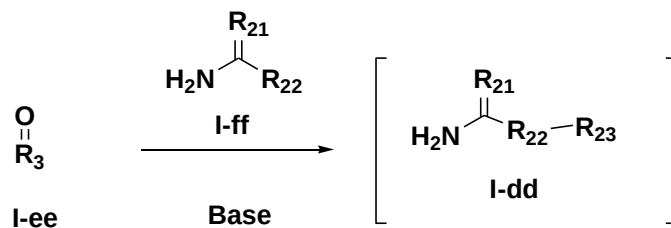
10 idénticos a los patrones de difracción de rayos X mostrados en las Figuras adjuntas divulgadas en el presente documento. Cualesquiera formas cristalinas que proporcionan patrones de difracción de rayos X sustancialmente idénticos a los descritos en las Figuras adjuntas caen dentro del ámbito de la presente

15 invención. La capacidad de determinar identidades sustanciales de patrones de difracción de rayos X está dentro de alcance de los expertos en la técnica.

Síntesis

Esquema de reacción 1: Preparación de hidrazona I-

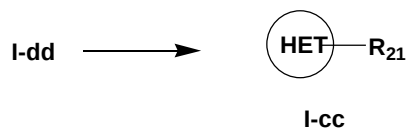
20 dd



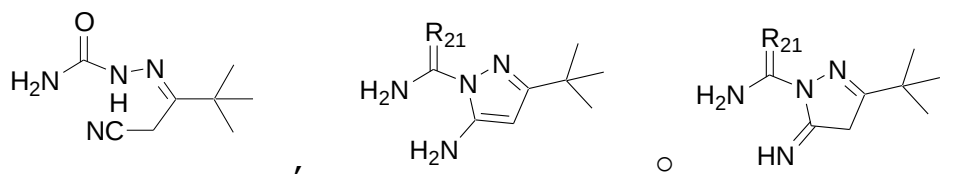
25 Una carbazida de Fórmula I-ff, tal como

clorhidrato de semicarbazida, se condensó con un compuesto de Fórmula I-ee, tal como pivaloil acetonitrilo, en un disolvente, por ejemplo, etanol, 2-propanol, 1-propanol y metanol, preferiblemente etanol, en la presencia de una base, por ejemplo, acetato de sodio, acetato de potasio, trietilamina y N-N-diisopropil-N-etil amina, preferiblemente acetato de sodio, a una temperatura en el intervalo de 20 - 60°C, preferiblemente, en el intervalo de 25 - 55°C, proporcionando el compuesto de hidrazona de Fórmula I-dd, en la que R_{21} es =O; R_{22} es -NH-NH₂ y R_{23} es cianoalquilo; o R_{22} y R_{23} se pueden tomar conjuntamente formando un anillo de 5- a 8- miembros, en el que el anillo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre amino, alquilo, arilo, o heteroarilo y opcionalmente puede contener 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos independientemente seleccionados entre el grupo constituido por N, S, u O.

Esquema de reacción 2: Preparación de hidrazona de Fórmula I-cc

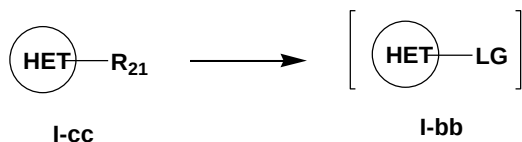


Un compuesto de hidrazona de Fórmula I-dd, tal como



se hizo reaccionar con un ortoformiato, por
 5 ejemplo, trimetilortoformiato, trietilortoformiato, y
 tripropilortoformiato, preferiblemente, trimetilortoformiato,
 ortoformiato en la presencia de un ácido, por ejemplo, ácido
 acético, ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico y ácido
 metanosulfónico, preferiblemente ácido acético, a temperatura
 10 elevada, tal como 40 - 90°C, preferiblemente, 40 - 75°C,
 produciendo el compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc, en la
 que $R_{21} = O$ y R_{22} and R_{23} son como se han establecido
 anteriormente.

Esquema de reacción 3: Conversión del Compuesto I-
 15 cc

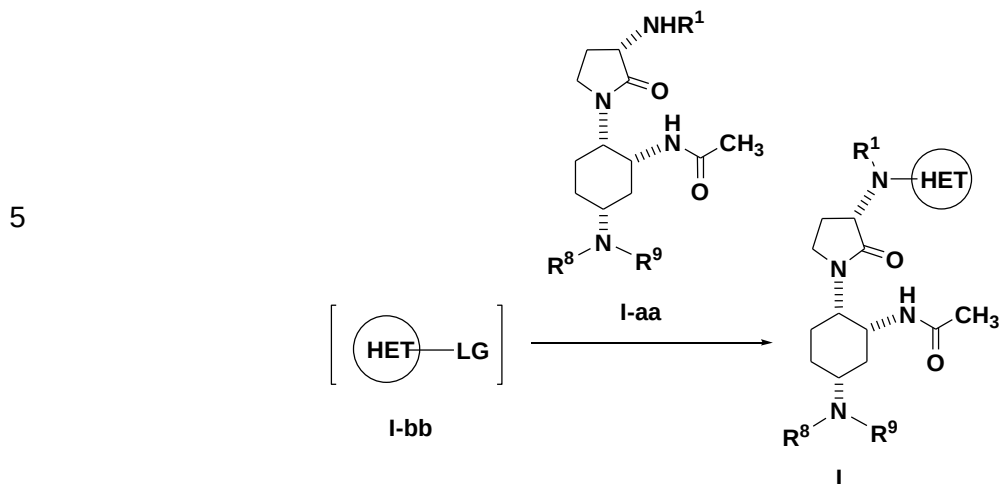


Un compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc se
 convierte en un compuesto de Fórmula I-bb, en la que LG es -
 20 OR_{16} , en la que R_{16} es alquilo C_{1-6} , fenilo, un heteroarilo de
 5- a 7- miembros que tiene uno o más átomos seleccionados
 entre N, S, u O, o un cicloalquilo de 3- a 7- miembros, todos
 los cuales están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos
 seleccionados entre halógeno, CF_3 o alquilo C_{1-6} , haciendo
 25 reaccionar el compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc, por

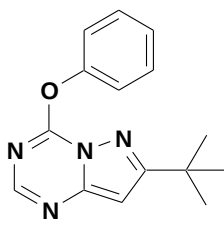
ejemplo, 7-tert-butil-3H-pirazol[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ona, con un agente acilante, un nucleófilo, tal como dimetil 4-aminopiridina (DMAP), y/o una base de amina terciaria, en un disolvente, por ejemplo, acetonitrilo, 5 diclorometano y oxicloruro de fósforo puro, seguido de la intercepción con o bien (i) un alcohol en la presencia de una segunda base de amina terciaria o (ii) un alcóxido formando un compuesto de Fórmula I-bb. Los ejemplos de agentes acilantes que se pueden usar son oxicloruro de 10 fósforo (POCl_3), cloruro de oxalilo, cloruro de tionilo y fosgeno. Un agente acilante preferido es POCl_3 . Trietilamina, N-N-diisopropil-N-etil amina (DIEA), tri-n-propilamina, N-metil morfolina y 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) son ejemplos de bases 15 de amina terciaria que se pueden usar en la conversión. Una base de amina terciaria es DIEA. En general, la cantidad de nucleófilo usado en la reacción es 2.0 a 4.0, preferiblemente, 3.0, equivalentes. Los ejemplos de alcoholes o alcóxidos que se pueden usar en la conversión 20 son fenol, pentafluorofenol, metanol, etanol, metóxido de sodio y fenolato de sodio siendo fenol el alcohol preferido. En general, la reacción e intercepción se puede llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de temperatura ambiente a 70°C .

25 Esquema de reacción 4: Preparación de un compuesto

de Fórmula I, o una sal del mismo



10 Un compuesto de Fórmula I-bb, por ejemplo,



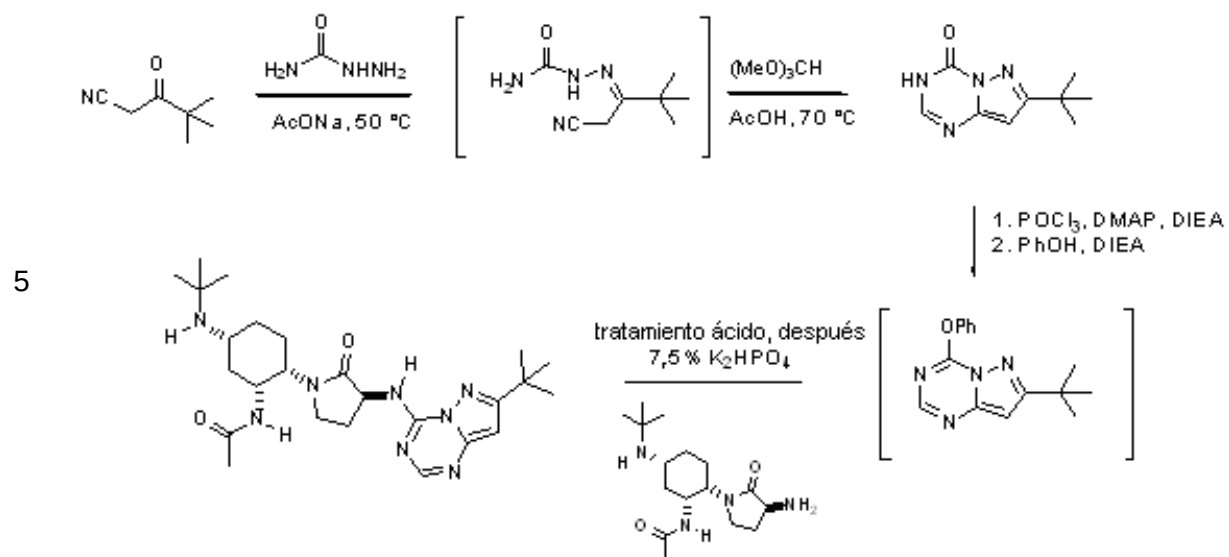
15 se acopla con un compuesto de Fórmula I-aa, preparado de manera similar al divulgado en el documento WO 2008/014381 A1, en el que: R₁ es independientemente hidrógeno o un grupo protector de amina seleccionado entre un grupo carbobenciloxi (Cbz), un grupo tert-butiloxycarbonilo (BOC), un grupo

20 fluorenilmetiloxycarbonilo (FMOC), un grupo bencilo (Bn), y un grupo p-metoxibencilo (PMB), preferiblemente hidrógeno; R₈ y R₉ son independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₆; R₂₁ es =O; HET es un anillo bicíclico heterociclo o heteroarilo de 3- a 14- miembros opcionalmente sustituido que tiene al menos

25 un heteroátomo de nitrógeno, preferiblemente dos a cuatro

heteroátomos totales, especialmente cuatro átomos de nitrógeno; y LG es $-OR_{16}$, en el que R_{16} es alquilo C_{1-6} , fenilo, un heteroarilo de 5- a 7- miembros que tiene uno o más átomos seleccionados entre N, S, u O, o un cicloalquilo de 3- a 7- miembros todos los cuales están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos seleccionados entre halógeno, CF_3 o alquilo C_{1-6} , obteniendo el compuesto de Fórmula I correspondiente, por ejemplo, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal de la misma. El acoplamiento se puede realizar mediante procesos de acoplamiento conocidos comúnmente en la técnica, o, como alternativa, mediante un tratamiento ácido seguido de la adición de una base. Los ejemplos de ácidos que se pueden usar en el tratamiento ácido son ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glicólico, y ácido clorhídrico. Los ejemplos de bases que se pueden añadir son K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , $NaHCO_3$ y $KHCO_3$.

Específicamente, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida se puede preparar de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



10 Para el proceso de la presente invención, los materiales de partida están comercialmente disponibles o se pueden preparar fácilmente por los expertos en la técnica. Disolventes, temperaturas, presiones, materiales de partida que tienen los grupos deseados, y otras condiciones de

15 reacción, se pueden fácilmente seleccionar según sea apropiado por los expertos en la técnica. El proceso se puede aumentar a escala con el fin de preparar mayores cantidades del compuesto de Fórmula I, tal como en la instalación de la producción comercial.

20 Ejemplos

Los siguientes Ejemplos ilustran las modalidades de los compuestos de la invención y materiales de partida, y no se pretende que limiten el alcance de las reivindicaciones.

Según sea apropiado, reacciones se llevaron a cabo

25 en una atmósfera de nitrógeno seco (o argón). Para las

reacciones anhidras, se emplearon disolventes DRISOLV® de EM. Para otras reacciones, se utilizaron disolventes de calidad reactivo o de calidad HPLC. Salvo que se establezca otra cosa, todos los reactivos obtenidos comercialmente se usaron
5 como se han recibido.

Las mediciones de CL/EM se obtuvieron usando un sistema híbrido de espectrómetro de masas quadropolar único Shimadzu HPLC/Waters ZQ. Los datos para el máximo de interés se reseñan a partir de los espectros de resonancia magnética
10 nuclear (RMN) de ionización por electropulverización en modo positivo se obtuvieron típicamente en instrumentos Bruker o JEOL 400 MHz y 600 MHz en los disolventes indicados. Todos los desplazamientos químicos se reseñan en ppm en tetrametilsilano con la resonancia del disolvente como el
15 patrón interno. Los datos de espectros de ^1H RMN se reseñan típicamente como sigue: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, s a = singlete ancho, d = doblete, dd = doblete de dobletes, t = triplete, c = cuarteto, sep = septeto, m = multiplete, app = aparente), constante de acoplamiento (Hz), e integración.

20 Los expertos en la técnica reconocerán las abreviaturas estándar utilizadas en el presente documento. Para facilidad de referencia, las abreviaturas incluyen, pero no se limitan necesariamente a: Hg = mercurio; sat. = saturados, HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento, AP = porcentaje de área, KF
25 = Karl-Fischer, RT = temperatura ambiente (salvo que se especifique de

otra manera RT es una temperatura de aproximadamente 22°C), mmol = milimoles, HRMS = espectroscopía de masas de alta resolución, °C = grados Celsius, kg - kilogramo o kilogramos, g = gramo o gramos, mg = miligramo o miligramos, l = litro o litros, ml (o mL) = mililitro o mililitros, h o hr = hora u horas, M = molar, N = normal, min = minuto o minutos, MHz = megahercio, v/v = volumen a relación de volumen, %p/p = porcentaje de peso/peso, p% = porcentaje en peso, nm = nanometro o nanómetros, LOD = pérdida de secado.

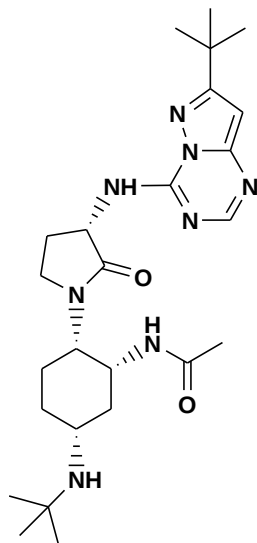
"α", "β", "R" y "S" son designaciones estereoquímicas familiares para los expertos en la técnica.

Ejemplo 1

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-Butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida

15

20



Ejemplo 1, Etapa 1: A un matraz de fondo redondo de 3 l se añadió clorhidrato de semicarbazida (100.0 g, 0.89 moles), pivaloil acetonitrilo (112.2 g, 0.89 moles) y etanol

(1 l) a 22 - 25°C. Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se enfrió hasta 12 - 15°C y se añadió acetato de sodio anhidro (73.5 g, 0.89 moles). La adición del acetato de sodio anhidro era endotérmica elevando por lo tanto la temperatura hasta 22 - 25°C. La mezcla de reacción se mantuvo a 22 - 25°C y se agitó durante 60 - 90 minutos. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC, que indicó que la formación del intermedio hidrazona estaba completa.

10 Ejemplo 1, Etapa 2: La mezcla de reacción se calentó después hasta 68 - 72°C y se añadió trimetilortoformiato (475.7 g, 4.48 moles) durante un período de 5 - 10 minutos. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta 40 - 45°C y después se añadió ácido acético (53.8 g, 15 0.89 moles) durante un período de 15 - 20 minutos. Tras la finalización de la adición, la temperatura se aumentó hasta 70±2°C durante un período de 20 - 25 min. Una vez a la temperatura prescrita, la mezcla de reacción se agitó durante 18 - 20 hr. A la finalización de este período, la mezcla de 20 reacción se analizó mediante HPLC, que indicó que la formación de la pirazol[1,5-a][1,3,5]triazina se había completado.

 Ejemplo 1, Etapa 3: La pirazol[1,5-a][1,3,5]triazina del Ejemplo 1, Etapa 2, se concentró a 50 - 25 55°C a presión reducida (~ 5-10 mm Hg) produciendo un

residuo. Se añadieron tetrahidrofurano (THF, 2 l) y acetona (2 l) al residuo, y la mezcla resultante se agitó a 50 - 55°C durante 90 minutos. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró a través de embudo Buckner para retirar el
5 cloruro de sodio resultante (NaCl) y acetato de sodio (NaOAc) precipita. El filtrado resultante se concentró hasta sequedad a 50 - 55°C a presión reducida (~ 400 - 450 mm Hg) produciendo un residuo. El residuo se recogió en 2-metilortoformiato (2-metil THF, 450 ml) y la mezcla
10 resultante se agitó a 22 - 25°C durante dos (2) horas. A la finalización de este período, la mezcla de reacción se filtró y después se lavó por pulverización con 2-metil THF (100 ml), seguido de tert-butil metil éter (MTBE, 200 ml). El producto resultante se secó a 45 - 50°C a presión reducida (~ 400 -
15 450 mm Hg) proporcionando 7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-ona (107.0 g, 62.1% p/p, HPLC de pureza: 99.2 AP a 220 nm). Se repitieron las etapas 1 a 3 a gran escala produciendo cantidades de kilogramos de 7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-ona.

20 Ejemplo 1, Etapa 4: A un reactor de vidrio revestido se añadió 7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-ona (1.0 kg, 5.2 moles), dimetil 4-aminopiridina (1.27 kg, 10.4 moles), acetonitrilo (10 l), y diisopropiletilamina (0.672 kg, 5.2 moles). La suspensión
25 resultante se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera

de nitrógeno durante un período de no menos de 15 minutos hasta que se formó una solución transparente. La solución transparente se añadió lentamente a un segundo reactor de vidrio revestido que contenía acetonitrilo (6.0 l) y

5 oxicloruro de fósforo (POCl_3 , 0.822 kg, 5.3 moles). Tras la finalización de la adición, la mezcla resultante se agitó por debajo de 35°C durante 2 horas. A la finalización de este período, la reacción se analizó mediante HPLC, que indicó que la reacción se había completado. Se añadieron fenol (0.64

10 kg, 6.8 moles) y diisopropiletilamina (0.87 kg) y la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante no menos de 1 hr. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC, que indicó que la reacción se había completado. Se añadieron 2-

15 Metil-THF (20 l), seguido de agua (10 l) a la mezcla de reacción. Las fases orgánica y acuosa se separaron y la fase acuosa se descartó. La fase orgánica se lavó con una solución de ácido cítrico - salmuera (5 % en peso, 10 l), y las fases orgánica y acuosa se separaron y la fase

20 acuosa se descartó de nuevo. El lavado anterior con solución de ácido cítrico - salmuera se repitió dos veces más. Tras la finalización de los lavados con solución de ácido cítrico - salmuera, se añadió una solución básica de fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4 , 7.5 % en peso, 10 l).

25 Las fases orgánica y acuosa se separaron y se descartó la

fase acuosa. El lavado con solución de K_2HPO_4 se repitió una vez más hasta pH ~8.

Ejemplo 1, Etapa 5: N-[2-(3-Amino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-tert-butilamino-ciclohexil]-acetamida

5 (preparada de una manera similar a la divulgada en la Publicación de Estados Unidos N° 2008/0027083 A1, 1.05 kg) se añadió a la fase orgánica básica del Ejemplo 1, Etapa 4. Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 hr. A
10 la finalización de este período, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC, que indicó que la reacción se había completado. Se añadieron agua (20 l) seguido de ácido acético (HOAc, 0.406 kg) a la mezcla de reacción, y las fases orgánica y acuosa resultantes se separaron. La fase
15 acuosa se extrajo con 2-metil THF (10 l). Se combinaron las fases orgánicas y se añadió HOAc (0.406 kg). La mezcla resultante se lavó con agua (10 l) y las fases orgánica y acuosa resultantes se separaron. Esta fase acuosa se extrajo de nuevo con 2-metil-THF (10 l). Se
20 combinaron de nuevo las fases acuosas y se añadió diclorometano (DCM, 15 l). Se añadió hidróxido de sodio (NaOH, 10 N, 1.04 l) para ajustar el pH hasta ~ 13.0. Tras la finalización de la adición, las fases orgánica y acuosa se separaron de nuevo y la fase de DCM rica en
25 producto se reservó. La fase acuosa se extrajo con

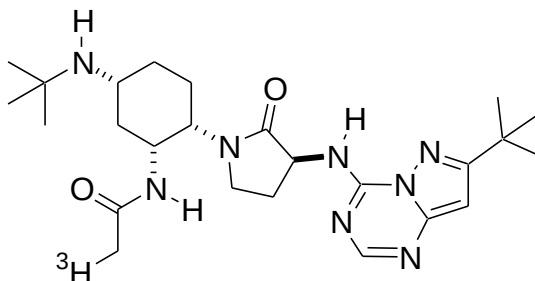
diclorometano adicional (10 l). Las fases orgánicas ricas en DCM se combinaron y se lavaron con agua (10 l). La solución resultante de DCM rica en producto se concentró a vacío hasta un volumen mínimo. Se añadió acetato de etilo (EtOAc) y el DCM y agua residuales se retiraron por destilación continuamente produciendo una suspensión (volumen final ~ 5 l). Se añadió MTBE (15 l) se añadió y la suspensión resultante se agitó durante no menos de 1 hr.

Después de este tiempo, la suspensión se filtró y la torta de filtro húmedo se lavó con MTBE adicional (5 l). La torta húmeda se secó a 55°C a vacío hasta una LOD $\leq$ 0.5 % en peso produciendo la base libre amorfa del Ejemplo 1 (0.9 kg, 55 M % de rendimiento, pureza por HPLC: 99.5 AP). ^1H RMN (600.13 MHz, DMSO- d_6) δ 1.04 (s, 9H), 1.34 (s, 9H), 1.58 (m, 3H), 1.64 (m, 2H), 1.81 (s, 3H), 2.05 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.93 (s a, 1H), 3.48 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 4.26 (s a, 1H), 4.86 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.94 (s a, 1H); ^{13}C RMN (125.8 MHz, DMSO- d_6) δ 21.3, 23.3, 25.9, 29.3, 30.0, 32.2, 32.6, 35.5, 43.1, 46.5, 47.7, 50.7, 51.7, 52.5, 92.3, 148.7, 148.8, 152.9, 167.3, 168.5, 171.2; HRMS calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_8\text{O}_2$ (M+1) 485.3274, encontrado 485.3343.

Ejemplo 2

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida marcada con tritio

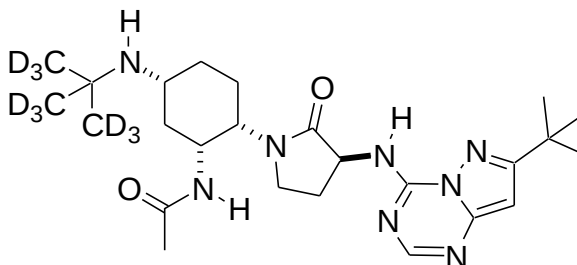
5

Ejemplo 3

10

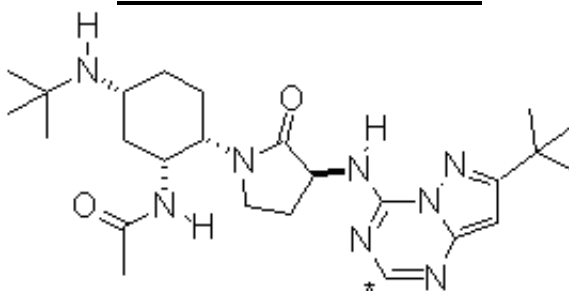
N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida marcada con deuterio

15

Ejemplo 4

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida marcada con carbono 14

20



25

* = Posición de la etiqueta ¹⁴C

Ejemplo 5**Forma N-1 cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida**

5 Una forma cristalina de base libre de N-
 ((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-
 butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-
 oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, incluyendo sus
 formas de sal, y solvatos, se preparó y se caracterizó como
 10 se describe más adelante.

Procesos para la Caracterización de las Formas**Datos de cristal único**

Se recogieron los datos en un difractómetro de
 serie Bruker-Nonius (Bruker AXS, Inc., 5465 East Cheryl
 15 Parkway Madison, WI 53711 USA) CAD4. Los parámetros de celda
 unitaria se obtuvieron a través de análisis de mínimos
 cuadrados de las situaciones de difractómetro experimentales
 de reflexiones 25 de ángulo alto. Las intensidades se
 midieron usando radiación Cu K α (λ = 1.5418 Å) a una
 20 temperatura constante con la técnica de barrido variable θ -2 θ
 y se corrigieron solamente por los factores de polarización
 de Lorente. Se recogieron las cuentas de fondo en los
 extremos del barrido durante la mitad del tiempo del barrido.
 De manera alternativa, se recogieron los datos de cristal
 25 único sobre un sistema Bruker-Nonius Kappa CCD 2000 usando

radiación Cu K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). La indexación y procesamiento de los datos de intensidad medidos se llevaron a cabo en el paquete software HKL2000 (Otwinowski, Z. et al. en Macromolecular Crystallography, Carter, W.C., Jr. et al., eds., Academic, NY, publ., Vol. 276, p. 307 - 326 (1997)) en la serie de programa Collect. (Collect Data collection and processing user interface: Collect: Data collection software, R. Hooft, Nonius B.V., 1998.) De manera alternativa, los datos de cristal único se recogieron en un sistema Bruker-AXS APEX2 CCD usando radiación Cu K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). La indexación y procesamiento de los datos de intensidad medidos se llevaron a cabo en la serie paquete/programa APEX2 (APEX2 Data collection and processing user interface: APEX2 User Manual, v1.27; Bruker AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 Estados Unidos).

Cuando esté indicado, los cristales se enfriaron en la corriente de enfriamiento de un sistema criogénico de Oxford (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: Cosier, J. et al., J. Appl. Cryst., 19:105 (1986)) durante la recogida de datos.

Las estructuras se resolvieron mediante procesos directos y se refinaron en la base de reflexiones observadas usando o bien el paquete de software SDP (SDP, Structure Determination Package, Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716. Factores de difusión, incluyendo f' y f'' , en el software SDP

se recogieron de las International Tables for Crystallography, Kynoch Press, Birmingham, England, Vol. IV, Tablas 2.2A y 2.3.1 (1974)) con modificaciones locales secundarias o los paquetes cristalográficos MAXUS (serie de
 5 software maXus solution and refinement: Mackay, S. et al., maXus: a computer program for the solution and refinement of crystal structures from diffraction data o SHELXTL4. Los parámetros atómicos derivados (coordenadas y factores de temperatura) se refinaron mediante mínimos cuadrados de
 10 matriz entera. La función minimizada en los refinamientos era $\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2$. R se define como $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ mientras $R_w = [\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2 / \sum_w |F_o|^2]^{1/2}$ donde w es una función de ponderación apropiada basándose en los errores en las intensidades observadas. Se examinaron mapas de
 15 diferencias en todas las fases de refinamiento. Se introdujeron hidrógenos en las posiciones idealizadas con factores de temperatura isotrópicas, pero no se variaron los parámetros de hidrógeno.

Datos de difracción en polvo de rayos X (PXRD)

20 Se obtuvieron los datos de PXRD usando un Bruker C2 GADDS. La radiación fue Cu K α (40 KV, 50 mA). La distancia de detector de muestra era 15 cm. Las muestras en polvo se colocaron en capilares de vidrio sellados de 1 mm o menos de un diámetro; el capilar se rotó durante la recogida de datos.
 25 Los datos se recogieron para $3 \leq 2\theta \leq 35^\circ$ con un tiempo de

exposición de muestra de al menos 2000 segundos. Los arcos de difracción de dos dimensiones resultantes se integraron para crear un patrón de 1 dimensión de PXRD tradicional con un tamaño de incremento de 0.02 grados 2θ en el intervalo de 3 a 35 grados 2θ . Se colocaron aproximadamente 200 mg en un portador de muestras Philips de difracción de rayos X en polvo (PXRD). La muestra se transfirió a una unidad Philips de MPD (45 KV, 40 mA, Cu $K\alpha$). Los datos se recogieron a temperatura ambiente en el intervalo 2 a 32 2θ (modo de barrido continuo, velocidad de barrido 0.03 grados/seg., rendijas de auto divergencia y anti difusión, rendija receptora: 0.2 mm, dispositivo de rotación de muestras: ON)

Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Experimentos DSC se realizaron en un TA INSTRUMENTS® modelo Q1000 o 2920. La muestra (aproximadamente 2 - 6 mg) se pesó en una bandeja de aluminio y se reseñó exactamente registrado hasta una centésima de miligramo, y se transfirió a DSC. El instrumento se purgó con gas nitrógeno a 50ml/min. Los datos se recogieron entre temperatura ambiente y 300°C a 10°C/min de velocidad de calentamiento. La representación gráfica se realizó con los máximos endotérmicos señalando hacia abajo.

Análisis gravimétrico térmico (TGA)

Se realizaron experimentos TGA en un TA INSTRUMENTS® modelo Q500 ó 2950. La muestra (aproximadamente

10 - 30 mg) se colocó en una bandeja de platino tarada
 previamente. El peso de la muestra se midió exactamente y se
 registró hasta una milésima de miligramo mediante el
 instrumento. El horno se purgó con gas nitrógeno a 100
 5 ml/min. Los datos se recogieron entre temperatura ambiente y
 300°C a 10°C/min de velocidad de calentamiento.

Preparación y análisis de la formas

Los datos de celda unitaria y otras propiedades para el
 ejemplo se presentan en la Tabla 1. Los parámetros de celda unitaria
 10 se obtuvieron a partir de un análisis cristalográfico de rayos X de
 cristal único. Una referencia detallada de celdas unitarias se puede
 encontrar en el capítulo 3 de Stout et al., X-Ray Structure
 Determination: a Practical Guide, Macmillan (1968).

Finalmente, la Figura 1 presenta el patrón de XRPD por
 15 ejemplo 5. Las Figuras 2 y 3 divulgan el análisis de DSC y TGA,
 respectivamente, del Ejemplo 5.

Preparación de la forma, caracterización de XRD, DSC y TGA

Ejemplo 5, Forma N-1, Base libre

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-Butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-
 20 butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-
 il)ciclohexil)acetamida, forma N-1, se cristalizó en acetato de etilo y
 MTBE. Forma N-1, es una forma pura (sin moléculas de agua odisolvente)
 de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-
 butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-
 25 il)ciclohexil)acetamida. La Forma N-1 se caracterizó mediante un

patrón de XRD que coincide con el patrón simulado generado a partir de los datos de estructura de cristal único. Forma N-1 se caracterizó mediante un termograma de DSC que tiene endotermia fusión/descomposición con un comienzo típicamente a aproximadamente 205°C. La Forma N-1 se caracterizó por una curva térmica TGA que tiene una pérdida de peso de hasta aproximadamente 210°C.

Tabla 1

Parámetros de celda unitaria

10

15

20

Compuesto	Exp 5
Estructura	Base
Forma	N-1
T	-70
a (Å)	7.3085 (6)
b (Å)	16.257 (1)
c (Å)	22.688 (2)
α°	90
β°	90
γ°	90
V (Å ³)	2695.4 (4)
Z'	1
V _m	673
Sg	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
D _{calc}	1.194

25

Las variables usadas en la tabla 1 se definen más

adelante:

T = temperatura en Centígrados para los datos cristalográficos (RT es temperatura ambiente que es aproximadamente +22°C)

5 V = volumen de celda unitaria

Z' = número de moléculas de fármaco por unidad asimétrica

V_m = V(celda unitaria) / (Z moléculas de fármaco por celda)

10 sg = grupo de espacio

dcalc = densidad cristalina calculada

Características farmacológicas comparativas

Ensayos y datos que comparan las características farmacológicas del Ejemplo 1 y compuestos encontrados en el
15 documento WO 2005/021500 A1, WO 2008/014381 A1 y WO 2008/014360 A1 se presentan más adelante.

Unión con células mononucleares de sangre periférica humana

Véase también: Yoshimura et al., J. Immunol.,
20 145:292 (1990). El ensayo de unión de CCR-2 humano se estableció con células mononucleares de sangre periférica (hPBMCs) usando ¹²⁵I-MCP-1 humana como el ligando trazador. hPBMCs se aislaron de leukopak de tipo humano (Biological Specialty Inc.) usando un protocolo estándar con Ficoll-
25 Hypaque (Mediatech CELLGRO®). hPBMCs aisladas se lavaron y

se diluyeron hasta 1×10^7 /ml en amortiguador de unión (RPMI-1640, 0.1% de BSA, 20 mM Hepes, pH 7.4). ^{125}I -MCP-1 (NEN/Perkin Elmer) se diluyó hasta 0.45 nM en amortiguador de unión. el compuesto se diluyó en amortiguador de unión a 3 veces las concentraciones finales usadas en el ensayo de unión. El ensayo de unión se realizó usando una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore). La unión total de ^{125}I -MCP-1 se determinó como sigue: para cada reacción de un volumen total de 150 μl se añadieron 5×10^5 células, 0.15 nM ^{125}I -MCP-1, y compuesto de manera que la concentración final variaba entre 0 y 100 nM. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos seguida de tres lavados con RPMI-1640, 0.1% de BSA, 0.4 M NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.4 usando una filtración de tubo múltiple a vacío (Millipore). Después de lavar, la placa se secó al aire durante 60 minutos a temperatura ambiente. A esto siguió la adición de 25 μl de Microscint 20 en cada pocillo. La placa se selló y se contó en el Trilux durante 1 minute. La unión no específica se determinó en la presencia de 300 nM de MCP-1 fría (PeproTech Inc.). ^{125}I -MCP-1 específica se calculó como la diferencia entre la unión total y no específica. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. La CI_{50} se define como la concentración de compuesto de competición requerida para reducir la unión específica en 50%.

El proceso usado para el ensayo de unión de CCR-5 a

células T era similar a aquellos para el ensayo de unión de CCR-2 a hPBMC excepto que las células T periféricas se usaron como una fuente de CCR-5 (véase más adelante) y ^{125}I -MIP-1 β como trazador (Amersham).

5 Aislamiento de células T periféricas

Un reciente informe indica que la expresión de CCR-5 en células T varía considerablemente entre los individuos (Desmetz, C. et al., "The strength of the chemotactic response to a CCR-5 binding chemokine is determined by the level of cell surface CCR-5 density", *Immunology*, 119 (4): 551 - 561 (2006)). Por lo tanto, se seleccionaron previamente donantes de sangre por la alta expresión de células T de CCR-5. hPBMCs se aislaron primero a partir de sangre entera humana mediante protocolo estándar con Ficoll-Hypaque. Después se usó análisis citométrico de flujo para medir la expresión de CCR-5 en las células T después de teñir con anticuerpo anti-CCR-5 más anticuerpo anti-CD4 o anticuerpo anti-CD8. Los donantes de sangre en los que > 5% de células T periféricas (CD4⁺ y CD8⁺) expresan CCR-5 se les requirió que proporcionaras sangre de nuevo para aislamiento de PBMCs y, posteriormente, de células T usando una técnica E-rosetting estándar que depende de la capacidad única de células T para unirse a células de glóbulos rojos de oveja (RBCs).

Quimiotaxis de CCR-2

25 El ensayo de quimiotaxis de CCR-2 humano se llevó a

cabo con la línea celular monolítica humana, THP-1. Las células THP-1 se marcaron primero con el tinte de fluorescencia Calcein-AM en RPMI-1640 sin rojo fenol, sin BSA (pH 7.4) a 37°C durante 30 minutos con agitación suave cada 5 15 minutos. Las células marcadas se lavaron después y se volvieron a suspender a 1×10^5 /ml en amortiguador de quimiotaxis (RPMI-1640 sin rojo fenol, 0.1% de BSA, pH 7.4). El compuesto de ensayo se diluyó en amortiguador de quimiotaxis de manera que la concentración de ensayo final 10 variaba entre 0.01 nM y 1 μ M. El ligando MCP-1 (PeproTech Inc.) se diluyó hasta 20 nM en amortiguador de quimiotaxis. Para realizar el ensayo, un volumen igual de diluciones de compuesto de ensayo se mezcló con un volumen igual de células THP-1 marcadas (Mezcla 1), y un volumen igual de diluciones 15 de compuesto de ensayo se mezcló con un volumen igual de ligando de MCP-1 (Mezcla 2). Ambas mezclas se incubaron independientemente a 37°C durante 10 minutos seguido de agitación suave. La quimiotaxis inducida por MCP-1 después se midió en placa de quimiotaxis (Becton Dickinson) colocando 20 50 μ l de Mezcla 1 en la cámara superior y 225 μ l de Mezcla 2 en la cámara inferior. La placa se cubrió con una tapa y se incubó a 37°C durante 30 minutos. 30 minutos después, la placa se leyó sobre un CYTOFLUOR®. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Para la señal a la determinación de 25 ruido, 50 μ l de células THP-1 marcadas solas (5×10^4 /pocillo)

se colocaron en la cámara superior y 225 µl de ligando MCP-1 solo se colocó en la cámara inferior (concentración final de 10 nM). La inhibición se logró mediante concentraciones graduadas del compuesto de ensayo se calculó como un porcentaje del control de MCP-1 sin compuesto. La CI50 se define como la concentración de compuesto de ensayo requerida para alcanzar el 50% de inhibición de quimiotaxis celular.

Quimiotaxis de CCR-5

Un proceso similar al establecido anteriormente se adoptó excepto que se usaron células T periféricas aisladas se usaron como células que expresan CCR-5 -y MIP-1β (50 nM, PeproTech Inc.) era el ligando.

Flujo de hERG

Se desarrollaron células HEK293 que expresan de manera estable canales de hERG (37°C, 5% CO₂) en medio de Tagle modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal bovino de Sigma, aminoácidos no esenciales, 2 mM L-glutamina y 500 µg/ml de G418, al incubador. Se usó amortiguador de disociación celular para extraer las células de los matraces, que después se sembraron en placas de 384 pocillos CORNING® revestidas con poli-D-lisina de color negro/transparente a una densidad de 2×10^4 células por pocillo (20 µl) en 10% de medio de suero, y se incubaron durante 15 - 24 horas a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ hasta que se obtuvo una monocapa confluyente de células.

Una solución madre 2 mM de tinte BTC-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) se preparó en 100% de DMSO y después se añadió 1:1 a 10% (p/v) de ácido plurónico en DMSO el día de ensayo. Después el tinte se diluyó en amortiguador EP
5 externo de hERG (140 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.3 y 10 mM de glucosa; todos los componentes de amortiguador obtenidos de Sigma Chemical). Esta mezcla de tinte BTC (30 µl) se añadió a las células y se produjo una concentración de carga final de 2.5 µM. Las
10 células se incuban a 21°C durante 45 minutos.

El compuesto de ensayo se diluyó hasta 10 mM DMSO en 60 µl. Después el compuesto se diluyó en serie a una relación de 1:2 en DMSO en columnas 1-10 y 11-20 de una placa de 384 pocillos. Se generaron placas listas para ensayo
15 mediante estampado de 2.5 µl de la placa diluida en serie de DMSO, que se preparó sobre la Velocity 11 BIOCEL®. Se crearon placas acuosas mediante la adición de 48 µl de amortiguador EP y después se diluyeron 30 - 45 minutos antes que el ensayo se leyera sobre el FLIPR®. Después de la carga
20 de tinte, el compuesto diluido acuoso se añadió se añadió a las celdas de las tres placas replicadas (10 µl) produciendo un intervalo de concentración de 10 puntos de 80 µM a 0.156 nM. La concentración final de DMSO en el ensayo es 1%. Las placas acuosas listas para ensayo se prepararon y se
25 diluyeron en un manipulador de líquido CyBio.

Las células cargadas con el tinte se leyeron sobre FLIPR®384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que excita el tinte usando la línea de 488 nm de un láser de argón. La emisión se filtró usando un filtro de paso de banda de $540 \pm$
5 30 nm. Los canales de hERG se estimularon para abrirse mediante la adición de 20 μ l/pocillo de amortiguador EP que contenía 66 mM K_2SO_4 y 1.3 mM Tl_2SO_4 (Sigma/Aldrich). Para cada placa, los datos se recogieron cada segundo durante un período de 12 segundos, momento en el que se añadió
10 amortiguador de estímulo que contenía Tl^+ . La recogida de datos se llevó a cabo cada Segundo durante 48 segundos, y después se continuó cada tres segundos durante 2 minutos adicionales.

El intervalo dinámico del ensayo se determinó para
15 pocillos blancos y totales. Los pocillos totales (columnas 21 y 22) definen la activación máxima de hERG para la placa (sin compuesto de ensayo presente), y los pocillos blancos (columnas 23 y 24) definen 100% de inhibición de hERG. Los pocillos blancos contienen 400 nM de cualquiera de los
20 inhibidores de hERG convencionales dofetilide (Ficker et al., 1998) o E-4031. Los puntos de datos brutos en cada pocillo de muestra se corrigieron primero para la variación de célula/señal, fondo de control negativo (blancos), y se normalizar para los controles positivos (totales) usando el
25 software FLIPR®. Las curvas de respuesta de concentración de

compuesto de ensayo para los datos de flujo hERG Tl^+ se ajustaron después usando Excel Fit (ID Business Solutions Limited, Surrey, Reino Unido) con una ecuación logística de un único sitio, $Y = A + ((B-A)/1 + ((C/X) ^ D))$ donde A =
 5 inhibición máxima. Los datos se analizaron mediante ajuste de amplitudes máximas de cambio en fluorescencia para el flujo de Tl^+ flux para una condición dada de compuesto de ensayo. Potencias (valores de CI_{50}) de compuesto se calcularon a partir de la media de pocillos triplicados.

10 Canal de sodio, Ensayo de unión del sitio 2

Véase también: Catterall, W.A. et al. J. Biol. Chem., 256:8922 (1981). El amortiguador de unión estándar contenía 50 mM HEPES, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 130 mM de cloruro de colina, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucosa,
 15 40 $\mu g/mL$ LqT. Las reacciones de unión se iniciaron mediante la adición de sinaptosomas (preparados a partir de cerebro de rata Wistar) a la mezcla de reacción que contenía 5 nM [^3H]-batracotoxina en un amortiguador de unión estándar y el compuesto a ensayar a la concentración deseable. Las
 20 muestras después se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. las reacciones se detuvieron mediante la adición de amortiguador de lavado enfriado con hielo que contenía 50 mM HEPES, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8mM $MgCl_2$ y 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. Los sinaptosomas se
 25 recogieron inmediatamente sobre filtros de fibra de vidrio y

se lavó tres veces con amortiguadores de lavado. La radiactividad de [^3H]-batracotoxina restante sobre los filtros se contó usando espectrómetros de centelleo líquido.

5 Ensayo de Permeabilidad de Membrana Artificial Paralelo (PAMPA, por sus siglas en ingles)

El Ensayo de Permeabilidad de Membrana Artificial Paralelo (PAMPA) consta de una combinación de lípidos a base de lecitina especialmente formulada denominado lípido del tracto gastrointestinal (GIT, por sus siglas en ingles). El
10 lípido GIT se uso para formar una membrana en un conjunto de placa de sándwich similar al usado en los ensayos Caco-2. El lípido GIT se parece mucho a la composición y comportamiento de membrana *in vivo* como se mide mediante compuestos convencionales se sabe que se absorben de manera pasiva en
15 seres humanos. PAMPA se usa de manera amplia como un modelo *in vitro* para la selección de permeabilidad de los compuestos descubiertos. La velocidad de paso de los compuestos a través de la membrana PAMPA se usa para determinar un coeficiente de permeabilidad (P_c), que puede estar
20 relacionado con la permeabilidad pasiva *in vivo* del compuesto.

El coeficiente de permeabilidad (P_c) de un compuesto particular se examina en un establecimiento dependiendo de pH con apical y basolateral pH de 7.4. Todos
25 los experimentos se llevan a cabo en determinaciones por

triplicado.

El compuesto de ensayo (10 mM de soluciones madre en 100% de DMSO) se diluyó 1:100 en amortiguador de pocillo donante de pH 7.4 (pION CAT n° 110151), proporcionando una
5 solución de ensayo 100 μ M en 1% de DMSO. El compuesto diluido en amortiguador de pocillo donante se transfirió a una placa Whatman UNIFILTER® y se filtró antes de dispensar 200 μ l en el pocillo donante de la placa de ensayo (pION CAT n° 110163). La membrana PAMPA se formó pipeteando 4 μ l de la
10 solución lipídica (pION CAT n° 110169) en la placa de filtro (VWR CAT n° 13503). La membrana se cubrió después con 200 μ l de amortiguador de pocillo aceptor a pH 7.4 (pION CAT n° 110139). La placa de ensayo PAMPA (lado de donante y lado de aceptor) se combinó y se dejó incubar a temperatura ambiente
15 durante 4 horas. La placa después de desensambló y las placas de espectrofotómetro (VWR CAT n° 655801) se llenaron (150 μ l/pocillo). Las placas de donante, aceptor, referencia, blanco se leyeron en el lector de placas SPECTRAMAX® UV. Los datos se capturaron mediante software
20 pION, que analiza los espectros y genera los valores de P_c .

Pinzamiento zonal hERG

Se usó el pinzamiento zonal de células enteras para medir directamente las corrientes de hERG en células HEK-293 que expresan de manera estable la subunidad α de los canales
25 de potasio de hERG. el compuesto se ensayó en un amortiguador

acuoso con pH 7.4 a temperatura ambiente. Se aplicaron pulsos de ensayo repetitivos (0.05 Hz) de un potencial de sostenimiento de -80 mV a +20 mV durante 2 segundos y se indujeron corrientes de cola después de los pulsos de ensayo mediante el
5 escalonamiento de la tensión hasta -65 mV. Los efectos del compuesto se calcularon mediante la medición de la inhibición de la corriente de cola máxima

Pinzamiento zonal de canal de sodio

Se usó el pinzamiento zonal de células enteras para
10 medir directamente las corrientes de sodio internas en las células HEK-293 que expresan el canal de sodio cardiaco humano 1, SCN5A. El compuesto se ensayó en un amortiguador acuoso sin proteína. Para determinar la inhibición en estado constante, se indujeron corrientes de sodio cada 5 segundos
15 usando el siguiente protocolo de tensión: las celdas se mantuvieron a un potencial de -90 mV y se escalonaron hasta -20 mV durante 60 ms. Los efectos se calcularon mediante la medición de la inhibición de corriente máxima durante el pulso de ensayo a -20 mV. La dependencia de la velocidad de
20 la inhibición se determinó mediante estimulación a las frecuencias de 1 Hz y 4 Hz.

Farmacocinética de dosis individual en Ratas

Ratas macho Sprague-Dawley (250 - 300 g) se usaron para los estudios farmacocinéticos. Ratas se mantuvieron en
25 ayunas durante toda una noche antes de la dosificación PO y

se alimentaron 4 h después de la dosificación. Se recogieron muestras de sangre (~ 0.3 ml) de la vena yugular en tubos que contenían K₂EDTA y después se centrifugaron a 4°C (1500 - 2000 x g) para obtener plasma. En un estudio de biodisponibilidad oral, 2 grupos de animales (N = 2 - 3 por grupo) recibieron el compuesto de ensayo o bien mediante una infusión intravenosa (IV) (durante 10 min) por la vena yugular mediante sonda nasogástrica oral. Se obtuvieron muestras de sangre en serie a 0.17 (para IV solamente), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h después de la dosis. Muestras de plasma, obtenidas mediante centrifugación a 4°C (1500-2000xg), se almacenaron a -20°C hasta análisis por CL/EM/EM.

Farmacocinéticas de dosis individual en monos

La farmacocinética de diversos compuestos de ensayo se evaluaron en monos cynomolgus macho en un diseño de retrocruzamiento. Los monos se mantuvieron en ayunas durante toda una noche antes de la dosificación PO y se alimentaron 4 h después de la dosificación. Un grupo de 1 - 3 animales (3 a 5 kg) recibieron el compuesto mediante infusión IV (durante 10 min) mediante una vena femoral y mediante sonda nasogástrica oral, con un lavado con agua de 1 semana entre tratamientos. Se recogieron muestras de sangre en serie (~ 0.3 ml) de la arteria de la vena femoral 0.17 (IV solamente), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h después de la dosis, y

se centrifugó a 4°C (1500 - 2000 x g) para obtener plasma. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta análisis por CL/EM/EM.

Análisis de datos para ensayos farmacocinéticos

5 Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron mediante análisis compartimental de concentración de plasma contra los datos de tiempo (software Kinetica, Version 4.2, InnaPhase Corporation, Philadelphia, PA). La concentración máxima (C_{max}) y el tiempo para C_{max} se registraron directamente
10 a partir de observaciones experimentales. El área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo ($AUC(0-T)$) se calculó usando una combinación de sumas lineales y log trapezoidal. La eliminación total de plasma (CL_{Tp}), volumen en estado constante de distribución (V_{ss}),
15 semivida de eliminación aparente ($T_{1/2}$) y tiempo de residencia medio (MRT) se estimó después de administración IV. Las estimaciones de $T_{1/2}$ se realizaron usando un mínimo de 3 momentos con concentraciones cuantificables. La biodisponibilidad absoluta oral (F) se estimó como la
20 relación de los valores de AUC normalizados por dosis después de dosis orales e IV.

Movilización de calcio de CCR-2

Ensayo de flujo de calcio intracelular mediado por CCR-2 humano se estableció con la línea celular monocítica
25 humana de THP-1. Células THP-1 se cargaron primero con

fluoróforo volviendo a suspenderlas en PBS amortiguado con glucosa y HEPES (pH 7.4) que contenía 4 μ M fluo-3 (Molecular Probes) y 1.25 mM de Probenecid y después se incubó durante 60 minutos a 37°C. Después de lavar para eliminar el exceso de fluo-3, las células se volvieron a suspender en amortiguador de lavado (que contienen RPMI sin rojo fenol con 1.25 mM de Probenecid, y se sembraron en placas de 96 pocillos a 2×10^5 /pocillo. La placa se colocó en FLIPR®-1 (Molecular Devices) que usa un láser de iones argón para excitar las células y se añadió de manera robótica el compuesto de ensayo y MCP-1 humana aunque controlando los cambios en fluorescencia. Se añadieron diluciones de compuesto de ensayo con un intervalo de concentración entre 0 y 100 nM amortiguador solo a cada pocillo, se centrifugaron y se incubaron durante 10 minutos. Después se añadió MCP-1 humana recombinante (PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 10 nM. El desplazamiento de fluorescencia se controló y la excursión de base-a-máximo se computó automáticamente. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Se calculó la inhibición mediante concentraciones graduadas de compuesto como un porcentaje del control de MCP-1 sin compuesto.

Movilización de calcio de CCR-5

Se adoptó un proceso similar a la movilización de

calcio de CCR-2 establecido anteriormente excepto que MIP-1 β (50 nM) era el ligando y la línea celular era HT1080/CCR-5 en la que CCR-5 endógeno estaba regulado hacia niveles más altos mediante activación al azar de la tecnología de expresión
5 génica (RAGE, por sus siglas en ingles).

Intercambio CCR-2 GTP- γ S

La unión dependiente de MCP-1 de [^{35} S]-GTP γ S a CCR-2 se determinó usando membranas preparadas a partir de la línea celular humana HT1080 en la que CCR-2 estaba
10 regulado hacia niveles más altos por tecnología RAGE (Athersys). cada reacción (200 μ L) contenía 20 mM Na-HEPES, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0.1% BSA (Sigma), 1% DMSO, y 10 μ M GDP (pH 7.4). La CE50 para la unión dependiente de MCP-1 de [^{35} S]-GTP γ S se determinó variando las
15 concentraciones de MCP-1 de 1 pM a 1 μ M. Las reacciones se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente y se recogieron los complejos [^{35} S]-GTP γ S/G α_i sobre una placa de filtro de 96 pocillos Millipore MAFC. La inhibición de unión de [^{35} S]-GTP γ S dependiente de MCP-1 a las membranas
20 de CCR-2 membranas por el compuesto de ensayo se determinó a 1 nM MCP-1 en condiciones idénticas. Se analizaron los datos usando el software de unión de ligando de Graphpad Prism 4.

Intercambio CCR-5 GTP- γ S

25 Se adoptó un proceso similar al proceso de

intercambio CCR-2 GTP- γ S establecido anteriormente excepto que MIP-1 α /LD78 β era el ligando y la línea celular era CCR-5/HT1080. MIP-1 α /LD78 β se usó como el ligandos de CCR-5 debido a que proporcionaba una mayor señal con
5 relación al ruido que MIP-1 β .

Regulación hacia niveles más altos de integrina (CD11b) de sangre entera de CCR-2

Se estableció un ensayo de regulación hacia niveles más altos de CD11b dependiente de CCR-2 con
10 sangre entera humana human. Sangre entera (100 μ l) se incubó previamente con un intervalo de concentración del Ejemplo 1 a 37°C durante 10 minutos. MCP-1 recombinante humana (10 μ l de 100nM) se añadió después a cada reacción hasta una concentración final de 10 nM,
15 excepto para reacciones de control no estimuladas. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de incubación, se añadió 1 ml de amortiguador FACS enfriado con hielo (PBS con 10% de FBS) y las muestras se centrifugaron 1500 rpm durante 5 minutos y
20 se volvieron a suspender en 50 μ l de amortiguador FACS. Después las células se incubaron con 20 μ l de solución anti-CD14-FITC/anti-CD11b-PE durante 20 minutos en hielo en la oscuridad seguido de 1 ml de 1x FACS de solución de lisis (Becton Dickinson) a cada reacción.
25 Después las muestras se incubaron durante 30 minutos

sobre hielo en la oscuridad. Después de la fijación y lisis de los glóbulos rojos, las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en 200 µl de solución de lisis FACS. Las muestras se analizaron
5 mediante citometría de flujo en 1 hora de tinción usando un citómetro de flujo FACSCalibur. La adquisición de datos y análisis se realizó usando el software CellQuestPro. Una estrategia de activación secuencial se usó para analizar la población de
10 monocitos CD14^{high} CD11b⁺. Para análisis, CD11b se midió como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés).

Regulación hacia niveles más altos de integrina CD11b de sangre entera de CCR-5

15 Se adoptó un proceso similar al proceso de regulación hacia niveles más altos de integrina CD11b de sangre entera de CCR-2 establecido anteriormente excepto que se usó MIP-1β (50 nM) como el ligando.

Se encuentran más adelante los datos para los
20 compuestos comparados (véanse los documentos WO 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 y WO 2008/014361 A1). Los datos comparativos muestran la combinación no esperada de las características farmacológicas deseables e inhibidoras de receptor CCR-2 y CCR-5 de
25 potencia equivalente.

Tabla 2**Datos comparativos In vitro**

Compuesto	CI ₅₀ (nM) de unión a CCR-2	CI ₅₀ (nM) de unión a CCR-5	CI ₅₀ (nM) de FLUJO hERG	Unión de canal de Na ⁺ (% inhibi- ción)	Permeabili- dad PAMPA (nm/seg)
Ejemplo 12as documento WO 2005/021500	0.27 (1)	No disponible	2,800	No disponi- ble	No disponible
Ejemplo 12aj documento WO 2005/021500	0.43 ± 0.06 (2)	No disponible	770	No disponibl e	No disponible
Ejemplo 2k documento WO 2005/021500	0.7 ± 0.3 (23)	2.3 ± 1.8	51,000	97%. 10,000 nM	529 ± 157 (9)
Ejemplo 12bd documento WO 2005/021500	1.15 ± 0.07 (2)	No disponible	>80,000	54%. 10,000 nM	392
Ejemplo 8a documento WO 2005/021500	1.83 ± 0.80 (12)	No disponible	>80,000	3%. 10,000 nM 33%. 30,000 nM	94 ± 58 (10)
Ejemplo 8e documento WO 2005/021500	2.20 ± 0.03 (2)	No disponible	>80,000	6%. 10,000 nM	2 ± 2 (2)

	Compuesto	CI ₅₀ (nM) de unión a CCR-2	CI ₅₀ (nM) de unión a CCR-5	CI ₅₀ (nM) de FLUJO hERG	Unión de canal de Na ⁺ (% inhibi- ción)	Permeabili- dad PAMPA (nm/seg)
5	Ejemplo 9c documento WO 2005/021500	0.96 ± 0.26 (19)	No disponible	>80.000	48%. 10,000 nM 75%. 30,000 nM	145 ± 71 (8)
10	Ejemplo 1 documento WO 2008/014381	1.4 ± 0.5 (18)	23.6 ± 12.0	>80.000	0%. 10,000 nM; 21%. 30,000 nM	443 ± 114 (8)
	Ejemplo 1 documento WO 2008/014360	2.74 ± 1.34 (15)	6.3 ± 1.5	>80.000	13%. 10,000 nM 32%. 30,000 nM	560 ± 86 (5)
15	Ejemplo 1 Presente Invención	6.2 ± 2.7	3.6 ± 1.8	>80.000	46%. 30,000 nM	336

Tabla 3**Datos comparativos adicionales in vitro**

	Compuesto	CI ₅₀ (nM) de Quimiotaxis de CCR-2	CI ₅₀ (nM) de Quimiotaxis de CCR-5	Pinzamiento zonal hERG (% Inhib.)	Pinzamiento zonal de canal de Na ⁺ (% Inhib.)
20	Ejemplo 2k Patente de Estados Unidos N° 7163937	0.24 ± 0.16 (12)	No disponible	83%. 10,000 nM	52%. 10,000 nM 90%. 30,000 nM

	Compuesto	CI ₅₀ (nM) de Quimiotaxis de CCR-2	CI ₅₀ (nM) de Quimiotaxis de CCR-5	Pinzamiento zonal hERG (% Inhib.)	Pinzamiento zonal de canal de Na ⁺ (% Inhib.)
5	Ejemplo 8a Documento WO 2005/021500	2.63 ± 1.24 (4)	No disponible	4%. 10,000 nM	22%. 10,000 nM 49%. 30,000 nM
10	Ejemplo 9c Documento WO 2005/021500	0.21	No disponible	4%. 10,000 nM	19%. 10,000 nM 39%. 30,000 nM
	Ejemplo 1 Documento WO 2008/014381	0.71 ± 0.16 (22)	No disponible	33%. 10,000 nM 61%. 30,000 nM	17%. 10,000 nM 19%. 30,000 nM
15	Ejemplo 1 Documento WO 2008/014360	0.8 ± 0.5 (16)	1.1 ± 0.7	12%. 10,000 nM 19%. 30,000 nM	29%. 30,000 nM
	Ejemplo 1 Presente Invención	0.8 ± 0.8	1.1 ± 0.6	1.2%. 10,000 nM 9.2%. 30,000 nM	15-20%. 10.000 nM 13-16%. 30,000 nM

20

25

Tabla 4**Datos comparativos adicionales *In vitro***

5

Compuesto	CCR-2 Ca ²⁺ Flux IC ₅₀ (nM)	CCR-5 ²⁺ Flux IC ₅₀ (nM)	CCR-2 GTP-γS IC ₅₀ (nM)	CCR-5 GTP-γS IC ₅₀ (nM)
Ejemplo 2k Patente de Estados Unidos N° 7163937	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
Ejemplo 1 WO 2008/014381	0.9	24.0	5	111.0
Ejemplo 1 Documento WO 2008/014360	0.8 ± 0.6	5.9 ± 3.3	3.5 ± 1.9	5.4 ± 3.2
Ejemplo 1 Presente Invención	2.9 ± 1.5	2.0 ± 1.4	3.5 ± 1.9	6.1 ± 1.2

10

15

Tabla 5**Datos comparativos adicionales *In vitro***

20

Compuesto	CCR-2 CD11b CI ₅₀ (nM)	CCR-5 CD11b CI ₅₀ (nM)
Ejemplo 2k Patente de Estados Unidos N° 7,163,937	4.7 ± 0.9	4.3 ± 4.4
Ejemplo 1 Documento WO 2008/014381	0.77 ± 0.40	No disponible

25

Compuesto	CCR-2 CD11b CI_{50} (nM)	CCR-5 CD11b CI_{50} (nM)
Ejemplo 1 Documento WO 2008/014360	2.6 $\pm$ 2.2	34.7 $\pm$ 11.0
Ejemplo 1 Documento Presente Invención	4.8	5.7

5

Tabla 6**Datos farmacocinéticos comparativos In vivo en rata**

Compuesto	Dosis IV/PO (mg/kg)	IC (ml/min/kg)	F%	Oral AUC (nM*h)
Ejemplo 2k Documento WO 2005/021500	2.5 / 25	40	68	9294
Ejemplo 8a Documento WO 2005/021500	6 / 72	42	1.4	690
Ejemplo 9c Documento WO 2005/021500	4 / 43	54	14	1855
Ejemplo 1 Documento WO 2008/014381	2 / 10	43	51	3794
Ejemplo 1 Documento WO 2008/014360	2 / 10	25	79	10169
Ejemplo 1 Presente Invención	2 / 10	49.7	94	6500

10

15

20

25

Tabla 7**Datos farmacocinéticos comparativos In vivo en los monos**

	Compuesto	Dosis IV/PO (mg/kg)	IC (ml/min/kg)	F%	Oral AUC (nM*h)
5	Ejemplo 2k Documento WO 2005/021500	1 / 1.4	25	46	862
10	Ejemplo 8a Documento WO 2005/021500	1 / 11	14	9.4	1896
	Ejemplo 9c Documento WO 2005/021500	1 / 10	12	26	6763
15	Ejemplo 1 Documento WO 2008/014381	1 / 1.3	23	47	836
	Ejemplo 1 Documento WO 2008/014360	1 / 1	12	95	2352
20	Ejemplo 1 Presente Invención	1 / 1	16.4	63	1300

Sorprendentemente, se descubrió que el Ejemplo 1 de la presente invención no son predominantemente activos contra CCR-2 o CCR-5, pero en su lugar son antagonistas duales de

potencia equivalente, medido por su capacidad de unión de CCR-2 y CCR-5, y poseen características farmacológicas beneficiosas. Véanse las Tablas 2 a 5. Por ejemplo, véase la Tabla 5 en la que el Ejemplo 1 tiene potencia equivalente
5 contra CCR-2 y CCR-5 mientras los Ejemplos 1 del documento WO 2008/014381 y documento WO 2008/014360 son predominantemente activos contra CCR-2.

Utilidad

Los compuestos de los ejemplos muestran que son
10 moduladores de la actividad del receptor de quimiocina usando ensayos conocidos por los expertos en la técnica. En esta sección, los inventores describen tales ensayos y proporcionan su referencia bibliográfica. Más ensayos se describen en el presente documento en la sección titulada "Características
15 Farmacológicas Comparativas", supra. Al mostrar actividad en estos ensayos de antagonismo de MCP-1, los compuestos de los ejemplos se espera que sean útiles en el tratamiento de enfermedades humanas asociadas a las quimiocinas y sus receptores afines. La definición de actividad en estos ensayos
20 es un compuesto que demuestra una CI_{50} de 30 μM o menor en concentración cuando se mide en un ensayo particular.

Antagonismo de entrada de calcio inducida por MCP-1
(Sullivan et al., Methods Mol. Biol., 114: 125 -
133 (1999))

25 Al menos uno de los compuestos descritos en los

ejemplos tienen actividad en el antagonismo de ensayo de entrada de calcio inducida por MCP-1 divulgado en el presente documento.

La movilización de calcio se mide usando el tinte
5 indicador de Ca^{2+} fluorescente, Fluo-3. Las células se incuban según 8×10^5 células/ml en solución salina amortiguada con fosfato que contiene 0.1% de albúmina sérica bovina, 20 mM de amortiguador HEPES, 5 mM de glucosa, 1% de suero bovino fetal, 4 μM Fluo-3 AM y 2.5 mM de Probenecid
10 durante 60 minutos a 37°C . Las células usadas para tales ensayos de calcio pueden incluir monocitos humanos aislados como se ha descrito por Weiner et al., J. Immunol. Methods, 36: 89 - 97 (1980) o líneas celulares que expresan receptor CCR-2 endógeno tal como THP-1 y MonoMac-6. Después, las
15 células se lavan tres veces en solución salina amortiguada con fosfato que contiene 0.1% de albúmina sérica bovina, 20 mM de HEPES, 5 mM de glucosa, y 2.5 mM de Probenecid. Las células se vuelven a suspender en solución salina amortiguada con fosfato que contiene 0.5% de albúmina sérica bovina, 20
20 mM de HEPES y 2.5 mM de Probenecid a una concentración final de $2 - 4 \times 10^6$ células/ml. Las células se siembran en microplacas de pared negra de 96 pocillos (100 μl /pocillo) y las placas se centrifugan a $200 \times g$ durante 5 minutos. Se añaden diversas concentraciones de compuesto a los pocillos
25 (50 μl /pocillo) y después de 5 minutos, se añaden 50

ul/pocillo de MCP-1 proporcionando una concentración final de 10 nM. La movilización de calcio se detecta usando un lector de placas de formación de imágenes fluorescente. La monocapa de células se excita con un láser de argón (488 nM) y la
5 fluorescencia asociada a células se mide durante 3 minutos, (cada segundo durante los primeros 90 segundos y cada 10 segundos durante los siguientes 90 segundos). Los datos se generan como unidades arbitrarias de fluorescencia y el cambio en fluorescencia para cada pocillo se determina como
10 el diferencial máximo - mínimo. La inhibición dependiente de compuesto se calcula con relación a la respuesta de MCP-1 solo.

Receptores de quimiocina de mamífero proporcionan una diana para interferir con o promover la función celular
15 inmune en un mamífero, tal como un ser humano. Los compuestos que inhiben o promueven la función del receptor de quimiocina son particularmente útiles para modular la función celular inmune para propósitos terapéuticos. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a compuestos
20 que son útiles en la prevención y/o tratamiento de una amplia variedad de trastornos y enfermedades infecciosos, inflamatorios e inmunoreguladores, incluyendo asma y enfermedades alérgicas, infección por microbios patógenos (que, por definición, incluyen virus), así como patologías
25 autoinmunes tales como la artritis reumatoide y

aterosclerosis.

Por ejemplo, un compuesto presente que inhibe una o más funciones de un receptor de quimiocina de mamífero (por ejemplo, un receptor de quimiocina humano) se puede
5 administrar para inhibir (es decir, reducir o prevenir) inflamación o enfermedad infecciosa. Como resultado, uno o más procesos inflamatorios, tales como emigración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis (por ejemplo, de enzimas, histamina) o liberación del mediador
10 inflamatorios, está inhibido.

De manera similar, un compuesto presente que promueve una o más funciones del receptor de quimiocina de mamífero (por ejemplo, una quimiocina humana) como se administra para estimular (inducir o potenciar) una respuesta
15 inmune o inflamatoria, tal como emigración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis (por ejemplo, de enzimas, histamina) o liberación de mediador inflamatorio, que da como resultado la estimulación beneficiosa de procesos inflamatorios. Por ejemplo, eosinófilos se pueden reclutar
20 para combatir infecciones de parásitos. Además, tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes anteriormente mencionadas también se pueden contemplar para un compuesto presente que promueve una o más funciones del receptor de quimiocina de mamífero si se contempla la
25 distribución de suficiente compuesto para provocar la pérdida

de la expresión del receptor sobre las células mediante la inducción de la internalización del receptor de quimiocina o la distribución del compuesto de una manera que da como resultado la dirección equivocada de la migración de células.

5 Además para primates, tales como seres humanos, se pueden tratar una diversidad de mamíferos diferentes de acuerdo con el proceso de la presente invención. Por ejemplo, mamíferos, que incluyen pero no se limitan a, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejillos de
10 indias, ratas, u otras especies de bovinos, ovinos, equinos, caninos, felinos, roedores o murinos se pueden tratar. Sin embargo, el proceso también se puede practicar en otras especies, tales como especies aviares. El sujeto tratado en los procesos anteriores es un mamífero, macho o hembra, en
15 los que se desea la modulación de actividad del receptor de quimiocina. "Modulación" como se usa en el presente documento pretende abarcar antagonismo, agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

Ensayo funcional basado en Lector de Placas de
20 Formación de Imágenes Fluorométricas (FLIPR®)

Células HT1080 (clon 3559.1.6) se sembraron según 10.000 células/pocillo (30 microlitros) en placas de 384 pocillos (fondo negro/transparente BIOCOAT® PDL, Beckton Dickinson) y se cargaron con 30 microlitros/pocillo de tiente
25 fluorescente Fluo-4 AM (preparado disolviendo 1 mg Fluo-4 AM

en 440 microlitros de DMSO y diluyendo con 100 microlitros de solución de plurónico antes de diluir con 10 ml de amortiguador Hanks). Las células se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ durante 30 min antes de lavarse tres veces con y
 5 suspenderse en Amortiguador de Ensayo (20 mM HEPES, 1.2 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM Probenecid, 0.5% BSA, 1x Hanks). El artículo de ensayo se diluyó en serie en DMSO y después se diluyó 1:10 con Amortiguador de Ensayo antes de añadirse a las células (10 microlitros/pocillo). Usando FLIPR®, las
 10 placas se leyeron (10 - 70 seg) para inducción de flujo (es decir, actividad agonista). Las células después se cargaron además con Solución Agonista (30 microlitros/pocillo; preparada diluyendo 30 microlitros de 100 microMolar MIP-1 beta en 100 ml de Amortiguador de Ensayo; este protocolo
 15 distribuye una concentración final de 5 nM MIP-1 beta en el ensayo) y las placas se leyeron usando FLIPR® durante un minuto. La actividad antagonista del artículo de ensayo se determinó con relación a control negativo de 0.4% de DMSO/Amortiguador.

20 Ensayo(s) y eficacia *in vivo*

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-Butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida (también
 denominado "Ejemplo 1") se evaluó en el ensayo vivo
 25 descrito más abajo.

Modelo de Peritonitis inducido por Tioglicolato
(TG) 48 horas en ratón hCCR-2 KI

Procesos

Los ratones hCCR-2 KI (C57BL/6-SVJ129) se
5 inyectaron por vía intraperitoneal con 1 ml de tioglicolato
(TG) (Hardy Diagnostics). Para cada estudio, se usaron ocho
ratones macho por grupo. Ejemplo 1 se dosificó por vía oral
1 antes de la inyección TG. El vehículo usado fue 0.01 N HCl
en agua. Cuarenta y ocho horas después de la inyección de
10 TG, se realizaron lavados peritoneales mediante inyección de
5 ml de PBS/10 mM EDTA/10% BSA en la cavidad peritoneal.

Para el estudio de peritonitis por TG de 48 horas,
el Ejemplo 1 se dosificó dos veces al día con la primera
dosis una hora antes de la inyección de TG. Recuento de
15 células peritoneales totales se obtuvieron sobre células
aisladas mediante un contador de células. Se realizaron
citospinas para determinar los recuentos de leucocitos
diferenciales. Las células se tiñeron durante 3 minutos con
tinte Wright-Giemsa (Sigma-Aldrich) y después se enjuagaron
20 con agua desionizada durante 5 minutos. Los recuentos
diferenciales se calcularon basándose en un total de 200
células contadas por muestra. También se recogió muestra de
sangre del seno retro-orbital al final de cada estudio en
EDTA para determinación de concentración de fármaco.

25 Para el análisis citométrico, células de exudado

peritoneal (1×10^6) se lavaron una vez con amortiguador FACS (PBS/0.5% de BSA) y se volvieron a suspender en amortiguador FACS. Las células se incubaron con un anticuerpo de bloqueo de Fc (BD Pharmingen) sobre hielo durante 15 min seguido de la adición de los siguientes anticuerpos (BD Pharmingen): anti-F4/80 conjugado a PE, anti-Ly6C conjugado a FITC, y anti-hCCR-2 conjugado a Alexa 647. Después de 45 min sobre hielo, las células se fijaron por BD CYTOFIX® durante 15 min sobre hielo, se lavaron dos veces con amortiguador FACS, y se volvieron a suspender en 200 μ l de amortiguador FACS. Los episodios celulares (40.000) se adquirieron para cada muestra y se analizaron los datos usando software FloJo (TreeStar). Se estableció una puerta FSC/SSC que incluye todos los monocitos (bajos SSC, mayores FSC) aunque se excluyen los granulocitos del análisis. Esta población controlada después se analizó para determinar la expresión de Ly6C (FITC), F4/80 (PE). Los números de monocitos/macrófagos peritoneales se determinaron multiplicando los recuentos de células peritoneales totales obtenidas mediante el contador de células y el porcentaje de monocitos/macrófagos identificados por células F4/80⁺ a partir de citometría de flujo. La significación estadística de las diferencias entre las medias se analizó usando en ensayo t apareado de dos colas con la significación establecida a valores de p por debajo de 0.05.

Resultados

El Ejemplo 1 se evaluó en el modelo de peritonitis de TG de ratón hCCR-2 KI para determinar la CE50 en la inhibición de de la infiltración de monocito/macrófago. Se
5 administró a los ratones tioglicolato, y se dosificó por vía oral con el Ejemplo 1 a 10, 50, o 160 mg/kg dos veces al día. Cuarenta y ocho horas después de tratamiento de TG, se obtuvo lavado peritoneal para el análisis de infiltrado celular mediante citometría de flujo.

10 Se observó una inhibición dependiente de la dosis en la infiltración de monocitos/macrófagos (Figure 4). Dosis de 10, 50, y 160 mg/kg proporcionó una inhibición de 25%, 54% y 63%, respectivamente. De los cuatro estudios separados con dosis múltiples, la inhibición máxima alcanzó ~ 70% y la
15 media de CE50 para inhibición de infiltración de monocitos/macrófagos mediante este análisis se estimó que era 4.9 nM, que se correlaciona bien con la CI50 *in vitro* (5.8 ± 2.3 nM) por ejemplo 1 inhibición de unión de MCP-1 de ratón ^{125}I a células que expresan CCR-2 de tipo humano (hPBMCs).

20 Para determinar el nivel *in vivo* de ocupación del receptor por el Ejemplo 1 en el modelo de peritonitis de tioglicolato de 48 horas en el ratón hCCR-2 KI, los niveles en plasma de tanto el Ejemplo 1 como MCP-1 de ratón se midieron. La restricción para esta estimación es que
25 solamente CCR-2 y su ligando principal MCP-1 se tomaron en

consideración. La ocupación del receptor de un ligando en la presencia de un inhibidor competitivo se define por la ecuación de Gaddum:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_d / [L]) (1 + [I] / K_i)}$$

Dado que el Ejemplo 1 es un inhibidor competitivo de la unión de MCP-1 a CCR-2, las cantidades de tanto el complejo de MCP-1 de ratón / receptor CCR-2 como el complejo de Ejemplo 1/ receptor CCR-2 se pueden determinar usando los niveles en suero de tanto MCP-1 de ratón como Ejemplo 1 no unido a proteína en plasma. El valor de K_d para la unión de MCP-1 de ratón a hCCR-2 es 0.91 +/- 0.08 nM (n = 8) que se determinó en experimentos de unión de ligando competitivos en frío usando ^{125}I -MCP-1 humano. La media de K_i por ejemplo 1 unión a hCCR-2 es 2.0 nM. La fracción de complejos de MCP-1 de ratón / receptor CCR-2 se determina usando la forma de la ecuación descrita anteriormente. Para determinar la fracción de los complejos Ejemplo 1/CCR-2 la ecuación se vuelve a definir como:

$$\frac{[RI]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_i / [I]) (1 + [L] / K_d)}$$

Finalmente, la cantidad de CCR-2 libre se determina a partir de:

$$[CCR-2]_{\text{total}} = [CCR-2]_{\text{libre}} + [MCP-1 \text{ de ratón } / CCR-2] + [Ejemplo 1 / CCR-2]$$

Como se muestra en la tabla 8, el porcentaje de

inhibición de infiltración de monocitos/macrófagos en el peritoneo a las 48 horas refleja el porcentaje de complejo Ejemplo 1/receptor CCR-2.

Tabla 8

5 Determinación de ocupación del receptor *In vivo* del Ejemplo 1 en sangre de ratones hCCR-2 KI en el modelo de Peritonitis de

TG de 48 horas

10	Dosis mg/kg	Concentra- ción de MCP-1 de ratón en plasma (nM)	Concentra- ción de Ejemplo 1 libre en plasma (nM) (veces de CI90 de unión de CCR-2)	% de CCR-2 unido a MCP- 1 de ratón	% de CCR-2 unido a Ejemplo 1	% de CCR-2 libre	% de inhibi- ción de infiltra- ción de monocitos /macró- fagos ^a
15	200 ^a	0.068	136.4	0.11	98.45	1.44	71
20	160	0.046	62.0	0.16	96.72	3.12	63
	50	0.048	16.6	0.56	88.74	10.69	54
	10	0.021	1.9	1.17	48.15	50.68	25
	0	0.022	0.0	2.36	0.00	97.64	0

^a La dosis se seleccionó de un estudio diferente de
25 otras dosis en la tabla proporcionando un ejemplo de

inhibición máxima. Esta dosis proporcionó la concentración libre en plasma de 1.9 veces CI_{90} de unión de hCCR-2 KI.

De manera colectiva, estos resultados claramente demuestran que el Ejemplo 1 es un potente bloqueador de la infiltración de monocitos/macrófagos con una CE_{50} de ~ 4.9 nM. La inhibición máxima de infiltración de monocitos/macrófagos por el Ejemplo 1 se puede lograr mediante un 98.5% de ocupación de CCR-2 con este compuesto. De manera notable, los estudios han demostrado una reducción similar (~ 70 - 80%) en la infiltración de monocitos/macrófagos en ratones deficientes en CCR-2-

Enfermedades o afecciones de seres humanos u otras especies que se pueden tratar con inhibidores de la función de receptor de quimiocina, incluyen, pero no se limitan a: enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares hipersensibles, neumonitis hipersensible, celulitis eosinófilas (por ejemplo, síndrome de Well), neumonías eosinófilas (por ejemplo, síndrome de Loeffler, neumonía eosinófila crónica), fasciitis eosinófila (por ejemplo, síndrome de Shulman), hipersensibilidad de tipo retrasado, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD, por sus siglas en ingles) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, o ILD asociada a artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso,

espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas),
5 síndrome de eosinofilia-mialgia debido a la ingestión de triptófano contaminado, alergias a picaduras a insectos; enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, artritis soriática, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, miastenia grave, diabetes de aparición juvenil;
10 glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet; rechazo de injertos (por ejemplo, en transplante), incluyendo rechazo de transplante homólogo o enfermedad de huésped contra injerto; enfermedades inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa;
15 espondiloartropatías; escleroderma; psoriasis (incluyendo psoriasis mediada por células T) y dermatosis inflamatoria tal como una dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria; vasculitis (por ejemplo, necronizante, cutánea, vasculitis hipersensible);
20 miositis eosinófila, fasciitis eosinófila; cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos. Otras enfermedades o afecciones en las que las respuestas inflamatorias no deseables se van a inhibir se pueden tratar, incluyendo, pero sin limitación a, vasculitis, placas
25 vulnerables, hiperplasia neointimal venosa, lesión de

reperfusión, hiperplasia neointimal de injerto - diálisis, hiperplasia intimal de derivación arterio venosa, aterosclerosis, ciertas malignidades hematológicas, toxicidad inducida por citocina (por ejemplo, choque séptico, cloque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis. Enfermedades o
 5 afecciones infecciosas de especies humanas u otras que se pueden tratar con inhibidores de la función de receptor de quimiocina , incluyen, pero no se limitan a, VIH.

Enfermedades o afecciones de seres humanos u otras
 10 especies que se pueden tratar con promotores de la función de receptor de quimiocina, incluyen, pero no se limitan a: inmunosupresión, tal como en individuos con síndromes de inmunodeficiencia tales como SIDA u otras infecciones virales, individuos sometidos a terapia de radiación,
 15 quimioterapia, terapia para enfermedad autoinmune o terapia de fármacos (por ejemplo, terapia por corticosteroides), que provoca inmunosupresión; inmunosupresión debida a deficiencia congénita en la función del receptor u otras causas; y enfermedades infecciosas, tales como enfermedades de
 20 parásitos, incluyendo, pero sin limitación a infecciones de helmintos, tales como nematodos (gusanos redondos); (Trichuriasis, Enterobiasis, Ascariasis, Hookworm, Strongyloidiasis, Trichinosis, filariasis); trematodos (platijas) (Schistosomiasis, Clonorchiasis), cestodos
 25 (gusamos de cinta) (Echinococcosis, Taeniasis saginata,

Cysticercosis); gusanos viscerales, migrañas de larva visceral (por ejemplo, *Toxocara*), gastroenteritis eosinófila (por ejemplo, *Anisaki* sp., *Phocanema* sp.), migrañas de larva cutánea (*Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*). Los
5 compuestos de la presente invención son, de acuerdo con lo anterior, útiles en la prevención y tratamiento de una amplia diversidad de trastornos y enfermedades inflamatorios, infecciosos e inmunorreguladores.

Además, el tratamiento anteriormente mencionado de
10 las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes también se pueden contemplar para la función de promotores de receptor de quimiocina si se contempla la distribución suficiente de compuesto para que provoque la pérdida de la expresión del receptor sobre las células mediante la
15 inducción de internalización o distribución de receptor de quimiocina del compuesto de una manera que da como resultado la dirección equivocada de la migración de células.

En otro aspecto, la presente invención se puede usar para evaluar agonistas o antagonistas específicos
20 supuestos de un receptor acoplado a proteína G. La presente invención se refiere al uso de estos compuestos en la preparación y ejecución de ensayos de selección para los compuestos que modulan la actividad de receptores de quimiocinas. Además, los compuestos de la presente invención
25 son útiles en el establecimiento o determinación del sitio de

unión de otros compuestos a receptores de quimiocinas, por ejemplo, mediante inhibición competitiva o como referencia en un ensayo para comparar su actividad conocida a un compuesto con una actividad no conocida. Cuando se desarrollan nuevos

5 ensayos o protocolos, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden usar para ensayar su eficacia. De manera específica, tales compuestos se pueden proporcionar en un kit comercial, por ejemplo, para uso en investigación farmacéutica que implica las enfermedades anteriores

10 anteriormente mencionadas. Los compuestos de la presente invención también son útiles para la evaluación de moduladores específicos supuestos de los receptores de quimiocinas. Además, se pueden utilizar compuestos de la presente invención para examinar la especificidad de

15 receptores acoplados a proteína G que no se cree que sean receptores de quimiocinas, o bien sirviendo como ejemplos de compuestos que no se unían o como variantes estructurales de compuestos activos sobre estos receptores que pueden ayudar a definir sitios específicos de interacción.

20 Los compuestos descritos en el presente documento son útiles para tratar o prevenir trastornos seleccionados entre artritis reumatoide, osteoartritis, choque séptico, aterosclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, choque hemodinámica, síndrome de sepsis, lesión de

25 reperfusión post isquémico, malaria, enfermedad de Crohn,

enfermedades inflamatorias del intestino, infección micobacteriana, meningitis, psoriasis, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades fibróticas, caquexia, rechazo de injerto, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias

5 de la piel, esclerosis múltiple, daño por radiación, lesión alveolar hipertóxica, VIH, demencia por VIH, diabetes mellitus no dependientes de insulina, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, fibrosis pulmonar idiopática, penfigoide buloso, infecciones parásitas helmínticas, colitis alérgica,

10 eccema, conjuntivitis, trasplante, eosinofilia familiar, celulitis eosinófila, neumonías eosinófilas, fasciitis eosinófila, gastroenteritis eosinófila, eosinofilia inducida por fármacos, fibrosis quística, síndrome de Churg-Strauss, linfoma, enfermedad de Hodgkin, carcinoma de colon, síndrome

15 de Felty, sarcoidosis, uveitis, Alzheimer, Glomerulonefritis, y lupus sistémico eritematoso, carcinoma de células de esófago escamosas, dolor neuropático, y obesidad.

En otro aspecto, los compuestos son útiles para tratar o prevenir trastornos inflamatorios seleccionados

20 entre artritis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias del intestino, psoriasis, insuficiencia cardiaca congestiva, esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias de la

25 piel.

En otro aspecto, los compuestos se usan para tratar o prevenir trastornos inflamatorios seleccionados entre artritis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias del
5 intestino, y esclerosis múltiple.

En otro aspecto, los ejemplos descritos en el presente documento pueden ser útiles para el tratamiento de una diversidad de cánceres, incluyendo, pero sin limitación, los siguientes:

10 carcinoma incluyendo el de la vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerada y con metástasis), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de de células pequeñas y no
pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata,
15 testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma exocrino pancreático), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides, y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas);

20 tumores hematopoyéticos de origen linfoide incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma de células vellosas, linfoma histiocítico, y linfoma de
25 Burketts;

tumores hematopoyéticos de origen mieloide incluyendo leucemias mielógenos agudos y crónicos, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide, y leucemia promielocítica;

5 tumores del sistema nervioso central y periférico incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas;

tumores de origen mesenquimal incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y

10 otros tumores incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer follicular de tiroides, y teratocarcinoma.

En otra modalidad, se divulgan en el presente documento procesos de tratamientos de cáncer, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de hígado, 15 cáncer de próstata, y melanoma. De manera adicional, los compuestos descritos en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer de ovarios, y mieloma múltiple.

La presente invención proporciona procesos para el 20 tratamiento de una diversidad de enfermedades proliferativas no cancerosas.

La terapia combinada para evitar y tratar trastornos y enfermedades inflamatorios, infecciosos e inmunorreguladores, incluyendo asma y enfermedades alérgicas, 25 así como patologías autoinmunes tales como artritis

reumatoide y aterosclerosis, y las patologías indicadas anteriormente se ilustra mediante la combinación de los compuestos de la presente invención y otros compuestos que se conocen para estas utilidades. Por ejemplo, en el

5 tratamiento o prevención de inflamación, los presentes compuestos se pueden usar junto con un agente anti-inflamatorio o analgésico tal como un un agonista opiáceo, un inhibidor de lipoxigenasa, un inhibidor de ciclooxigenasa-2, un inhibidor de interleucina, tal como un inhibidor de

10 interleucina-1, un inhibidor de factor de necrosis tumoral, un antagonista de NMDA, un inhibidor de óxido nítrico o un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, un agente no esteroide anti inflamatorio, un inhibidor de la fosfodiesterasa, o un agente anti inflamatorio supresor de

15 citocinas, por ejemplo con un compuesto tal como acetaminofeno, aspirina, codeína, fentanilo, ibuprofeno, indometacina, ketorolac, morfina, naproxeno, fenacetina, piroxicam, un analgésico esteroide, sufentanilo, sunlindac, interferón alfa y similares. De manera similar, los

20 presentes compuestos se pueden administrar con un mitigador de dolor; un potenciador tal como cafeína, un antagonista de H₂, simeticona, hidróxido de aluminio o magnesio; un descongestivo tal como fenilefrina, fenilpropanolamina, seudofedrina, oximetazolina, epinefrina, nafazolina,

25 xilometazolina, propilhexedrina, o levodesoxi-efedrina; y

antitusígenos tales como codeína, hidrocodona, caramifen, carbetapentano, o dextrametorfan; un diurético; y una antihistamina sedante o no sedante. Del mismo modo, los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar

5 en combinación con otros fármacos que se usan en el tratamiento/prevención/supresión o mejora de las enfermedades o afecciones para los que el compuesto de la presente invención son útiles. Tales fármacos se pueden administrar, mediante una vía y en una cantidad comúnmente usada de esta

10 manera, de manera simultánea o secuencial con un compuesto de la presente invención. Cuando se usa un compuesto de manera simultánea con uno o más fármacos diferentes, se puede usar una composición farmacéutica que contiene tales fármacos además del compuesto de la presente invención. De acuerdo

15 con lo anterior, las composiciones farmacéuticas incluyen las que también contienen uno o más ingredientes activos diferentes, además de un compuesto de la presente descripción.

Los ejemplos de otros ingredientes activos que se

20 pueden combinar con un compuesto de la presente invención, o bien administrados de manera diferente o en las mismas composiciones farmacéuticas, incluyen, pero no se limitan a:

(a) antagonistas de integrina tales como las selectinas, ICAM y VLA-4; (b) esteroides tales como beclometasona,

25 metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona, e

hidrocortisona; (c) inmunosupresores tales como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina y otros inmunosupresores de tipo FK-506; (d) antihistaminas (antagonistas de histamina H1) tales como bromofeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, 5 triprolidina, clemastina, diphenhidramina, difenilpiralina, tripelennamina, hidroxizina, metdilazina, prometazina, trimeprazina, azatadina, ciproheptadina, antazolina, feniramina, pirilamina, astemizol, terfenadina, loratadina, cetirizina, fexofenadina, descarboetoxiloratadina, y 10 similares; (e) anti asmáticos no esteroides tales como agonistas de b2 (terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetarina, albuteral, bitolterol, y pirbuterol), theofillina, cromolin de sodio, atropina, bromuro de ipratropio, antagonistas de leukotrieno (zafirlukast, 15 montelukast, pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-102.203), inhibidores de la síntesis de leukotrieno (zileuton, BAY-1005); (f) agentes antiinflamatorios no esteroides (NSAID, por sus siglas en ingles) tales como derivados de ácido propiónico (alminoprofeno, benxaprofeon, ácido buclórico, 20 carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, mioprofeno, naproxeno, oxaprozin, pirprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico, y tioxaprofeno), derivados de ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenac, 25 clidanac, diclofenac, fenclofenac, ácido fenclózico,

fentiazac, furofenac, ibufenac, isoxepac, oxpinac, sulindac, tiopinac, tolmetina, zidometacina, y zomepirac), derivados del ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico),
5 derivados de ácido bifenilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetil salicílico, sulfasalazina) y las pirazolonas (apazona, bezopiperilon, feprazona, mofebutazona, oxiphenbutazona, fenilbutazona); (g)
10 inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2); (h) inhibidores de la fosfodiesterasa tipo IV (PDE-IV); (i) otros antagonistas de la receptores de quimiocinas; (j) agentes reductores de colesterol tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (lovastatin, simvastatina, pravastatina,
15 fluvastatina, atorvastatina, y otras estatinsas), secuestrantes (colestiramina y colestipol), ácido nicotínico, derivados de ácido fenofíbrico (gemfibrozil, clofibrat, fenofibrato y benza fibrato), y probucol; (k) agentes anti-diabéticos tales como insulina, sulfonilureas, biguanidas
20 (metformina), inhibidores de la α -glucosidasa (acarbose) y glitazonas (troglitazona y pioglitazona); (l) preparaciones de interferones (interferón alfa-2a, interferón-2B, interferón alfa-N3, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón gamma-1b); (m) compuestos antivirales tales como
25 efavirenz, nevirapina, indinavir, ganciclovir, lamivudina,

famciclovir, y zalcitabina; (o) otro compuesto tal como ácido 5-aminosalicílico y sus profármacos, antimetabolitos tales como azatioprina y 6-mercaptopurina, y agentes quimioterapéuticos de cáncer citotóxicos. La relación de peso del compuesto de la presente invención con el segundo ingrediente activo se puede variar y dependerá de las dosis eficaces de cada ingrediente.

En general, una dosis eficaz de cada uno de usará. De este modo, por ejemplo, cuando un compuesto se combina con un NSAID la relación de peso del compuesto de la presente invención con el NSAID variará en general entre aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 1:1000, o como alternativa entre aproximadamente 200:1 y aproximadamente 1:200. Las combinaciones de un compuesto de la presente invención y otros ingredientes activos en general también estarán dentro del intervalo anteriormente mencionado, pero en cada caso, se debe usar una dosis eficaz de cada ingrediente activo.

En el tratamiento de cáncer, una combinación de agentes quimioterapéuticos y / u otros tratamientos (por ejemplo, terapia de radiación) es a menudo ventajoso. El segundo (o tercer) agente puede tener el mismo o diferente mecanismo de acción que el agente terapéutico principal. Puede ser especialmente útil emplear combinaciones de fármacos citotóxicos en las que los dos o más fármacos que se

están administrando actúan de diferentes maneras o en diferentes fases del ciclo celular, y/o donde los dos o más fármacos tienen toxicidades de superposición o efectos secundarios, y/o donde los fármacos que se combinan cada uno

5 tiene una eficacia demostrada en el tratamiento del estado patológico particular manifestado por el paciente.

De acuerdo con lo anterior, los compuestos descritos en el presente documento (u otras fórmulas divulgadas en el presente documento) se pueden administrar en

10 combinación con otros agentes anti-cáncer y citotóxicos y tratamientos útiles en el tratamiento de cáncer u otras enfermedades proliferativas. La invención en el presente documento además comprende el uso de los compuestos en el presente documento (u otras fórmulas divulgadas en el

15 presente documento), en la preparación de medicamentos para el tratamiento de cáncer, y/o comprende el empaquetamiento de los compuestos del presente documento conjuntamente con las instrucciones de los compuestos que se van a usar en combinación con otros agentes anticáncer o citotóxicos y

20 tratamientos para el tratamiento de cáncer. La presente invención además comprende combinaciones de los compuestos y uno o más agentes adicionales en forma de kit, por ejemplo, cuando se envasan conjuntamente o se colocan en paquetes separados para venderse conjuntamente como un kit, o cuando

25 están empaquetados para ser formulados conjuntamente.

El segundo (o más) agentes anti-cáncer se pueden seleccionar entre cualquiera de uno o más de los siguientes:

agentes alquilantes (incluyendo mostazas de nitrógeno, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, derivados de etilenimina, y triazenos); anti-angiogénicos (incluyendo inhibidores de metaloproteínaasa de matrix); antimetabolitos (incluyendo inhibidores de adenosina deaminasa, antagonistas de ácido fólico, análogos de purina, y análogos de pirimidina); antibióticos o anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos CTLA-4, antraciclinas); inhibidores de aromatasa;

modificadores de la respuesta de ciclo celular; enzimas; inhibidores de farnesil-proteína transferasa;

agentes hormonales y antihormonales y esteroides (incluyendo análogos sintéticos, glucocorticoides, estrógenos/anti-estrógenos [por ejemplo, SERM], andrógenos/anti-andrógenos, progestinas, agonistas del receptor de progesterona, y agonistas y antagonistas de liberación de la hormona luteinizante [LHRH]); moduladores del sistema de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF, por sus siglas en ingles)/ receptor de factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR, por sus siglas en ingles) (incluyendo inhibidores IGFR1); inhibidores de la señalización de integrina; inhibidores de la cinasa (incluyendo inhibidores multi-cinasa y/o inhibidores de la Src cinasa o Src/abl,

inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina [CDK por sus siglas en ingles], anticuerpos panHer, Her-1 y Her-2, inhibidores VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF, inhibidores EGFR, inhibidores de la proteína activada por
5 mitógeno [MAP, por sus siglas en ingles], inhibidores de MEK, inhibidores de la Aurora cinasa, inhibidores de PDGF, y otros inhibidores de la tirosina cinasa inhibidores o inhibidores de serina /treonina cinasa;

agentes interruptores de microtubulos, tales como
10 ecteinascidinas o sus análogos y derivados; agentes estabilizadores de microtúbulos tales como taxanos, y los epotilones de origen natural y sus análogos sintéticos y semisintéticos

unión de microtúbulos, agentes desestabilizadores
15 (incluyendo vinca alcaloides); e

inhibidores de topoisomerasa; inhibidores de la prenil-proteína transferasa; complejos de coordinación de platino; inhibidores de la señal de transducción; y otros agentes usados como agentes anticáncer y citotóxicos tales
20 como modificadores de respuesta biológica, factores de crecimiento, y moduladores inmunes.

De manera adicional, los compuestos de la presente invención se pueden formular o administrar conjuntamente con otros agentes terapéuticos que se seleccionan por su utilidad
25 particular en la dirección de efectos secundarios asociados a

las afecciones anteriormente mencionadas. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden formular con agentes para prevenir náuseas, hipersensibilidad e irritación gástrica, tales como antieméticos, y antihistamínicos H_1 y H_2 .

5 Los otros agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, se pueden usar, por ejemplo, en aquellas cantidades indicadas en el Vademecum de Especialidades Farmacéuticas o como se determina de otra manera por los
10 expertos en la técnica.

Los compuestos se administran a un mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende significar una cantidad de un compuesto de la presente descripción que, cuando se
15 administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a un mamífero, es eficaz para prevenir o mejorar la afección patológica o la progresión de la enfermedad.

Dosificación y formulación

Los compuestos de la presente descripción se pueden
20 administrar en formas de dosificación oral tales como comprimidos, cápsulas (cada una de las cuales incluye formulaciones de liberación sostenida o liberación con el tiempo), pastillas, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes, y emulsiones. También se pueden
25 administrar en forma intravenosa (bolo o infusión),

intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular, todas las formas usando formas de dosificación bien conocidas por los expertos en la técnica farmacéutica. Se pueden administrar solos, pero en general se administrarán con un vehículo farmacéutico seleccionado en base a la vía elegida de administración y práctica farmacéutica estándar.

El régimen de dosificación para los compuestos de la presente invención variarán, de hecho, dependiendo de factores conocidos, tales como características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; la especie, edad, sexo, salud, condición médica, y peso del receptor; la naturaleza y grado de los síntomas, el tipo de tratamiento simultáneo, la frecuencia de tratamiento, la vía de administración, la función renal y hepática del paciente, y el efecto deseado. Un médico o veterinario puede determinar y prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar, o detener el progreso del trastorno.

A modo de guía general, la dosificación oral diaria de cada ingrediente activo, cuando se usa para los efectos indicados, variará entre aproximadamente 0.001 y 1000 mg/kg de peso corporal, o entre aproximadamente 0.01 y 100 mg/kg de peso corporal al día, o como alternativa, entre aproximadamente 1.0 y 20 mg/kg/día. Por vía intravenosa, las dosis variarán entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10

mg/kg/minuto durante una infusión de velocidad constante. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una única dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres, o cuatro
5 veces al día. En una modalidad, la dosificación oral diaria de ingrediente activo está entre 3 y 600 mg administrado una vez al día o en dosis individuales administradas dos veces al día. Como alternativa, el ingrediente activo se puede administrar en dosis de 10 - 20 mg administrado dos veces al
10 día o 40 a 100 mg administrados una vez al día. Como alternativa, el ingrediente activo se puede administrar una dosis de 12.5 mg dos veces al día o 75 mg una vez al día. Como alternativa, el ingrediente activo se puede administrar en dosis de 3, 10, 30, 100, 300, y 600 mg administrados o
15 bien una vez o dos veces al día.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en forma intranasal mediante uso por vía tópica de vehículos intranasales adecuados o mediante vías transdérmicas, usando parches cutáneos transdérmico. Cuando
20 se administra en la forma de un sistema de administración transdérmica, la dosificación de la administración será de hecho, mejor continua que intermitente a través del régimen de dosificación.

Los compuestos se administran típicamente en mezcla
25 con diluyentes, excipientes, o vehículos farmacéuticos

(mencionados de manera colectiva en el presente documento como vehículos farmacéuticos) seleccionados de manera adecuado con respecto a la forma propuesta de administración, esto es, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y
5 similares, y consistente con prácticas farmacéuticas colectivas.

Por ejemplo, para la administración oral en la forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un vehículo oral, no tóxico,
10 farmacéuticamente aceptable, inerte tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metil celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares; para la administración oral en forma líquida, los componentes de fármaco oral se pueden combinar
15 con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable oral, no tóxicos, inerte tal como etanol, glicerol, agua, y similares. Además, cuando se desea o es necesario, también se pueden incorporar aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, y colorantes adecuados en la mezcla. Los aglutinantes
20 adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, tragacanto, o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados
25 en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio,

estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, y similares. Los agentes disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, goma xantano, y similares.

5 Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en la forma de sistemas de administración de liposomas, tales como pequeñas vesículas unilamelares, grandes vesículas unilamelares, y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de una diversidad de
10 fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles como vehículos de fármacos diana. Tales polímeros pueden incluir
15 polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspirtamidedfenol, o polietileneóxido-polilisina sustituida con restos de palmitoilo. Además, los compuestos de la presente invención se pueden acoplar a una
20 clase de polímeros biodegradables útiles en el logro de la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poliepsilon caprolactona, ácido polihidroxi butírico, poliortoésteres, poliacetales,
25 polidihidropiranos, policianoacilatos, y copolímeros de

bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Las formas de dosificación (composiciones farmacéuticas) adecuadas para la administración pueden contener entre aproximadamente 1 miligramo y aproximadamente
5 100 miligramos de ingrediente activo por unidad de dosificación. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo estará ordinariamente presente en una cantidad de aproximadamente 0.5 - 95% en peso en base del peso total de la composición.

10 Las cápsulas de gelatina pueden contener los ingrediente activos y vehículos en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, y similares. Se pueden usar diluyentes similares para preparar comprimidos. Tanto los comprimidos como las
15 cápsulas se pueden fabricar en forma de productos de liberación sostenida para proporcionar la liberación continua de la medicación durante un período de horas. Los comprimidos pueden estar revestidos con azúcar o revestidos con película para enmascarar cualquier sabor desagradable y
20 proteger el comprimido de la atmósfera, o con revestimiento entérico para la disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener colorante y aromatizante
25 para incrementar la aceptación del paciente.

En general, agua, un aceite adecuado, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa), y soluciones de azúcar relacionadas y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles son vehículos adecuados para soluciones parenterales. Las soluciones para la administración parenteral pueden contener una sal soluble en agua del ingrediente activo, los agentes estabilizantes adecuados, si es necesario, sustancias amortiguador. Agentes antioxidantes tales como bisulfito de sodio, sulfito de sodio, o ácido ascórbico, o bien solos o combinados, son agentes estabilizantes adecuados. También se usan ácido cítrico y sus sales y EDTA de sodio. Además, soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalkonio, metil- o propil-parabeno, y clorobutanol.

Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo.

Las formas de dosificación farmacéuticas útiles representativas para la administración de los compuestos de la presente invención se pueden ilustrar como sigue:

Cápsulas

Se pueden preparar un gran número de cápsulas unitarias llenando cápsulas de gelatina duras de dos piezas convencionales cada una con 100 miligramos de ingrediente activo en polvo, 150 miligramos de lactosa, 50 miligramos de

celulosa, y 6 miligramos de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blandas

Una mezcla de ingrediente activo en un aceite digerible tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva se puede preparar e inyectar mediante una bomba de desplazamiento positivo en gelatina para formar cápsulas de gelatina blandas que contienen 100 miligramos del ingrediente activo. Las cápsulas se deben lavar y secar.

10 Comprimidos

Los comprimidos se pueden preparar mediante procesos convencionales de manera que la unidad de dosificación sea 100 miligramos de ingrediente activo, 0.2 miligramos de dióxido de silicio coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 miligramos de celulosa microcristalina, 11 miligramos de almidón y 98.8 miligramos de lactosa. Revestimientos apropiados se pueden aplicar para incrementar la palatabilidad o retraso de absorción.

20 Inyectables

Una composición parenteral adecuada para la administración por inyección se puede preparar por agitación 1.5% en peso de ingrediente activo en 10% por volumen de propilenglicol y agua. La solución se debe hacer isotónica con cloruro de sodio y esterilizar.

Suspensión

Una suspensión acuosa se puede preparar para la administración oral de manera que cada 5 ml contengan 100 mg de ingrediente activo finamente dividido, 200 mg de carboximetil
5 celulosa de sodio, 5 mg de benzoato de sodio, 1.0 g de solución de sorbitol, U.S.P., y 0.025 ml de vainillina.

Cuando los compuestos de la presente invención se combinan con otros agentes anticoagulantes, por ejemplo, una dosificación diaria puede ser aproximadamente 0.1 a 100
10 miligramos del compuesto de Fórmula I y aproximadamente 1 a 7.5 miligramos del segundo anticoagulante, por kilogramo de peso corporal de paciente. Para una forma de dosificación de comprimido, los compuestos de la presente invención en general pueden estar presentes en una cantidad de
15 aproximadamente 5 a 10 miligramos por unidad de dosificación, y el segundo anticoagulante en una cantidad de aproximadamente 1 a 5 miligramos por unidad de dosificación.

Cuando dos o más de los segundos agentes terapéuticos anteriores se administran con el compuesto de
20 los ejemplos, en general la cantidad de cada componente en una dosificación diaria típica y forma de dosificación se puede reducir con relación a la dosificación usual del agente cuando se administra solo, en vista del efecto aditivo o sinérgico de los agentes terapéuticos cuando se administran
25 en combinación.

Particularmente cuando se proporciona una única unidad de dosificación, el potencial existe para una interacción química entre los ingrediente activos combinados. Por esta razón, cuando el compuesto de los ejemplos y un
5 segundo agente terapéutico se combinan en una única unidad de dosificación se formulan de manera que aunque los ingredientes activos estén combinados en una única unidad de dosificación, el contacto físico entre los ingredientes activos se minimiza (esto es, se reduce). Por ejemplo, un
10 ingrediente activo puede estar con revestimiento entérico. Mediante revestimiento entérico de uno de los ingredientes activos, es posible que no solamente minimice el contacto entre los ingrediente activos combinados, pero también, es posible controlar la liberación de uno de estos componentes
15 en el tracto gastrointestinal de manera que uno de estos componentes no se libera en el estómago pero en su lugar se libera en los intestinos. Uno de los ingredientes activos también puede estar revestido con un material que efectúe una liberación sostenida a través del tracto gastrointestinal y
20 también sirve para minimizar el contacto físico entre los ingredientes activos combinados. Además, el componente de liberación sostenida puede estar de manera adicional con revestimiento entérico de manera que la liberación de este componente se produce solamente en el intestino. Todavía
25 otro planteamiento implicaría la formación de un producto de

combinación en el que un componente está revestido con un polímero de liberación sostenida y/o entérica, y el otro componente también está revestido con un polímero tal como un grado de viscosidad bajo de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) u otro material apropiado como se conoce en la técnica, con el fin de separar además los componentes activos. El revestimiento de polímero sirve para formar una barrera adicional para la interacción con el otro componente.

Éstas así como otras formas de minimizar el contacto entre los componentes de productos de combinación de la presente invención, si se administran en una única forma de dosificación o se administra en formas separadas pero al mismo tiempo de la misma manera, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica, una vez armado con la presente descripción.

De manera adicional, ciertos compuestos descritos en el presente documento pueden ser útiles como metabolitos de otros compuestos. Por lo tanto, en una modalidad, los compuestos pueden ser útiles o bien como un compuesto sustancialmente pura, que después también se puede incorporar en una composición farmacéutica, o puede ser útil como metabolito que se genera después de la administración del profármaco de ese compuesto. En una modalidad, un compuesto puede ser útil como un metabolito siendo útil para el tratamiento de trastornos como se ha descrito en el presente

documento.

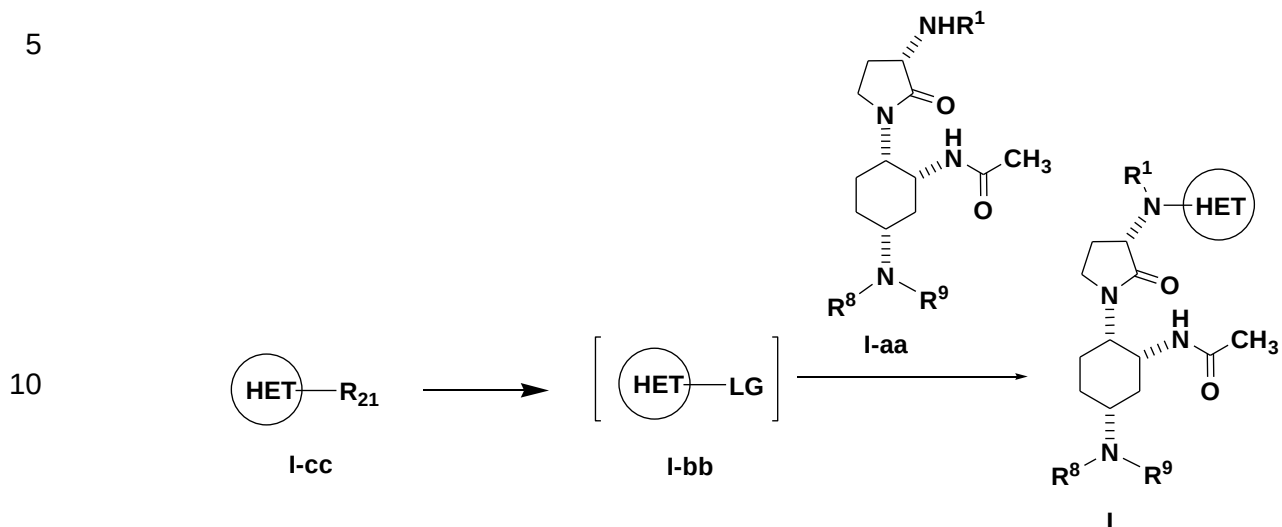
“Sustancialmente puro” como se usa en el presente documento pretende incluir un compuesto que tiene una pureza mayor de aproximadamente 90 por ciento en peso, incluyendo
5 aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, y 100 por ciento.

Como ejemplo, un compuesto divulgado en el presente documento puede ser sustancialmente puro teniendo una pureza mayor de aproximadamente 90 por ciento (en peso), donde el
10 resto de menos de aproximadamente 10 por ciento de material comprende otro metabolito del compuesto, un profármaco del compuesto, y/o reacción y/o impurezas de procesamiento que surgen de esta preparación.

Obviamente, numerosas modificaciones y variaciones
15 de la presente invención son posibles a la luz de de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto se ha de entender que dentro del alcance de las reivindicaciones anexas, la invención se puede poner en práctica de otra manera diferente de la descrita de manera específica en el presente documento.

REIVINDICACIONES (Divisional)

1. Un proceso de preparación de un compuesto de Fórmula I, o una forma de sal del mismo:



caracterizados porque comprende:

1) convertir un compuesto de hidrazona de Fórmula I-cc en un compuesto de Fórmula I-bb; y

2) acoplar compuesto de Fórmula I-bb con un compuesto de Fórmula I-aa; en la que:

R₁ es independientemente hidrógeno o un grupo protector de amina seleccionado entre un grupo carbobenciloxi, un tert-butiloxycarbonilo, un grupo fluorenilmetiloxycarbonilo, un grupo bencilo, y un grupo p-metoxibencilo;

R₈ y R₉ son independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R₂₁ es = O;

HET es un anillo heterociclo o heteroarilo bicíclico de 3 a 14 miembros opcionalmente sustituido que tiene al menos un heteroátomo de nitrógeno; y

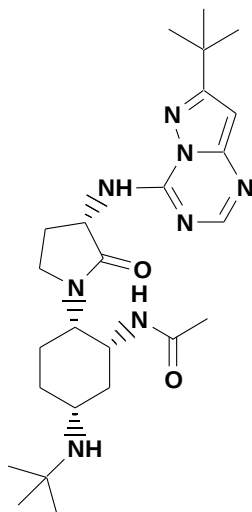
5 LG es $-OR_{16}$, en el que R_{16} es alquilo C_{1-6} , fenilo, un heteroarilo de 5 a 7 miembros que tiene uno o más átomos seleccionados entre N, S, u O, o un cicloalquilo de 3 a 7 miembros, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos seleccionados entre halógeno, CF_3 o alquilo C_{1-6} .

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un antagonista
novedoso: N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-

5 oxopirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:

10



15

o su sal, solvato o profármaco, farmacéuticamente aceptable, que tiene
una actividad del receptor dual de CCR-2 y CCR-5 inesperada. También
se describen formas cristalinas, metabolitos, composiciones
farmacéuticas que contienen los mismos y procesos de uso de los mismos
como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias,
alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares. La
20 presente invención también proporciona procesos de preparación de
compuestos de Fórmula (I) como los provistos en la presente, incluyendo
N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-3-(7-tert-butilpirazolo[1,5-

25

También se proporcionan en la presente compuestos que son
intermediarios útiles del proceso.

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from CARTER, Percy H. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 03 June 2010 (03.06.2010)
VIII-2-1(i v)		an assignment from CHERNEY, Robert J. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 22 June 2010 (22.06.2010)
VIII-2-1(i v)		an assignment from ROSSO, Victor W. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 03 June 2010 (03.06.2010)
VIII-2-1(i v)		an assignment from LI, Jun to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 03 June 2010 (03.06.2010)

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

PODER OTORGADO POR BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

APOSTILLA

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
SALLY B. HANSEN
3. QUIEN ACTÚA EN CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. LLEVA EL SELLO DE:
SALLY B. HANSEN, NOTARIO

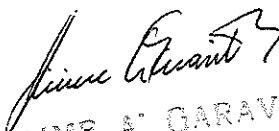
CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NUEVA JERSEY
6. EL 28 DE JUNIO DE 2007
7. POR BRADLEY ABELOW, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. N° A295716
9. SELLO (APARECE ADHERIDO SELLO DORADO)
10. FIRMA (FIRMADO) BRADLEY ABELOW

Texto en inglés y en español mediante el cual **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** domiciliada en Nueva York, Nueva York, otorga poder a **ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o OLGA GEORGETTE OTERO y/o RICARDO METKE y/o JUAN PABLO CONCHA**

Dado y suscrito el 30 de mayo de 2007

(Firmado) Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior)


JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Texto en inglés y en español mediante el cual el suscrito Notario certifica el 30 de mayo de 2007 la existencia legal de la sociedad **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** así como las funciones y firma de su representante autorizado Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior) para lo cual se basó en los documentos relacionados en inglés en el punto 6 de la certificación los cuales se traducen aquí al español, a saber:

Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.

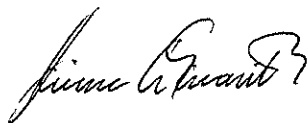
Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado mayo 24, 2005.

[Firmado] SALLY B. HANSEN, Notario Público

[Sello en tinta que dice: "SALLY B. HANSEN. Notario Público de Nueva Jersey. Mi comisión vence el 6 de junio de 2010"]

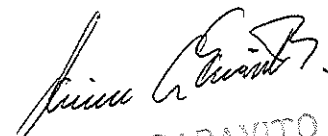
[Aparece sello realzado]

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 82106



JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
2da. 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
SALLY B HANSEN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
SALLY B HANSEN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF JUNE 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A295716
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

4442688-1

RAISBECK & MCKENZIE

Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NTT: 880.068.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bskenet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 United States of America

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, a full and sufficient power of attorney to obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits, layout-designs and vegetal varieties; the registration of trademarks, denominations of origin, commercial names, trade emblems, slogans and domain names; its renewal, assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Processes of protection to the consumer, unfair competition, oppositions, cancellations, nullity, precautionary injunctions, infringement, granting of licenses, writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 30 day of may of 2007

Signature of the person issuing the Power



Anastasia P. Winslow
Senior Patent Counsel

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciliada en

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; el registro de marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales, enseñanzas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado hasta el momento en los mismos asuntos, por cualquiera de los mencionados apoderados en representación de ésta sociedad.

Dado y firmado en

A los 30 días del mes de mayo de 2007

Firma de la persona que firma el Poder

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 30 day of May
2007, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That Name of the person issuing the power
Anastasia P. Winslow
of legal age and domiciled in
Princeton, NJ USA
Address, city, state, country

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as
Senior Patent Counsel
Position of the person issuing the Power

of the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

4. That the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

having its home office in

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

(Please indicate here the documents such as the articles of incorporation, by laws or resolution from the Board of Directors and their dates, on which the notary relied to grant the certification)

- Certification executed by Sr. Vice President and General Counsel of Bristol-Myers Squibb Company on April 7, 2007
- Amended and Restated Certificate of Incorporation of Bristol-Myers Squibb Company dated May 24, 2005

Notary Public
Sally B. Hansen
SALLY B. HANSEN
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 6, 2010

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 30 días del mes de mayo
de 2007, el suscrito Notario

DA FE

1. Que Anastasia P. Winslow

mayor y domiciliado en Princeton, NJ
Estados Unidos de América

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Abogados de Patentes Senior
de la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

4. Que la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

con sede en

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

- Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.
- Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado el 4 de mayo de 2005.

El Notario Público



(51) **International Patent Classification:**
C07D 487/04 (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)

[US/US]; c/o Bristol-Myers Squibb Company, 1 Squibb Drive, New Brunswick, New Jersey 08903 (US).

(21) **International Application Number:**
PCT/US2010/052288

(74) **Agents:** **DUNCAN, Laurelee A.** et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, New Jersey 08543-4000 (US).

(22) **International Filing Date:**
12 October 2010 (12.10.2010)

(81) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) **Filing Language:** English

(26) **Publication Language:** English

(30) **Priority Data:**
61/250,978 13 October 2009 (13.10.2009) US

(71) **Applicant** (*for all designated States except US*): **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** [US/US]; Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000 (US).

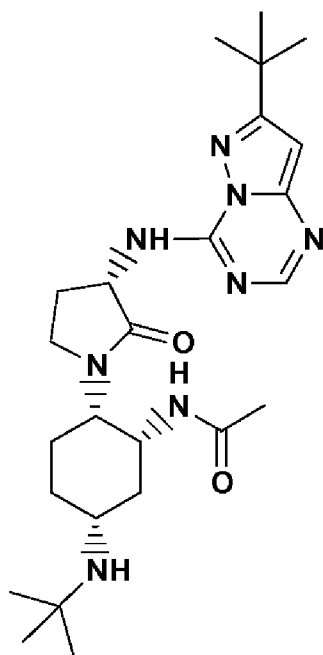
(72) **Inventors; and**

(75) **Inventors/Applicants** (*for US only*): **CARTER, Percy H.** [US/US]; c/o Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543 (US). **CHERNEY, Robert J.** [US/US]; c/o Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543 (US). **ROSSO, Victor W.** [US/US]; c/o Bristol-Myers Squibb Company, 1 Squibb Drive, New Brunswick, New Jersey 08903 (US). **LI, Jun**

(84) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) **Title:** N-((1R,2S,5R)-5-(TERT-BUTYLAMINO)-2-((S)-3-(7-TERT-BUTYLPYRAZOLO[1,5-A][1,3,5]TRIAZIN-4-YLAMINO)-2-OXOPYRROLIDIN-1-YL)CYCLOHEXYL)ACETAMIDE, A DUAL MODULATOR OF CHEMOKINE RECEPTOR ACTIVITY, CRYSTALLINE FORMS AND PROCESSES



(I)

(57) **Abstract:** The present invention provides a novel antagonist: N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide; or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or pro-drug, thereof, having unexpected dual CCR-2 and CCR-5 receptor activity. Crystalline forms, metabolites, pharmaceutical compositions containing the same and methods of using the same as agents for the treatment of inflammatory diseases, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases are also disclosed. The present disclosure also provides processes for preparing compounds of Formula (I) as provided herein, including N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butylamino)-2-((S)-3-(7-tert-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide. Compounds that are useful intermediates of the process are also provided herein.

**Declarations under Rule 4.17:**

- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

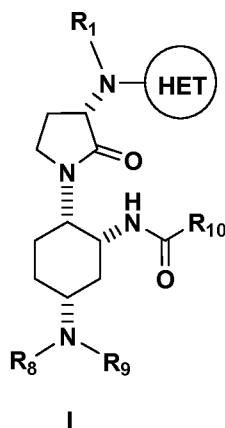
N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-BUTYLAMINO)-2-((S)-3-(7-*tert*-
BUTYLPYRAZOLO[1,5-A][1,3,5]TRIAZIN-4-YLAMINO)-2-OXOPYRROLIDIN-
1-YL)CYCLOHEXYL)ACETAMIDE, A DUAL MODULATOR OF CHEMOKINE
RECEPTOR ACTIVITY, CRYSTALLINE FORMS AND PROCESSES

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention provides N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-
3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-
10 3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-
yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug,
thereof, having unexpected desirable dual activity. Crystalline forms of the present
invention are also provided. Pharmaceutical compositions containing the same and
methods of using the same as agents for the treatment of inflammatory diseases,
15 allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases is also an
objective of this invention. The present disclosure also provides a process for
preparing compounds of Formula (I), including N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-
((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-
yl)cyclohexyl)acetamide:



20

wherein R¹, R⁸, R⁹, R¹⁰, and  are as described herein. Compounds that are
useful intermediates of the process are also provided herein. Metabolites of active
compounds, pharmaceutical compositions, and use thereof are also provided herein.

DESCRIPTION OF THE RELATED ART

[0002] Chemokines are chemotactic cytokines, of molecular weight 6-15 kDa, that are released by a wide variety of cells to attract and activate, among other cell types, macrophages, T and B lymphocytes, eosinophils, basophils and neutrophils (reviewed in: Charo et al., *New Eng. J. Med.*, 354:610-621 (2006); Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998); and Rollins, *Blood*, 90:909-928 (1997)). There are two major classes of chemokines, CXC and CC, depending on whether the first two cysteines in the amino acid sequence are separated by a single amino acid (CXC) or are adjacent (CC). The CXC chemokines, such as interleukin-8 (IL-8), neutrophil-activating protein-2 (NAP-2) and melanoma growth stimulatory activity protein (MGSA) are chemotactic primarily for neutrophils and T lymphocytes, whereas the CC chemokines, such as RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , the monocyte chemotactic proteins (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, and MCP-5) and the eotaxins (-1 and -2) are chemotactic for, among other cell types, macrophages, T lymphocytes, eosinophils, dendritic cells, and basophils. There also exist the chemokines lymphotactin-1, lymphotactin-2 (both C chemokines), and fractalkine (a CX₃C chemokine) that do not fall into either of the major chemokine subfamilies.

[0003] The chemokines bind to specific cell-surface receptors belonging to the family of G-protein-coupled seven-transmembrane-domain proteins (reviewed in: Horuk, *Trends Pharm. Sci.*, 15:159-165 (1994)) which are termed “chemokine receptors.” On binding their cognate ligands, chemokine receptors transduce an intracellular signal through the associated trimeric G proteins, resulting in, among other responses, a rapid increase in intracellular calcium concentration, changes in cell shape, increased expression of cellular adhesion molecules, degranulation, and promotion of cell migration. There are at least ten human chemokine receptors that bind or respond to CC chemokines with the following characteristic patterns (reviewed in Zlotnik et al., *Immunity*, 12:121 (2000)): CCR-1 (or “CKR-1” or “CC-CKR-1”) [MIP-1 α , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch et al., *Cell*, 72:415-425 (1993), and Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998)); CCR-2A and CCR-2B (or “CKR-2A”/“CKR-2B” or “CC-CKR-2A”/“CC-CKR-2B”) [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2752-2756 (1994), and Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998)); CCR-3 (or “CKR-3” or “CC-CKR-

3”) [eotaxin-1, eotaxin-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere et al., *J. Biol. Chem.*, 270:16491-16494 (1995), and Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998)); CCR-4 (or “CKR-4” or “CC-CKR-4”) [TARC, MDC] (Power et al., *J. Biol. Chem.*, 270:19495-19500 (1995), and Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998)); CCR-5 (or “CKR-5” OR “CC-CKR-5”) [MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β] (Samson et al., *Biochemistry*, 35:3362-3367 (1996)); CCR-6 (or “CKR-6” or “CC-CKR-6”) [LARC] (Baba et al., *J. Biol. Chem.*, 272:14893-14898 (1997)); CCR-7 (or “CKR-7” or “CC-CKR-7”) [ELC] (Yoshie et al., *J. Leukoc. Biol.*, 62:634-644 (1997)); CCR-8 (or “CKR-8” or “CC-CKR-8”) [I-309] (Napolitano et al., *J. Immunol.*, 157:2759-2763 (1996)); CCR-10 (or “CKR-10” or “CC-CKR-10”) [MCP-1, MCP-3] (Bonini et al., *DNA Cell Biol.*, 16:1249-1256 (1997)); and CCR-11 [MCP-1, MCP-2, and MCP-4] (Schweickart et al., *J. Biol. Chem.*, 275:9550 (2000)).

[0004] In addition to the mammalian chemokine receptors, mammalian cytomegaloviruses, herpesviruses and poxviruses have been shown to express, in infected cells, proteins with the binding properties of chemokine receptors (reviewed in: Wells et al., *Curr. Opin. Biotech.*, 8:741-748 (1997)). Human CC chemokines, such as RANTES and MCP-3, can cause rapid mobilization of calcium via these virally encoded receptors. Receptor expression may be permissive for infection by allowing for the subversion of normal immune system surveillance and response to infection. Additionally, human chemokine receptors, such as CXCR4, CCR-2, CCR-3, CCR-5 and CCR-8, can act as co-receptors for the infection of mammalian cells by microbes as with, for example, the human immunodeficiency viruses (HIV).

[0005] The chemokines and their cognate receptors have been implicated as being important mediators of inflammatory, infectious, and immunoregulatory disorders and diseases, including asthma and allergic diseases; as well as autoimmune pathologies, such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis; and metabolic diseases, such as atherosclerosis and diabetes (reviewed in: Charo et al., *New Eng. J. Med.*, 354:610-621 (2006); Gao, Z. et al., *Chem. Rev.*, 103:3733 (2003); Carter, P.H., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6:510 (2002); Trivedi et al., *Ann. Reports Med. Chem.*, 35:191 (2000); Saunders et al., *Drug Disc. Today*, 4:80 (1999); Premack et al., *Nature Medicine*, 2:1174 (1996)). For example, the chemokine monocyte chemoattractant-1 (MCP-1) and its receptor CC Chemokine Receptor 2 (CCR-2) play a pivotal role in attracting

leukocytes to sites of inflammation and in subsequently activating these cells. When the chemokine MCP-1 binds to CCR-2, it induces a rapid increase in intracellular calcium concentration, increased expression of cellular adhesion molecules, and the promotion of leukocyte migration. Demonstration of the importance of the MCP-1/CCR-2 interaction has been provided by experiments with genetically modified mice. MCP-1 $-/-$ mice were unable to recruit monocytes into sites of inflammation after several different types of immune challenge (Lu, B. et al., *J. Exp. Med.*, 187:601 (1998)). Likewise, CCR-2 $-/-$ mice were unable to recruit monocytes or produce interferon- γ when challenged with various exogenous agents; moreover, the leukocytes of CCR-2 null mice did not migrate in response to MCP-1 (Boring, L. et al., *J. Clin. Invest.*, 100:2552 (1997)), thereby demonstrating the specificity of the MCP-1/CCR-2 interaction. Two other groups have independently reported equivalent results with different strains of CCR-2 $-/-$ mice (Kuziel, W.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12053 (1997), and Kurihara, T. et al., *J. Exp. Med.*, 186:1757 (1997)). The viability and generally normal health of the MCP-1 $-/-$ and CCR-2 $-/-$ animals is noteworthy, in that disruption of the MCP-1/CCR-2 interaction does not induce physiological crisis. Taken together, these data lead one to the conclusion that molecules that block the actions of MCP-1/CCR-2 would be useful in treating a number of inflammatory and autoimmune disorders (reviewed in: Fera, M. et al., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 16:49 (2006); and Dawson, J. et al., *Exp. Opin. Ther. Targets*, 7:35 (2003)). This hypothesis has now been validated in a number of different animal disease models, as described below.

[0006] It is known that MCP-1 is upregulated in patients with rheumatoid arthritis (Koch, A. et al., *J. Clin. Invest.*, 90:772-779 (1992)). Moreover, several preclinical studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating rheumatoid arthritis. A DNA vaccine encoding MCP-1 was shown recently to ameliorate chronic polyadjuvant-induced arthritis in rats (Youssef, S. et al., *J. Clin. Invest.*, 106:361 (2000)). Likewise, the disease symptoms could be controlled via direct administration of antibodies for MCP-1 to rats with collagen-induced arthritis (Ogata, H. et al., *J. Pathol.*, 182:106 (1997)), or streptococcal cell wall-induced arthritis (Schimmer, R.C. et al., *J. Immunol.*, 160:1466 (1998)). Perhaps most significantly, a peptide antagonist of MCP-1, MCP-1(9-76),

was shown both to prevent disease onset and to reduce disease symptoms (depending on the time of administration) in the MRL-lpr mouse model of arthritis (Gong, J.-H. et al., *J. Exp. Med.*, 186:131 (1997)). Moreover, it has been demonstrated the administration of small molecule CCR-2 antagonists reduced clinical score in rodent models of arthritis (Brodmerkel, C.M. et al., *J. Immunol.*, 175:5370 (2005); and Xia, M. et al., U.S. Publication No. 2006/0069123). Administration of an anti-CCR-2 antibody had varying effects on murine CIA, depending on the time of administration (Bruhl, H. et al., *J. Immunol.*, 172:890 (2004)). Recent studies with CCR-2 $-/-$ mice have suggested that deletion of CCR-2 can exacerbate rodent arthritis models in specific experimental circumstances (Quinones, M.P. et al., *J. Clin. Invest.*, 113:856 (2004); Quinones, M.P. et al., *J. Mol. Med.*, 84:503 (2006)).

[0007] It is known that MCP-1 is upregulated in atherosclerotic lesions, and it has been shown that circulating levels of MCP-1 are reduced through treatment with therapeutic agents (Rezaie-Majd, A. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22:1194-1199 (2002)). Several key studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating atherosclerosis. For example, when MCP-1 $-/-$ mice are crossed with LDL receptor-deficient mice, an 83% reduction in aortic lipid deposition was observed (Gu, L. et al., *Mol. Cell*, 2:275 (1998)). Similarly, when MCP-1 was genetically ablated from mice which already overexpressed human apolipoprotein B, the resulting mice were protected from atherosclerotic lesion formation relative to the MCP-1 $+/+$ apoB control mice (Gosling, J. et al., *J. Clin. Invest.*, 103:773 (1999)). Likewise, when CCR-2 $-/-$ mice are crossed with apolipoprotein E $-/-$ mice, a significant decrease in the incidence of atherosclerotic lesions was observed (Boring, L. et al., *Nature*, 394:894 (1998); Dawson, T.C. et al., *Atherosclerosis*, 143:205 (1999)). Finally, when apolipoprotein E $-/-$ mice are administered a gene encoding a peptide antagonist of CCR-2, then lesion size is decreased and plaque stability is increased (Ni, W. et al., *Circulation*, 103:2096-2101 (2001)). Transplantation of bone marrow from CCR-2 $-/-$ mice into ApoE3-Leiden mice inhibited early atherogenesis (Guo, J. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23:447 (2003)), but had minimal effects on advanced lesions (Guo, J. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25:1014 (2005)).

[0008] Patients with type 2 diabetes mellitus typically exhibit insulin resistance as one of the hallmark features of the disease. Insulin resistance is also associated with the grouping of abnormalities known as the “metabolic syndrome” or “syndrome X,” which includes obesity, atherosclerosis, hypertension, and dyslipidemia (reviewed in: 5 Eckel et al., *Lancet*, 365:1415 (2005)). It is well-recognized that inflammation plays a role in exacerbating the disease process in type 2 diabetes and the “syndrome X” pathologies (reviewed in: Chen, H., *Pharmacological Research*, 53:469 (2006); Neels et al., *J. Clin. Invest.*, 116:33 (2006); Danadona et al., *Am. J. Cardiol.*, 90:27G-33G (2002); Pickup et al., *Diabetologia*, 41:1241 (1998)). MCP-1 is recognized as playing 10 a role in obesity-induced insulin resistance. In culture, human preadipocytes constitutively expressed MCP-1 (Gerhardt, *Mol. Cell. Endocrinology*, 175:81 (2001)). CCR-2 is expressed on adipocytes; Addition of MCP-1 to differentiated adipocytes *in vitro* decreases insulin-stimulated glucose uptake and the expression of several adipogenic genes (LpL, adipsin, GLU-4), aP2, β 3-adrenergic receptor, and PPAR γ) 15 (Sartipy, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6902 (1999)). Patients with type 2 diabetes had greater levels of circulating MCP-1 than non-diabetic controls (Nomura, S. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 121:437 (2000)), and release of MCP-1 from adipose tissue could be reduced by treatment with anti-diabetic therapies such as metformin or thiazolidinediones (Bruun, J.M. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90:2282 (2005)). 20 Likewise, MCP-1 was also overexpressed in murine experimental models of obesity, and was primarily produced by adipose tissue (Sartipy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:7265 (2003)). In obese mice, the expression of MCP-1 both preceded and occurred concurrently with the onset of insulin resistance (Xu, H. et al., *J. Clin. Invest.*, 112:1821 (2003)). Another study showed that the expression of MCP-1 25 positively correlated with body mass in the perigonadal adipose tissue of mice (Weisberg et al., *J. Clin. Invest.*, 112:1796 (2003)). Consistent with these data, the development of insulin resistance in *db/db* mice was ameliorated either via genetic deletion of MCP-1 or by gene-induced expression of a dominant negative peptide (Kanda, H. et al., *J. Clin. Invest.*, 116:1494 (2006)). The logical converse could also 30 be demonstrated: overexpression of MCP-1 in adipose tissue promoted insulin resistance (Kamei, N. et al., *J. Biol. Chem.*, 281:26602 (2006)). One conflicting result showing that genetic deletion of MCP-1 does not effect insulin resistance in the *db/db*

mouse has also appeared (Chow, F.Y. et al., *Diabetologia*, 50:471 (2007)).

Consistent with the data on MCP-1, direct studies with CCR-2 (the MCP-1 receptor) have showed that it plays a role in the formation of obesity and obesity-induced insulin resistance. Maintenance of a high fat diet increased the numbers of circulating CCR-2⁺ inflammatory monocytes in both wild-type (Tsou, C.L. et al., *J. Clin. Invest.*, 117:902 (2007)) and ApoE ^{-/-} mice (Tacke, F. et al., *J. Clin. Invest.*, 117:185 (2007)). Genetic deletion of CCR-2 reduced numbers of activated macrophages in murine adipose tissue (Lumeng, C.N. et al., *Diabetes*, 56:16 (2007)), but did not affect a population of M2 adipose macrophages thought to maintain the “lean” state (Lumeng, C.N. et al., *J. Clin. Invest.*, 117:175 (2007)). Genetic deletion of CCR-2 reduced diet-induced obesity and improved insulin sensitivity in diet-induced obesity model (Weisberg, S.P. et al., *J. Clin. Invest.*, 116:115 (2006); Cornelius, P. et al., PCT Publication No. WO 2006/013427 A2), depending on experimental conditions (Chen, A. et al., *Obes. Res.*, 13:1311 (2005)). Administration of a small molecule CCR-2 antagonist also improved insulin sensitivity in this same model (Weisberg, S.P. et al., *J. Clin. Invest.*, 116:115 (2006)).

[0009] Two studies described the important role of CCR-2 in hypertension-induced vascular inflammation, remodeling, and hypertrophy (Bush, E. et al., *Hypertension*, 36:360 (2000); Ishibashi, M. et al., *Circ. Res.*, 94:1203 (2004)).

[0010] It is known that MCP-1 is upregulated in human multiple sclerosis, and it has been shown that effective therapy with interferon β -1b reduces MCP-1 expression in peripheral blood mononuclear cells, suggesting that MCP-1 plays a role in disease progression (Iarlori, C. et al., *J. Neuroimmunol.*, 123:170-179 (2002)). Other studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating multiple sclerosis; all of these studies have been demonstrated in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the conventional animal model for multiple sclerosis. Administration of antibodies for MCP-1 to animals with EAE significantly diminished disease relapse (Kennedy, K.J. et al., *J. Neuroimmunol.*, 92:98 (1998)). Furthermore, two reports have shown that CCR-2 ^{-/-} mice are resistant to EAE (Fife, B.T. et al., *J. Exp. Med.*, 192:899 (2000); Izikson, L. et al., *J. Exp. Med.*, 192:1075 (2000)). A subsequent report extended these initial observations by examining the effects of CCR-2 deletion in mice from different strains (Gaupp, S. et

al., *Am. J. Pathol.*, 162:139 (2003)). Notably, administration of a small molecule CCR-2 antagonist also blunted disease progression in C57BL/6 mice (Brodmerkel, C.M. et al., *J. Immunol.*, 175:5370 (2005)).

- [0011] It is known that MCP-1 is upregulated in patients who develop
- 5 bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation (Reynaud-Gaubert, M. et al., *J. Heart Lung Transplant.*, 21:721-730 (2002); Belperio, J. et al., *J. Clin. Invest.*, 108:547-556 (2001)). In a murine model of bronchiolitis obliterans syndrome, administration of an antibody to MCP-1 led to attenuation of airway obliteration; likewise, CCR-2 ^{-/-} mice were resistant to airway obliteration in this same model
- 10 (Belperio, J. et al., *J. Clin. Invest.*, 108:547-556 (2001)). These data suggest that antagonism of MCP-1/CCR-2 may be beneficial in treating rejection of organs following transplantation. In addition, studies have shown that disruption of MCP-1/CCR-2 axis was able to prolong the survival of islet transplant (Lee, I. et al., *J. Immunol.*, 171:6929 (2003); Abdi, R. et al., *J. Immunol.*, 172:767 (2004)). In rat graft
- 15 models, CCR-2 and MCP-1 was shown to be upregulated in grafts that develop graft vasculopathy (Horiguchi, K. et al., *J. Heart Lung Transplant.*, 21:1090 (2002)). In another study, anti-MCP-1 gene therapy attenuated graft vasculopathy (Saiura, A. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24:1886 (2004)). One study described inhibition of experimental vein graft neointimal formation by blockage of MCP-1
- 20 (Tatewaki, H. et al., *J. Vasc. Surg.*, 45:1236 (2007)).

- [0012] Other studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating asthma. Sequestration of MCP-1 with a neutralizing antibody in ovalbumin-challenged mice resulted in marked decrease in bronchial hyperresponsiveness and inflammation (Gonzalo, J.-A. et al., *J. Exp. Med.*, 188:157 (1998)). It proved possible to reduce allergic airway
- 25 inflammation in *Schistosoma mansoni* egg-challenged mice through the administration of antibodies for MCP-1 (Lukacs, N.W. et al., *J. Immunol.*, 158:4398 (1997)). Consistent with this, MCP-1 ^{-/-} mice displayed a reduced response to challenge with *Schistosoma mansoni* egg (Lu, B. et al., *J. Exp. Med.*, 187:601 (1998)).

- 30 [0013] Other studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating kidney disease. Administration of antibodies for MCP-1 in a murine model of glomerular nephritis

resulted in a marked decrease in glomerular crescent formation and deposition of type I collagen (Lloyd, C.M. et al., *J. Exp. Med.*, 185:1371 (1997)). In addition, MCP-1 $-/-$ mice with induced nephrotoxic serum nephritis showed significantly less tubular damage than their MCP-1 $+/+$ counterparts (Tesch, G.H. et al., *J. Clin. Invest.*, 103:73
5 (1999)).

[0014] Several studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating systemic lupus erythematosus. CCR-2 $-/-$ mice exhibited prolonged survival and reduced renal disease relative to their WT counterparts in a murine model of systemic lupus
10 erythematosus (Perez de Lema, G. et al., *J. Am. Soc. Neph.*, 16:3592 (2005)). These data are consistent with the disease-modifying activity found in recent studies on genetic deletion of MCP-1 (Shimizu, S. et al., *Rheumatology* (Oxford), 43:1121 (2004); Tesch, G.H. et al., *J. Exp. Med.*, 190:1813 (1999)) or administration of a peptide antagonist of CCR-2 (Hasegawa, H. et al., *Arthritis Rheum.*, 48:2555 (2003))
15 in rodent models of lupus.

[0015] A remarkable 30-fold increase in CCR-2⁺ lamina propria lymphocytes was observed in the small bowels from Crohn's patients relative to non-diseased ileum (Connor, S.J. et al., *Gut*, 53:1287 (2004)). Also of note, there was an expansion in the subset of circulating CCR-2⁺/CD14⁺/CD56⁺ monocytes in patients with active
20 Crohn's disease relative to controls. Several rodent studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating Crohn's disease/colitis. CCR-2 $-/-$ mice were protected from the effects of dextran sodium sulfate-induced colitis (Andres, P.G. et al., *J. Immunol.*, 164:6303 (2000)). Administration of a small molecule antagonist of CCR-2, CCR-5, and CXCR3
25 (murine binding affinities = 24, 236, and 369 nM, respectively) also protected against dextran sodium sulfate-induced colitis (Tokuyama, H. et al., *Int. Immunol.*, 17:1023 (2005)). Finally, MCP-1 $-/-$ mice showed substantially reduced colonic damage (both macroscopic and histological) in a hapten-induced model of colitis (Khan, W.I. et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 291:G803 (2006)).

30 **[0016]** Two reports described the overexpression of MCP-1 in the intestinal epithelial cells and bowel mucosa of patients with inflammatory bowel disease

(Reinecker, H.C. et al., *Gastroenterology*, 108:40 (1995), and Grimm, M.C. et al., *J. Leukoc. Biol.*, 59:804 (1996)).

[0017] One study described the association of promoter polymorphism in the MCP-1 gene with scleroderma (systemic sclerosis) (Karrer, S. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 124:92 (2005)). In related models of tissue fibrosis, inhibition of CCR-2/MCP-1 axis reduced fibrosis in skin (Yamamoto, T. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 121:510 (2003); Ferreira, A.M. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 126:1900 (2006)), lung (Okuma, T. et al., *J. Pathol.*, 204:594 (2004); Gharace-Kermani, M. et al., *Cytokine*, 24:266 (2003)), kidney (Kitagawa, K. et al., *Am. J. Pathol.*, 165:237 (2004); Wada, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15:940 (2004)), heart (Hayashidani, S. et al., *Circulation*, 108:2134 (2003)), and liver (Tsuruta, S. et al., *Int. J. Mol. Med.*, 14:837 (2004)).

[0018] One study has demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating alveolitis. When rats with IgA immune complex lung injury were treated intravenously with antibodies raised against rat MCP-1 (JE), the symptoms of alveolitis were partially alleviated (Jones, M.L. et al., *J. Immunol.*, 149:2147 (1992)).

[0019] Several studies have shown the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating cancer (reviewed in: Craig, M.J. et al., *Cancer Metastasis Rev.*, 25:611 (2006); Conti, I. et al., *Seminars in Cancer Biology*, 14:149 (2004); Giles, R. et al., *Curr. Cancer Drug Targets*, 6:659 (2006)). When immunodeficient mice bearing human breast carcinoma cells were treated with an anti-MCP-1 antibody, inhibition of lung micrometastases and increases in survival were observed (Salcedo, R. et al., *Blood*, 96:34-40 (2000)). Using human clinical tumor specimens, CCR-2 expression was associated with prostate cancer progression (Lu, Y. et al., *J. Cell. Biochem.*, 101:676 (2007)). *In vitro*, MCP-1 expression has been shown to mediate prostate cancer cell growth and invasion (Lu, Y. et al., *Prostate*, 66:1311 (2006)); furthermore, MCP-1 expressed by prostate cancer cells induced human bone marrow progenitors for bone resorption (Lu, Y. et al., *Cancer Res.*, 67:3646 (2007)).

[0020] Multiple studies have described the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR-2 interaction in treating restenosis. In humans, MCP-1 levels correlate directly with risk for restenosis (Cipollone, F. et al., *Arterioscler.*

- Thromb. Vasc. Biol.*, 21:327 (2001)). Mice deficient in CCR-2 or in MCP-1 showed reductions in the intimal area and in the intima/media ratio (relative to wildtype littermates) after arterial injury (Roque, M. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22:554 (2002); Schober, A. et al., *Circ. Res.*, 95:1125 (2004); Kim, W.J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310:936 (2003)). In mice, transfection of a dominant negative inhibitor of MCP-1 in the skeletal muscle (Egashira, K. et al., *Circ. Res.*, 90:1167 (2002)) also reduced intimal hyperplasia after arterial injury. Blockade of CCR-2 using a neutralizing antibody reduced neointimal hyperplasia after stenting in primates (Horvath, C. et al., *Circ. Res.*, 90:488 (2002)).
- 10 **[0021]** Two reports describe the overexpression of MCP-1 rats with induced brain trauma (King, J.S. et al., *J. Neuroimmunol.*, 56:127 (1994), and Berman, J.W. et al., *J. Immunol.*, 156:3017 (1996)). In addition, studies have shown that both CCR-2 *-/-* (Dimitrijevic, O.B. et al., *Stroke*, 38:1345 (2007)) and MCP-1 *-/-* mice (Hughes, P.M. et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22:308 (2002)) are partially protected from
- 15 ischemia/reperfusion injury.
- [0022]** It is known that monocytes/macrophages play an important role in the development of neuropathic pain (Liu, T. et al., *Pain*, 86:25 (2000)). Consistent with this notion, a potential role for CCR-2 in the treatment of both inflammatory and neuropathic pain has been described recently. CCR-2 *-/-* mice showed altered
- 20 responses to inflammatory pain relative to their WT counterparts, including reduced pain behavior after intraplantar formalin injection and slightly reduced mechanical allodynia after intraplantar CFA injection (Abbadie, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:7947 (2003)). In addition, CCR-2 *-/-* mice did not display significant mechanical allodynia after sciatic nerve injury. Likewise, a small molecule CCR-2
- 25 antagonist reduced mechanical allodynia to ~80% of pre-injury levels after oral administration (Abbadie, C. et al., PCT Publication No. WO 2004/110376).
- [0023]** One study described the critical role of MCP-1 in ischemic cardiomyopathy (Frangogiannis, N.G. et al., *Circulation*, 115:584 (2007)). Another study described the attenuation of experimental heart failure following inhibition of
- 30 MCP-1 (Hayashidani, S. et al., *Circulation*, 108:2134 (2003)).
- [0024]** Other studies have provided evidence that MCP-1 is overexpressed in various disease states not mentioned above. These reports provide correlative

evidence that MCP-1 antagonists could be useful therapeutics for such diseases.

Another study has demonstrated the overexpression of MCP-1 in rodent cardiac allografts, suggesting a role for MCP-1 in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis (Russell, M.E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6086 (1993)).

- 5 The overexpression of MCP-1 has been noted in the lung endothelial cells of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (Antoniades, H.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5371 (1992)). Similarly, the overexpression of MCP-1 has been noted in the skin from patients with psoriasis (Deleuran, M. et al., *J. Dermatol. Sci.*, 13:228 (1996), and Gillitzer, R. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 101:127 (1993)); correlative
10 findings with predominance of CCR-2+ cells have also been reported (Vestergaard, C. et al., *Acta Derm. Venerol.*, 84:353 (2004)). Finally, a recent report has shown that MCP-1 is overexpressed in the brains and cerebrospinal fluid of patients with HIV-1-associated dementia (Garzino-Demo, A., PCT Publication No. WO 99/46991).

- [0025] In addition, CCR-2 polymorphism has been shown to be associated with
15 sarcoidosis at least in one subset of patients (Spagnolo, P. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 168:1162 (2003)).

- [0026] It should also be noted that CCR-2 has been implicated as a co-receptor for some strains of HIV (Doranz, B.J. et al., *Cell*, 85:1149 (1996)). It has also been determined that the use of CCR-2 as an HIV co-receptor can be correlated with
20 disease progression (Connor, R.I. et al., *J. Exp. Med.*, 185:621 (1997)). This finding is consistent with the recent finding that the presence of a CCR-2 mutant, CCR-2-64I, is positively correlated with delayed onset of HIV in the human population (Smith, M.W. et al., *Science*, 277:959 (1997)). Although MCP-1 has not been implicated in these processes, it may be that MCP-1 antagonists that act via binding to CCR-2 may
25 have beneficial therapeutic effects in delaying the disease progression to AIDS in HIV-infected patients.

- [0027] It should be noted that CCR-2 is also the receptor for the human chemokines MCP-2, MCP-3, and MCP-4 (Luster, *New Eng. J. Med.*, 338:436-445 (1998)). Since the new compounds of formula (I) described herein antagonize MCP-1
30 by binding to the CCR-2 receptor, it may be that these compounds of formula (I) are also effective antagonists of the actions of MCP-2, MCP-3, and MCP-4 that are mediated by CCR-2. Accordingly, when reference is made herein to "antagonism of

MCP-1,” it is to be assumed that this is equivalent to “antagonism of chemokine stimulation of CCR-2.”

[0028] Accordingly, compounds that modulate chemokine activity could demonstrate a wide range of utilities in treating inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases. PCT Publication Nos. WO 2005/021500 A1 (incorporated herein by reference and assigned to present applicant), WO 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 and WO 2008/014361 A1, disclose compounds that modulate MCP-1, MCP-2, MCP-3 and MCP-4 activity via CCR-2. The references also disclose various processes to prepare these compounds including multistep syntheses that include the introduction and subsequent removal of protecting groups.

[0029] It is desirable to find new compounds with improved pharmacological characteristics compared with known chemokine modulators. For example, it is desirable to find new compounds with equipotent dual CCR-2/5 inhibitory activity in comparison to selectivity for CCR-2 alone, predominantly CCR-2 versus CCR-5, predominantly CCR-5 versus CCR-2, or other G protein-coupled receptors (*i.e.*, 5HT_{2A} receptor). It is also desirable to find compounds with equipotent dual CCR-2/5 inhibitory activity and advantageous characteristics in one or more of the following categories:

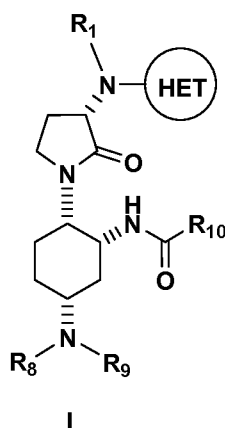
- (a) pharmaceutical properties (*i.e.*, solubility, permeability, amenability to sustained release formulations);
- (b) dosage requirements (*e.g.*, lower dosages and/or once-daily dosing);
- (c) factors which decrease blood concentration peak-to-trough characteristics (*i.e.*, clearance and/or volume of distribution);
- (d) factors that increase the concentration of active drug at the receptor (*i.e.*, protein binding, volume of distribution);
- (e) factors that decrease the liability for clinical drug-drug interactions (cytochrome P450 enzyme inhibition or induction, such as CYP 2D6 inhibition, see Dresser, G.K. et al., *Clin. Pharmacokinet.*, 38:41-57 (2000), which is hereby incorporated by reference); and
- (f) factors that decrease the potential for adverse side-effects (*e.g.*, pharmacological selectivity beyond G protein-coupled receptors, potential chemical

or metabolic reactivity, limited CNS penetration, ion-channel selectivity). It is especially desirable to find compounds having a desirable combination of the aforementioned pharmacological characteristics.

- 5 **[0030]** It is also desirable in the art to provide new and/or improved processes to prepare such compounds. These processes may be characterized, without limitation, by a) facile adaptation to larger scale production, such as pilot plant or manufacturing scales; b) process steps and/or techniques enabling improvements in the purity (including chiral purity), stability and/or ease of handling of intermediates and/or final
10 compounds; and/or c) fewer process steps.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

- [0031]** The present invention provides a novel antagonist: N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt,
15 solvate or prodrug, thereof, having unexpected equipotent dual CCR-2 and CCR-5 receptor inhibitory activity. In addition, the present invention presents a novel and unexpected combination of equipotent dual CCR-2/5 activity and desirable pharmacological characteristics. Crystalline and metabolite forms of the present
20 invention are also provided. Pharmaceutical compositions containing the same and methods of using the same as agents for the treatment of inflammatory diseases, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases is also an objective of this invention. The present disclosure also provides a process for preparing compounds of Formula (I), including N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-
25 ((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



wherein R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , and  are as described herein. Compounds that are useful intermediates of the process are also provided herein.

- 5 **[0032]** The present disclosure also provides the use of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-(2-hydroxy-1,1-dimethyl-ethyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt,
- 10 solvate or prodrug, for the manufacture of a medicament for the treatment of inflammatory diseases, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases.

- [0033]** The present disclosure also provides metabolites of active compounds, or pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof, pharmaceutical compositions
- 15 thereof and methods of using the metabolites in the treatment of inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases, particularly diabetes, multiple sclerosis, Crohn's disease and/or atherosclerosis.

- [0034]** Accordingly, disclosed herein are novel modulators of chemokine activity, or pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof, having an unexpected
- 20 combination of desirable pharmacological characteristics.

- [0035]** The present disclosure provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a therapeutically effective amount of at least

one of the compounds of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug form thereof.

[0036] The present disclosure also provides methods for treating inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases, particularly diabetes, multiple sclerosis, Crohn's disease and/or atherosclerosis, comprising administering to a host in need of such treatment a therapeutically effective amount of at least one of the compounds of the present invention, or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug form thereof.

[0037] The present disclosure provides a process for preparing compounds disclosed herein and intermediates useful therefore.

[0038] The present disclosure provides for the use of the compounds of the present invention in therapy.

[0039] The present disclosure provides the use of compounds of the present invention for the manufacture of a medicament for the treatment of inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0040] Figure 1 discloses the experimental and simulated powder patterns of the N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide.

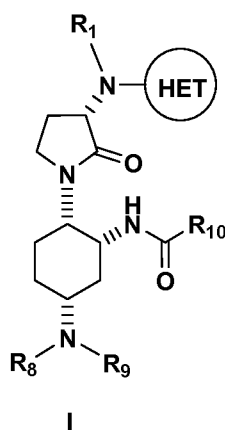
[0041] Figure 2 discloses the differential scanning calorimetry analysis of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base Form N-1.

[0042] Figure 3 discloses the thermogravimetric analysis of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base Form N-1.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0043] The present invention provides a novel antagonist: N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug, thereof, having unexpected equipotent dual CCR-2 and CCR-5

receptor activity. Additionally, the present invention provides a novel combination of desirable pharmacological characteristics. Crystalline forms and metabolites of the present invention are also provided. Pharmaceutical compositions containing the same and methods of using the same as agents for the treatment of inflammatory diseases, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases is also an objective of this invention. The present disclosure also provides a process for preparing compounds of Formula (I), including N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



10

wherein R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} , and  are as described herein. Compounds that are useful intermediates of the process are also provided herein.

[0044] N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-Butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, unexpectedly demonstrates equipotent dual CCR-2/5 receptor inhibitory activity.

[0045] Additionally, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide demonstrates a desirable combination of equipotent dual CCR-2/5 receptor inhibitory activity and pharmacological characteristics including a surprisingly high degree of oral bioavailability in combination with indications that it is highly efficacious and has excellent safety criteria.

[0046] Known modulators of chemokine receptors, such as those disclosed in PCT Publication Nos. WO 2004/071460 A1 and WO 2005/021500 A1 (U.S. Patent No. 7,163,937, issued January 16, 2007, assigned to present Applicant) are not sufficiently efficacious, as measured by their CCR-2 or CCR-5-binding ability (a
5 measure of efficacy), and/or they lack appropriate criteria for safety as indicated by ion channel selectivity as measured by hERG and Na⁺ ion channel studies.

[0047] Other known modulators of chemokine receptors, such as those disclosed in PCT Publication Nos. WO 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 and WO 2008/014361 A1, are selective as antagonist or partial agonist/antagonist of CCR-2
10 receptor activity. However, these known modulators demonstrate predominantly CCR-2 activity and are not equipotent dual antagonists, as measured by their CCR-2 and CCR-5-binding ability.

[0048] Other known modulators of chemokine receptors, such as those disclosed by Carter et al. (*American Chemical Society*, August 17, 2008) are dual CCR-2/5
15 modulators but lack appropriate criteria for safety as indicated by ion channel selectivity as measured by hERG and Na⁺ ion channel studies.

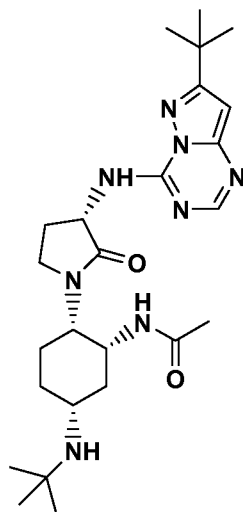
[0049] In contrast, as illustrated by the data presented herein in the section titled "Comparative Pharmacological Characteristics", *infra*, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide surprisingly exhibits equipotent CCR-5 and
20 CCR-2 binding ability. In addition, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide demonstrates a surprisingly high degree of membrane permeability, and yet maintains equipotent CCR-2/5 dual binding ability along with
25 excellent ion channel selectivity.

[0050] Accordingly, the present invention provides new chemokine modulators having equipotent CCR-2 and CCR-5 binding ability and improves pharmacological characteristics that are expected to be useful in treating inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases.

30

EMBODIMENTS

[0051] In one embodiment, the disclosure is directed to N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



5

and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0052] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide.

[0053] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, wherein the crystalline form comprises the N-1 and/or P-1 Form.

[0054] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, wherein the crystalline form comprises the N-1 Form.

[0055] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, wherein the crystalline form comprises the N-1 or P-1 Form in substantially pure form.

[0056] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, wherein the crystalline form comprises the N-1 Form in substantially pure form.

- 5 **[0057]** Another embodiment is the N-1 Form characterized by unit cell parameters substantially equal to the following:

Cell dimensions:

$$a = 7.3085(6)$$

$$b = 16.257(1)$$

10 $c = 22.688(2)$

$$\alpha^\circ = 90$$

$$\beta^\circ = 90$$

$$\gamma^\circ = 90$$

Space group $P2_12_12_1$

15 Molecules/unit cell (Z): 1

Density, calc $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$: 1.194

wherein said crystal is at a temperature of about -70°C .

- [0058]** Another embodiment is the N-2 Form characterized by (or having) a
20 power x ray diffraction pattern substantially according to Figure 1.

[0059] Another embodiment is the N-2 Form characterized by (or having) a differential scanning calorimetry thermogram substantially in accordance with that shown in Figure 2, having an endothermic transition above ca. 205°C .

- [0060]** Another embodiment is characterized by (or having) a thermal gravimetric
25 analysis curve in accordance with that shown in Figure 3.

- [0061]** Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, comprising Form N-1, characterized by the unit cell parameters found in Table 1; and/or a powder x-ray diffraction pattern
30 substantially according to Figure 1.

[0062] Another embodiment is a pharmaceutical composition comprised of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-

ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0063] Another embodiment is a pharmaceutical composition comprised of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, pharmaceutically acceptable salts, thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0064] Another embodiment is a pharmaceutical composition comprised of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, pharmaceutically acceptable salts, thereof, and at least one additional therapeutic agent.

[0065] Another embodiment is a method for modulating chemokine or chemokine receptor activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0066] Another embodiment is a method of modulating CCR-2 and CCR-5 receptor activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0067] Another embodiment is a method modulating MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1a, MIP-1b and RANTES activity that is mediated by the CCR-2 and CCR-5 receptor comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0068] Another embodiment is a method of modulating MCP-1 activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0069] Another embodiment is a method of treating a disorder, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof, said the disorder is selected from diabetes, obesity, metabolic syndrome, stroke, neuropathic pain, ischemic cardiomyopathy, psoriasis, hypertension, scleroderma, osteoarthritis, aneurism, fever, cardiovascular disease, Crohn's disease, congestive heart failure, autoimmune diseases, HIV-infection, HIV-associated dementia, psoriasis, idiopathic pulmonary fibrosis, transplant arteriosclerosis, physically- or chemically-induced brain trauma, inflammatory bowel disease, alveolitis, colitis, systemic lupus erythematosus, nephrotoxic serum nephritis, glomerulonephritis, asthma, multiple sclerosis, atherosclerosis, vasculitis, vulnerable plaques, rheumatoid arthritis, restenosis, venous neointimal hyperplasia, dialysis-graft neointimal hyperplasia, arterio-venous shunt intimal hyperplasia, organ transplantation, chronic allograft nephropathy, and cancer.

[0070] Another embodiment is a method of treating a disorder, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof, wherein said disorder is selected from diabetes, obesity, Crohn's disease, psoriasis, idiopathic pulmonary fibrosis, transplant arteriosclerosis, physically- or chemically-induced brain trauma, inflammatory bowel disease, alveolitis, colitis, systemic lupus erythematosus, nephrotoxic serum nephritis, glomerulonephritis, asthma, multiple sclerosis, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis, restenosis, organ transplantation, cancer, venous neointimal hyperplasia, dialysis-graft neointimal hyperplasia, and arterio-venous shunt neointimal hyperplasia.

[0071] Another embodiment is a method of treating a disorder, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof, wherein said disorder is selected from diabetes, obesity,

Crohn's disease, systemic lupus erythematosus, glomerulonephritis, multiple sclerosis, atherosclerosis, restenosis, organ transplantation, venous neointimal hyperplasia, dialysis-graft neointimal hyperplasia, and arterio-venous shunt neointimal hyperplasia.

5 **[0072]** Another embodiment is a method of treating a disorder, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-
 ((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-
 ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically
 acceptable salts, thereof, wherein said disorder is selected from multiple sclerosis,
 10 atherosclerosis, Crohn's disease, diabetes, venous neointimal hyperplasia, dialysis-
 graft neointimal hyperplasia, and arterio-venous shunt neointimal hyperplasia.

[0073] Another embodiment is a method of treating a disorder, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-
 ((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-
 15 ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically
 acceptable salts, thereof, wherein said disorder is being selected from restenosis,
 organ transplantation, cancer, venous neointimal hyperplasia, dialysis-graft
 neointimal hyperplasia, and arterio-venous shunt neointimal hyperplasia.

[0074] Another embodiment is a method of treating diabetes, comprising
 20 administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-
 ((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-
 ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically
 acceptable salts, thereof.

[0075] Another embodiment is a method of treating Crohn's disease, comprising
 25 administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-
 ((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-
 ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically
 acceptable salts, thereof.

[0076] Another embodiment is a method of treating multiple sclerosis, comprising
 30 administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-
 ((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-

ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0077] Another embodiment is a method of treating atherosclerosis, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-
5 ((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0078] Another embodiment is a method of treating restenosis, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-
10 ((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0079] Another embodiment is a method of treating organ transplantation, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective
15 amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0080] Another embodiment is a method of treating cancer, for example, breast cancer, liver cancer, prostate cancer and melanoma, comprising administering to a
20 patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0081] Another embodiment is a method of treating venous neointimal
25 hyperplasia, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0082] Another embodiment is a method of treating dialysis-graft neointimal
30 hyperplasia, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-

butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0083] Another embodiment is a method of treating arterio-venous shunt neointimal hyperplasia, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

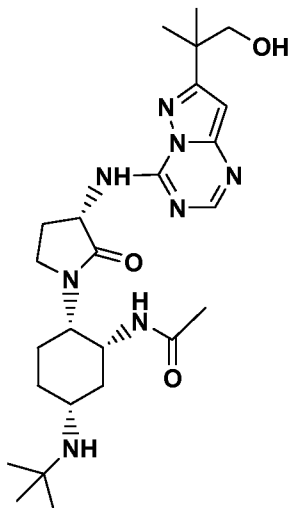
[0084] Another embodiment is a method of treating an inflammatory disease, allergic, autoimmune, metabolic, and/or cardiovascular diseases comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0085] Another embodiment is a method of treating a disease which is at least partially mediated by CCR-2 and CCR-5, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0086] Another embodiment is a method of using N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, and pharmaceutically acceptable salts, thereof, in the preparation of a medicament for the treatment of diabetes, obesity, metabolic syndrome, stroke, neuropathic pain, ischemic cardiomyopathy, psoriasis, hypertension, scleroderma, osteoarthritis, aneurism, fever, cardiovascular disease, Crohn's disease, congestive heart failure, autoimmune diseases, HIV-infection, HIV-associated dementia, psoriasis, idiopathic pulmonary fibrosis, transplant arteriosclerosis, physically- or chemically-induced brain trauma, inflammatory bowel disease, alveolitis, colitis, systemic lupus erythematosus, nephrotoxic serum nephritis, glomerulonephritis, asthma, multiple sclerosis, atherosclerosis, vasculitis, vulnerable plaques, rheumatoid arthritis, restenosis, venous neointimal hyperplasia, dialysis-graft neointimal hyperplasia, arterio-venous shunt intimal hyperplasia, organ transplantation, chronic allograft nephropathy, cancer, venous neointimal hyperplasia,

dialysis-graft neointimal hyperplasia, and arterio-venous shunt neointimal hyperplasia.

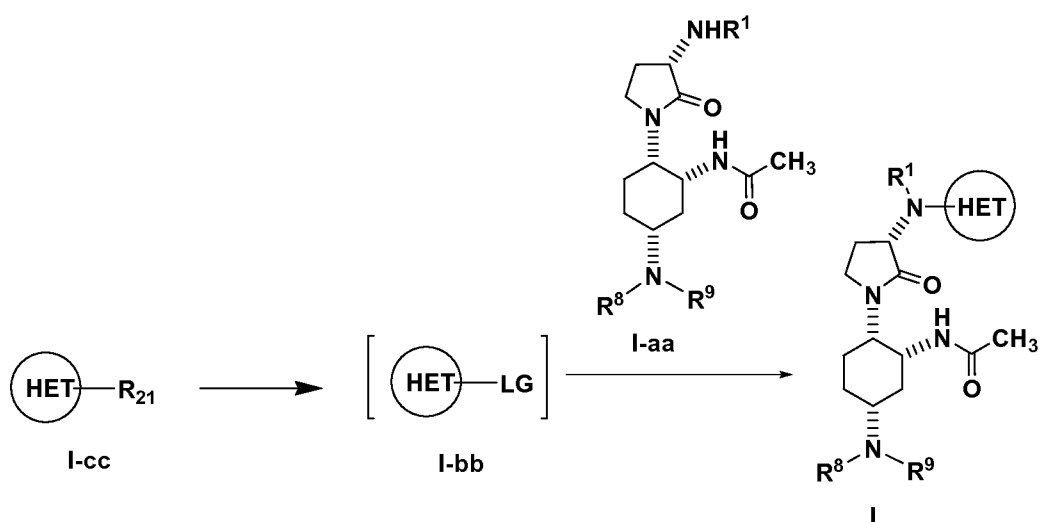
- [0087] In yet another embodiment, the disclosure is directed to N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-(2-hydroxy-1,1-dimethyl-ethyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



- and pharmaceutically acceptable salts, thereof. Pharmaceutical compositions containing the same and methods of using the same as agents for the treatment of inflammatory diseases, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases is also an embodiment of this invention.

PROCESS EMBODIMENTS

- [0088] In a first embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula I, or a salt form thereof:



comprising:

- 1) converting a hydrazone compound of formula I-cc to a compound of formula I-bb; and
- 2) coupling the compound of formula I-bb with a compound of formula I-aa; wherein:

R_1 is independently hydrogen or an amine-protecting group selected from a carbobenzyloxy group, a *tert*-butyloxycarbonyl, a fluorenylmethyloxycarbonyl group, a benzyl group, and a *p*-methoxybenzyl group;

R_8 and R_9 are independently hydrogen or C_{1-6} alkyl;

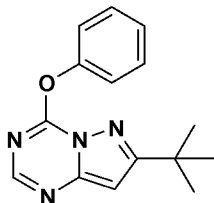
R_{21} is =O;

HET is an optionally substituted 3- to 14-membered heterocycle or heteroaryl bicyclic ring having at least one nitrogen heteroatom; and

LG is $-OR_{16}$, wherein R_{16} is C_{1-6} alkyl, phenyl, a 5- to 7-membered heteroaryl having one or more atoms selected from N, S, or O, or a 3- to 7-membered cycloalkyl, all of which are optionally substituted with 1 to 3 groups selected from halogen, CF_3 or C_{1-6} alkyl.

[0089] In a second embodiment, the disclosure provides a process wherein the compound of formula I is N-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(*tert*-butylamino)-2-((*S*)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide.

[0090] In a third embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula I wherein the compound of formula I-bb is a compound of the formula:



5 [0091] In a fourth embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula I wherein the coupling occurs via an acidic work-up followed by the addition of a base.

[0092] In a fifth embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula I wherein the acid in acidic work-up is selected from citric acid,
10 tartaric acid, glycolic acid, and hydrochloric acid.

[0093] In a sixth embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula I wherein the base is selected from K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , $NaHCO_3$ and $KHCO_3$.

[0094] In a seventh embodiment, the disclosure provides a process for preparing a
15 compound of formula I wherein converting of the hydrazone compound of formula I-cc to the compound of formula I-bb comprises reacting the hydrazone compound of formula I-cc with an acylating agent, a nucleophile, and/or a tertiary amine base in a solvent followed by interception with either (i) an alcohol in the presence of a second tertiary amine base or (ii) an alkoxide to form the compound of formula I-bb.

20 [0095] In an eighth embodiment, the disclosure provides a process wherein the acylating agent is selected from phosphorus oxychloride, oxalyl chloride, thionyl chloride and phosgene, preferably phosphorus oxychloride.

[0096] In a ninth embodiment, the disclosure provides a process wherein the tertiary amine base is selected from triethylamine, *N,N*-diisopropyl-*N*-ethyl amine, tri-
25 *n*-propylamine, *N*-methyl morpholine and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, preferably *N,N*-diisopropyl-*N*-ethyl amine.

[0097] In a tenth embodiment, the disclosure provides a process wherein the nucleophile is selected from dimethyl 4-aminopyridine, dimethylaniline, pyridine and lutidine, preferably dimethyl 4-aminopyridine.

[0098] In an eleventh embodiment, the disclosure provides a process wherein the amount of nucleophile used in the reaction is 2.0 to 4.0 equivalents, preferably, 3.0 equivalents.

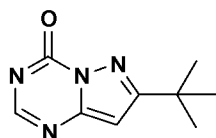
[0099] In a twelfth embodiment, the disclosure provides a process wherein the alcohol or alkoxide is selected from phenol, pentafluorophenol, methanol, ethanol, sodium methoxide and sodium phenolate, preferably, phenol.

[00100] In a thirteenth embodiment, the present disclosure provides a process wherein the second tertiary amine base is selected from triethylamine, *N-N*-diisopropyl-*N*-ethyl amine, tri-*n*-propylamine, *N*-methyl morpholine, and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, preferably, *N-N*-diisopropyl-*N*-ethyl amine.

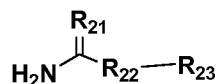
[00101] In a fourteenth embodiment, the disclosure provides a process wherein the solvent is selected from acetonitrile, dichloromethane and neat phosphorus oxychloride.

[00102] In a fifteenth embodiment, the disclosure provides a process wherein the reaction and interception is carried out at a temperature in the range of ambient temperature to 70 °C.

[00103] In a sixteenth embodiment, the disclosure provides a process wherein the compound of formula I-cc is a compound of the formula:



[00104] In a seventeenth embodiment, the present invention provides a process wherein the hydrazone compound formula I-cc is prepared by a process comprising reacting a hydrazone compound of formula I-dd



I-dd

with orthoformate in the presence of an acid at elevated temperature to yield the hydrazone compound of formula I-cc; wherein R_{21} is =O; R_{22} is -NH-NH₂; and R_{23} is

cyanoalkyl; or R_{22} and R_{23} may be taken together to form a 5- to 8-membered ring, wherein the ring may be optionally substituted with one or more substituents selected from amino, alkyl, aryl, or heteroaryl and may optionally contain 1, 2, 3, or 4 heteroatoms independently selected from the group consisting of N, S, or O.

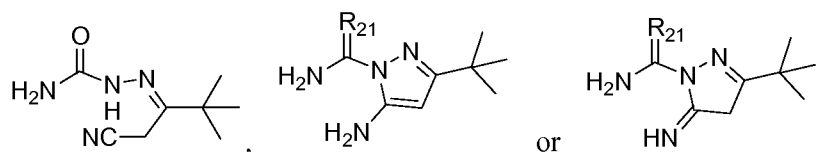
5

[00105] In an eighteenth embodiment, the disclosure provides a process wherein the orthoformate is selected from trimethylorthoformate, triethylorthoformate, and tripropylorthoformate, preferably, trimethylorthoformate.

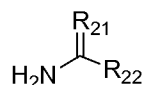
[00106] In a nineteenth embodiment, the disclosure provides a process wherein the
10 acid is selected from acetic acid, trifluoroacetic acid, hydrochloric acid and methanesulfonic acid, preferably, acetic acid.

[00107] In a twentieth embodiment, the disclosure provides a process wherein the reaction is carried out at a temperature in the range of 40-90 °C, preferably, 40-75 °C.

[00108] In a twenty-first embodiment, the disclosure provides a process wherein
15 the compound of formula I-dd is selected from a compound of the formula:



[00109] In a twenty-second embodiment, the disclosure provides a process wherein the hydrazone compound formula I-dd is prepared by a process comprising
20 condensing a compound of formula I-ee, $R_{23}=O$, with a carbazide compound of formula I-ff:



I-ff

in a solvent in the presence of a base to yield the hydrazone compound of formula I-
25 dd; wherein R_{21} is =O and R_{22} and R_{23} are as set forth above.

[00110] In a twenty-third embodiment, the disclosure provides a process wherein the solvent is selected from ethanol, 2-propanol, 1-propanol and methanol, preferably, ethanol.

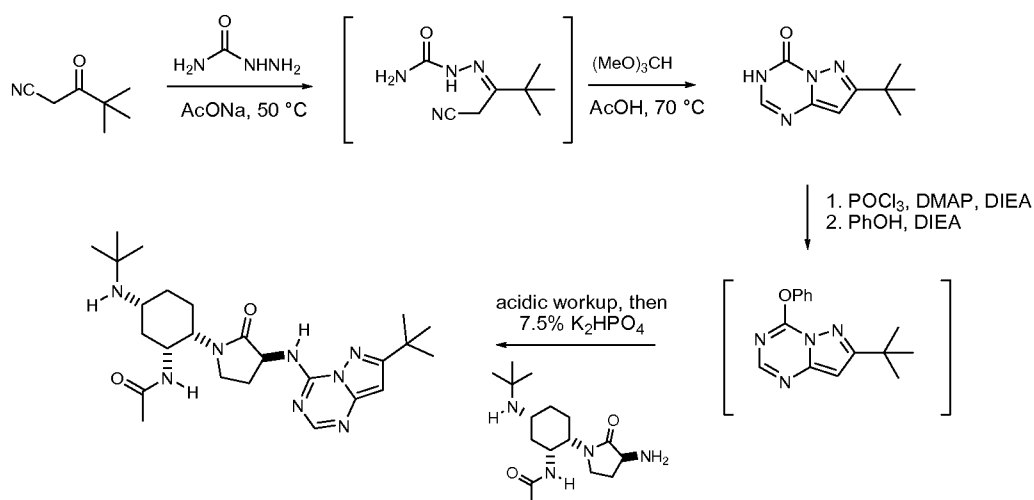
[00111] In a twenty-fourth embodiment, the disclosure provides a process wherein the base is selected from sodium acetate, potassium acetate, triethylamine and *N,N*-diisopropyl-*N*-ethyl amine, preferably, sodium acetate.

[00112] In a twenty-fifth embodiment, the disclosure provides a process wherein the condensation occurs at a temperature in the range of 20-60 °C, preferably, 25-55 °C.

[00113] In a twenty-sixth embodiment, the present invention provides a process wherein the carbazide compound of formula I-ff is semicarbazide hydrochloride.

[00114] In a twenty-seventh embodiment, the present invention provides a process wherein the compound of formula I-ee is pivaloyl acetonitrile.

[00115] In a twenty-eighth embodiment, the present invention provides a process for preparing *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-5-(*tert*-butylamino)-2-((*S*)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide comprising the process set forth in the following scheme:



15

[00116] The present invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential attributes thereof. Thus, the above embodiments should not be considered limiting. Any and all embodiments of the present invention may be taken in conjunction with any other embodiment or embodiments to describe additional embodiments. Each individual element (*e.g.*, preferable or special aspects) of the embodiments is its own independent embodiment. Furthermore, any element of an embodiment is meant to be combined with any and all other elements from any

embodiment to describe an additional embodiment. In addition, the present invention encompasses combinations of different embodiment, parts of embodiments, definitions, descriptions, and examples of the invention noted herein.

5

DEFINITIONS

[00117] The following are definitions of terms used in this specification and appended claims. The initial definition provided for a group or term herein applies to that group or term throughout the specification and claims, individually or as part of another group, unless otherwise indicated.

- 10 **[00118]** The term “alkyl” refers to straight or branched chain hydrocarbon groups having 1 to 12 carbon atoms, preferably 1 to 6 carbon atoms. When numbers appear in a subscript after the symbol “C”, the subscript defines with more specificity the number of carbon atoms that a particular group may contain. For example, “C₁₋₆alkyl” refers to straight and branched chain alkyl groups with 1 to 6 carbon atoms, such as
- 15 methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, *t*-butyl, n-pentyl, and so forth. The subscript “0” refers to a bond. Thus, the term hydroxy(C₀₋₂)alkyl or (C₀₋₂)hydroxyalkyl includes hydroxy, hydroxymethyl and hydroxyethyl. Alkyl groups may be substituted with 1 to 3 groups selected from (C₁₋₆)alkyl, (C₂₋₆)alkenyl, hydroxy, halogen, cyano, nitro, CF₃, O(C₁₋₆alkyl), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₆alkyl),
- 20 CO₂H, CO₂(C₁₋₆alkyl), NHCO₂(C₁₋₆alkyl), -S(C₁₋₆alkyl), NH₂, NH(C₁₋₆alkyl), N(C₁₋₆alkyl)₂, N(CH₃)₃⁺, SO₂(C₁₋₆alkyl), C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH(alkyl), C(=O)(C₁₋₄alkylene)N(C₁₋₄alkyl)₂, C₃₋₇cycloalkyl, phenyl, benzyl, phenylethyl, phenoxy, benzyloxy, naphthyl, a 4- to 7-membered heterocyclo, and/ or a 5- to 6-membered heteroaryl. When a substituted alkyl is
- 25 substituted with an aryl, heterocyclo, cycloalkyl, or heteroaryl group, said ringed systems are as defined below and thus may have 0, 1, 2, or 3 substituents, also as defined below.

- [00119]** When the term “alkyl” is used together with another group, such as in “arylalkyl”, this conjunction defines with more specificity at least one of the
- 30 substituents that the substituted alkyl will contain. For example, “arylalkyl” refers to a substituted alkyl group as defined above where at least one of the substituents is an aryl, such as benzyl. Thus, the term aryl(C₀₋₄)alkyl includes a substituted lower alkyl

having at least one aryl substituent and also includes an aryl directly bonded to another group, *i.e.*, aryl(C₀)alkyl.

[00120] The term “alkenyl” refers to straight or branched chain hydrocarbon groups having 2 to 12 carbon atoms and at least one double bond. Alkenyl groups of 2 to 6 carbon atoms and having one double bond are most preferred. Alkenyl groups may be substituted as described above for alkyl groups.

[00121] The term “alkynyl” refers to straight or branched chain hydrocarbon groups having 2 to 12 carbon atoms and at least one triple bond. Alkynyl groups of 2 to 6 carbon atoms and having one triple bond are most preferred. Alkynyl groups may be substituted as described above for alkyl groups.

[00122] The term “alkylene” refers to bivalent straight or branched chain hydrocarbon groups having 1 to 12 carbon atoms, preferably 1 to 8 carbon atoms, *e.g.*, {—CH₂—}_n, wherein *n* is 1 to 12, preferably 1 to 8. Lower alkylene groups, that is, alkylene groups of 1 to 2 carbon atoms, are most preferred. The terms “alkenylene” and “alkynylene” refer to bivalent radicals of alkenyl and alkynyl groups, respectively, as defined above. Alkenylene groups may be substituted as described above for alkyl groups.

[00123] The term “alkoxy” refers to an oxygen atom substituted by alkyl, as defined herein. For example, the term “alkoxy” or includes the group —O—C₁₋₆alkyl.

[00124] When a subscript is used with reference to an alkoxy, thioalkyl or aminoalkyl, the subscript refers to the number of carbon atoms that the group may contain in addition to heteroatoms.

[00125] It should be understood that the selections for all groups, including for examples, alkoxy, thioalkyl, and aminoalkyl, will be made by one skilled in the field to provide stable compounds.

[00126] The term “carbonyl” refers to a bivalent carbonyl group —C(=O)—.

[00127] The term “acyl” refers to a carbonyl group linked to an organic radical, more particularly, the group C(=O)R_e, as well as the bivalent group —C(=O)R_e—, which are linked to organic radicals. The group R_e can be selected from alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, heterocyclo, aryl, or heteroaryl as defined herein, or when appropriate, the corresponding bivalent group, *e.g.*, alkylene.

[00128] The term “cycloalkyl” refers to fully saturated and partially unsaturated hydrocarbon rings (and therefore includes “cycloalkenyl rings”) of 3 to 9, preferably 3 to 7 carbon atoms. The term “cycloalkyl” includes such rings having 0, 1, 2, or 3 substituents selected from (C₁₋₄)alkyl, (C₂₋₄)alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF₃, O(C₁₋₄alkyl), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄alkyl), CO₂H, CO₂(C₁₋₄alkyl), NHCO₂(C₁₋₄alkyl), S(C₁₋₄alkyl), NH₂, NH(C₁₋₄alkyl), N(C₁₋₄alkyl)₂, N(C₁₋₄alkyl)₃⁺, SO₂(C₁₋₄alkyl), C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH(alkyl), and/or C(=O)(C₁₋₄alkylene)N(C₁₋₄alkyl)₂. The term “cycloalkyl” also includes such rings having a second ring fused thereto (*e.g.*, including benzo, heterocyclo, or heteroaryl rings) or having a carbon-carbon bridge of 3 to 4 carbon atoms.

[00129] The term “halo” or “halogen” refers to chloro, bromo, fluoro and iodo.

[00130] The term “haloalkyl” means a substituted alkyl having one or more halo substituents. For example, “haloalkyl” includes mono, bi, and trifluoromethyl.

[00131] The term “haloalkoxy” means an alkoxy group having one or more halo substituents. For example, “haloalkoxy” includes OCF₃.

[00132] The term “heteroatoms” shall include oxygen, sulfur and nitrogen.

[00133] The term “aryl” refers to phenyl, biphenyl, fluorenyl, 1-naphthyl and 2-naphthyl. The term “aryl” includes such rings having 0, 1, 2 or 3 substituents selected from (C₁₋₄)alkyl, (C₂₋₄)alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF₃, O(C₁₋₄alkyl), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄alkyl), CO₂H, CO₂(C₁₋₄alkyl), NHCO₂(C₁₋₄alkyl), S(C₁₋₄alkyl), NH₂, NH(C₁₋₄alkyl), N(C₁₋₄alkyl)₂, N(C₁₋₄alkyl)₃⁺, SO₂(C₁₋₄alkyl), C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH(alkyl), and/or C(=O)(C₁₋₄alkylene)N(C₁₋₄alkyl)₂.

[00134] The terms “heterocyclo” or “heterocyclic” refers to substituted and unsubstituted non-aromatic (which may be partially or fully saturated) 3- to 15-membered rings having 1 to 4 heteroatoms. Such rings can be 3- to 7-membered monocyclic groups, 7- to 11-membered bicyclic groups, and 10- to 15-membered tricyclic groups. Each ring of the heterocyclo group containing a heteroatom can contain one or two oxygen or sulfur atoms and/or from 1 to 4 nitrogen atoms provided that the total number of heteroatoms in each ring is four or less, and further provided that the ring contains at least one carbon atom. The fused rings completing bicyclic and tricyclic groups may contain only carbon atoms and may be saturated, partially

- saturated, or unsaturated. The nitrogen and sulfur atoms may optionally be oxidized and the nitrogen atoms may optionally be quaternized. The heterocyclo group may be attached at any available nitrogen or carbon atom. The heterocyclo ring may contain 0, 1, 2 or 3 substituents selected from (C₁₋₄)alkyl, (C₂₋₄)alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF₃, O(C₁₋₄alkyl), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄alkyl), CO₂H, CO₂(C₁₋₄alkyl), NHCO₂(C₁₋₄alkyl), S(C₁₋₄alkyl), NH₂, NH(C₁₋₄alkyl), N(C₁₋₄alkyl)₂, N(C₁₋₄alkyl)₃⁺, SO₂(C₁₋₄alkyl), C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH₂, C(=O)(C₁₋₄alkylene)NH(alkyl), and/or C(=O)(C₁₋₄alkylene)N(C₁₋₄alkyl)₂. Exemplary heterocyclic groups include azetidiny, pyrrolidiny, oxetany, imidazoliny, oxazolidiny, isoxazoliny, thiazolidiny, isothiazolidiny, tetrahydrofurany, piperidy, piperaziny, 2-oxopiperaziny, 2-oxopiperidy, 2-oxopyrrolodiny, 2-oxoazepiny, azepiny, 4-piperidony, tetrahydropyrany, morpholiny, thiamorpholiny, thiamorpholiny sulfoxide, thiamorpholiny sulfone, 1,3-dioxolane, quinuclidiny, tetrahydro-1,1-dioxothieny and the like.
- [00135]** The term “heteroaryl” refers to substituted and unsubstituted aromatic 3- to 14-membered rings having 1 to 4 heteroatoms selected from O, S, or N in at least one of the rings. Said rings can be 5- or 6-membered monocyclic groups, 9- or 10-membered bicyclic groups, and 11- to 14-membered tricyclic groups. Each ring of the heteroaryl group containing a heteroatom can contain one or two oxygen or sulfur atoms and/or from 1 to 4 nitrogen atoms provided that the total number of heteroatoms in each ring is four or less and each ring has at least one carbon atom. The fused rings completing the bicyclic and tricyclic groups may contain only carbon atoms and may be saturated, partially saturated, or unsaturated. The nitrogen and sulfur atoms may optionally be oxidized and the nitrogen atoms may optionally be quaternized. Heteroaryl groups which are bicyclic or tricyclic must include at least one fully aromatic ring but the other fused ring or rings may be aromatic or non-aromatic. The heteroaryl group may be attached at any available nitrogen or carbon atom of any ring. The heteroaryl ring system may contain 0, 1, 2 or 3 substituents selected from (C₁₋₄)alkyl, (C₂₋₄)alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF₃, O(C₁₋₄alkyl), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄alkyl), CO₂H, CO₂(C₁₋₄alkyl), NHCO₂(C₁₋₄alkyl), S(C₁₋₄alkyl), NH₂, NH(C₁₋₄alkyl), N(C₁₋₄alkyl)₂, N(C₁₋₄alkyl)₃⁺, SO₂(C₁₋₄alkyl),

$C(=O)(C_{1-4}\text{alkylene})NH_2$, $C(=O)(C_{1-4}\text{alkylene})NH(\text{alkyl})$, and/or $C(=O)(C_{1-4}\text{alkylene})N(C_{1-4}\text{alkyl})_2$.

[00136] Exemplary heteroaryl groups include pyrrolyl, pyrazolyl, pyrazolinyl, imidazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, thiadiazolyl, isothiazolyl, furanyl, thienyl, oxadiazolyl, pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, triazinyl, indolyl, benzothiazolyl, benzodioxolyl, benzoxazolyl, benzothienyl, quinolinyl, tetrahydroisoquinolinyl, isoquinolinyl, benzimidazolyl, benzopyranyl, indoliziny, benzofuranyl, chromonyl, coumarinyl, benzopyranyl, cinnoliny, quinoxaliny, indazolyl, pyrrolopyridyl, furopyridyl, dihydroisoindolyl, tetrahydroquinolinyl and the like. Particular heteroaryl groups include, for example, 6-substituted quinazolin-4-yl and 6-trifluoromethyl-quinazolin-4-yl.

[00137] Where a group is optionally substituted, it shall include substituted and unsubstituted groups.

[00138] The compounds herein described may have asymmetric centers.

Compounds of the present invention containing an asymmetrically substituted atom may be isolated in optically active or racemic forms. It is well known in the art how to prepare optically active forms, such as by resolution of racemic forms or by synthesis from optically active starting materials. Many geometric isomers of olefins, C=N double bonds, and the like can also be present in the compounds described herein, and all such stable isomers are contemplated in the present invention. Cis and trans geometric isomers of the compounds of the present invention are described and may be isolated as a mixture of isomers or as separated isomeric forms. All chiral, diastereomeric, racemic forms and all geometric isomeric forms of a structure are intended, unless the specific stereochemistry or isomeric form is specifically indicated.

[00139] One enantiomer of compounds disclosed herein may display superior activity compared with the other. Thus, all of the stereochemistries are considered to be a part of the present invention. When required, separation of the racemic material can be achieved by HPLC using a chiral column or by a resolution using a resolving agent such as camphonic chloride as in Young, S.D. et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2602-2605 (1995).

[00140] The phrase “pharmaceutically acceptable” is employed herein to refer to those compounds, materials, compositions, and/or dosage forms which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of human beings and animals without excessive toxicity, irritation, allergic response, or other problem or complication, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio.

[00141] As used herein, “pharmaceutically acceptable salts” refer to derivatives of the disclosed compounds wherein the parent compound is modified by making acid or base salts thereof. Examples of pharmaceutically acceptable salts include, but are not limited to, mineral or organic acid salts of basic residues such as amines; alkali or organic salts of acidic residues such as carboxylic acids; and the like. The pharmaceutically acceptable salts include the conventional non-toxic salts or the quaternary ammonium salts of the parent compound formed, for example, from non-toxic inorganic or organic acids. For example, such conventional non-toxic salts include those derived from inorganic acids such as hydrochloric, benzene sulfonic, hydrobromic, sulfuric, sulfamic, phosphoric, nitric and the like; and the salts prepared from organic acids such as acetic, propionic, succinic, glycolic, stearic, lactic, malic, tartaric, citric, ascorbic, pantoic, maleic, hydroxymaleic, phenylacetic, glutamic, benzoic, salicylic, sulfanilic, 2-acetoxybenzoic, fumaric, toluenesulfonic, methanesulfonic, ethane disulfonic, oxalic, isethionic, and the like.

[00142] The pharmaceutically acceptable salts of the present invention can be synthesized from the parent compound which contains a basic or acidic moiety by conventional chemical methods. Generally, such salts can be prepared by reacting the free acid or base forms of these compounds with a stoichiometric amount of the appropriate base or acid in water or in an organic solvent, or in a mixture of the two; generally, nonaqueous media like ether, ethyl acetate, ethanol, isopropanol, or acetonitrile are preferred. Lists of suitable salts are found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985), the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

[00143] Since prodrugs are known to enhance numerous desirable qualities of pharmaceuticals (*e.g.*, solubility, bioavailability, manufacturing, etc.) the compounds of the present invention may be delivered in prodrug form. Thus, the present invention is intended to cover prodrugs of the presently claimed compounds, methods

of delivering the same and compositions containing the same. "Prodrugs" are intended to include any covalently bonded carriers which release an active parent drug of the present invention *in vivo* when such prodrug is administered to a mammalian subject. Prodrugs in the present invention are prepared by modifying functional groups present in the compound in such a way that the modifications are cleaved, either in routine manipulation or *in vivo*, to the parent compound. Prodrugs include compounds of the present invention wherein a hydroxy, amino, or sulfhydryl group is bonded to any group that, when the prodrug of the present invention is administered to a mammalian subject, it cleaves to form a free hydroxyl, free amino, or free sulfhydryl group, respectively. Examples of prodrugs include, but are not limited to, acetate, formate and benzoate derivatives of alcohol and amine functional groups in the compounds of the present invention.

[00144] "Stable compound" and "stable structure" are meant to indicate a compound that is sufficiently robust to survive isolation to a useful degree of purity from a reaction mixture, and formulation into an efficacious therapeutic agent. The present invention is intended to embody stable compounds.

[00145] "Therapeutically effective amount" is intended to include an amount of a compound of the present invention alone or an amount of the combination of compounds claimed or an amount of a compound of the present invention in combination with other active ingredients effective to inhibit both CCR-2 and CCR-5 or effective to treat or prevent disorders as discussed herein.

[00146] As used herein, "treating" or "treatment" cover the treatment of a disease-state in a mammal, particularly in a human, and include: (a) preventing the disease-state from occurring in a mammal, in particular, when such mammal is predisposed to the disease-state but has not yet been diagnosed as having it; (b) inhibiting the disease-state, *i.e.*, arresting its development; and/or (c) relieving the disease-state, *i.e.*, causing regression of the disease state.

[00147] The names used herein to designate a specific form, *e.g.*, "N-1" or "P-1", should not be considered limiting with respect to any other substance possessing similar or identical physical and chemical characteristics, but rather it should be understood that these designations are mere identifiers that should be interpreted according to the characterization information also presented herein.

[00148] The present invention provides crystalline forms of the free base of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide as a novel material, in particular, in a pharmaceutically acceptable form. In certain preferred embodiments, crystalline forms of the free base are in substantially pure form. Preferred embodiments of the free base are disclosed in the examples as the N-1 form. Additionally, it is believed that the free base may exist as the P-1 form and/or a combination of the N-1 and P-1 forms.

[00149] As used herein “polymorph” refers to crystalline forms having the same chemical composition but different spatial arrangements of the molecules, atoms, and/or ions forming the crystal.

[00150] As used herein “solvate” refers to a crystalline form of a molecule, atom, and/or ions that further contains molecules of a solvent or solvents incorporated into the crystalline structure. The solvent molecules in the solvate may be present in a regular arrangement and/or a non-ordered arrangement. The solvate may comprise either a stoichiometric or nonstoichiometric amount of the solvent molecules. For example, a solvate with a nonstoichiometric amount of solvent molecules may result from partial loss of solvent from the solvate.

[00151] The present invention is intended to include all isotopes of atoms occurring in the present compounds. Isotopes include those atoms having the same atomic number but different mass numbers. By way of general example and without limitation, isotopes of hydrogen include deuterium and tritium. Isotopes of carbon include ^{13}C and ^{14}C . Isotopically-labeled compounds of the invention can generally be prepared by conventional techniques known to those skilled in the art or by processes analogous to those described herein, using an appropriate isotopically-labeled reagent in place of the non-labeled reagent otherwise employed.

[00152] As used herein “amorphous” refers to a solid form of a molecule, atom, and/or ions that is not crystalline. An amorphous solid does not display a definitive x-ray diffraction pattern.

[00153] As used herein, “substantially pure,” when used in reference to a crystalline form, means a compound having a purity greater than 90 weight %, including greater than 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 and 99 weight %, and also

including equal to about 100 weight % of Compound I, based on the weight of the compound. The remaining material comprises other form(s) of the compound, and/or reaction impurities and/or processing impurities arising from its preparation. For example, a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base or salt, may be deemed substantially pure in that it has a purity greater than 90 weight %, as measured by means that are at this time known and generally accepted in the art, where the remaining less than 10 weight % of material comprises other form(s) of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base or salt, and/or reaction impurities and/or processing impurities.

[00154] Samples of the crystalline forms may be provided with substantially pure phase homogeneity, indicating the presence of a dominant amount of a single crystalline form and optionally minor amounts of one or more other crystalline forms. The presence of more than one crystalline form in a sample may be determined by techniques such as powder x-ray diffraction (PXRD) or solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy (SSNMR). For example, the presence of extra peaks in the comparison of an experimentally measured PXRD pattern with a simulated PXRD pattern may indicate more than one crystalline form in the sample. The simulated PXRD may be calculated from single crystal x-ray data. See Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns," Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (April 1963).

[00155] Preferably, the crystalline form has substantially pure phase homogeneity as indicated by less than 10%, preferably less than 5%, and more preferably less than 2% of the total peak area in the experimentally measured PXRD pattern arising from the extra peaks that are absent from the simulated PXRD pattern. Most preferred is a crystalline form having substantially pure phase homogeneity with less than 1% of the total peak area in the experimentally measured PXRD pattern arising from the extra peaks that are absent from the simulated PXRD pattern.

[00156] Procedures for the preparation of crystalline forms are known in the art. The crystalline forms may be prepared by a variety of methods, including for

example, crystallization or recrystallization from a suitable solvent, sublimation, growth from a melt, solid state transformation from another phase, crystallization from a supercritical fluid, and jet spraying. Techniques for crystallization or recrystallization of crystalline forms from a solvent mixture include, for example, evaporation of the solvent, decreasing the temperature of the solvent mixture, crystal seeding a supersaturated solvent mixture of the molecule and/or salt, freeze drying the solvent mixture, and addition of antisolvents (countersolvents) to the solvent mixture.

5 [00157] The forms may be characterized and distinguished using single crystal x-ray diffraction, which is based on unit cell measurements of a single crystal of a form at a fixed analytical temperature. A detailed description of unit cells is provided in Stout et al., Chapter 3, *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Co., New York (1968). Alternatively, the unique arrangement of atoms in spatial relation within the crystalline lattice may be characterized according to the observed fractional atomic coordinates. Another means of characterizing the crystalline structure is by powder x-ray diffraction analysis in which the experimental or observed diffraction profile is compared to a simulated profile representing pure powder material, both run at the same analytical temperature, and measurements for the subject form characterized as a series of 2θ values.

15 [00158] Other means of characterizing the form may be used, such as solid state nuclear magnetic resonance (SSNMR), differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis. These parameters may also be used in combination to characterize the subject form.

[00159] The term “negligible weight loss,” as employed herein, as characterized by TGA indicates the presence of a neat (non-solvated) crystal form.

25 [00160] In one embodiment of the invention, a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base or salt, is provided in substantially pure form. This crystalline form may be employed in pharmaceutical compositions which may optionally include one or more other components selected, for example, from the group consisting of excipients, carriers, and one of other active pharmaceutical ingredients or active chemical entities of different molecular structures.

[00161] Preferably, the crystalline form has substantially pure phase homogeneity as indicated by less than 10%, preferably less than 5%, and more preferably less than 2% of the total peak area in the experimentally measured PXRD pattern arising from the extra peaks that are absent from the simulated PXRD pattern. Most preferred is a
5 crystalline form having substantially pure phase homogeneity with less than 1% of the total peak area in the experimentally measured PXRD pattern arising from the extra peaks that are absent from the simulated PXRD pattern.

[00162] In another embodiment, a composition is provided consisting essentially of the crystalline forms of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-
10 butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base or salt. The composition of this embodiment may comprise at least 90 weight % of the form, based on its weight in the composition.

[00163] The presence of reaction impurities and/or processing impurities may be determined by analytical techniques known in the art, such as, for example,
15 chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry or infrared spectroscopy.

[00164] Crystalline forms may be prepared by a variety of methods, including for example, crystallization or recrystallization from a suitable solvent, sublimation, growth from a melt, solid state transformation from another phase, crystallization
20 from a supercritical fluid, and jet spraying. Techniques for crystallization or recrystallization of crystalline forms from a solvent mixture include, for example, evaporation of the solvent, decreasing the temperature of the solvent mixture, crystal seeding a supersaturated solvent mixture of the molecule and/or salt, freeze drying the solvent mixture, and addition of antisolvents (countersolvents) to the solvent mixture.
25 High throughput crystallization techniques may be employed to prepare crystalline forms including polymorphs.

[00165] Crystals of drugs, including polymorphs, methods of preparation, and characterization of drug crystals are discussed in Byrn, S.R. et al., *Solid-State Chemistry of Drugs*, 2nd Edition, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

30 [00166] For crystallization techniques that employ solvent, the choice of solvent or solvents is typically dependent upon one or more factors, such as solubility of the compound, crystallization technique, and vapor pressure of the solvent.

Combinations of solvents may be employed; for example, the compound may be solubilized into a first solvent to afford a solution, followed by the addition of an antisolvent to decrease the solubility of the compound in the solution and to afford the formation of crystals. An “antisolvent” is a solvent in which the compound has low solubility. Suitable solvents for preparing crystals include polar and nonpolar solvents.

[00167] In one method to prepare crystals, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base or salt, is suspended and/or stirred in a suitable solvent to afford a slurry, which may be heated to promote dissolution. The term “slurry,” as used herein, means a saturated solution, which may also contain an additional amount of the solid to afford a heterogeneous mixture at a given temperature. Suitable solvents in this regard include, for example, polar aprotic solvents and polar protic solvents, and mixtures of two or more of these, as disclosed herein.

[00168] Seed crystals may be added to any crystallization mixture to promote crystallization. As will be clear to the skilled artisan, seeding is used as a means of controlling growth of a particular crystalline form or as a means of controlling the particle size distribution of the crystalline product. Accordingly, calculation of the amount of seeds needed depends on the size of the seed available and the desired size of an average product particle as described, for example, in Mullin, J.W. et al., “Programmed cooling of batch crystallizers,” *Chemical Engineering Science*, 26:369-377 (1971). In general, seeds of small size are needed to effectively control the growth of crystals in the batch. Seeds of small size may be generated by sieving, milling, or micronizing of larger crystals, or by micro-crystallization of solutions. Care should be taken that milling or micronizing of crystals does not result in any change in crystallinity from the desired crystal form (*i.e.*, change to amorphous or to another polymorph).

[00169] A cooled mixture may be filtered under vacuum, and the isolated solids may be washed with a suitable solvent, such as cold recrystallization solvent, and dried under a nitrogen purge to afford the desired crystalline form. The isolated solids may be analyzed by a suitable spectroscopic or analytical technique, such as

SSNMR, DSC, PXRD, or the like, to assure formation of the preferred crystalline form of the product. The resulting crystalline form is typically produced in an amount of greater than about 70 weight % isolated yield, but preferably greater than 90 weight % based on the weight of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base or salt, originally employed in the crystallization procedure. The product may be co-milled or passed through a mesh screen to de-lump the product, if necessary.

[00170] Crystalline forms may be prepared directly from the reaction medium of the final process step for preparing N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base or salt. This may be achieved, for example, by employing in the final process step a solvent or mixture of solvents from which the compound may be crystallized. Alternatively, crystalline forms may be obtained by distillation or solvent addition techniques. Suitable solvents for this purpose include any of those solvents described herein, including protic polar solvents, such as alcohols, and aprotic polar solvents, such as ketones.

[00171] By way of general guidance, the reaction mixture may be filtered to remove any undesired impurities, inorganic salts, and the like, followed by washing with reaction or crystallization solvent. The resulting solution may be concentrated to remove excess solvent or gaseous constituents. If distillation is employed, the ultimate amount of distillate collected may vary, depending on process factors including, for example, vessel size, stirring capability, and the like. By way of general guidance, the reaction solution may be distilled to about 1/10 the original volume before solvent replacement is carried out. The reaction may be sampled and assayed to determine the extent of the reaction and the wt % product in accordance with standard process techniques. If desired, additional reaction solvent may be added or removed to optimize reaction concentration. Preferably, the final concentration is adjusted to about 50 wt % at which point a slurry typically results.

[00172] It may be preferable to add solvents directly to the reaction vessel without distilling the reaction mixture. Preferred solvents for this purpose are those which may ultimately participate in the crystalline lattice, as discussed above in connection

with solvent exchange. Although the final concentration may vary depending on desired purity, recovery and the like, the final concentration of the free base in solution is preferably about 4% to about 7%. The reaction mixture may be stirred following solvent addition and simultaneously warmed. By way of illustration, the reaction mixture may be stirred for about 1 hour while warming to about 70 °C. The reaction is preferably filtered hot and washed with either the reaction solvent, the solvent added or a combination thereof. Seed crystals may be added to any crystallization solution to initiate crystallization.

[00173] The various forms described herein may be distinguishable from one another through the use of various analytical techniques known to one of ordinary skill in the art. Such techniques include, but are not limited to, powder x-ray diffraction (PXRD), differential scanning calorimetry (DSC) and/or thermogravimetric analysis (TGA). Alternatively, the forms may be characterized and distinguished using single crystal x-ray diffraction, which is based on unit cell measurements of a single crystal of a given form at a fixed analytical temperature. A detailed description of unit cells is provided in Stout et al., Chapter 3, *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Co., New York (1968). Specifically, the unique arrangement of atoms in spatial relation within the crystalline lattice may be characterized according to the observed fractional atomic coordinates. Another means of characterizing the crystalline structure is by powder x-ray diffraction analysis in which the observed diffraction profile is compared to a simulated profile generated from single crystal structure data. Powder x-ray diffraction measurements for the subject form are characterized as a series of 2θ values (usually four or more).

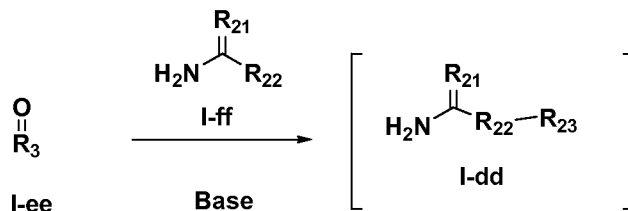
[00174] Other means of characterizing the form may be used, such as solid state nuclear magnetic resonance (SSNMR) spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), thermography and gross examination of the crystalline or amorphous morphology. These parameters may also be used in combination to characterize the subject form.

[00175] One of ordinary skill in the art will appreciate that an x-ray diffraction pattern may be obtained with a measurement error that is dependent upon the measurement conditions employed. In particular, it is generally known that intensities in an x-ray diffraction pattern may fluctuate depending upon measurement

conditions employed and the shape or morphology of the crystal. It should be further understood that relative intensities may also vary depending upon experimental conditions and, accordingly, the exact order of intensity should not be taken into account. Additionally, a measurement error of diffraction angle for a conventional x-ray diffraction pattern is typically about 0.2° 2θ values or less, preferably about 0.1° 2θ values (as discussed hereinafter), and such degree of measurement error should be taken into account as pertaining to the aforementioned diffraction angles. Consequently, it is to be understood that the crystal forms of the instant invention are not limited to the crystal forms that provide x-ray diffraction patterns completely identical to the x-ray diffraction patterns depicted in the accompanying Figures disclosed herein. Any crystal forms that provide x-ray diffraction patterns substantially identical to those disclosed in the accompanying Figures fall within the scope of the present invention. The ability to ascertain substantial identities of x-ray diffraction patterns is within the purview of one of ordinary skill in the art.

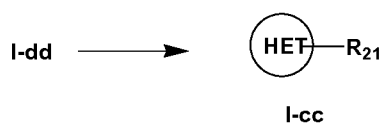
SYNTHESIS

Scheme 1: Preparation of hydrazone I-dd

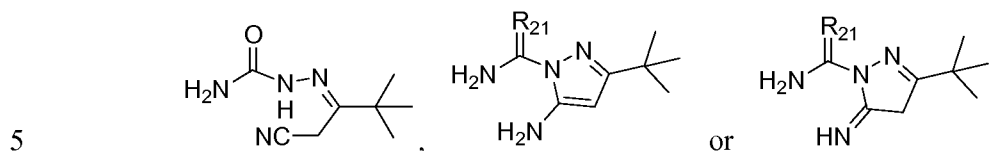


[00176] A carbazide of formula I-ff, such as semicarbazide hydrochloride, was condensed with a compound of formula I-ee, such as pivaloyl acetonitrile, in a solvent, for example, ethanol, 2-propanol, 1-propanol and methanol, preferably ethanol, in the presence of a base, for example, sodium acetate, potassium acetate, triethylamine and *N,N*-diisopropyl-*N*-ethyl amine, preferably sodium acetate, at a temperature in the range of 20-60 °C, preferably, in the range of 25-55 °C, to provide the hydrazone compound of formula I-dd, wherein R_{21} is =O; R_{22} is -NH-NH₂; and R_{23} is cyanoalkyl; or R_{22} and R_{23} may be taken together to form a 5- to 8-membered ring, wherein the ring may be optionally substituted with one or more substituents selected from amino, alkyl, aryl, or heteroaryl and may optionally contain 1, 2, 3 or 4 heteroatoms independently selected from the group consisting of N, S, or O.

Scheme 2: Preparation of hydrazone of Formula I-cc

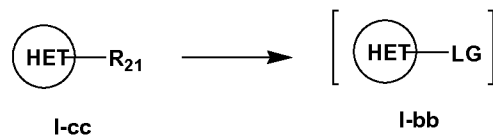


[00177] A hydrazone compound of formula I-dd, such as



was reacted with an orthoformate, for example, trimethylorthoformate, triethylorthoformate, and tripropylorthoformate, preferably, trimethylorthoformate, orthoformate in the presence of an acid, for example, acetic acid, trifluoroacetic acid, hydrochloric acid and methanesulfonic acid, preferably acetic acid, at elevated
10 temperature, such as 40-90 °C, preferably, 40-75 °C, to yield the hydrazone compound of formula I-cc, wherein $\text{R}_{21} = \text{O}$ and R_{22} and R_{23} are as set forth above.

Scheme 3: Conversion of Compound I-cc

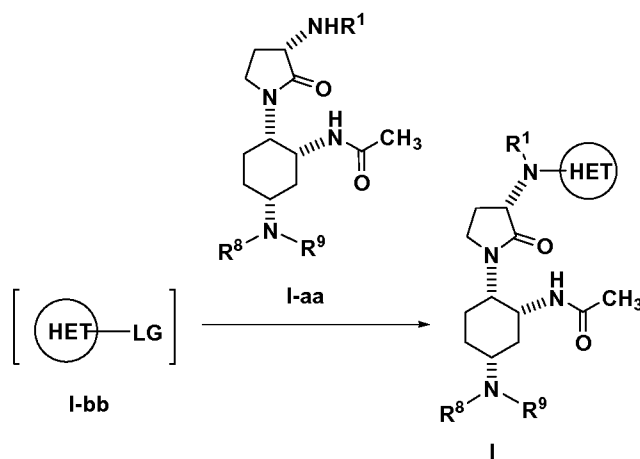


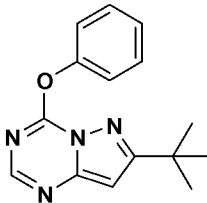
15 [00178] A hydrazone compound of formula I-cc is converted to a compound of Formula I-bb, wherein LG is $-\text{OR}_{16}$, wherein R_{16} is C_{1-6} alkyl, phenyl, a 5- to 7-membered heteroaryl having one or more atoms selected from N, S, or O, or a 3- to 7-membered cycloalkyl, all of which are optionally substituted with 1 to 3 groups selected from halogen, CF_3 or C_{1-6} alkyl, by reacting the hydrazone compound of
20 formula I-cc, for example, 7-*tert*-butyl-3H-pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-one, with an acylating agent, a nucleophile, such as dimethyl 4-aminopyridine (DMAP), and/or a tertiary amine base, in a solvent, for example, acetonitrile, dichloromethane and neat phosphorus oxychloride, followed by interception with either (i) an alcohol in the presence of a second tertiary amine base or (ii) an alkoxide to form the compound of
25 formula I-bb. Examples of acylating agents that may be used are phosphorus oxychloride (POCl_3), oxalyl chloride, thionyl chloride and phosgene. A preferred

acylating agent is POCl₃. Triethylamine, *N,N*-diisopropyl-*N*-ethyl amine (DIEA), tri-
 n-propylamine, *N*-methyl morpholine and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO)
 are examples of tertiary amine bases that may be used in the conversion. A preferred
 tertiary amine base is DIEA. Generally, the amount of nucleophile used in the
 5 reaction is 2.0 to 4.0, preferably, 3.0, equivalents. Examples of alcohols or alkoxides
 that may be used in the conversion are phenol, pentafluorophenol, methanol, ethanol,
 sodium methoxide and sodium phenolate with phenol being the preferred alcohol.
 Generally, the reaction and interception may be carried out at a temperature in the
 range of ambient temperature to 70 °C.

10

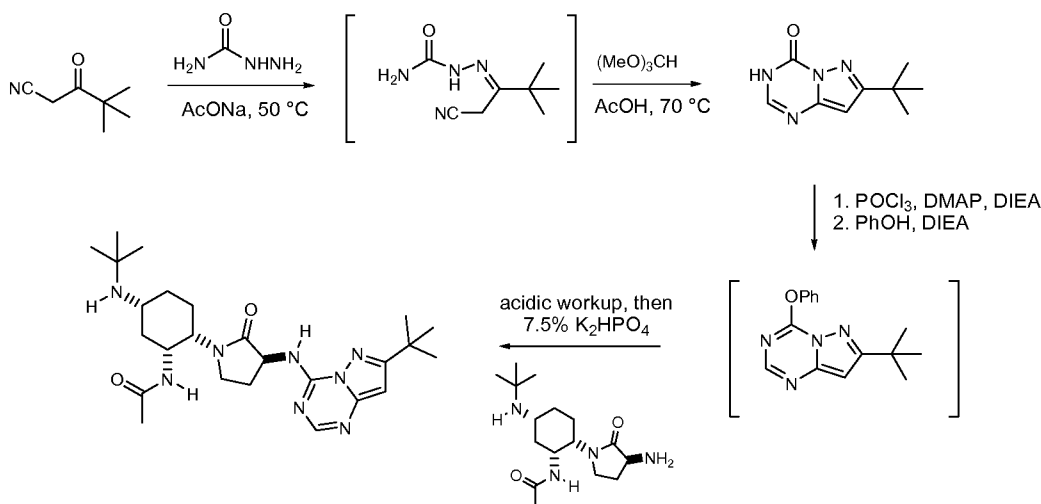
Scheme 4: Preparation of a compound of formula I, or a salt thereof



[00179] A compound of formula I-bb, for example, , is coupled
 with a compound of formula I-aa, prepared in a similar manner as described in WO
 15 2008/014381 A1, wherein: R₁ is independently hydrogen or an amine-protecting
 group selected from a carbobenzyloxy (Cbz) group, a *tert*-butoxycarbonyl (BOC), a
 fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group, a benzyl (Bn) group, and a p-
 methoxybenzyl (PMB) group, preferably hydrogen; R₈ and R₉ are independently
 hydrogen or C₁₋₆alkyl; R₂₁ is =O; HET is an optionally substituted 3- to 14-membered
 20 heterocyclo or heteroaryl bicyclic ring having at least one nitrogen heteroatom,
 preferably two to four total heteroatoms, especially four nitrogen atoms; and LG is -

OR₁₆, wherein R₁₆ is C₁₋₆alkyl, phenyl, a 5- to 7-membered heteroaryl having one or more atoms selected from N, S, or O, or a 3- to 7-membered cycloalkyl, all of which are optionally substituted with 1 to 3 groups selected from halogen, CF₃ or C₁₋₆alkyl, to obtain the corresponding compound of formula I, for example, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a salt thereof. Coupling may be performed by coupling methods commonly known in art, or, alternatively, via an acidic work-up followed by the addition of a base. Examples of acids that may be used in the acidic work-up are citric acid, tartaric acid, glycolic acid, and hydrochloric acid. Examples of bases that may be added are K₂HPO₄, Na₂HPO₄, NaHCO₃ and KHCO₃.

[00180] Specifically, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide may be prepared according to the following scheme:



[00181] For the process of this invention, starting materials are commercially available or can be readily prepared by one of ordinary skill in the art. Solvents, temperatures, pressures, starting materials having the desired groups, and other reaction conditions, may be readily selected as appropriate by one of ordinary skill in the art. The process can be scaled up in order to prepare larger quantities of the compound of formula I, such as in a commercial production facility.

EXAMPLES

[00182] The following Examples illustrate embodiments of the inventive compounds and starting materials, and are not intended to limit the scope of the claims.

- 5 [00183] As appropriate, reactions were conducted under an atmosphere of dry nitrogen (or argon). For anhydrous reactions, DRISOLV® solvents from EM were employed. For other reactions, reagent grade or HPLC grade solvents were utilized. Unless otherwise stated, all commercially obtained reagents were used as received.

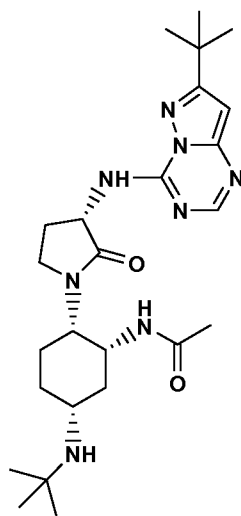
- [00184] LC/MS measurements were obtained using a Shimadzu HPLC/Waters ZQ
10 single quadrupole mass spectrometer hybrid system. Data for the peak of interest are reported from positive-mode electrospray ionization. NMR (nuclear magnetic resonance) spectra were typically obtained on Bruker or JEOL 400 MHz and 600 MHz instruments in the indicated solvents. All chemical shifts are reported in ppm from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard. ¹H NMR
15 spectral data are typically reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, br s = broad singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, t = triplet, q = quartet, sep = septet, m = multiplet, app = apparent), coupling constants (Hz), and integration.

- [00185] One of skill in the art will recognize the standard abbreviations utilized herein. For ease of reference, the abbreviations include, but are not necessarily
20 limited to: Hg = mercury; sat. = saturated, HPLC = high-performance liquid chromatography, AP = area percent, KF = Karl-Fischer, RT = room temperature (unless specified otherwise RT is a temperature of about 22 °C), mmol = millimoles, HRMS = high-resolution mass spectroscopy, °C = degrees Celsius, kg - kilogram or kilograms, g = gram or grams, mg = milligram or milligrams, L = liter or liters, mL
25 (or ml) = milliliter or milliliters, h or hr = hour or hours, M = molar, N = normal, min = minute or minutes, MHz = megahertz, v/v = volume to volume ratio, %w/w = weight/weight percent, wt% = weight percent, nm = nanometer or nanometers, LOD = loss of drying.

- [00186] “α”, “β”, “R” and “S” are stereochemical designations familiar to those
30 skilled in the art.

EXAMPLE 1

N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-Butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide



[00187] Example 1, Step 1: To a 3 L round-bottom flask was added semicarbazide
 5 hydrochloride (100.0 g, 0.89 moles), pivaloyl acetonitrile (112.2 g, 0.89 moles) and
 ethanol (1 L) at 22-25 °C. Upon completion of addition, the reaction mixture was
 cooled to 12-15 °C and anhydrous sodium acetate (73.5 g, 0.89 moles) was added.
 The addition of the anhydrous sodium acetate was endothermic thereby raising the
 temperature to 22-25 °C. The reaction mixture was maintained at 22-25 °C and
 10 stirred for 60-90 minutes. After this time, the reaction mixture was analyzed by
 HPLC, which indicated that the formation of the hydrazone intermediate was
 complete.

[00188] Example 1, Step 2: The reaction mixture was then heated to 68-72 °C and
 trimethylorthoformate (475.7 g, 4.48 moles) was added during a 5-10 minute period.
 15 The reaction mixture was allowed to cool to 40-45 °C and then acetic acid (53.8 g,
 0.89 moles) was added during a 15-20 minute period. Upon completion of addition,
 the temperature was raised to 70±2 °C during a 20-25 min period. Once at the
 prescribed temperature, the reaction mixture was stirred for 18-20 hr. At the
 conclusion of this period, the reaction mixture was analyzed by HPLC, which
 20 indicated that the formation of the pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine was complete.

[00189] Example 1, Step 3: The pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine from Example 1,
 Step 2, was concentrated at 50-55 °C under reduced pressure (~ 5-10 mm Hg) to yield
 a residue. Tetrahydrofuran (THF, 2 L) and acetone (2 L) were added to the residue,

and the resulting mixture was stirred at 50-55 °C for 90 minutes. After this time, the reaction mixture was filtered through Buckner funnel to remove the resultant sodium chloride (NaCl) and sodium acetate (NaOAc) precipitates. The resulting filtrate was concentrated to dryness at 50-55 °C under reduced pressure (~ 400-450 mm Hg) to yield a residue. The residue was taken up in 2-methylorthoformate (2-methyl THF, 450 mL) and the resulting mixture was stirred at 22-25 °C for two (2) hours. At the conclusion of this period, the reaction mixture was filtered and then spray washed with 2-methyl THF (100 mL), followed by *tert*-butyl methyl ether (MTBE, 200 mL). The resulting product was dried at 45-50 °C reduced pressure (~ 400-450 mm Hg) to provide 7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-one (107.0 g, 62.1% w/w, HPLC purity: 99.2 AP at 220 nm). Steps 1 to 3 were repeated on a larger scale to produce kilogram quantities of 7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-one.

[00190] Example 1, Step 4: To a glass lined reactor was added 7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-one (1.0 kg, 5.2 moles), dimethyl 4-aminopyridine (1.27 kg, 10.4 moles), acetonitrile (10 L), and diisopropylethylamine (0.672 kg, 5.2 mole). The resulting slurry was stirred at ambient temperature under a nitrogen atmosphere for a period of no less than 15 minutes until a clear solution was formed. The clear solution was slowly added to a second glass lined reactor containing acetonitrile (6.0 L) and phosphorus oxychloride (POCl₃, 0.822 kg, 5.3 moles). Upon completion of addition, the resulting mixture was stirred at below 35 °C for 2 hours. At the conclusion of this period, the reaction was analyzed by HPLC, which indicated that the reaction was complete. Phenol (0.64 kg, 6.8 mole) and diisopropylethylamine (0.87 kg) were added and the resulting reaction mixture was stirred at ambient temperature for no less than 1 hr. After this time, the reaction mixture was analyzed by HPLC, which indicated that the reaction was completed. 2-Methyl-THF (20 L), followed by water (10 L) were added to the reaction mixture. The organic and aqueous phases were separated and the aqueous phase was discarded. The organic phase was washed with a citric acid-brine solution (5 wt%, 10 L), and the resulting organic and aqueous phases were separated and the aqueous phase was discarded again. The above citric acid-brine solution wash was repeated two more times. Upon completion of the citric acid-brine solution washes, a potassium phosphoric base solution (K₂HPO₄, 7.5 wt%, 10 L) was added. The organic and

aqueous phases were separated and the aqueous phase was discarded. The above K_2HPO_4 solution wash was repeated one more time until pH ~8.

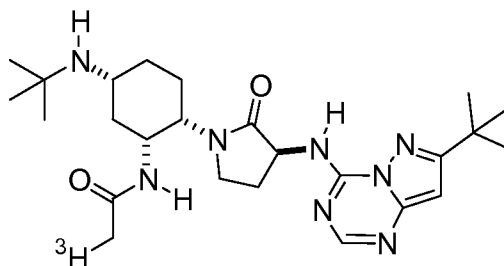
[00191] Example 1, Step 5: N-[2-(3-Amino-2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-5-*tert*-butylamino-cyclohexyl]-acetamide (prepared in a similar manner as described in U.S.

- 5 Publication No. 2008/0027083 A1, 1.05 kg) was added to the basic organic phase from Example 1, Step 4. Upon completion of addition, the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 16 hr. At the conclusion of this period, the reaction mixture was analyzed by HPLC, which indicated the reaction was complete. Water (20 L) followed by acetic acid (HOAc, 0.406 kg) were added to the reaction mixture, and the resulting organic and aqueous layers were separated. The aqueous layer was extracted with 2-methyl THF (10 L). The organic layers were combined and HOAc (0.406 kg) was added. The resulting mixture was washed with water (10L) and the resulting organic and aqueous layers were separated. This aqueous layer was extracted again with 2-methyl-THF (10 L). The aqueous layers were combined again and dichloromethane (DCM, 15 L) was added. Sodium hydroxide (NaOH, 10 N, 1.04 L) was added to adjust the pH to ~ 13.0. Upon completion of addition, the organic and aqueous layers were separated again and the product-rich DCM layer was set aside. The aqueous layer was extracted with additional dichloromethane (10L). The DCM rich organic layers were combined and washed with water (10 L). The resulting product rich DCM solution was concentrated *in vacuo* to a minimum volume. Ethyl acetate (EtOAc) was added and the residual DCM and water were continuously distilled off to yield a slurry (final volume ~ 5 L). MTBE (15 L) was added and the resulting slurry was stirred for no less than 1hr. After this time, the slurry was filter and the wet filter cake was washed with additional MTBE (5 L). The wet cake was dried at 55 °C *in vacuo* until LOD $\leq$ 0.5 wt% to afford the amorphous free base of Example 1 (0.9 kg, 55 M% yield, HPLC purity: 99.5 AP). ^1H NMR (600.13 MHz, DMSO- d_6) δ 1.04 (s, 9H), 1.34 (s, 9H), 1.58 (m, 3H), 1.64 (m, 2H), 1.81 (s, 3H), 2.05 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.93 (br s, 1H), 3.48 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 4.26 (br s, 1H), 4.86 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.94 (br s, 1H); ^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6) δ 21.3, 23.3, 25.9, 29.3, 30.0, 32.2, 32.6, 35.5, 43.1, 46.5, 47.7, 50.7, 51.7, 52.5, 92.3, 148.7, 148.8, 152.9, 167.3, 168.5, 171.2; HRMS calcd for $C_{25}H_{40}N_8O_2$ (M+1) 485.3274, found 485.3343.

EXAMPLE 2

Tritium-labeled N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-
butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-
yl)cyclohexyl)acetamide

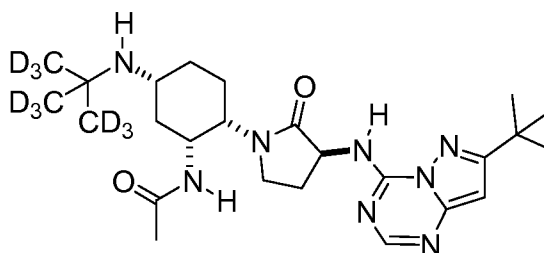
5



EXAMPLE 3

Deuterium-labeled N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-
butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-
yl)cyclohexyl)acetamide

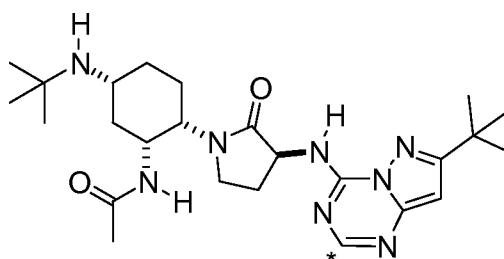
10



EXAMPLE 4

Carbon-14 labeled N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-
butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-
yl)cyclohexyl)acetamide

15



* = Position of ^{14}C label

EXAMPLE 5

N-1 Crystal Form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide

[00192] A free base crystal form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, including salt forms, and solvates thereof, was prepared and characterized as described below.

Procedures for Characterizing the Forms

Single Crystal Data

[00193] Data were collected on a Bruker-Nonius (Bruker AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA) CAD4 serial diffractometer. Unit cell parameters were obtained through least-squares analysis of the experimental diffractometer settings of 25 high-angle reflections. Intensities were measured using Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) at a constant temperature with the θ -2 θ variable scan technique and were corrected only for Lorentz-polarization factors. Background counts were collected at the extremes of the scan for half of the time of the scan.

Alternately, single crystal data were collected on a Bruker-Nonius Kappa CCD 2000 system using Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Indexing and processing of the measured intensity data were carried out with the HKL2000 software package (Otwinowski, Z. et al. in *Macromolecular Crystallography*, Carter, W.C., Jr. et al., eds., Academic, NY, publ., Vol. 276, pp. 307-326 (1997)) in the Collect program suite. (Collect Data collection and processing user interface: Collect: Data collection software, R. Hooft, Nonius B.V., 1998.) Alternately, single crystal data were collected on a Bruker-AXS APEX2 CCD system using Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Indexing and processing of the measured intensity data were carried out with the APEX2 software package/program suite (APEX2 Data collection and processing user interface: APEX2 User Manual, v1.27; Bruker AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA).

[00194] When indicated, crystals were cooled in the cold stream of an Oxford cryo system (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: Cosier, J. et al., *J. Appl. Cryst.*, 19:105 (1986)) during data collection.

[00195] The structures were solved by direct methods and refined on the basis of
 5 observed reflections using either the SDP (SDP, Structure Determination Package, Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716. Scattering factors, including f' and f'' , in the SDP software were taken from the *International Tables for Crystallography*, Kynoch Press, Birmingham, England, Vol. IV, Tables 2.2A and 2.3.1 (1974)) software package with minor local modifications or the crystallographic packages MAXUS
 10 (maXus solution and refinement software suite: Mackay, S. et al., maXus: a computer program for the solution and refinement of crystal structures from diffraction data or SHELXTL4. The derived atomic parameters (coordinates and temperature factors) were refined through full matrix least-squares. The function minimized in the refinements was $\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2$. R is defined as $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ while $R_w = [\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2 / \sum_w |F_o|^2]^{1/2}$ where w is an appropriate weighting function based on errors in the
 15 observed intensities. Difference maps were examined at all stages of refinement. Hydrogens were introduced in idealized positions with isotropic temperature factors, but no hydrogen parameters were varied.

20 X-ray Powder Diffraction Data (PXRD)

[00196] PXRD data were obtained using a Bruker C2 GADDS . The radiation was Cu K α (40 KV, 50mA). The sample-detector distance was 15 cm. Powder samples were placed in sealed glass capillaries of 1mm or less in diameter; the capillary was rotated during data collection. Data were collected for $3 \leq 2\theta \leq 35^\circ$ with a sample
 25 exposure time of at least 2000 seconds. The resulting two-dimensional diffraction arcs were integrated to create a traditional 1-dimensional PXRD pattern with a step size of 0.02 degrees 2θ in the range of 3 to 35 degrees 2θ . About 200 mg were packed into a Philips powder x-ray diffraction (PXRD) sample holder. The sample was transferred to a Philips MPD unit (45 KV, 40 mA, Cu K α). Data were collected at
 30 room temperature in the 2 to 32 2θ -range (continuous scanning mode, scanning rate 0.03 degrees/sec., auto divergence and anti scatter slits, receiving slit: 0.2 mm, sample spinner : ON)

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

[00197] DSC experiments were performed in a TA INSTRUMENTS® model Q1000 or 2920. The sample (about 2-6 mg) was weighed in an aluminum pan and
 5 recorded accurately recorded to a hundredth of a milligram, and transferred to the DSC. The instrument was purged with nitrogen gas at 50mL/min. Data were collected between room temperature and 300 °C at 10 °C/min heating rate. The plot was made with the endothermic peaks pointing down.

10 Thermal Gravimetric Analysis (TGA)

[00198] TGA experiments were performed in a TA INSTRUMENTS® model Q500 or 2950. The sample (about 10-30 mg) was placed in a previously tared platinum pan previously tared. The weight of the sample was measured accurately and recorded to a thousandth of a milligram by the instrument. The furnace was
 15 purged with nitrogen gas at 100 mL/min. Data were collected between room temperature and 300 °C at 10 °C/min heating rate.

Preparation and Analysis of the Forms

[00199] The unit cell data and other properties for the example are presented in
 20 Table 1. The unit cell parameters were obtained from single crystal x-ray crystallographic analysis. A detailed account of unit cells can be found in Chapter 3 of Stout et al., *X-Ray Structure Determination: a Practical Guide*, Macmillan (1968).
 [00200] Finally, Figure 1 presents the XRPD pattern for Example 5. Figures 2 and 3 disclose the DSC and TGA analysis, respectively, of Example 5.

25

Form Preparation, XRD, DSC and TGA Characterization

Example 5, N-1 Form, Free Base

[00201] N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-Butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, form N-1,
 30 was crystallized from ethyl acetate and MTBE. Form N-1, is a neat (no molecules of water or solvent) form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-

yl)cyclohexyl)acetamide. Form N-1 was characterized by a XRD pattern which matches the simulated pattern generated from the single crystal structure data. Form N-1 was characterized by a DSC thermogram having a melt/decomposition endotherm with an onset typically at ca. 205 °C. Form N-1 was characterized by a TGA thermal

5 curve having a weight loss at up to ca. 210 °C.

TABLE 1
Unit Cell Parameters

Compound	Exp 5
Structure	Base
Form	N-1
T	-70
a(Å)	7.3085(6)
b(Å)	16.257(1)
c(Å)	22.688(2)
α°	90
β°	90
γ°	90
V(Å ³)	2695.4(4)
Z'	1
V _m	673
Sg	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
D _{calc}	1.194

10 [00202] The variables used in Table 1 are defined below:

T = temperature in Centigrade for the crystallographic data (RT is room temperature which is about +22 °C)

V = volume of unit cell

Z' = number of drug molecules per asymmetric unit

15 V_m = V(unit cell) / (Z drug molecules per cell)

sg = space group

dcalc = calculated crystal density

COMPARATIVE PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS

[00203] Assays and data comparing the pharmacological characteristics of

- 5 Example 1 and compounds found in WO 2005/021500 A1, WO 2008/014381 A1 and WO 2008/014360 A1 are presented below.

Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Binding

[00204] See also: Yoshimura et al., *J. Immunol.*, 145:292 (1990). The human

- 10 CCR-2 binding assay was established with human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs) using ^{125} I-human MCP-1 as the tracer ligand. hPBMCs were isolated from human leukopak (Biological Specialty Inc.) using a standard protocol with Ficoll-Hypaque (Mediatech CELLGRO®). Isolated hPBMCs were washed and diluted to 1×10^7 /ml in binding buffer (RPMI-1640, 0.1%BSA, 20 mM Hepes, pH 7.4). ^{125} I-MCP-1 (NEN/Perkin Elmer) was diluted to 0.45 nM in binding buffer. The
15 compound was diluted in binding buffer at 3-fold the final concentrations used in the binding assay. The binding assay was performed using a 96-well filter plate (Millipore). Total ^{125} I-MCP-1 binding was assessed as follows: to each reaction of a total volume of 150 μ l were added 5×10^5 cells, 0.15 nM ^{125} I-MCP-1, and compound
20 such that the final concentration ranged from 0 to 100 nM. The plate was incubated at room temperature for 30 minutes followed by three washes with RPMI-1640, 0.1% BSA, 0.4 M NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.4 using a vacuum manifold filtration (Millipore). After washing, the plate was air-dried for 60 minutes at room
25 temperature. This was followed by adding 25 μ l of Microscint 20 into each well. The plate was sealed and counted on the Trilux for 1 minute. Non-specific binding was determined in the presence of 300 nM cold MCP-1 (PeproTech Inc.). Specific ^{125} I-MCP-1 was calculated as the difference between total and non-specific binding. All conditions were tested in duplicate. The IC50 is defined as the concentration of competing compound required to reduce specific binding by 50%.
- 30 [00205] The procedure used for T cell CCR-5 binding assay was similar to those for hPBMC CCR-2 binding assay except that human peripheral T cells was used as a source of CCR-5 (see below) and ^{125} I-MIP-1 β as a tracer (Amersham).

Isolation of Peripheral T Cells

[00206] A recent report indicates that CCR-5 expression on T cells varies considerably among individuals (Desmetz, C. et al., "The strength of the chemotactic response to a CCR-5 binding chemokine is determined by the level of cell surface CCR-5 density", *Immunology*, 119(4):551-561 (2006)). Therefore, blood donors were pre-screened for high T-cell expression of CCR-5. hPBMCs were first isolated from human whole blood by standard protocol with Ficoll-Hypaque. Flow cytometric analysis was then used to measure CCR-5 expression on T cells following staining with anti-CCR-5 antibody plus anti-CD4 antibody or anti-CD8 antibody. Those blood donors in which >5% peripheral T cells (CD4⁺ and CD8⁺) express CCR-5 were requested to provide blood again for isolation of PBMCs and, subsequently, of T cells using a standard E-rosetting technique which relies on the unique ability of T cells to bind to sheep red blood cells (RBCs).

15

CCR-2 Chemotaxis

[00207] The human CCR-2 chemotaxis assay was conducted with the human monocytic cell line, THP-1. THP-1 cells were first labeled with the fluorescent dye Calcein-AM in phenol red-free, BSA-free RPMI-1640 (pH 7.4) at 37 °C for 30 minutes with gentle mixing every 15 minutes. The labeled cells were then washed and re-suspended at 1×10^5 /ml in chemotaxis buffer (phenol red-free RPMI-1640, 0.1% BSA, pH 7.4). The test compound was diluted in chemotaxis buffer such that the final assay concentration ranged from 0.01 nM to 1 μ M. The ligand MCP-1 (PeproTech Inc.) was diluted to 20 nM in chemotaxis buffer. To perform the assay, an equal volume of test compound dilutions was mixed with an equal volume of labeled THP-1 cells (Mixture 1), and an equal volume of test compound dilutions was mixed with an equal volume of diluted MCP-1 ligand (Mixture 2). Both mixtures were incubated independently at 37 °C for 10 minutes followed by gentle mixing. MCP-1-induced chemotaxis was then measured in a chemotaxis plate (Becton Dickinson) by placing 50 μ l of Mixture 1 in the top chamber and 225 μ l of Mixture 2 in the bottom chamber. The plate was covered with a lid and incubated at 37 °C for 30 minutes. 30 minutes later, the plate was read on a CYTOFLUOR®. All

conditions were tested in duplicate. For signal to noise determination, 50 μ l of labeled THP-1 cells alone (5×10^4 /well) were placed into the top chamber and 225 μ l of ligand MCP-1 alone was placed in the bottom chamber (final concentration of 10 nM). The inhibition achieved by graded concentrations of test compound was
5 calculated as a percentage of the compound-free MCP-1 control. The IC₅₀ is defined as the concentration of test compound required to reach 50% inhibition of cellular chemotaxis.

CCR-5 Chemotaxis

10 **[00208]** A similar procedure to that set forth above was adopted except that isolated peripheral T cells was used as CCR-5-expressing cells and MIP-1 β (50 nM, PeproTech Inc.) was the ligand.

hERG Flux

15 **[00209]** HEK293 cells stably-expressing hERG channels were grown (37 °C, 5% CO₂) in Dulbecco's Modified Eagle's Media supplemented with 10% Sigma fetal bovine serum, non-essential amino acids, 2mM L-glutamine and 500 μ g/ml G418, at incubator. Cell dissociation buffer was used to extract the cells from flasks, which were then plated into 384-well CORNING® poly-D-lysine coated black/clear plates
20 at a density of 2×10^4 cells per well (20 μ l) in 10% serum media, and incubated for 15-24 hours at 37 °C in a 5% CO₂ incubator until a confluent monolayer of cells was obtained.

[00210] A 2 mM stock of BTC-AM dye (Molecular Probes, Eugene, OR) was prepared in 100% DMSO and then added 1:1 to 10% (w/v) pluronic acid in DMSO on
25 the day of assay. The dye was then diluted in hERG external EP buffer (140 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.3 and 10 mM glucose; all buffer components obtained from Sigma Chemical). This BTC dye mixture (30 μ l) was added to the cells and produced a final loading concentration of 2.5 μ M. Cells are incubated at 21 °C for 45 minutes.

30 **[00211]** The test compound was diluted to 10 mM DMSO in 60 μ l. The compound was then serially-diluted at a 1:2 ratio in DMSO in columns 1-10 and 11-20 of a 384-well plate. Assay-ready plates were generated by stamping 2.5 μ l from the DMSO

serially diluted plate, which was prepared on the Velocity 11 BIOCEL®. Aqueous plates were created by adding 48 µl of EP buffer and then were diluted 30 - 45 minutes before the assay was read on the FLIPR®. After dye loading, aqueous-diluted compound was added to the cells of the three replicate plates (10 µl) yielding a ten point concentration range of 80 µM to 0.156 nM. Final DMSO concentration in the assay is 1%. Assay-ready aqueous plates were prepared and diluted on a CyBio liquid handler.

[00212] Cells loaded with dye were read on the FLIPR®384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), which excites the dye using the 488 nm line of an argon laser.

Emission was filtered using a 540 ± 30 nm bandpass filter. hERG channels are stimulated to open by the addition of 20 µl/well EP buffer containing 66 mM K₂SO₄ and 1.3 mM TI₂SO₄ (Sigma/Aldrich). For each plate, data were collected every second for a period of 12 seconds, at which time the TI⁺-containing stimulus buffer was added. Data collection proceeded every second for 48 seconds, and then continued every three seconds for an additional 2 minutes.

[00213] The dynamic range of the assay was determined from *blanks* and *totals* wells. The *totals* wells (columns 21 and 22) define maximal hERG activation for the plate (no test compound present), and the *blanks* wells (columns 23 and 24) define 100% hERG inhibition. The *blanks* wells contain 400 nM of either of the standard hERG inhibitors dofetilide (Ficker et al., 1998) or E-4031. Raw data points in each sample well were first corrected for cell/signal variation, negative control (blanks) background, and normalized to the positive controls (totals) using the online FLIPR® software. Test compound concentration response curves for the hERG TI⁺ flux data were then fit using Excel Fit (ID Business Solutions Limited, Surrey, UK) with a single-site logistic equation, $Y = A + ((B-A)/1 + ((C/X)^D))$ where A= maximal inhibition. Data were analyzed by fitting maximum amplitudes of change in fluorescence for TI⁺ flux for a given condition of test compound. Potencies (IC₅₀ values) of compound were calculated from the average of triplicate wells.

Sodium Channel, Site 2 Binding Assay

[00214] See also: Catterall, W.A. et al. *J. Biol. Chem.*, 256:8922 (1981). The standard binding buffer contained 50 mM HEPES, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 130 mM

choline chloride, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 40 µg/mL LqT. Binding reactions were initiated by adding synaptosomes (prepared from Wistar rat brain) to the reaction mixture containing 5 nM [³H]-batrachotoxin in a standard binding buffer and the compound to be tested at the desirable concentration. Samples
5 were then mixed and incubated at 37 °C for 60 minutes. The reactions were stopped by adding ice-cold washing buffer containing 50 mM HEPES, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.8 mM CaCl₂, 0.8mM MgCl₂ and 1 mg/mL bovine serum albumin. The synaptosomes were immediately collected onto glass fiber filters and washed 3 times with washing buffers. The radioactivity of [³H]-batrachotoxin remaining on the filters
10 was counted using liquid scintillation spectrometers.

Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)

[00215] The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) consists of a specially formulated lecithin-based lipid combination referred to as the
15 gastrointestinal tract (GIT) lipid. The GIT lipid is used to form a membrane in a sandwich plate assembly similar to that used in the Caco-2 assays. The GIT lipid closely resembles *in vivo* membrane composition and performance as measured by standard compounds that are known to be passively absorbed in humans. PAMPA is widely used as an *in vitro* model for permeability screening of discovery compounds.
20 The rate of passage of compounds through the PAMPA membrane is used to determine a permeability coefficient (P_c), which can be related to the *in vivo* passive permeability of the compound.

[00216] The permeability coefficient (P_c) of a particular compound is examined in a pH-dependent setting with apical and basolateral pH of 7.4. All experiments are
25 conducted in triplicate determinations.

[00217] The test compound (10 mM stocks in 100% DMSO) was diluted 1:100 in pH 7.4 donor well buffer (pION CAT # 110151), providing a 100 µM assay solution in 1% DMSO. Compound diluted in donor well buffer was transferred to a Whatman UNIFILTER® plate and filtered prior to dispensing 200 µl into the donor well of the
30 assay plate (pION CAT #110163). The PAMPA membrane was formed by pipetting 4 µl of the lipid solution (pION CAT #110169) onto the filter plate (VWR CAT #13503). The membrane was then covered with 200 µl of acceptor well buffer at pH

7.4 (pION CAT #110139). The PAMPA assay plate (donor side and acceptor side) was combined and allowed to incubate at room temperature for 4 hours. The plate was then disassembled and spectrophotometer plates (VWR CAT #655801) were filled (150 μ l/well). The donor, acceptor, reference, and blank plates were read in the
5 SPECTRAMAX® UV plate reader. Data was captured by the pION software, which analyzes the spectra and generates Pc values.

hERG Patch Clamp

[00218] Whole-cell patch-clamp was used to directly measure hERG currents in
10 HEK-293 cells stably expressing the cloned hERG potassium channel α subunit. The compound was tested in an aqueous buffer with pH 7.4 at room temperature. Repetitive test pulses (0.05 Hz) were applied from a holding potential of -80 mV to +20 mV for 2 seconds and tail currents were elicited following the test pulses by stepping the voltage to -65 mV. The effects from the compound were calculated by
15 measuring inhibition of peak tail current

Sodium Channel Patch Clamp

[00219] Whole-cell patch-clamp was used to directly measure inward sodium currents in HEK-293 cells expressing the human cardiac sodium channel, SCN5A.
20 The compound was tested at a protein-free aqueous buffer. For determining steady state inhibition, sodium currents were elicited every 5 seconds using the following voltage protocol: cells were held at a potential of -90 mV and stepped to -20 mV for 60 ms. Effects were calculated by measuring inhibition of peak current during the test pulse to -20 mV. Rate-dependence of inhibition was assessed by stimulation at
25 frequencies of 1 Hz and 4 Hz.

Single-Dose Pharmacokinetics in Rats

[00220] Male Sprague-Dawley rats (250-300 g) were used for the pharmacokinetic studies. Rats were fasted overnight prior to PO dosing and fed 4 h post dose. Blood
30 samples (~0.3 mL) were collected from the jugular vein into K₂EDTA-containing tubes and then centrifuged at 4 °C (1500-2000xg) to obtain plasma. In an oral bioavailability study, 2 groups of animals (N=2-3 per group) received the test

compound either as an intravenous (IV) infusion (over 10 min) via the jugular vein or by oral gavage. Serial blood samples were obtained at 0.17 (for IV only), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h post dose. Plasma samples, obtained by centrifugation at 4 °C (1500-2000xg), were stored at -20 °C until analysis by LC/MS/MS.

5

Single-Dose Pharmacokinetics in Monkeys

[00221] The pharmacokinetics of various test compounds were evaluated in male cynomolgus monkeys in a crossover-design. Monkeys were fasted overnight prior to PO dosing and fed 4 h post dose. A group of 1-3 animals (3 to 5 kg) received the compound by IV infusion (over 10 min) via a femoral vein and by oral gavage, with a 1-week washout between treatments. Serial blood samples (~0.3 mL) were collected from a femoral artery at 0.17 (IV only), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h post dose, and centrifuged at 4 °C (1500-2000xg) to obtain plasma. Samples were stored at -20 °C until analysis by LC/MS/MS.

15

Data Analysis for Pharmacokinetic Assays

[00222] The pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of plasma concentration vs. time data (Kinetica software, Version 4.2, InnaPhase Corporation, Philadelphia, PA). The peak concentration ($C_{\max}$) and time for $C_{\max}$ were recorded directly from experimental observations. The area under the curve from time zero to the last sampling time ($AUC(0-T)$) was calculated using a combination of linear and log trapezoidal summations. The total plasma clearance (CL_{Tp}), steady-state volume of distribution (V_{ss}), apparent elimination half-life ($T_{1/2}$) and mean residence time (MRT) were estimated after IV administration. Estimations of $T_{1/2}$ was made using a minimum of 3 time points with quantifiable concentrations. The absolute oral bioavailability (F) was estimated as the ratio of dose-normalized AUC values following oral and IV doses.

CCR-2 Calcium Mobilization

30 [00223] Human CCR-2-mediated intracellular calcium flux assay was established with the human monocytic cell line THP-1 monocytic cell line. THP-1 cells were first loaded with fluorophore by resuspending them in a glucose- and HEPES-

buffered PBS (pH 7.4) containing 4 μ M fluo-3 (Molecular Probes) and 1.25 mM Probenecid and then incubated for 60 minutes at 37 °C. After washing once to remove excess fluo-3, the cells were re-suspended in washing buffer (containing phenol red-free RPMI) with 1.25 mM Probenecid, and plated into 96-well plate at 2×10^5 /well.

- 5 The plate was placed in a FLIPR®-1 (Molecular Devices) that uses an argon-ion laser to excite the cells and robotically adds the test compound and human MCP-1 while monitoring changes in fluorescence. Test compound dilutions with a range of concentration from 0 to 100 nM or buffer alone were added to each well, centrifuged and incubated for 10 minutes. Recombinant human MCP-1 (PeproTech Inc.) was then
10 added to a final concentration of 10 nM. The fluorescence shift was monitored and the base-to-peak excursion computed automatically. All conditions were tested in duplicate. The inhibition achieved by graded concentrations of compound was calculated as a percentage of the compound-free MCP-1 control.

15 CCR-5 Calcium Mobilization

[00224] A similar procedure to the CCR-2 calcium mobilization set forth above was adopted except that MIP-1 β (50 nM) was the ligand and the cell line was HT1080/CCR-5 in which endogenous CCR-5 is upregulated by random activation of gene expression (RAGE) technology.

20

CCR-2 GTP- γ S Exchange

- [00225] The MCP-1 dependent binding of [^{35} S]-GTP γ S to CCR-2 was determined using membranes prepared from the HT1080 human cell line in which endogenous CCR-2 was upregulated by RAGE technology (Athersys). Each reaction (200 μ L)
25 contained 20 mM Na-HEPES, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0.1% BSA (Sigma), 1% DMSO, and 10 μ M GDP (pH 7.4). The EC₅₀ for MCP-1 dependent binding of [^{35} S]-GTP γ S was determined by varying the MCP-1 concentrations from 1 pM to 1 μ M. Reactions were incubated for 90 minutes hour at room temperature and [^{35} S]-GTP γ S/G α_i complexes were collected on a Millipore MAFC 96 well filter plate. The
30 inhibition of MCP-1 dependent [^{35} S]-GTP γ S binding to CCR-2 membranes by the test compound was determined at 1 nM MCP-1 under identical conditions. Data were analyzed using the ligand binding software from Graphpad Prism 4.

CCR-5 GTP- γ S Exchange

[00226] A similar procedure to the CCR-2 GTP- γ S exchange procedure set forth above was adopted except that MIP-1 α /LD78 β was the ligand and the cell line was
5 CCR-5/HT1080. MIP-1 α /LD78 β was used as the CCR-5 ligand because it provided a bigger signal to noise ratio than MIP-1 β .

CCR-2 Whole Blood Integrin (CD11b) Upregulation

[00227] A CCR-2-dependent CD11b upregulation assay was established with
10 human whole blood. Whole blood (100 μ l) was pre-incubated with a concentration range of Example 1 at 37°C for 10 minutes. Human recombinant MCP-1 (10 μ l of 100nM) was then added to each reaction to a final concentration of 10nM, except for unstimulated control reactions. The reactions were incubated for 30 minutes at 37°C. After incubation, 1ml of ice cold FACS (PBS with 10% FBS) buffer was added, and
15 the samples were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes and re-suspended in 50 μ l of FACS buffer. The cells were then incubated with 20 μ l of anti-CD14-FITC/anti-CD11b-PE solution for 20 minutes on ice in the dark followed by addition of 1 ml of 1x FACS lysing solution (Becton Dickinson) to each reaction. The samples were then incubated for 30 minutes on ice in the dark. Following fixation and red blood cell
20 lysis, the cells were centrifuged and resuspended in 200 μ l FACS-lysing solution. Samples were analyzed by flow cytometry within 1 hour of staining using a FACSCalibur flow cytometer. Data acquisition and analysis were performed using CellQuestPro software. A sequential gating strategy was used to analyze the CD14^{high} CD11b⁺ monocyte population. For analysis, CD11b was measured as median
25 fluorescence intensity (MFI).

CCR-5 Whole Blood CD11b Upregulation

[00228] Similar procedure to the CCR-2 whole blood CD11b upregulation procedure set forth above was adopted except that MIP-1 β (50 nM) was used as the
30 ligand.

[00229] Find below data for compared compounds (See WO 2008/014381 A1, WO 2008/014360 A1 and WO 2008/014361 A1). The comparative data shows the

unexpected combination of equipotent dual CCR-2 and CCR-5 receptor inhibitory and desirable pharmacological characteristics.

TABLE 2

5

Comparative *In vitro* Data

Compound	CCR-2 Binding IC ₅₀ (nM)	CCR-5 Binding IC ₅₀ (nM)	hERG FLUX IC ₅₀ (nM)	Na ⁺ channel binding (%) inhibition)	PAMPA permeability (nm/sec)
Example 12as WO 2005/021500	0.27 (1)	Not available	2,800	Not available	Not available
Example 12aj WO 2005/021500	0.43 ± 0.06 (2)	Not available	770	Not available	Not available
Example 2k WO 2005/021500	0.7 ± 0.3 (23)	2.3 ± 1.8	51,000	97%, 10,000 nM	529 ± 157 (9)
Example 12bd WO 2005/021500	1.15 ± 0.07 (2)	Not available	>80,000	54%, 10,000 nM	392
Example 8a WO 2005/021500	1.83 ± 0.80 (12)	Not available	>80,000	3%, 10,000 nM 33%, 30,000 nM	94 ± 58 (10)
Example 8e WO 2005/021500	2.20 ± 0.03 (2)	Not available	>80,000	6%, 10,000 nM	2 ± 2 (2)
Example 9c WO 2005/021500	0.96 ± 0.26 (19)	Not available	>80,000	48%, 10,000 nM 75%, 30,000 nM	145 ± 71 (8)
Example 1 WO 2008/014381	1.4 ± 0.5 (18)	23.6 ± 12.0	>80,000	0%, 10,000 nM; 21%, 30,000 nM	443 ± 114 (8)

Compound	CCR-2 Binding IC ₅₀ (nM)	CCR-5 Binding IC ₅₀ (nM)	hERG FLUX IC ₅₀ (nM)	Na ⁺ channel binding (%) inhibition)	PAMPA permeability (nm/sec)
Example 1 WO 2008/014360	2.74 ± 1.34 (15)	6.3 ± 1.5	>80,000	13%, 10,000 nM 32%, 30,000 nM	560 ± 86 (5)
Example 1 Present Invention	6.2 ± 2.7	3.6 ± 1.8	>80,000	46%, 30,000 nM	336

TABLE 3

Additional Comparative *In vitro* Data

Compound	CCR-2 Chemotaxis IC ₅₀ (nM)	CCR-5 Chemotaxis IC ₅₀ (nM)	hERG patch clamp (% Inhib.)	Na ⁺ channel patch clamp (% Inhib.)
Example 2k U.S. Patent No. 7163937	0.24 ± 0.16 (12)	Not available	83%, 10,000 nM	52%, 10,000 nM 90%, 30,000 nM
Example 8a WO 2005/021500	2.63 ± 1.24 (4)	Not available	4%, 10,000 nM	22%, 10,000 nM 49%, 30,000 nM
Example 9c WO 2005/021500	0.21	Not available	4%, 10,000 nM	19%, 10,000 nM 39%, 30,000 nM
Example 1 WO 2008/014381	0.71 ± 0.16 (22)	Not available	33%, 10,000 nM 61%, 30,000 nM	17%, 10,000 nM 19%, 30,000 nM
Example 1 WO 2008/014360	0.8 ± 0.5 (16)	1.1 ± 0.7	12%, 10,000 nM 19%, 30,000 nM	29%, 30,000 nM
Example 1 Present Invention	0.8 ± 0.8	1.1 ± 0.6	1.2%, 10,000 nM 9.2%, 30,000 nM	15-20%, 10,000 nM 13-16%, 30,000 nM

TABLE 4
Additional Comparative *In vitro* Data

Compound	CCR-2 Ca ²⁺ Flux IC ₅₀ (nM)	CCR-5 ²⁺ Flux IC ₅₀ (nM)	CCR-2 GTP-γS IC ₅₀ (nM)	CCR-5 GTP-γS IC ₅₀ (nM)
Example 2k U.S. Patent No. 7163937	Not available	Not available	Not available	Not available
Example 1 WO 2008/014381	0.9	24.0	5	111.0
Example 1 WO 2008/014360	0.8 ± 0.6	5.9 ± 3.3	3.5 ± 1.9	5.4 ± 3.2
Example 1 Present Invention	2.9 ± 1.5	2.0 ± 1.4	3.5 ± 1.9	6.1 ± 1.2

5

TABLE 5
Additional Comparative *In vitro* Data

Compound	CCR-2 CD11b IC ₅₀ (nM)	CCR-5 CD11b IC ₅₀ (nM)
Example 2k U.S. Patent No. 7,163,937	4.7 ± 0.9	4.3 ± 4.4
Example 1 WO 2008/014381	0.77 ± 0.40	Not available
Example 1 WO 2008/014360	2.6 ± 2.2	34.7 ± 11.0
Example 1 Present Invention	4.8	5.7

10

TABLE 6

Comparative *In vivo* Pharmacokinetic Data in the Rat

Compound	Dose IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	Oral AUC (nM*h)
Example 2k WO 2005/021500	2.5 / 25	40	68	9294
Example 8a WO 2005/021500	6 / 72	42	1.4	690
Example 9c WO 2005/021500	4 / 43	54	14	1855
Example 1 WO 2008/014381	2 / 10	43	51	3794
Example 1 WO 2008/014360	2 / 10	25	79	10169
Example 1 Present Invention	2 / 10	49.7	94	6500

TABLE 7

Comparative *In vivo* Pharmacokinetic Data in the Monkey

Compound	Dose IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	Oral AUC (nM*h)
Example 2k WO 2005/021500	1 / 1.4	25	46	862
Example 8a WO 2005/021500	1 / 11	14	9.4	1896
Example 9c WO 2005/021500	1 / 10	12	26	6763
Example 1 WO 2008/014381	1 / 1.3	23	47	836
Example 1 WO 2008/014360	1 / 1	12	95	2352
Example 1 Present Invention	1 / 1	16.4	63	1300

[00230] Surprisingly, it was discovered that Example 1 of the present invention are
 5 not predominantly active against CCR-2 or CCR-5, but instead are equipotent dual
 antagonists, as measured by their CCR-2 and CCR-5 binding ability, and posses
 beneficial pharmacological characteristics. See Tables 2 to 5. For example, see Table
 5 wherein Example 1 is equipotent against CCR-2 and CCR-5 while Examples 1 of
 WO 2008/014381 and WO 2008/014360 are predominantly active against CCR-2.

10

UTILITY

[00231] The compounds of the examples are shown to be modulators of chemokine
 receptor activity using assays know by those skilled in the art. In this section, we
 describe such assays and give their literature reference. More assays are described
 15 herein in the section titled "Comparative Pharmacological Characteristics", *supra*. By
 displaying activity in these assays of MCP-1 antagonism, compounds of the examples
 are expected to be useful in the treatment of human diseases associated with

chemokines and their cognate receptors. The definition of activity in these assays is a compound demonstrating an IC₅₀ of 30 μ M or lower in concentration when measured in a particular assay.

5 Antagonism of MCP-1-induced Calcium Influx

(Sullivan et al., *Methods Mol. Biol.*, 114:125-133 (1999))

[00232] At least one compounds described in the examples have activity in the antagonism of MCP-1-induced calcium influx assay described here.

[00233] Calcium mobilization is measured using the fluorescent Ca²⁺ indicator dye,

- 10 Fluo-3. Cells are incubated at 8 x 10⁵ cells/ml in phosphate-buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, 20 mM HEPES buffer, 5 mM glucose, 1% fetal bovine serum, 4 μ M Fluo-3 AM and 2.5 mM Probenecid for 60 minutes at 37 °C. Cells used for such calcium assays can include human monocytes isolated as described by Weiner et al., *J. Immunol. Methods*, 36:89-97 (1980) or cell lines which expresses the
- 15 endogenous CCR-2 receptor such as THP-1 and MonoMac-6. The cells are then washed three times in phosphate-buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, 20 mM HEPES, 5 mM glucose and 2.5 mM Probenecid. The cells are resuspended in phosphate-buffered saline containing 0.5% bovine serum albumin, 20 mM HEPES and 2.5 mM Probenecid at a final concentration of 2-4 x 10⁶ cells/ml.
- 20 Cells are plated into 96-well, black-wall microplates (100 μ l/well) and the plates centrifuged at 200 x g for 5 minutes. Various concentrations of compound are added to the wells (50 μ l/well) and after 5 minutes, 50 μ l/well of MCP-1 is added to give a final concentration of 10 nM. Calcium mobilization is detected by using a fluorescent-imaging plate reader. The cell monolayer is excited with an argon laser
- 25 (488 nM) and cell-associated fluorescence measured for 3 minutes, (every second for the first 90 seconds and every 10 seconds for the next 90 seconds). Data are generated as arbitrary fluorescence units and the change in fluorescence for each well determined as the maximum-minimum differential. Compound-dependent inhibition is calculated relative to the response of MCP-1 alone.

- 30 [00234] Mammalian chemokine receptors provide a target for interfering with or promoting immune cell function in a mammal, such as a human. Compounds that inhibit or promote chemokine receptor function are particularly useful for modulating

immune cell function for therapeutic purposes. Accordingly, the present invention is directed to compounds which are useful in the prevention and/or treatment of a wide variety of inflammatory, infectious, and immunoregulatory disorders and diseases, including asthma and allergic diseases, infection by pathogenic microbes (which, by definition, includes viruses), as well as autoimmune pathologies such as the rheumatoid arthritis and atherosclerosis.

[00235] For example, an instant compound which inhibits one or more functions of a mammalian chemokine receptor (*e.g.*, a human chemokine receptor) may be administered to inhibit (*i.e.*, reduce or prevent) inflammation or infectious disease. As a result, one or more inflammatory process, such as leukocyte emigration, adhesion, chemotaxis, exocytosis (*e.g.*, of enzymes, histamine) or inflammatory mediator release, is inhibited.

[00236] Similarly, an instant compound which promotes one or more functions of the mammalian chemokine receptor (*e.g.*, a human chemokine) as administered to stimulate (induce or enhance) an immune or inflammatory response, such as leukocyte emigration, adhesion, chemotaxis, exocytosis (*e.g.*, of enzymes, histamine) or inflammatory mediator release, resulting in the beneficial stimulation of inflammatory processes. For example, eosinophils can be recruited to combat parasitic infections. In addition, treatment of the aforementioned inflammatory, allergic and autoimmune diseases can also be contemplated for an instant compound which promotes one or more functions of the mammalian chemokine receptor if one contemplates the delivery of sufficient compound to cause the loss of receptor expression on cells through the induction of chemokine receptor internalization or the delivery of compound in a manner that results in the misdirection of the migration of cells.

[00237] In addition to primates, such as humans, a variety of other mammals can be treated according to the method of the present invention. For instance, mammals, including but not limited to, cows, sheep, goats, horses, dogs, cats, guinea pigs, rats or other bovine, ovine, equine, canine, feline, rodent or murine species can be treated. However, the method can also be practiced in other species, such as avian species. The subject treated in the methods above is a mammal, male or female, in whom modulation of chemokine receptor activity is desired. "Modulation" as used herein is

intended to encompass antagonism, agonism, partial antagonism and/or partial agonism.

Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR®)-based Functional Assay

- 5 **[00238]** HT1080 cells (clone 3559.1.6) were plated at 10,000 cells/well (30 microliters) in 384-well plates (black/clear bottom BIOCOAT® PDL, Beckton Dickinson) and charged with 30 microliters/well of Fluo-4 AM fluorescent dye (prepared by dissolving 1 mg Fluo-4 AM in 440 microliters DMSO and diluting with 100 microliters of pluronic solution before diluting further with 10 mL of Hanks
- 10 buffer). The cells were incubated at 37° C with 5% CO₂ for 30 min before being washed three times and suspended in Assay Buffer (20 mM HEPES, 1.2 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM Probenecid, 0.5% BSA, 1x Hanks). The test article was serially diluted in DMSO and then diluted 1:10 with Assay Buffer before being added to the cells (10 microliters/well). Using FLIPR®, the plates were read (10 - 70 sec) for
- 15 induction of flux (*i.e.*, agonist activity). The cells were then further charged with Agonist Solution (30 microliters/well; prepared by diluting 30 microliters of 100 microMolar MIP-1 beta in 100 mL of Assay Buffer; this protocol delivers a final concentration of 5 nM MIP-1 beta in the assay) and the plates were read using FLIPR® for one minute. Antagonist activity of the test article was determined
- 20 relative to 0.4% DMSO/Buffer negative control.

IN VIVO ASSAY(S) AND EFFICACY

- [00239]** N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-Butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide (also referred
- 25 to as “Example 1”) was evaluated in the vivo assay described below.

48-hour Thioglycollate (TG)-Induced Peritonitis Model in hCCR-2 KI Mouse Methods

- [00240]** The hCCR-2 KI mice (C57BL/6-SVJ129) were injected intraperitoneally
- 30 with 1 ml of thioglycollate (TG) (Hardy Diagnostics). For each study, eight male mice per group were used. Example 1 was dosed orally 1 hour prior to TG injection. The vehicle used was 0.01 N HCl in water. Forty-eight hours post TG injection,

peritoneal lavages were performed by injecting 5 ml PBS/10 mM EDTA/10% BSA into the peritoneal cavity.

[00241] For the 48-hour TG peritonitis study, Example 1 was dosed twice a day with the first dose one hour prior to TG injection. Total peritoneal cell counts were obtained on isolated cells by a cell counter. Cytospins were performed to determine differential leukocyte counts. The cells were stained for 3 minutes with Wright-Giemsa Stain (Sigma-Aldrich) and then rinsed with deionized water for 5 minutes. Differential counts were calculated based on a total of 200 cells counted per sample. Blood was also collected from the retro-orbital sinus at the end of each study in EDTA for determination of drug concentration.

[00242] For flow cytometric analysis, peritoneal exudate cells (1×10^6) were washed once with FACS buffer (PBS/0.5% BSA) and resuspended in FACS buffer. Cells were incubated with an Fc-blocking antibody (BD Pharmingen) on ice for 15 min followed by addition of the following antibodies (BD Pharmingen): PE conjugated anti-F4/80, FITC conjugated anti-Ly6C, and Alexa 647 conjugated anti-hCCR-2. After 45 min on ice, cells were fixed by BD CYTOFIX® for 15 min on ice, washed twice with FACS buffer, and resuspended in 200 μ l FACS buffer. Cellular events (40,000) were acquired for each sample and data were analyzed using FloJo software (TreeStar). A FSC/SSC gate was set to include all monocytes (low SSC, higher FSC) while excluding granulocytes from the analysis. This gated population was then analyzed for Ly6C (FITC), F4/80 (PE) expression. Peritoneal monocytes/macrophage numbers were determined by multiplying total peritoneal cell counts obtained by the cell counter and the percentage of monocytes/macrophages identified by F4/80⁺ cells from flow cytometry. Statistical significance of differences between means was analyzed using the paired two-tailed t test with significance set at p values below 0.05.

Results

[00243] Example 1 was evaluated in the hCCR-2 KI mouse TG peritonitis model to determine its EC₅₀ in inhibiting monocyte/macrophage infiltration. Mice were administered thioglycollate, and dosed orally with Example 1 at 10, 50, or 160 mg/kg

BID. Forty eight hours post TG treatment, peritoneal lavage was obtained for cellular infiltrate analysis by flow cytometry.

[00244] A dose-dependent inhibition in monocyte/macrophage infiltration was observed (Figure 4). Doses of 10, 50, and 160 mg/kg gave an inhibition of 25%, 54% and 63%, respectively. Of the four separate studies with multiple doses, the maximal inhibition reached was ~ 70% and the average EC50 for inhibition of monocyte/macrophage infiltration by this analysis was estimated to be 4.9 nM, which correlates well with the *in vitro* IC50 (5.8 ± 2.3 nM) for Example 1 inhibition of ¹²⁵I-mouse MCP-1 binding to human CCR-2-expressing cells (hPBMCs).

10 [00245] To assess the *in vivo* level of receptor occupancy by Example 1 in the 48-hour thioglycolate peritonitis model in the hCCR-2 KI mouse, plasma levels of both Example 1 and mouse MCP-1 were measured. The caveat for this estimation is that only CCR-2 and its major ligand MCP-1 were taken into consideration. The receptor occupancy of a ligand in the presence of a competitive inhibitor is defined by the
15 Gaddum equation:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_d / [L]) (1 + [I] / K_i)}$$

[00246] Since Example 1 is a competitive inhibitor of MCP-1 binding to CCR-2, the amounts of both mouse MCP-1/CCR-2 receptor complex and Example 1/CCR-2
20 receptor complex can be determined using the serum levels of both mouse MCP-1 and protein-unbound Example 1 in plasma. The K_d for mouse MCP-1 binding to hCCR-2 is 0.91 +/- 0.08 nM (n=8) which was determined in cold competition ligand binding experiments using ¹²⁵I-human MCP-1. The average K_i for Example 1 binding to hCCR-2 is 2.0 nM. The fraction of mouse MCP-1/CCR-2 receptor complexes is
25 determined using the form of the equation described above. To determine the fraction of Example 1/CCR-2 complexes the equation is re-defined as:

$$\frac{[RI]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_i / [I]) (1 + [L] / K_d)}$$

Finally, the amount of CCR-2 free is determined from:

30 $[CCR-2]_{total} = [CCR-2]_{free} + [mouse\ MCP-1/CCR-2] + [Example\ 1/CCR-2]$

[00247] As shown in Table 8, the percent inhibition of monocyte/macrophage infiltration into the peritoneum at 48 hour reflects the percentage of Example 1/CCR-2 receptor complex.

5

TABLE 8

Determination of *In vivo* Receptor Occupancy of Example 1 in Blood of hCCR-2 KI Mice in the 48-hour TG Peritonitis Model

Dose mg/kg	Concentration of Mouse MCP-1 in plasma (nM)	Concentration of free Example 1 in plasma (nM) (fold IC90 CCR-2 binding)	% mouse MCP-1 bound CCR-2	% Example 1 bound CCR-2	% free CCR-2	% inhibition of monocyte/ macrophage infiltration ^a
200 ^a	0.068	136.4	0.11	98.45	1.44	71
160	0.046	62.0	0.16	96.72	3.12	63
50	0.048	16.6	0.56	88.74	10.69	54
10	0.021	1.9	1.17	48.15	50.68	25
0	0.022	0.0	2.36	0.00	97.64	0

^a dose was selected from a different study from other doses in the table to provide an example of maximal inhibition. This dose provided a free plasma concentration of 1.9-fold IC90 the hCCR-2 KI binding.

[00248] Collectively, these results clearly demonstrate that Example 1 is a potent blocker of monocyte/macrophage infiltration with an EC50 of ~ 4.9 nM. Maximal inhibition of monocyte/macrophage infiltration by Example 1 can be achieved by 98.5% CCR-2 occupancy with this compound. Notably, the studies have demonstrated a similar reduction (~ 70 - 80%) in monocyte/macrophage infiltration in CCR-2-deficient mice.

[00249] Diseases or conditions of human or other species which can be treated with inhibitors of chemokine receptor function, include, but are not limited to:

20

inflammatory or allergic diseases and conditions, including respiratory allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, hypersensitivity lung diseases, hypersensitivity pneumonitis, eosinophilic cellulitis (*e.g.*, Well's syndrome), eosinophilic pneumonias (*e.g.*, Loeffler's syndrome, chronic eosinophilic pneumonia), eosinophilic fasciitis (*e.g.*, Shulman's syndrome), delayed-type hypersensitivity, interstitial lung diseases (ILD) (*e.g.*, idiopathic pulmonary fibrosis, or ILD associated with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, ankylosing spondylitis, systemic sclerosis, Sjögren's syndrome, polymyositis or dermatomyositis); systemic anaphylaxis or hypersensitivity responses, drug allergies (*e.g.*, to penicillin, cephalosporins), eosinophilia-myalgia syndrome due to the ingestion of contaminated tryptophan, insect sting allergies; autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, myasthenia gravis, juvenile onset diabetes; glomerulonephritis, autoimmune thyroiditis, Behcet's disease; graft rejection (*e.g.*, in transplantation), including allograft rejection or graft-versus-host disease; inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis; spondyloarthropathies; scleroderma; psoriasis (including T-cell mediated psoriasis) and inflammatory dermatoses such as an dermatitis, eczema, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, urticaria; vasculitis (*e.g.*, necrotizing, cutaneous, and hypersensitivity vasculitis); eosinophilic myositis, eosinophilic fasciitis; cancers with leukocyte infiltration of the skin or organs. Other diseases or conditions in which undesirable inflammatory responses are to be inhibited can be treated, including, but not limited to, vasculitis, vulnerable plaques, venous neointimal hyperplasia reperfusion injury, dialysis-graft neointimal hyperplasia, artio-venous shunt intimal hyperplasia, atherosclerosis, certain hematologic malignancies, cytokine-induced toxicity (*e.g.*, septic shock, endotoxic shock), polymyositis, dermatomyositis. Infectious diseases or conditions of human or other species which can be treated with inhibitors of chemokine receptor function, include, but are not limited to, HIV.

[00250] Diseases or conditions of humans or other species which can be treated with promoters of chemokine receptor function, include, but are not limited to: immunosuppression, such as that in individuals with immunodeficiency syndromes such as AIDS or other viral infections, individuals undergoing radiation therapy,

chemotherapy, therapy for autoimmune disease or drug therapy (*e.g.*, corticosteroid therapy), which causes immunosuppression; immunosuppression due to congenital deficiency in receptor function or other causes; and infections diseases, such as parasitic diseases, including, but not limited to helminth infections, such as nematodes (round worms); (Trichuriasis, Enterobiasis, Ascariasis, Hookworm, Strongyloidiasis, Trichinosis, filariasis); trematodes (flukes) (Schistosomiasis, Clonorchiasis), cestodes (tape worms) (Echinococcosis, Taeniasis saginata, Cysticercosis); visceral worms, visceral larva migraines (*e.g.*, Toxocara), eosinophilic gastroenteritis (*e.g.*, Anisaki sp., Phocanema sp.), cutaneous larva migraines (*Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*). The compounds of the present invention are accordingly useful in the prevention and treatment of a wide variety of inflammatory, infectious and immunoregulatory disorders and diseases.

[00251] In addition, treatment of the aforementioned inflammatory, allergic and autoimmune diseases can also be contemplated for promoters of chemokine receptor function if one contemplates the delivery of sufficient compound to cause the loss of receptor expression on cells through the induction of chemokine receptor internalization or delivery of compound in a manner that results in the misdirection of the migration of cells.

[00252] In another aspect, the instant invention may be used to evaluate the putative specific agonists or antagonists of a G protein coupled receptor. The present invention is directed to the use of these compounds in the preparation and execution of screening assays for compounds that modulate the activity of chemokine receptors. Furthermore, the compounds of this invention are useful in establishing or determining the binding site of other compounds to chemokine receptors, *e.g.*, by competitive inhibition or as a reference in an assay to compare its known activity to a compound with an unknown activity. When developing new assays or protocols, compounds according to the present invention could be used to test their effectiveness. Specifically, such compounds may be provided in a commercial kit, for example, for use in pharmaceutical research involving the aforementioned diseases. The compounds of the instant invention are also useful for the evaluation of putative specific modulators of the chemokine receptors. In addition, one could utilize compounds of this invention to examine the specificity of G protein coupled receptors

that are not thought to be chemokine receptors, either by serving as examples of compounds which do not bind or as structural variants of compounds active on these receptors which may help define specific sites of interaction.

[00253] Compounds disclosed herein are useful to treat or prevent disorders
5 selected from rheumatoid arthritis, osteoarthritis, septic shock, atherosclerosis, aneurism, fever, cardiovascular effects, haemodynamic shock, sepsis syndrome, post ischemic reperfusion injury, malaria, Crohn's disease, inflammatory bowel diseases, mycobacterial infection, meningitis, psoriasis, congestive heart failure, fibrotic diseases, cachexia, graft rejection, autoimmune diseases, skin inflammatory diseases,
10 multiple sclerosis, radiation damage, hyperoxic alveolar injury, HIV, HIV dementia, non-insulin dependent diabetes mellitus, asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, idiopathic pulmonary fibrosis, bullous pemphigoid, helminthic parasitic infections, allergic colitis, eczema, conjunctivitis, transplantation, familial eosinophilia, eosinophilic cellulitis, eosinophilic pneumonias, eosinophilic fasciitis, eosinophilic
15 gastroenteritis, drug induced eosinophilia, cystic fibrosis, Churg-Strauss syndrome, lymphoma, Hodgkin's disease, colonic carcinoma, Felty's syndrome, sarcoidosis, uveitis, Alzheimer, Glomerulonephritis, and systemic lupus erythematosus, esophageal squamous cell carcinoma, neuropathic pain, and obesity.

[00254] In another aspect, the compounds are useful to treat or prevent
20 inflammatory disorders selected from rheumatoid arthritis, osteoarthritis, atherosclerosis, aneurism, fever, cardiovascular effects, Crohn's disease, inflammatory bowel diseases, psoriasis, congestive heart failure, multiple sclerosis, autoimmune diseases, skin inflammatory diseases.

[00255] In another aspect, the compounds are used to treat or prevent inflammatory
25 disorders selected from rheumatoid arthritis, osteoarthritis, atherosclerosis, Crohn's disease, inflammatory bowel diseases, and multiple sclerosis.

[00256] In another aspect, examples disclosed herein may be useful in for the treatment of a variety of cancers, including, but not limited to, the following:

carcinoma including that of the bladder (including accelerated and metastatic
30 bladder cancer), breast, colon (including colorectal cancer), kidney, liver, lung (including small and non-small cell lung cancer and lung adenocarcinoma), ovary, prostate, testes, genitourinary tract, lymphatic system, rectum, larynx, pancreas

(including exocrine pancreatic carcinoma), esophagus, stomach, gall bladder, cervix, thyroid, and skin (including squamous cell carcinoma);

- hematopoietic tumors of lymphoid lineage including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, hairy cell lymphoma, histiocytic lymphoma, and Burkett's lymphoma;

hematopoietic tumors of myeloid lineage including acute and chronic myelogenous leukemias, myelodysplastic syndrome, myeloid leukemia, and promyelocytic leukemia;

- tumors of the central and peripheral nervous system including astrocytoma, neuroblastoma, glioma, and schwannomas;

tumors of mesenchymal origin including fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma; and

- other tumors including melanoma, xenoderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, thyroid follicular cancer, and teratocarcinoma.

- [00257] In another embodiment, disclosed herein are methods of treating cancer, wherein the cancer is selected from breast cancer, liver cancer, prostate cancer, and melanoma. Additionally, compounds disclosed herein may be useful in the treatment of ovarian cancer, and multiple myeloma.

[00258] The present invention provides methods for the treatment of a variety of non-cancerous proliferative diseases.

- [00259] Combined therapy to prevent and treat inflammatory, infectious and immunoregulatory disorders and diseases, including asthma and allergic diseases, as well as autoimmune pathologies such as rheumatoid arthritis and atherosclerosis, and those pathologies noted above is illustrated by the combination of the compounds of this invention and other compounds which are known for such utilities. For example, in the treatment or prevention of inflammation, the present compounds may be used in conjunction with an anti-inflammatory or analgesic agent such as an opiate agonist, a lipoxigenase inhibitor, a cyclooxygenase-2 inhibitor, an interleukin inhibitor, such as an interleukin-1 inhibitor, a tumor necrosis factor inhibitor, an NMDA antagonist, an inhibitor or nitric oxide or an inhibitor of the synthesis of nitric oxide, a non-steroidal

anti-inflammatory agent, a phosphodiesterase inhibitor, or a cytokine-suppressing anti-inflammatory agent, for example with a compound such as acetaminophen, aspirin, codeine, fentanyl, ibuprofen, indomethacin, ketorolac, morphine, naproxen, phenacetin, piroxicam, a steroidal analgesic, sufentanyl, sunlindac, interferon alpha and the like. Similarly, the instant compounds may be administered with a pain
5 reliever; a potentiator such as caffeine, an H₂-antagonist, simethicone, aluminum or magnesium hydroxide; a decongestant such as phenylephrine, phenylpropanolamine, pseudophedrine, oxymetazoline, ephinephrine, naphazoline, xylometazoline, propylhexedrine, or levodesoxy-ephedrine; and antitussive such as codeine,
10 hydrocodone, caramiphen, carbetapentane, or dextromethorphan; a diuretic; and a sedating or non-sedating antihistamine. Likewise, compounds disclosed herein may be used in combination with other drugs that are used in the treatment/prevention/suppression or amelioration of the diseases or conditions for which compound of the present invention are useful. Such other drugs may be
15 administered, by a route and in an amount commonly used therefore, contemporaneously or sequentially with a compound of the present invention. When a compound is used contemporaneously with one or more other drugs, a pharmaceutical composition containing such other drugs in addition to the compound of the present invention may be used. Accordingly, the pharmaceutical compositions
20 include those that also contain one or more other active ingredients, in addition to a compound of the present disclosure.

[00260] Examples of other active ingredients that may be combined with a compound of the present invention, either administered separately or in the same pharmaceutical compositions, include, but are not limited to: (a) integrin antagonists
25 such as those for selectins, ICAMs and VLA-4; (b) steroids such as beclomethasone, methylprednisolone, betamethasone, prednisone, dexamethasone, and hydrocortisone; (c) immunosuppressants such as cyclosporin, tacrolimus, rapamycin and other FK-506 type immunosuppressants; (d) antihistamines (H₁-histamine antagonists) such as bromopheniramine, chlorpheniramine, dexchlorpheniramine, triprolidine, clemastine,
30 diphenhydramine, diphenylpyraline, tripeleminamine, hydroxyzine, methdilazine, promethazine, trimeprazine, azatadine, cyproheptadine, antazoline, pheniramine pyrilamine, astemizole, terfenadine, loratadine, cetirizine, fexofenadine,

descarboethoxyloratadine, and the like; (e) non-steroidal anti-asthmatics such as β_2 -agonists (terbutaline, metaproterenol, fenoterol, isoetharine, albuteral, bitolterol, and pirbuterol), theophylline, cromolyn sodium, atropine, ipratropium bromide, leukotriene antagonists (zafirlukast, montelukast, pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-102,203), leukotriene biosynthesis inhibitors (zileuton, BAY-1005); (f) non-steroidal antiinflammatory agents (NSAIDs) such as propionic acid derivatives (alminoprofen, benxaprofen, bucloxic acid, carprofen, fenbufen, fenoprofen, fluprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indoprofen, ketoprofen, miroprofen, naproxen, oxaprozin, pirprofen, pranoprofen, suprofen, tiaprofenic acid, and tioxaprofen), acetic acid derivatives (indomethacin, acemetacin, alclofenac, clidanac, diclofenac, fenclofenac, fenclozic acid, fentiazac, furofenac, ibufenac, isoxepac, oxpinac, sulindac, tiopinac, tolmetin, zidometacin, and zomepirac), fenamic acid derivatives (flufenamic acid, meclofenamic acid, mefenamic acid, niflumic acid and tolfenamic acid), biphenylcarboxylic acid derivatives (diflunisal and flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam and tenoxicam), salicylates (acetyl salicylic acid, sulfasalazine) and the pyrazolones (apazone, bezpiperylon, feprazone, mofebutazone, oxyphenbutazone, phenylbutazone); (g) cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors; (h) inhibitors of phosphodiesterase type IV (PDE-IV); (i) other antagonists of the chemokine receptors; (j) cholesterol lowering agents such as HMG-CoA reductase inhibitors (lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, and other statins), sequestrants (cholestyramine and colestipol), nicotinic acid, fenofibric acid derivatives (gemfibrozil, clofibrat, fenofibrate and benzaifibrate), and probucol; (k) anti-diabetic agents such as insulin, sulfonylureas, biguanides (metformin), α -glucosidase inhibitors (acarbose) and glitazones (troglitazone and pioglitazone); (l) preparations of interferons (interferon α -2a, interferon-2B, interferon α -N3, interferon β -1a, interferon β -1b, interferon γ -1b); (m) antiviral compounds such as efavirenz, nevirapine, indinavir, ganciclovir, lamivudine, famciclovir, and zalcitabine; (o) other compound such as 5-aminosalicylic acid and prodrugs thereof, antimetabolites such as azathioprine and 6-mercaptopurine, and cytotoxic cancer chemotherapeutic agents. The weight ratio of the compound of the present invention to the second active ingredient may be varied and will depend upon the effective doses of each ingredient.

[00261] Generally, an effective dose of each will be used. Thus, for example, when a compound is combined with an NSAID the weight ratio of the compound of the present invention to the NSAID will generally range from about 1000:1 to about 1:1000, or alternatively from about 200:1 to about 1:200. Combinations of a
5 compound of the present invention and other active ingredients will generally also be within the aforementioned range, but in each case, an effective dose of each active ingredient should be used.

[00262] In treating cancer, a combination of chemotherapeutic agents and/or other treatments (*e.g.*, radiation therapy) is often advantageous. The second (or third) agent
10 may have the same or different mechanism of action than the primary therapeutic agent. It may be especially useful to employ cytotoxic drug combinations wherein the two or more drugs being administered act in different manners or in different phased of the cell cycle, and/or where the two or more drugs have overlapping toxicities or side effects, and/or where the drugs being combined each has a demonstrated efficacy
15 in treating the particular disease state manifested by the patient.

[00263] Accordingly, compounds disclosed herein (or other formulae disclosed herein) may be administered in combination with other anti-cancer and cytotoxic agents and treatments useful in the treatment of cancer or other proliferative diseases. The invention herein further comprises use of the compounds herein (or other
20 formulae disclosed herein), in preparing medicaments for the treatment of cancer, and/or it comprises the packaging of the compounds of herein together with instructions that the compounds be used in combination with other anti-cancer or cytotoxic agents and treatments for the treatment of cancer. The present invention further comprises combinations of the compounds of and one or more additional
25 agents in kit form, *e.g.*, where they are packaged together or placed in separate packages to be sold together as a kit, or where they are packaged to be formulated together.

[00264] The second (or more) anti-cancer agents may be selected from any one or more of the following:
30 alkylating agents (including nitrogen mustards, alkyl sulfonates, nitrosoureas, ethylenimine derivatives, and triazenes); anti-angiogenics (including matrix metalloproteinase inhibitors); antimetabolites (including adenosine deaminase

inhibitors, folic acid antagonists, purine analogues, and pyrimidine analogues); antibiotics or antibodies (including monoclonal antibodies, CTLA-4 antibodies, anthracyclines); aromatase inhibitors;

cell-cycle response modifiers; enzymes; farnesyl-protein transferase

5 inhibitors;

hormonal and antihormonal agents and steroids (including synthetic analogs, glucocorticoids, estrogens/anti-estrogens [*e.g.*, SERMs], androgens/anti-androgens, progestins, progesterone receptor agonists, and luteinizing hormone-releasing [LHRH] agonists and antagonists); insulin-like growth factor (IGF)/insulin-like

10 growth factor receptor (IGFR) system modulators (including IGFR1 inhibitors); integrin-signaling inhibitors; kinase inhibitors (including multi-kinase inhibitors and/or inhibitors of Src kinase or Src/abl, cyclin dependent kinase [CDK] inhibitors, panHer, Her-1 and Her-2 antibodies, VEGF inhibitors, including anti-VEGF antibodies, EGFR inhibitors, mitogen-activated protein [MAP] inhibitors, MEK
15 inhibitors, Aurora kinase inhibitors, PDGF inhibitors, and other tyrosine kinase inhibitors or serine /threonine kinase inhibitors;

microtubule-disruptor agents, such as ecteinascidins or their analogs and derivatives; microtubule-stabilizing agents such as taxanes, and the naturally-occurring epothilones and their synthetic and semi-synthetic analogs;

20 microtubule-binding, destabilizing agents (including vinca alkaloids); and topoisomerase inhibitors; prenyl-protein transferase inhibitors; platinum coordination complexes; signal transduction inhibitors; and other agents used as anti-cancer and cytotoxic agents such as biological response modifiers, growth factors, and immune modulators.

25

[00265] Additionally, the compounds of the present invention can be formulated or co-administered with other therapeutic agents that are selected for their particular usefulness in addressing side effects associated with the aforementioned conditions. For example, compounds of the invention may be formulated with agents to prevent
30 nausea, hypersensitivity and gastric irritation, such as antiemetics, and H₁ and H₂ antihistaminics.

[00266] The above other therapeutic agents, when employed in combination with the compounds of the present invention, can be used, for example, in those amounts indicated in the Physicians' Desk Reference (PDR) or as otherwise determined by one of ordinary skill in the art.

- 5 [00267] The compounds are administered to a mammal in a therapeutically effective amount. By "therapeutically effective amount" it is meant an amount of a compound of the present disclosure that, when administered alone or in combination with an additional therapeutic agent to a mammal, is effective to prevent or ameliorate the disease condition or the progression of the disease.

10

DOSAGE AND FORMULATION

- [00268] The compounds of this disclosure can be administered in such oral dosage forms as tablets, capsules (each of which includes sustained release or timed release formulations), pills, powders, granules, elixirs, tinctures, suspensions, syrups, and emulsions. They may also be administered in intravenous (bolus or infusion), intraperitoneal, subcutaneous, or intramuscular form, all using dosage forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts. They can be administered alone, but generally will be administered with a pharmaceutical carrier selected on the basis of the chosen route of administration and standard pharmaceutical practice.
- 15 [00269] The dosage regimen for the compounds of the present invention will, of course, vary depending upon known factors, such as the pharmacodynamic characteristics of the particular agent and its mode and route of administration; the species, age, sex, health, medical condition, and weight of the recipient; the nature and extent of the symptoms; the kind of concurrent treatment; the frequency of treatment; the route of administration, the renal and hepatic function of the patient, and the effect desired. A physician or veterinarian can determine and prescribe the effective amount of the drug required to prevent, counter, or arrest the progress of the disorder.

- 20 [00270] By way of general guidance, the daily oral dosage of each active ingredient, when used for the indicated effects, will range between about 0.001 to 1000 mg/kg of body weight, or between about 0.01 to 100 mg/kg of body weight per day, or alternatively, between about 1.0 to 20 mg/kg/day. Intravenously, the doses
- 25 30

will range from about 1 to about 10 mg/kg/minute during a constant rate infusion.

Compounds of this invention may be administered in a single daily dose, or the total daily dosage may be administered in divided doses of two, three, or four times daily.

In one embodiment, the daily oral dosage of the active ingredient is between 3 and

5 600 mg either administered once daily or in divided doses administered twice daily.

Alternatively, the active ingredient may be administered in doses of 10-20 mg administered twice daily or 40 to 100 mg administered once daily. Alternatively, the active ingredient may be administered a dose of 12.5 mg twice a day or 75 mg once a day. Alternatively, the active ingredient may be administered in doses of 3, 10, 30,

10 100, 300, and 600 mg administered either once or twice a day.

[00271] Compounds of this invention can be administered in intranasal form via topical use of suitable intranasal vehicles, or via transdermal routes, using transdermal skin patches. When administered in the form of a transdermal delivery system, the dosage administration will, of course, be continuous rather than intermittent

15 throughout the dosage regimen.

[00272] The compounds are typically administered in admixture with suitable pharmaceutical diluents, excipients, or carriers (collectively referred to herein as pharmaceutical carriers) suitably selected with respect to the intended form of administration, that is, oral tablets, capsules, elixirs, syrups and the like, and

20 consistent with conventional pharmaceutical practices.

[00273] For instance, for oral administration in the form of a tablet or capsule, the active drug component can be combined with an oral, non-toxic, pharmaceutically acceptable, inert carrier such as lactose, starch, sucrose, glucose, methyl cellulose, magnesium stearate, dicalcium phosphate, calcium sulfate, mannitol, sorbitol and the like; for oral administration in liquid form, the oral drug components can be combined with any oral, non-toxic, pharmaceutically acceptable inert carrier such as ethanol, glycerol, water, and the like. Moreover, when desired or necessary, suitable binders, lubricants, disintegrating agents, and coloring agents can also be incorporated into the mixture. Suitable binders include starch, gelatin, natural sugars such as glucose or

25 like; for oral administration in liquid form, the oral drug components can be combined with any oral, non-toxic, pharmaceutically acceptable inert carrier such as ethanol, glycerol, water, and the like. Moreover, when desired or necessary, suitable binders, lubricants, disintegrating agents, and coloring agents can also be incorporated into the mixture. Suitable binders include starch, gelatin, natural sugars such as glucose or

30 beta-lactose, corn sweeteners, natural and synthetic gums such as acacia, tragacanth, or sodium alginate, carboxymethylcellulose, polyethylene glycol, waxes, and the like. Lubricants used in these dosage forms include sodium oleate, sodium stearate,

magnesium stearate, sodium benzoate, sodium acetate, sodium chloride, and the like. Disintegrators include, without limitation, starch, methyl cellulose, agar, bentonite, xanthan gum, and the like.

[00274] The compounds of the present invention can also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles, and multilamellar vesicles. Liposomes can be formed from a variety of phospholipids, such as cholesterol, stearylamine, or phosphatidylcholines.

[00275] Compounds of the present invention may also be coupled with soluble polymers as targetable drug carriers. Such polymers can include polyvinylpyrrolidone, pyran copolymer, polyhydroxypropylmethacrylamide-phenol, polyhydroxyethylaspartamidephenol, or polyethyleneoxide-polylysine substituted with palmitoyl residues. Furthermore, the compounds of the present invention may be coupled to a class of biodegradable polymers useful in achieving controlled release of a drug, for example, polylactic acid, polyglycolic acid, copolymers of polylactic acid and polyglycolic acid, polyepsilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydropyrans, polycyanoacylates, and crosslinked or amphipathic block copolymers of hydrogels.

[00276] Dosage forms (pharmaceutical compositions) suitable for administration may contain from about 1 milligram to about 100 milligrams of active ingredient per dosage unit. In these pharmaceutical compositions the active ingredient will ordinarily be present in an amount of about 0.5-95% by weight based on the total weight of the composition.

[00277] Gelatin capsules may contain the active ingredient and powdered carriers, such as lactose, starch, cellulose derivatives, magnesium stearate, stearic acid, and the like. Similar diluents can be used to make compressed tablets. Both tablets and capsules can be manufactured as sustained release products to provide for continuous release of medication over a period of hours. Compressed tablets can be sugar coated or film coated to mask any unpleasant taste and protect the tablet from the atmosphere, or enteric coated for selective disintegration in the gastrointestinal tract.

[00278] Liquid dosage forms for oral administration can contain coloring and flavoring to increase patient acceptance.

[00279] In general, water, a suitable oil, saline, aqueous dextrose (glucose), and related sugar solutions and glycols such as propylene glycol or polyethylene glycols are suitable carriers for parenteral solutions. Solutions for parenteral administration may contain a water soluble salt of the active ingredient, suitable stabilizing agents, and if necessary, buffer substances. Antioxidizing agents such as sodium bisulfite, sodium sulfite, or ascorbic acid, either alone or combined, are suitable stabilizing agents. Also used are citric acid and its salts and sodium EDTA. In addition, parenteral solutions can contain preservatives, such as benzalkonium chloride, methyl- or propyl-paraben, and chlorobutanol.

10 [00280] Suitable pharmaceutical carriers are described in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, a standard reference text in this field.

[00281] Representative useful pharmaceutical dosage-forms for administration of the compounds of this invention can be illustrated as follows:

15

Capsules

[00282] A large number of unit capsules can be prepared by filling standard two-piece hard gelatin capsules each with 100 milligrams of powdered active ingredient, 150 milligrams of lactose, 50 milligrams of cellulose, and 6 milligrams magnesium stearate.

20

Soft Gelatin Capsules

[00283] A mixture of active ingredient in a digestible oil such as soybean oil, cottonseed oil or olive oil may be prepared and injected by means of a positive displacement pump into gelatin to form soft gelatin capsules containing 100 milligrams of the active ingredient. The capsules should be washed and dried.

25

Tablets

[00284] Tablets may be prepared by conventional procedures so that the dosage unit is 100 milligrams of active ingredient, 0.2 milligrams of colloidal silicon dioxide, 5 milligrams of magnesium stearate, 275 milligrams of microcrystalline cellulose, 11

30

milligrams of starch and 98.8 milligrams of lactose. Appropriate coatings may be applied to increase palatability or delay absorption.

Injectable

- 5 **[00285]** A parenteral composition suitable for administration by injection may be prepared by stirring 1.5% by weight of active ingredient in 10% by volume propylene glycol and water. The solution should be made isotonic with sodium chloride and sterilized.

10 Suspension

[00286] An aqueous suspension can be prepared for oral administration so that each 5 mL contain 100 mg of finely divided active ingredient, 200 mg of sodium carboxymethyl cellulose, 5 mg of sodium benzoate, 1.0 g of sorbitol solution, U.S.P., and 0.025 mL of vanillin.

15

[00287] Where the compounds of this invention are combined with other anticoagulant agents, for example, a daily dosage may be about 0.1 to 100 milligrams of the compound of Formula I and about 1 to 7.5 milligrams of the second anticoagulant, per kilogram of patient body weight. For a tablet dosage form, the

20 compounds of this invention generally may be present in an amount of about 5 to 10 milligrams per dosage unit, and the second anti-coagulant in an amount of about 1 to 5 milligrams per dosage unit.

[00288] Where two or more of the foregoing second therapeutic agents are administered with the compound of the examples, generally the amount of each

25 component in a typical daily dosage and typical dosage form may be reduced relative to the usual dosage of the agent when administered alone, in view of the additive or synergistic effect of the therapeutic agents when administered in combination.

[00289] Particularly when provided as a single dosage unit, the potential exists for a chemical interaction between the combined active ingredients. For this reason,

30 when the compound of the examples and a second therapeutic agent are combined in a single dosage unit they are formulated such that although the active ingredients are combined in a single dosage unit, the physical contact between the active ingredients

is minimized (that is, reduced). For example, one active ingredient may be enteric coated. By enteric coating one of the active ingredients, it is possible not only to minimize the contact between the combined active ingredients, but also, it is possible to control the release of one of these components in the gastrointestinal tract such that one of these components is not released in the stomach but rather is released in the intestines. One of the active ingredients may also be coated with a material which effects a sustained-release throughout the gastrointestinal tract and also serves to minimize physical contact between the combined active ingredients. Furthermore, the sustained-released component can be additionally enteric coated such that the release of this component occurs only in the intestine. Still another approach would involve the formulation of a combination product in which the one component is coated with a sustained and/or enteric release polymer, and the other component is also coated with a polymer such as a low viscosity grade of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) or other appropriate materials as known in the art, in order to further separate the active components. The polymer coating serves to form an additional barrier to interaction with the other component.

[00290] These as well as other ways of minimizing contact between the components of combination products of the present invention, whether administered in a single dosage form or administered in separate forms but at the same time by the same manner, will be readily apparent to those skilled in the art, once armed with the present disclosure.

[00291] Additionally, certain compounds disclosed herein may be useful as metabolites of other compounds. Therefore, in one embodiment, compounds may be useful either as a substantially pure compound, which may also then be incorporated into a pharmaceutical composition, or may be useful as metabolite which is generated after administration of the prodrug of that compound. In one embodiment, a compound may be useful as a metabolite by being useful for treating disorders as described herein.

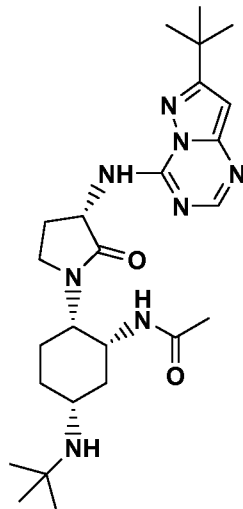
[00292] "Substantially pure" as used herein is intended to include a compound having a purity greater than about 90 weight percent, including about 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, and 100 percent.

[00293] As one example, a compound disclosed herein may be substantially pure in having a purity greater than about 90 percent (by weight), where the remaining less than about 10 percent of material comprises other metabolite of the compound, a prodrug of the compound, and/or reaction and/or processing impurities arising from
5 its preparation.

[00294] Obviously, numerous modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings. It is therefore to be understood that within the scope of the appended claims, the invention may be practiced otherwise than as specifically described herein.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound having the formula:



5 or a salt thereof.

2. The compound of claim 1 that is a crystalline form said compound.

3. The crystalline form of claim 2, wherein the crystalline form comprises
10 the N-1 Form.

4. The crystalline form according of claim 3, wherein said Form N-1 is in substantially pure form.

15 5. The crystalline form of claim 3, wherein the N-1 Form is characterized by unit cell parameters substantially equal to the following:

Cell dimensions:

$$a = 7.3085(6)$$

$$b = 16.257(1)$$

20 $c = 22.688(2)$

$$\alpha^\circ = 90$$

$$\beta^\circ = 90$$

$$\gamma^\circ = 90$$

Space group $P2_12_12_1$

Molecules/unit cell (Z): 1

Density, calc $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$: 1.194

wherein said crystal is at a temperature of about -70°C .

5

6. The crystalline form as defined in claim 3 as characterized by a powder x-ray diffraction pattern substantially in accordance with that shown in Figure 1.

10

7. The crystalline form as defined in claim 3 which is characterized by a differential scanning calorimetry thermogram substantially in accordance with that shown in Figure 2, having an endothermic transition above ca. 205°C .

15

8. The crystalline form as defined in claim 3 which is characterized by a thermal gravimetric analysis curve in accordance with that shown in Figure 3.

9. A pharmaceutical composition comprising the compound of claim 1.

20

10. The pharmaceutical composition of claim 9 further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

11. The pharmaceutical composition of claim 9 further comprising at least one additional therapeutic agent.

25

12. A method of modulating CCR-2 and CCR-5 receptor activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the compound of claim 1.

30

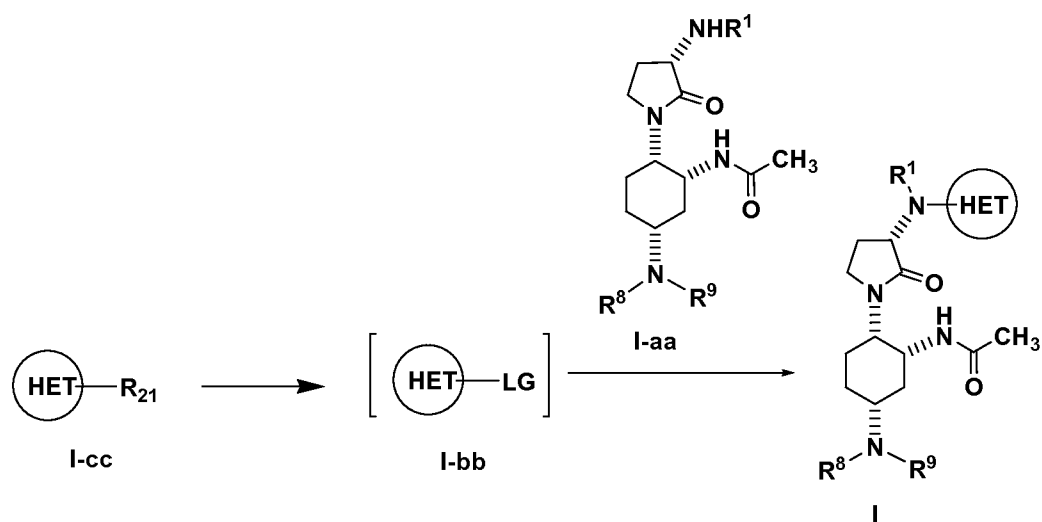
13. A method of treating a disorder, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the compound of claim 1, said the disorder is selected from diabetes, obesity, metabolic syndrome, stroke, neuropathic pain, ischemic cardiomyopathy, psoriasis, hypertension, scleroderma,

osteoarthritis, aneurism, fever, cardiovascular disease, Crohn's disease, congestive heart failure, autoimmune diseases, HIV-infection, HIV-associated dementia, psoriasis, idiopathic pulmonary fibrosis, transplant arteriosclerosis, physically- or chemically-induced brain trauma, inflammatory bowel disease, alveolitis, colitis,

5 systemic lupus erythematosus, nephrotoxic serum nephritis, glomerulonephritis, asthma, multiple sclerosis, atherosclerosis, vasculitis, vulnerable plaques, rheumatoid arthritis, restenosis, venous neointimal hyperplasia, dialysis-graft neointimal hyperplasia, arterio-venous shunt intimal hyperplasia, organ transplantation, chronic allograft nephropathy, cancer, venous neointimal hyperplasia, dialysis-graft

10 neointimal hyperplasia, and arterio-venous shunt neointimal hyperplasia.

14. A process for preparing a compound of formula I, or a salt form thereof:



15 comprising:

- 1) converting a hydrazone compound of formula I-cc to a compound of formula I-bb; and
- 2) coupling the compound of formula I-bb with a compound of formula I-aa; wherein:

20 R₁ is independently hydrogen or an amine-protecting group selected from a carbobenzyloxy group, a *tert*-butyloxycarbonyl, a fluorenylmethyloxycarbonyl group, a benzyl group, and a *p*-methoxybenzyl group;

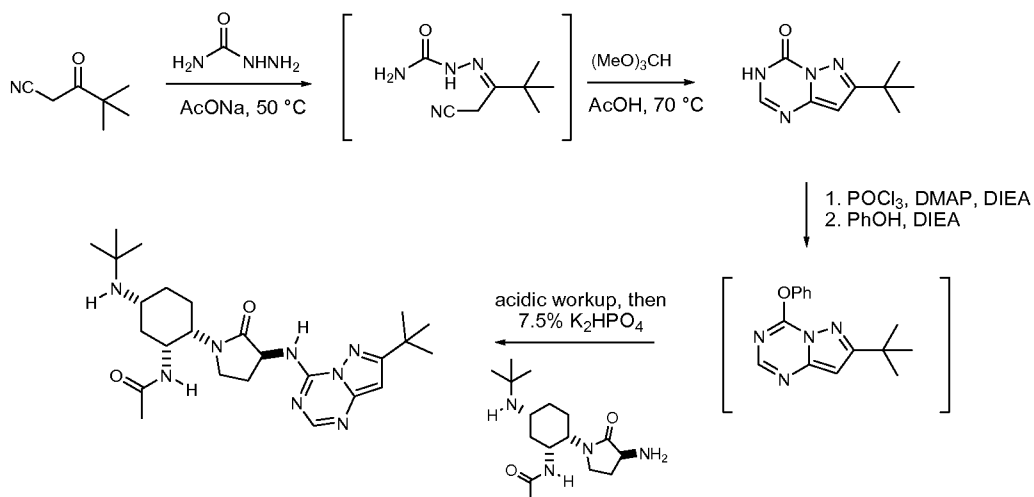
R_8 and R_9 are independently hydrogen or C_{1-6} alkyl;

R_{21} is =O;

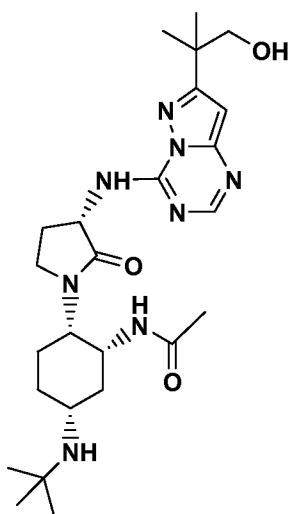
HET is an optionally substituted 3- to 14-membered heterocycle or heteroaryl bicyclic ring having at least one nitrogen heteroatom; and

5 LG is $-OR_{16}$, wherein R_{16} is C_{1-6} alkyl, phenyl, a 5- to 7-membered heteroaryl having one or more atoms selected from N, S, or O, or a 3- to 7-membered cycloalkyl, all of which are optionally substituted with 1 to 3 groups selected from halogen, CF_3 or C_{1-6} alkyl.

10 15. A process for preparing N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide comprising the process set forth in the following scheme:



15 16. A compound having the formula:

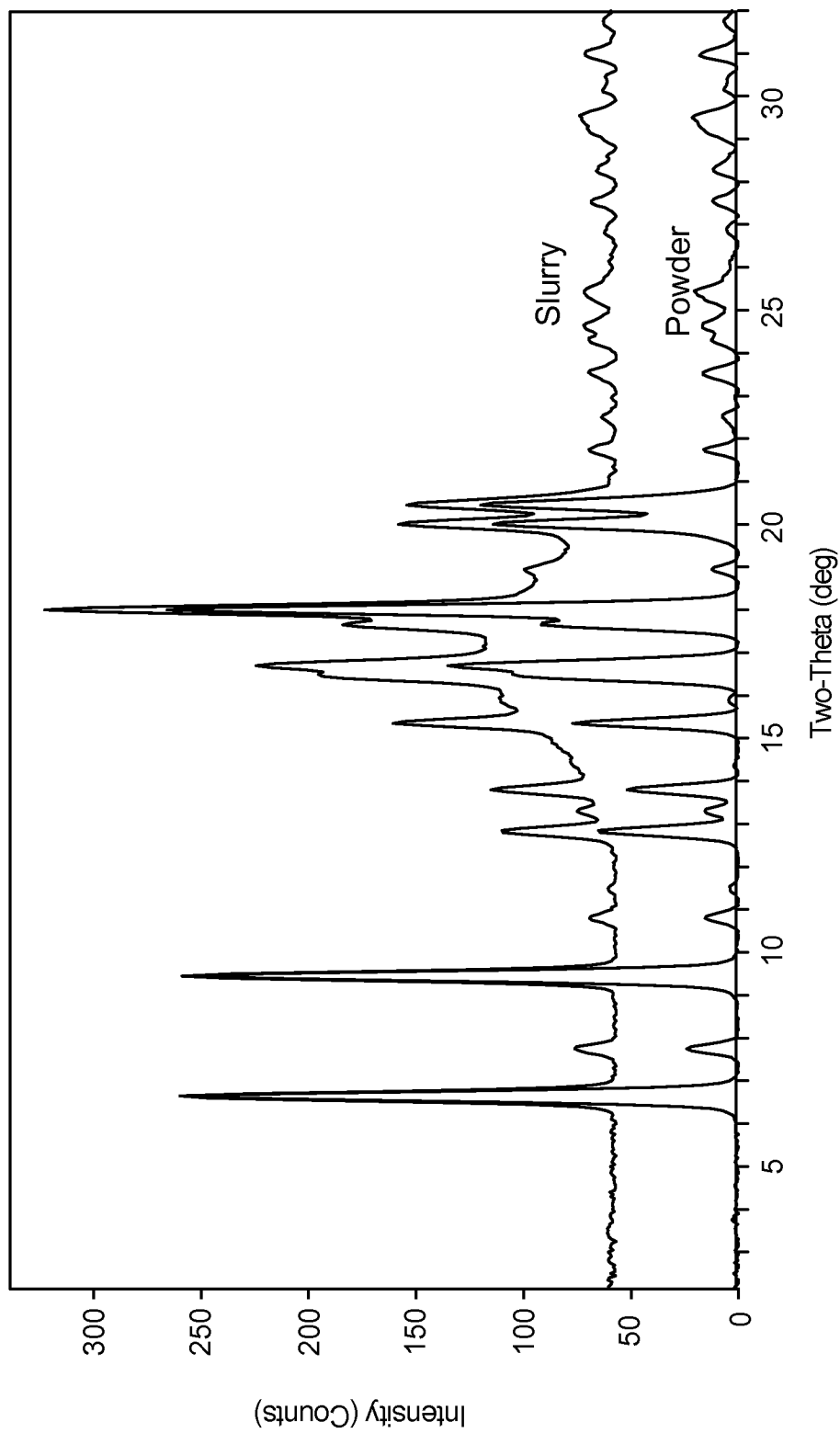


or a salt thereof.

1 / 3

FIG. 1

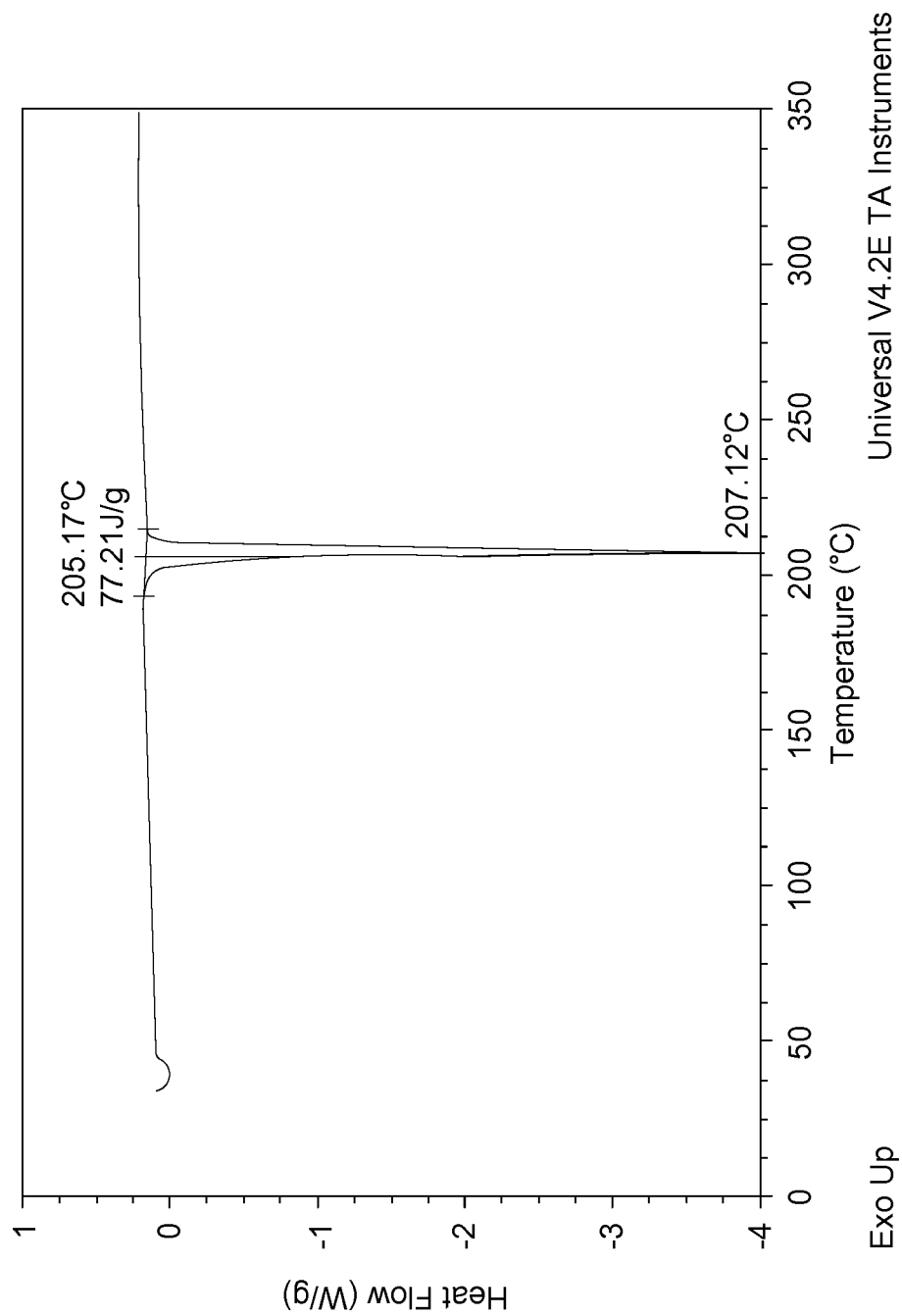
Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide (Example 5)



2 / 3

FIG. 2

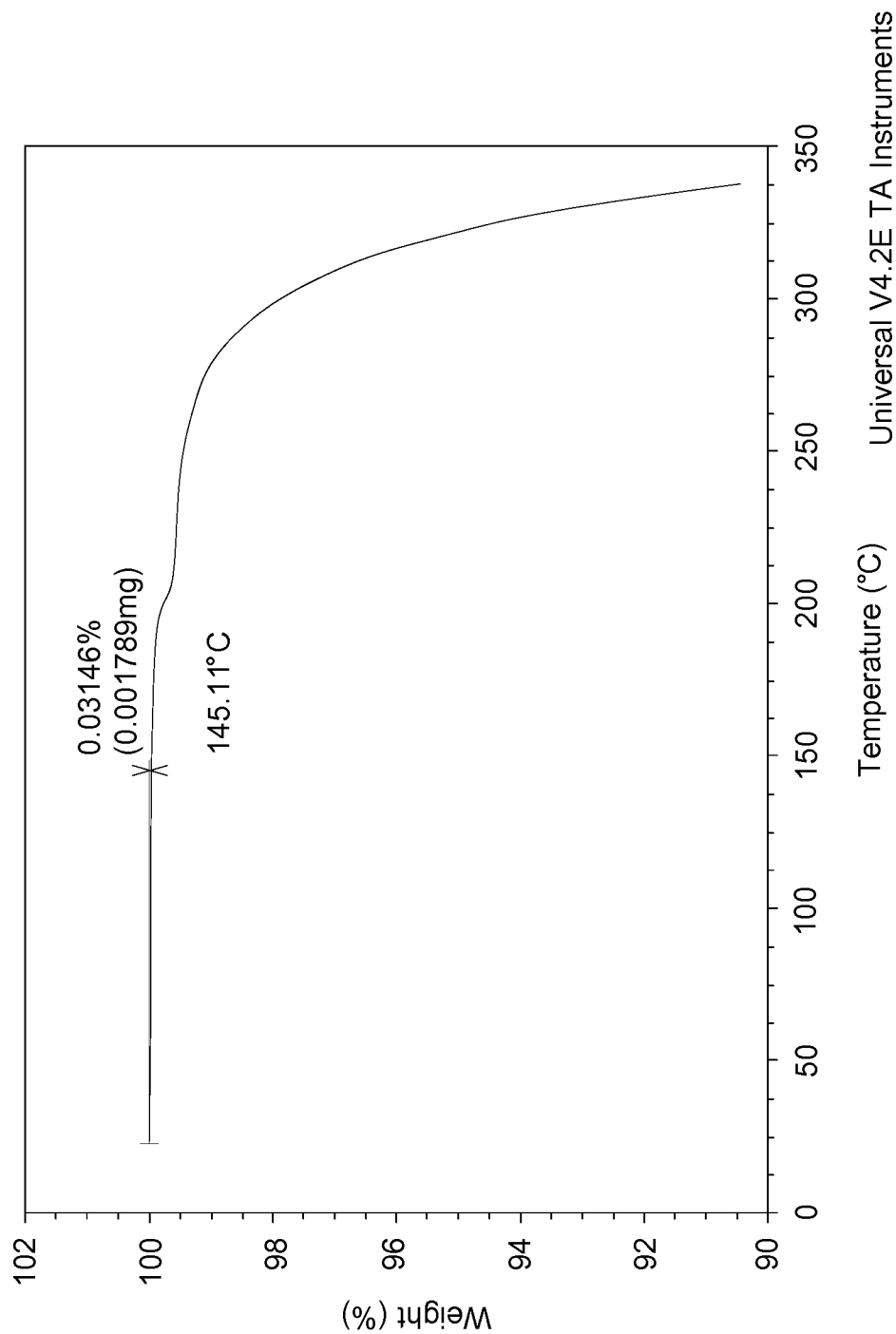
DSC of the N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base Form N-1 (Example 5)



3 / 3

FIG. 3

TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-3-(7-*tert*-butylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-ylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide free base Form N-1 (Example 5)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/052288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D487/04 A61K31/53 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/054627 A1 (CARTER PERCY H [US] ET AL) 10 March 2005 (2005-03-10) page 123, paragraph 0978 - page 129, line 1031; claims; examples	1-13,15, 16
A	WO 2008/014381 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; YANG MICHAEL G [US]; CHERNEY ROBERT J [U] 31 January 2008 (2008-01-31) claims; examples	1-13,15, 16
A	WO 2008/014360 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; CARTER PERCY H [US]; DUNCIA JOHN V [US];) 31 January 2008 (2008-01-31) claims; examples	1-13,15, 16
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 2010

Date of mailing of the international search report

25/01/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gavriliu, Daniela

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/052288

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/50079 A1 (SOD CONSEILS RECH APPLIC [FR]; PREVOST GREGOIRE [FR]; LONCHAMPT MARIE-) 27 June 2002 (2002-06-27) page 31, line 5 - page 33, line 13; claims; examples -----	1-13,15, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/052288

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-13, 15, 16

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/052288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005054627	A1	10-03-2005	
		AU 2004268968 A1	10-03-2005
		BR PI0413713 A	17-10-2006
		CA 2536384 A1	10-03-2005
		EP 1656345 A1	17-05-2006
		IS 8313 A	20-02-2006
		JP 2007502843 T	15-02-2007
		KR 20060117903 A	17-11-2006
		MX PA06001819 A	04-05-2006
		NZ 545317 A	31-03-2009
		US 2009124668 A1	14-05-2009
		US 2007032526 A1	08-02-2007
		WO 2005021500 A1	10-03-2005
WO 2008014381	A2	31-01-2008	
		AR 062114 A1	15-10-2008
		AT 471928 T	15-07-2010
		AU 2007279256 A1	31-01-2008
		CA 2659259 A1	31-01-2008
		CL 21942007 A1	08-02-2008
		CL 21952007 A1	08-02-2008
		CL 21962007 A1	30-05-2008
		CO 6190527 A2	19-08-2010
		DK 2049477 T3	25-10-2010
		EA 200900244 A1	28-08-2009
		EP 2049477 A2	22-04-2009
		EP 2184283 A1	12-05-2010
		ES 2346591 T3	18-10-2010
		HR 20100371 T1	31-08-2010
		JP 2009544758 T	17-12-2009
		KR 20090035036 A	08-04-2009
		PE 08382008 A1	14-06-2008
		PT 2049477 E	27-08-2010
		SG 158925 A1	26-02-2010
		SI 2049477 T1	30-09-2010
		US 2008027083 A1	31-01-2008
WO 2008014360	A2	31-01-2008	
		AR 062124 A1	15-10-2008
		AU 2007279333 A1	31-01-2008
		CA 2659253 A1	31-01-2008
		EA 200900245 A1	28-08-2009
		EP 2046779 A2	15-04-2009
		EP 2194051 A1	09-06-2010
		JP 2009544756 T	17-12-2009
		KR 20090033915 A	06-04-2009
		PE 07322008 A1	13-06-2008
		SG 158924 A1	26-02-2010
		US 2010113489 A1	06-05-2010
		US 2008027084 A1	31-01-2008
WO 0250079	A1	27-06-2002	
		AR 037485 A1	17-11-2004
		AU 2509602 A	01-07-2002
		AU 2002225096 B2	13-07-2006
		CA 2432417 A1	27-06-2002
		EP 1345941 A1	24-09-2003
		JP 2004516297 T	03-06-2004
		US 2004048849 A1	11-03-2004

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-13, 15, 16

Pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives, their
pharmaceutical compositions, preparation and uses

2. claim: 14

Process for preparing 1-cyclohexyl-pyrrolodines of formula
(I)
