EC

CSA716674

Organización y Digitalización CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

OF

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 09-19203

54. **TÍTULO** Moduladores de la actividad del receptor de Quimiocina, Formas Cristalinas y procesos

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** Bristol - Myers Squibb Compan

DOMICILIO Estados Unidos de America

74. **APODERADO** Alvaro Correa Ordoñez
C. C. 79143366 de Bogotá

22. **BOGOTÁ, D. C.**

(FORMA P-10)

28-02-2004

PETIT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 497

ción

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) **SOLICITUD DE :**

[X] **Patente de Invención** — **Capítulo I.**
[X] **Patente de Modelo de Utilidad** — **Capítulo II.**

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
Dirección: P.O. Box 4000, Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-Mail

IDENTIFICACION
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número

(3) **REPRESENTANTE O APODERADO**

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500 Fax: 3762211
E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número 79.143.366 Usaquén TP 28281

(4) **INVENTOR (ES)**

Nombre: CARTER, Percy; DUNCIA, John, V.; MUDRYK, Boguslaw, M; RANDAZZO, Michael, E.; XIAO, Zili ; YANG, Michael, G.; ZHAO, Rulin;
Dirección: Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543, Estados Unidos de América; Route 206 & Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543 Estados Unidos de América; Bristol-Myers Squibb Company, 1 Squibb Drive, New Brunswick, New Jersey 08903 Estados Unidos de América; Bristol-Myers Squibb Company, 1 Squibb Drive, New Brunswick, New Jersey 08903, Estados Unidos de América; Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543, Estados Unidos de América; Bristol-Myers Squibb Company. Route 206 & Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543, Estados Unidos de América; Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543, Estados Unidos de América.

(72) Nacionalidad o Domicilio:

(5) **PCT (85)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/074377 Fecha 26.07.2007
Publicación Internacional No. WO/2008/014360 Fecha 31.01.2008

(6) **Título (54)** MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS Y PROCESOS

(7) **Clasificación Internacional (51)** C07D 403/12; A61K 31/4025; C07D 207/273; C07D 317/72

(8) **Prioridad** SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	28.07.2006	60/834,235
US	21.03.2007	60/896,026
US	25.07.2007	11/782,742

(9) **Comprobante de pago No.**

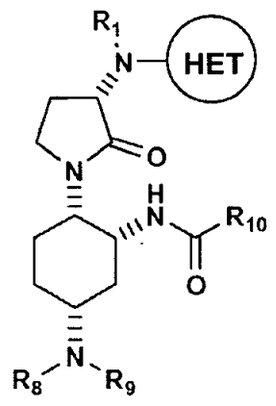
	Fecha
09-5,902	ENE-26-2009
09-2,003	ENE-09-2009
08-100,468	DIC-26-2008
08-100,486	DIC-26-2008
08-100,487	DIC-26-2008
08-100,488	DIC-26-2008
08-100,479	DIC-26-2008
08-100,331	DIC-26-2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [X] Poderes, si fuere el caso (ver radicado No. 08.129.339 poder General Bristol-Myers Squibb Company)
- [X] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [X] Arte final 12 x 12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: Extractos

(11) **FIGURA CARATERISTICA**



(I)

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

000003

TRADUCCIÓN OFICIAL Nº 097/2009 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del traductor. Esta es una traducción oficial efectuada el día 10 de febrero de 2009 por la señora Teresa Jiménez de Montes, con cc 41.569.149 de Bogotá, traductora oficial según Resolución Nº 220 del 6 de febrero de 1978, expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

==========

11079 PCT

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

ESTADO DE NEW JERSEY)
) Suscrito y Jurado
CONDADO DE MERCER)

Yo, Evelyn Vazquez, Notaria Pública, en y para el estado antes mencionado, certifico hoy 30 de diciembre de 2008, que las copias adjuntas son copias completas, fieles y exactas de las cesiones originales firmadas por los citados inventores.

Firmado, Evelyn Vazquez
Notaria Pública
Evelyn Vazquez
Notaria Pública de New Jersey
No. 2106805
Mi comisión vence el 9 de diciembre de 2012
Registrada e el Condado de Middlesex

[SELLO]
EVELYN VAZQUEZ
NOTARIA PÚBLICA
NEW JERSEY

11079 NP

CESIÓN

Nosotros,
Percy H. Carter, John V. Duncia, Boguslaw M. Mudryk, Michael E. Randazzo, Zili Xiao, Michael G. Yang, Rulin Zhao

De acuerdo con las obligaciones contractuales asumidas hasta ahora por nosotros y/o a cambio de una contraprestación válida y efectiva cuyo recibo y suficiencia se acusan por el presente documento, mediante el presente vendemos y cedemos a **Bristol-Myers Squibb Company**, una sociedad de Delaware, con domicilio de negocios en Rt. 206 & Province Line Road, Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, a sus sucesores, causahabientes y representantes legales, la totalidad de nuestros derechos, títulos y participación los cuales incluyen el derecho y el beneficio total sobre las prioridades que puedan otorgarse ahora o en el futuro, a nosotros, por las leyes locales o por tratado, incluida la convención internacional para la protección de

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

propiedad industrial en y para todos los países del mundo incluidos los Estados Unidos y sus territorios y posesiones, en y sobre la invención titulada:

MODULADORES DE LA ACTIVIDAD RECEPTORA DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS Y PROCESO

Inventado por nosotros y descrito en la solicitud de patentes de los Estados Unidos no provisional

Solicitud No. 11/782,742, presentada 25 de julio, 2007

Incluyendo la citada solicitud de patentes de los Estados Unidos no provisional y cualquier solicitud que reclame antigüedad de la citada solicitud no provisional presentada en cualquier país y con respecto a cualquier patente que pueda ser emitida y/u otorgada con respecto a la misma y todas las divisiones, continuaciones, reexpediciones, certificados de re-examen, y extensiones de las mismas en todos los países, cuya participación constituye la propiedad total sobre dicha invención y sobre todas las citadas solicitudes, patentes (incluyendo reemisión de patentes) extensiones, y certificados de re-examen pertenecerán y serán disfrutados por Bristol-Myers Squibb Company y sus sucesores y causahabientes hasta el máximo de los términos para los cuales esas patentes (incluidas las reexpediciones de patentes), certificados de extensión y de re-examen puedan otorgarse y/o emitirse en su totalidad como si los mismos hubieren sido mantenidos y disfrutadas por nosotros, si esta venta, cesión y transferencia no se hubiere realizado;

Y por el presente aceptamos comunicar al mencionado cesionario o a su representante sobre cualquier hecho del que tengamos conocimiento con respecto a dicha invención, a dar testimonio en cualquier proceso legal, a firmar y/o suscribir cualquier otro documento adicional y/o instrumento que pueda ser necesario, legítimo y adecuado para la presentación y/o proceso judicial de todas las solicitudes, incluyendo solicitudes divisionales, de continuación y de reemisión, certificados de extensiones y reexamen y/o el otorgamiento y/o extensión de los mismos y/o de otra manera garantizar el título de dicha invención y de todas las solicitudes, patentes (incluidas las re-emisiones de patentes, certificados de extensiones y reexamen de las mismas, en dicho cesionario y en general, a revisar todos los actos que sean necesarios para colaborar con el cesionario, sus sucesores y causahabientes para obtener y hacer cumplir la adecuada protección de dicha invención en todos los países.

Firmado el 14 de agosto de 2007 por [Firma ilegible]
Percy H. Carter

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 14 de agosto de 2007, ante mí, compareció Percy H, Carter a quien conozco como la persona que firmó la cesión adjunta y reconoció ante mí que la firmó.

Firmado [ilegible]
Notario Público

[SELLO]

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 225 MINJUSTICIA

DAWNET BRAGG
Notaria Pública de New Jersey
Mi comisión vence septiembre 22, 2009

Firmado el 3 de agosto de 2007, por John V. Duncia
John V. Duncia

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 3 de agosto de 2007, compareció ante mí John V. Duncia a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 3 de agosto de 2007, por [firma ilegible]
Boguslaw M. Mudryk

Estado de New Jersey)
)
Condado de Middlesex)

Hoy 3 de agosto de 2007, compareció ante mí Boguslaw M. Mudryk a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Marie S. Alberta
Notaria Pública

[SELLO]
MARIE S. ALBERTA
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Nº 2264594
Certificada en el Condado de Middlesex
Vencimiento comisión septiembre 29, 2010

Firmado el 3 de agosto de 2007, por [firma ilegible]
MICHAEL E. RANDAZZO

Estado de New Jersey)
)
Condado de Middlesex)

Hoy 3 de agosto de 2007, compareció ante mí MICHAEL E. RANDAZZO a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

Firmado, Marie S. Alberta
Notaria Pública

[SELLO]
MARIE S. ALBERTA
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Nº 2264594
Certificada en el Condado de Middlesex
Vencimiento comisión septiembre 29, 2010

Firmado el 20 de agosto de 2007, por
[Firma Ilegible]
Zili Xiao

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 20 de agosto de 2007, compareció ante mí Zili Xiao a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 2 de agosto de 2007, por [Firma Ilegible]
Michael G. Yang

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 2 de agosto de 2007, compareció ante mí Michael G. Yang a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 6 de agosto de 2007, por [Firma Ilegible
Rhulin Zhao

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTOR OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 6 de agosto de 2007, compareció ante mí Rhulin Zhao a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

10720 PSP 2

CESIÓN

Nosotros,
Percy H. Carter, Robert J. Cherney, Soo S. Ko, Anurag S. Srivastava, Zili Xiao y Michael G. Yang

De acuerdo con las obligaciones contractuales asumidas hasta ahora por nosotros y/o a cambio de una contraprestación válida y efectiva cuyo recibo y suficiencia se acusan por el presente documento, mediante el presente vendemos y cedemos a **Bristol-Myers Squibb Company**, una sociedad de Delaware, con domicilio de negocios en Rt. 206 & Province Line Road, Princeton Road; Princeton, NJ 08543-4000, a sus sucesores, causahabientes y representantes legales, la totalidad de nuestros derechos, títulos y participación los cuales incluyen el derecho y el beneficio total sobre las prioridades que puedan otorgarse ahora o en el futuro, a nosotros, por las leyes locales o por tratado, incluida la convención internacional para la protección de propiedad industrial en y para todos los países del mundo incluidos los Estados Unidos y sus territorios y posesiones, en y sobre la invención titulada:

DERIVADOS CÍCLICOS COMO MODULADORES DE LA ACTIVIDAD RECEPTORA DE LA QUIMIOCINA

Inventado por nosotros y descrito en la solicitud de patentes de los Estados Unidos no provisional

Solicitud No. 60/896,026, presentada 21 de marzo, 2007

Incluyendo la citada solicitud de patentes de los Estados Unidos no provisional y cualquier solicitud que reclame antigüedad de la citada solicitud no provisional presentada en cualquier país y con respecto a cualquier patente que pueda ser emitida y/u otorgada con respecto a la misma y todas las divisiones, continuaciones, reexpediciones, certificados de re-examen y de extensiones de las mismas en todos los países, cuya participación constituye la propiedad total sobre dicha invención y sobre todas las citadas solicitudes, patentes (incluyendo reemisión de patentes) extensiones, y certificados de reexamen que serán de propiedad de y disfrutados por Bristol-Myers Squibb Company y sus sucesores y causahabientes hasta el máximo de los términos para los cuales esas patentes (incluidas las rexpediciones de patentes), certificados de extensión y de reexamen puedan otorgarse y/o emitirse en su totalidad

TERESA J. DE MONTES
MINJUSTICIA

como si las mismas hubieren sido mantenidos y disfrutados por nosotros, si esta venta, cesión y transferencia no se hubiere realizado;

Y por el presente aceptamos comunicar al mencionado cesionario o a su representante sobre cualquier hecho del que tengamos conocimiento con respecto a dicha invención, a dar testimonio en cualquier proceso legal, a firmar y/o suscribir cualquier otro documento adicional y/o instrumento que pueda ser necesario, legítimo y adecuado para la presentación y/o proceso judicial de todas las solicitudes, incluyendo solicitudes divisionales, de continuación y de reemisión, certificados de reextensiones y de reexamen y/o el otorgamiento y/o extensión de los mismos y/o de otra manera garantizar el título de dicha invención y de todas las solicitudes, patentes (incluidas las re-expediciones de patentes, certificados de extensiones, reexamen de las mismas, en dicho escenario y en general, a revisar todos los actos que sean necesarios para colaborar al cesionario, sus sucesores y causahabientes en la obtención y aplicación de la protección debida para dicha invención en todos los países.

Firmado el 25 de abril de 2007 por [Firma ilegible]
Percy H. Carter

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 25 de abril de 2007, ante mí, compareció Percy H, Carter a quien conozco como la persona que firmó la cesión adjunta y reconoció ante mí que la firmó.

Firmado [ilegible]
Notario Público

[SELLO]
DAWNET BRAGG
Notaria Pública de New Jersey
Mi comisión vence septiembre 22, 2009

Firmado el 1 de mayo de 2007, por
[Firma llegible]
Robert J. Cherney

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 1 de mayo de 2007, compareció ante mí Robert J. Cherney a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 1 de mayo de 2007, por [Firma llegible]
Soo S. Ko

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 1 de mayo de 2007, compareció ante mí Soo S. Ko a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 1 de mayo de 2007, por [Firma llegible]
Anurag S. Srivastava

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 1 de mayo de 2007, compareció ante mí Anurag S. Srivastava a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 23 de abril de 2007, por [Firma llegible]
Zili Xiao

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 23 de abril de 2007, compareció ante mí Zili Xiao a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 23 de abril de 2007, por
[Firma ilegible]
Michael G. Yang

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 23 de abril de 2007, compareció ante mí Michael G. Yang a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Worldwide
10720 PSP

CESIÓN

Nosotros,
Michael G. Yang, Robert J. Chemey, Zili Xiao

De acuerdo con las obligaciones contractuales asumidas hasta ahora por nosotros y/o a cambio de una contraprestación válida y efectiva cuyo recibo y suficiencia se acusan por el presente documento, mediante el presente vendemos y cedemos a **Bristol-Myers Squibb Company**, una sociedad de Delaware, con domicilio de negocios en Rt. 206 & Province Line Road, Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, a sus sucesores, causahabientes y representantes legales, la totalidad de nuestros derechos, títulos y participación los cuales incluyen el derecho y el beneficio total sobre las prioridades que puedan otorgarse ahora o en el futuro, a nosotros, por las leyes locales o por tratado, incluida la convención internacional para la protección de propiedad industrial en y para todos los países del mundo incluidos los Estados Unidos y sus territorios y posesiones, en y sobre la invención titulada:

DERIVADOS CÍCLICOS COMO MODULADORES DE LA ACTIVIDAD RECEPTORA DE LA QUIMIOCINA

Inventado por nosotros y descrito en la solicitud de patentes de los Estados Unidos no provisional

Solicitud No. 60/834,235, presentada 28 de julio, 2006

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

Incluyendo la citada solicitud de patentes de los Estados Unidos no provisional y cualquier solicitud que reclame antigüedad de la citada solicitud no provisional presentada en cualquier país y con respecto a cualquier patente que pueda ser emitida y/u otorgada con respecto a la misma y todas las divisiones, continuaciones, reexpediciones, certificados de re-examen, y extensiones de las mismas en todos los países, cuya participación constituye la propiedad total sobre dicha invención y sobre todas las citadas solicitudes, patentes (incluyendo reemisión de patentes) extensiones, y certificados de reexamen que serán mantenidos y disfrutados por Bristol-Myers Squibb Company y sus sucesores y causahabientes hasta el máximo de los términos para los cuales esas patentes (incluidas la re-emisión de patentes), certificados de extensión y de reexamen puedan otorgarse y/o emitirse en su totalidad como si las mismas hubieren sido mantenidos y disfrutadas por nosotros, si esta venta, cesión y transferencia no se hubiere realizado;

Y por el presente aceptamos comunicar al mencionado cesionario o a su representante sobre cualquier hecho del que tengamos conocimiento con respecto a dicha invención, a dar testimonio en cualquier proceso legal, a firmar y/o suscribir cualquier otro documento adicional y/o instrumento que pueda ser necesario, legítimo y adecuado para la presentación y/o proceso de todas las solicitudes, incluyendo solicitudes divisionales, de continuación y de reemisión, certificados de re-extensiones y re-examen y/o el otorgamiento y/o extensión de las mismas y/o de otra manera garantizar el título de dicha invención y de todas las solicitudes, patentes (incluidas la re-expedición de patentes, certificados de extensiones, reexamen de las mismas, en dicho escenario y en general, a revisar todos los actos que sean necesarios para colaborar al cesionario, sus sucesores y causahabientes en la obtención y aplicación de la protección debida para dicha invención en todos los países.

Firmado el 11 de junio de 2007 por Michael G. Yang
Michael G.Yang

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 11 de junio de 2007, ante mí, compareció Michael G. Yang a quien conozco como la persona que firmó la cesión adjunta y reconoció ante mí que la firmó.

Firmado [ilegible]
Notario Público

[SELLO]
DAWNET BRAGG
Notaria Pública de New Jersey
Mi comisión vence septiembre 22, 2009

Firmado el 12 de junio de 2007, por [Firma llegible]
Robert J. Cherney

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

Hoy 12 de junio de 2007, compareció ante mí Robert J. Cherney a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

Firmado el 8 de junio de 2007, por
[Firma llegible]
Zili Xiao

Estado de New Jersey)
)
Condado de Somerset)

Hoy 8 de junio de 2007, compareció ante mí Zili Xiao a quien conozco como la persona mencionada y quien firmó la cesión anterior y reconoció ante mí su firma.

Firmado, Dawnett Bragg
Notaria Pública

[SELLO]
DAWNETT BRAGG
Notaria Pública, Estado de New Jersey
Vencimiento comisión septiembre 22, 2009

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

896013

APOSTILLE
(Convention de La Haye du octobre 5, 1961)

1. País	Estados Unidos de America
Este documento público	
2. Fue firmado por	EVELYN VAZQUEZ
3. actuando en su carácter de	Notaria Pública, Estado de New Jersey
4. lleva el sello/timbre de	EVELYN VAZQUEZ, NOTARIA

CERTIFICADO

5. EN	TRENTON, NEW JERSEY
6. el	VEINTIOCHO DE ENERO DE 2009
7. por	R. David Rousseau, Tesorero de New Jersey
8. Número	A352509
9. Sello/Estampilla	10. Firma
Gran Sello del Estado de New Jersey	ILEGIBLE

Certificado Número: 113534447
Verifique este certificado en línea en http://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

Teresa Jiménez de Montes
c.c. 41.569.149 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No.220 del
6 de febrero de 1978,
expedida por el 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:
EVELYN VAZQUEZ

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
EVELYN VAZQUEZ, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 28TH DAY OF JANUARY 2009

7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A352509

9. SEAL/STAMP:



10. SIGNATURE



Certificate Number: 113534447
Verify this certificate online at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

Legal

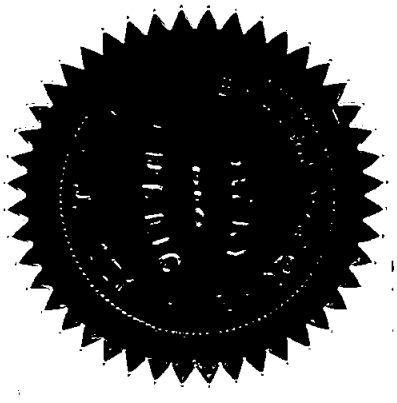
11079 PCT

NOTARY CERTIFICATION

STATE OF NEW JERSEY)
)
COUNTY OF MERCER) ss.

I, Evelyn Vazquez, a Notary Public, in and for said state, do certify on this 30th day of December 2008, that the attached are complete, full, true, and exact copies of the original assignments signed by the named inventors.

Notary Public
Evelyn Vazquez
Notary Public of New Jersey
No. 2106805
My Commission Expires December 9, 2012
Registered in Middlesex County



ASSIGNMENT

We,

Percy H. Carter, John V. Duncia, Boguslaw M. Mudryk, Michael E. Randazzo, Zili Xiao, Michael G. Yang, Rulin Zhao

pursuant to contractual obligations heretofore assumed by us and/or for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, do hereby sell and assign to **Bristol-Myers Squibb Company**, a Delaware corporation, having a place of business at Rt. 206 & Province Line Road, Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest, which includes the right to and full benefit of such priorities as may now or hereafter be granted to us by local laws or by treaty, including any international convention for the protection of industrial property, in and for all countries of the world, including the United States and its territories and possessions, in and to the invention entitled:

MODULATORS OF CHEMOKINE RECEPTOR ACTIVITY, CRYSTALLINE FORMS AND PROCESS

invented by us and described in the non-provisional United States patent application

Application No. 11/782,742, filed July 25, 2007

including said non-provisional United States patent application and any application claiming priority from said non-provisional application, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, and all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications, patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates to be held and enjoyed by the said Bristol-Myers Squibb Company and its successors and assigns to the full end of the terms to which said patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates may be granted and/or issued, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made;

And we hereby agree to communicate to said assignee or its representatives any facts known to us respecting said invention, to testify in any legal proceedings, to sign and/or execute any further documents and/or instruments which may be necessary, lawful and proper in and/or for the filing and/or prosecution of all applications, including divisional, continuation and reissue applications, extensions and reexamination certificates and/or the granting and/or issuance thereof and/or to otherwise secure title to said invention and all of said applications, patents (including reissue patents, extensions and reexamination certificates in said assignee, and in general to do everything possible to aid said assignee, its successors and assigns to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

Signed this 14th day of August, 2007 by _____
Percy H. Carter

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Somerset)

On the 14th day of August, 2007, before me came Percy H. Carter to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 3rd day of August, 2007 by John V. Duncia

John V. Duncia

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Somerset)

On the 3rd day of August, 2007, before me came John V. Duncia to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 3 day of August, 2007 by Boguslaw Mudryk
Boguslaw M. Mudryk

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Middlesex)

On the 3RD day of August, 2007, before me came Boguslaw M. Mudryk to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

Marie S. Alberta
Notary Public

[SEAL]

MARIE S. ALBERTA
Notary Public, State of New Jersey
No. 2264594
Qualified in Middlesex County
Commission Expires Sept. 29, 2010

11079 NP

Signed this 3 day of August, 2007 by Michael E. Randazzo

Michael E. Randazzo

STATE OF New Jersey)
)
COUNTY OF Middlesex)

On the 3rd day of August, 2007, before me came Michael E. Randazzo to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

Marie S. Alberta
Notary Public

[SEAL]

MARIE S. ALBERTA
Notary Public, State of New Jersey
No. 2264594
Qualified in Middlesex County
Commission Expires Sept. 29, 2010

Signed this 20 day of August, 2007 by _____
Zili Xiao

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Somerset)

On the 20th day of August, 2007, before me came Zili Xiao to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 2nd day of August, 2007 by Michael G. Yang

Michael G. Yang

STATE OF New Jersey)
)
COUNTY OF Somerset)

On the 2nd day of August, 2007, before me came Michael G. Yang to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 06 day of August, 2007 by _____
Rulin Zhao

STATE OF New Jersey)
)
COUNTY OF Somerset)

On the 6th day of August, 2007, before me came Rulin Zhao to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

ASSIGNMENT

We,

Percy H. Carter, Robert J. Cherney, Soo S. Ko, Anurag S. Srivastava, Zili Xiao, and Michael G. Yang

pursuant to contractual obligations heretofore assumed by us and/or for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, do hereby sell and assign to **Bristol-Myers Squibb Company**, a Delaware corporation, having a place of business at Rt. 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000, its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest, which includes the right to and full benefit of such priorities as may now or hereafter be granted to us by local laws or by treaty, including any international convention for the protection of industrial property, in and for all countries of the world, including the United States and its territories and possessions, in and to the invention entitled:

CYCLIC DERIVATIVES AS MODULATORS OF CHEMOKINE RECEPTOR ACTIVITY

invented by us and described in the provisional United States patent application

Application Number 60/896,026, filed March 21, 2007

Including said provisional United States patent application and any application claiming priority from said provisional application, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, and all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications, patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates to be held and enjoyed by the said Bristol-Myers Squibb Company and its successors and assigns to the full end of the terms to which said patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates may be granted and/or issued, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made;

And we hereby agree to communicate to said assignee or its representatives any facts known to us respecting said invention, to testify in any legal proceedings, to sign and/or execute any further documents and/or instruments which may be necessary, lawful and proper in and/or for the filing and/or prosecution of all applications, including divisional, continuation and reissue applications, extensions and reexamination certificates and/or the granting and/or issuance thereof and/or to otherwise secure title to said invention and all of said applications, patents (including reissue patents, extensions and reexamination certificates in said assignee, and in general to do everything possible to aid said assignee, its successors and assigns to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

Signed this 25th day of April, 2007 by _____
Percy H. Carter

STATE OF New Jersey)
)
COUNTY OF Somerset)

On the 25th day of April, 2007, before me came Percy H. Carter to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 1st day of May, 2007 by Robert J. Cherney
Robert J. Cherney

STATE OF New Jersey)
)
COUNTY OF Somerset)

On the 1st day of May, 2007, before me came Robert J. Cherney to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

Dawnet Bragg
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 1st day of May, 2007 by

Soo S. Ko

STATE OF New Jersey)
)
COUNTY OF Somerset)

On the 1st day of May, 2007, before me came Soo S. Ko to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 1st day of May, 2007 by _____
Anurag S. Srivastava

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Somerset)

On the 1st day of May, 2007, before me came Anurag S. Srivastava to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 23 day of April, 2007 by _____
Zili Xiao

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Somerset)

On the 23 day of April, 2007, before me came Zili Xiao to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 23 day of April, 2007 by Michael G. Yang
Michael G. Yang

STATE OF New Jersey)
)
COUNTY OF Somerset)

On the 23 day of April, 2007, before me came Michael G. Yang to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

ASSIGNMENT

We,

Michael G. Yang, Robert J. Cherney, Zili Xiao

pursuant to contractual obligations heretofore assumed by us and/or for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, do hereby sell and assign to **Bristol-Myers Squibb Company**, a Delaware corporation, having a place of business at Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest, which includes the right to and full benefit of such priorities as may now or hereafter be granted to us by local laws or by treaty, including any international convention for the protection of industrial property, in and for all countries of the world, including the United States and its territories and possessions, in and to the invention entitled:

CYCLIC DERIVATIVES AS MODULATORS OF CHEMOKINE RECEPTOR ACTIVITY

invented by us and described in the provisional United States patent application

Application Number 60/834,235, filed July 28, 2006

Including said provisional United States patent application and any application claiming priority from said provisional application, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, and all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications, patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates to be held and enjoyed by the said Bristol-Myers Squibb Company and its successors and assigns to the full end of the terms to which said patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates may be granted and/or issued, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made;

And we hereby agree to communicate to said assignee or its representatives any facts known to us respecting said invention, to testify in any legal proceedings, to sign and/or execute any further documents and/or instruments which may be necessary, lawful and proper in and/or for the filing and/or prosecution of all applications, including divisional, continuation and reissue applications, extensions and reexamination certificates and/or the granting and/or issuance thereof and/or to otherwise secure title to said invention and all of said applications, patents (including reissue patents, extensions and reexamination certificates in said assignee, and in general to do everything possible to aid said assignee, its successors and assigns to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

Signed this 11th day of June, 2007 by Michael G. Yang
Michael G. Yang

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Somerset)

On the 11th day of June, 2007, before me came Michael G. Yang, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

Dawnet Bragg
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 12th day of June, 2007 by _____
Robert J. Cherney

STATE OF New Jersey)
COUNTY OF Somerset)

On the 12th day of June, 2007, before me came Robert J. Cherney, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 08 day of JUNE, 2007 by _____ 000054
Zili Xiao

STATE OF New Jersey
COUNTY OF Somerset)

On the 8th day of June, 2007, before me came Zili Xiao, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

_____
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
31 January 2008 (31.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/014360 A2

(51) International Patent Classification:
C07D 403/12 (2006.01) *A61K 31/4025* (2006.01)
C07D 207/273 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/074377

(22) International Filing Date: 26 July 2007 (26.07.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/834,235	28 July 2006 (28.07.2006)	US
60/896,026	21 March 2007 (21.03.2007)	US
11/782,742	25 July 2007 (25.07.2007)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** [US/US]; P.O. Box 4000, Route 206 and ProvinceLine Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CARTER, Percy, H.** [US/US]; Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543 (US). **DUNCIA, John, V.** [US/US]; Route 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543 (US). **MUDRYK, Boguslaw, M.** [US/US]; Bristol-Myers Squibb Company, 1 Squibb Drive, New Brunswick, NJ 08903 (US). **RANDAZZO, Michael, E.** [US/US]; Bristol-Myers Squibb Company, 1 Squibb Drive, New Brunswick, NJ 08903 (US). **XIAO, Zili** [CN/US]; Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543 (US). **YANG, Michael, G.** [US/US]; Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543 (US). **ZHAO, Rulin** [CA/US]; Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543 (US).

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

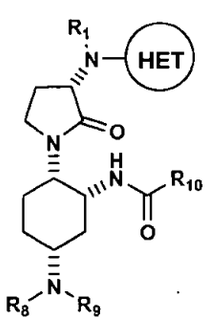
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MODULATORS OF CHEMOKINE RECEPTOR ACTIVITY, CRYSTALLINE FORMS AND PROCESS



(I)

(57) Abstract: The present invention provides a novel antagonist or partial agonists/antagonist of MCP-I receptor activity: N-((lR,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-l- yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug, thereof, having an unexpected combination of desirable pharmacological characteristics. 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, 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-((lR,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-l-yl)cyclohexyl)acetamide: wherein R^1, R^8, R^9, R^{10}, and "HET" are as described herein. Compounds that are useful intermediates of the process are also provided herein.

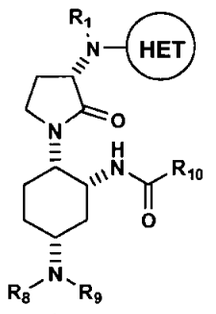
WO 2008/014360 A2

MODULATORS OF CHEMOKINE RECEPTOR ACTIVITY, CRYSTALLINE FORMS AND PROCESS

[0001] This application claims priority from U.S. Provisional Application Nos. 60/834,235, and 60/896,026 filed July 28, 2006 and March 21, 2007, respectively, the disclosures of both of which are incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention provides N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug, thereof, having an unexpected combination of desirable pharmacological characteristics. 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, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases is also an objective of this invention. The present invention also provides a process for preparing compounds of Formula (I), including N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



I

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.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] 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 and Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* **2006**, *354*, 610-621; Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, *338*, 436-445; and Rollins, *Blood* **1997**, *90*, 909-928). 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-1α, MIP-1β, 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 CX_3C chemokine) that do not fall into either of the major chemokine subfamilies.

[0004] 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.* **1994**, *15*, 159-165) which are termed "chemokine receptors." On binding their cognate ligands, chemokine receptors transduce an intracellular signal though 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 and Oshie *Immunity* **2000**, *12*, 121): CCR-1 (or "CKR-1" or "CC-CKR-1") [MIP-1α, MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch, et al., *Cell* **1993**, *72*, 415-425, and Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, *338*, 436-445); 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* **1994**, *91*, 2752-2756, and Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, *338*, 436-445); CCR-3 (or "CKR-3" or "CC-CKR-3") [eotaxin-1, eotaxin-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere, et

al., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16491-16494, and Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, *338*, 436-445); CCR-4 (or "CKR-4" or "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power, et al., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19495-19500, and Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, *338*, 436-445); CCR-5 (or "CKR-5" OR "CC-CKR-5") [MIP-1α, RANTES, MIP-1β] (Sanson, et al., *Biochemistry* **1996**, *35*, 3362-3367); CCR-6 (or "CKR-6" or "CC-CKR-6") [LARC] (Baba, et al., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14893-14898); CCR-7 (or "CKR-7" or "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie et al., *J. Leukoc. Biol.* **1997**, *62*, 634-644); CCR-8 (or "CKR-8" or "CC-CKR-8") [I-309] (Napolitano et al., J. Immunol., 1996, 157, 2759-2763); CCR-10 (or "CKR-10" or "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini, et al., *DNA and Cell Biol.* **1997**, *16*, 1249-1256); and CCR-11 [MCP-1, MCP-2, and MCP-4] (Schweickert, et al., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 90550).

[0005] 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 and Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, *8*, 741-748). 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, CCR2, CCR3, CCR5 and CCR8, can act as co-receptors for the infection of mammalian cells by microbes as with, for example, the human immunodeficiency viruses (HIV).

[0006] 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 and Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* **2006**, *354*, 610-621; Z. Gao and W. A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, **103**, 3733; P. H. Carter, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 510; Trivedi, et al, *Ann. Reports Med. Chem.* **2000**, *35*, 191; Saunders and Tarby, *Drug Disc. Today* **1999**, *4*, 80; Premack and Schall, *Nature Medicine* **1996**, *2*, 1174). 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 (Bao Lu, et al., *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 601). 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 (Landin Boring, et al., *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2552), 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 (William A. Kuziel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12053, and Takao Kurihara, et al., *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 1757). 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/CCR2 would be useful in treating a number of inflammatory and autoimmune disorders (reviewed in: M. Feria and F. Díaz-González, *Exp. Opin. Ther. Patents* **2006**, *16*, 49; and J. Dawson, W. Miltz, and C. Wiessner, C. *Exp. Opin. Ther. Targets* **2003**, *7*, 35). This hypothesis has now been validated in a number of different animal disease models, as described below.

[0007] It is known that MCP-1 is upregulated in patients with rheumatoid arthritis (Alisa Koch, et al., *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 772 – 779). Moreover, several preclinical studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 interaction in treating rheumatoid arthritis. A DNA vaccine encoding MCP-1 was shown recently to ameliorate chronic polyadjuvant-induced arthritis in rats (Sawsan Youssef, et al., *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 361). Likewise, the disease symptoms could be controlled via direct administration of antibodies for MCP-1 to rats with collagen-induced arthritis (Hiroomi Ogata, et al., *J. Pathol.* **1997**, *182*, 106), or streptococcal cell wall-induced arthritis (Ralph C. Schimmer, et al., *J.*

Immunol. **1998**, *160*, 1466). 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 (Jiang-Hong Gong, et al., *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 131). Moreover, it has been demonstrated the administration of small molecule CCR2 antagonists reduced clinical score in rodent models of arthritis (C. M. Brodmerkel, et al, *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5370; and M. Xia, et al. US Patent Application 0069123, 2006). Administration of an anti-CCR2 antibody had varying effects on murine CIA, depending on the time of administration (H. Bruhl, et al. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 890). Recent studies with CCR2-/- mice have suggested that deletion of CCR2 can exacerbate rodent arthritis models in specific experimental circumstances (M. P. Quinones, et al. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 856; M. P. Quinones, et al. *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 503).

[0008] 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 (Abdolreza Rezaie-Majd, et al, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1194 – 1199). Several key studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 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 (Long Gu, et al., *Mol. Cell* **1998**, *2*, 275). 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 (Jennifa Gosling, et al., *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 773). Likewise, when CCR-2 -/- mice are crossed with apolipoprotein E -/- mice, a significant decrease in the incidence of atherosclerotic lesions was observed (Landin Boring, et al, *Nature* **1998**, *394*, 894; T. C. Dawson, et al. *Atherosclerosis* **1999**, *143*, 205). Finally, when apolipoprotein E -/- mice are administered a gene encoding a peptide antagonist of CCR2, then lesion size is decreased and plaque stability is increased (W. Ni, et al. *Circulation* **2001**, *103*, 2096 – 2101). Transplantation of bone marrow from CCR2-/- mice into ApoE3-Leiden mice inhibited early atherogenesis (J. Guo, et al.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **2003**, *23*, 447), but had minimal effects on advanced lesions (J. Guo, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 1014).

[0009] 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: Eckel, et al. *Lancet* **2005**, *365*, 1415). 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, *Pharmacological Research* **2006**, *53*, 469; Neels and Olefsky, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 33; Danadona and Aljada, *Am J Cardiol.* **2002** *90*, 27G-33G; Pickup and Crook, *Diabetologia* **1998**, *41*, 1241). MCP-1 is recognized as playing a role in obesity-induced insulin resistance. In culture, human preadipocytes constitutively expressed MCP-1 (Gerhardt, *Mol. Cell. Endocrinology* **2001**, *175*, 81). CCR2 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, β3-adrenergic receptor, and PPARγ) (P. Sartipy and D. Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1999**, *96*, 6902). Patients with type 2 diabetes had greater levels of circulating MCP-1 than non-diabetic controls (S. Nomura, et al. *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, *121*, 437), and release of MCP-1 from adipose tissue could be reduced by treatment with anti-diabetic therapies such as metformin or thiazolidinediones (J. M. Bruun, et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 2282). Likewise, MCP-1 was also overexpressed in murine experimental models of obesity, and was primarily produced by adipose tissue (Sartipy and Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7265). In obese mice, the expression of MCP-1 both preceded and occurred concurrently with the onset of insulin resistance (H. Xu, et al. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1821). Another study showed that the expression of MCP-1 positively correlated with body mass in the perigonadal adipose tissue of mice (Weisberg, et al. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1796). 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 (H. Kanda, et al. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1494). The logical converse could also be demonstrated: overexpression of MCP-1 in adipose

tissue promoted insulin resistance (N. Kamei, et al. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26602). One conflicting result showing that genetic deletion of MCP-1 does not effect insulin resistance in the *db/db* mouse has also appeared (F. Y. Chow, et al. *Diabetologia* **2007**, *50*, 471). Consistent with the data on MCP-1, direct studies with CCR2 (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 $CCR2^+$ inflammatory monocytes in both wild-type (C. L. Tsou, et al. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 902) and $ApoE^{-/-}$ mice (F. Tacke, et al. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 185). Genetic deletion of CCR2 reduced numbers of activated macrophages in murine adipose tissue (C. N. Lumeng, et al. *Diabetes* **2007**, *56*, 16), but did not affect a population of M2 adipose macrophages thought to maintain the "lean" state (C. N. Lumeng, et al. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 175). Genetic deletion of CCR2 reduced diet-induced obesity and improved insulin sensitivity in diet-induced obesity model (S. P. Weisberg, et al. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 115; P Cornelius, RP Gladue, RS Sebastian, WO patent 2006/013427 A2), 2006), depending on experimental conditions (A. Chen, et al. *Obes. Res.* **2005**, *13*, 1311). Administration of a small molecule CCR2 antagonist also improved insulin sensitivity in this same model (S. P. Weisberg, et al. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 115).

[0010] Two studies described the important role of CCR2 in hypertension-induced vascular inflammation, remodeling, and hypertrophy (E Bush et al., *Hypertension* **2000**, *36*, 360; M Ishibashi, et al. *Circ. Res.* **2004**, *94*, 1203).

[0011] 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 (Carla Iarlori, et al., *J. Neuroimmunol.* **2002**, *123*, 170 – 179). 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 scelerosis. Administration of antibodies for MCP-1 to animals with EAE significantly diminished disease relapse (K. J. Kennedy, et al., *J. Neuroimmunol.* **1998**, *92*, 98). Furthermore, two reports have shown that CCR-2 -/- mice are resistant to EAE (B. T. Fife, et al., *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 899;

L. Izikson, et al., *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1075). A subsequent report extended these initial observations by examining the effects of CCR2 deletion in mice from different strains (S. Gaupp, et al. *Am. J. Pathol.* **2003**, *162*, 139). Notably, administration of a small molecule CCR2 antagonist also blunted disease progression in C57BL/6 mice (C. M. Brodmerkel, et al. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5370).

[0012] It is known that MCP-1 is upregulated in patients who develop bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation (Martine Reynaud-Gaubert, et al., *J. of Heart and Lung Transplant.*, **2002**, *21*, 721 – 730; John Belperio, et al., *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 547 – 556). In a murine model of bronchiolitis obliterans syndrome, administration of an antibody to MCP-1 led to attenuation of airway obliteration; likewise, CCR2 -/- mice were resistant to airway obliteration in this same model (John Belperio, et al., *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 547 – 556). These data suggest that antagonism of MCP-1/CCR2 may be beneficial in treating rejection of organs following transplantation. In addition, studies have shown that disruption of MCP-1/CCR2 axis was able to prolong the survival of islet transplant (I Lee et al. *J Immunol* **2003**, *171*, 6929; R Abdi et al., *J Immunol* **2004**, *172*, 767). In rat graft models, CCR2 and MCP-1 was shown to be upregulated in grafts that devlop graft vasculopathy (K Horiguchi et al., *J Heart Lung Transplant.* **2002**, *21*, 1090). In another study, anti-MCP-1 gene therapy attenuated graft vasculopathy (A Saiura et al., *Artherioscler Thromb Vasc Biol* **2004**, *24*, 1886). One study described inhibition of experimental vein graft neoinitimal formation by blockage of MCP-1 (H Tatewaki et al., *J Vasc Surg.* **2007**, *45*,1236).

[0013] Other studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 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 (Jose-Angel Gonzalo, et al., *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 157). It proved possible to reduce allergic airway inflammation in *Schistosoma mansoni* egg-challenged mice through the administration of antibodies for MCP-1 (Nicholas W. Lukacs, et al., J. Immunol. 1997, 158, 4398). Consistent with this, MCP-1 -/- mice displayed a reduced response to challenge with *Schistosoma mansoni* egg (Bao Lu, et al., *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 601).

[0014] Other studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 interaction in treating kidney disease. Administration of antibodies for MCP-1 in a murine model of glomerularnephritis resulted in a marked decrease in glomerular crescent formation and deposition of type I collagen (Clare M. Lloyd, et al., *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1371). In addition, MCP-1 -/- mice with induced nephrotoxic serum nephritis showed significantly less tubular damage than their MCP-1 +/+ counterparts (Gregory H. Tesch, et al., *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 73).

[0015] Several studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 interaction in treating systemic lupus erythematosus. $CCR2^{-/-}$ mice exhibited prolonged survival and reduced renal disease relative to their WT counterparts in a murine model of systemic lupus erythematosus (G. Perez de Lema, et al. *J. Am. Soc. Neph.* **2005**, *16*, 3592). These data are consistent with the disease-modifying activity found in recent studies on genetic deletion of MCP-1 (S. Shimizu, et al. *Rheumatology (Oxford)* **2004**, *43*, 1121; Gregory H. Tesch, et al., *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1813) or administration of a peptide antagonist of CCR2 (H. Hasegawa, et al. *Arthritis & Rheumatism* **2003**, *48*, 2555) in rodent models of lupus.

[0016] A remarkable 30-fold increase in $CCR2^{+}$ lamina propria lymphocytes was observed in the small bowels from Crohn's patients relative to non-diseased ileum (S. J. Connor, et al. *Gut* **2004**, *53*, 1287). Also of note, there was an expansion in the subset of circulating $CCR2^{+}/CD14^{+}/CD56^{+}$ monocytes in patients with active Crohn's disease relative to controls. Several rodent studies have demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 interaction in treating Crohn's disease/colitis. $CCR\text{-}2^{-/-}$ mice were protected from the effects of dextran sodium sulfate-induced colitis (Pietro G. Andres, et al., *J. Immunol.* **2000**, *164*, 6303). Administration of a small molecule antagonist of CCR2, CCR5, and CXCR3 (murine binding affinities = 24, 236, and 369 nM, respectively) also protected against dextran sodium sulfate-induced colitis (H. Tokuyama, et al. *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 1023). Finally, MCP-1-/- mice showed substantially reduced colonic damage (both macroscopic and histological) in a hapten-induced model of colitis (W. I. Khan, et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *291*, G803).

[0017] Two reports described the overexpression of MCP-1 in the intestinal epithelial cells and bowel mucosa of patients with inflammatory bowel disease (H. C. Reinecker, et al., *Gastroenterology* **1995**, *108*, 40, and Michael C. Grimm, et al., *J. Leukoc. Biol.* **1996**, *59*, 804).

[0018] One study described the association of promoter polymorphism in the MCP-1 gene with scleroderma (systemic sclerosis) (S Karrer et al., *J Invest Dermatol.* **2005**, *124*, 92). In related models of tissue fibrosis, inhibition of CCR2/MCP-1 axis reduced fibrosis in skin (T Yamamoto and K Nishioka, *J Invest Dermatol* **2003**, *121*, 510; AM Ferreira et al., *J Invest Dermatol.* **2006**, *126*, 1900), lung (T Okuma et al., *J Pathol.* **2004**, *204*, 594; M Gharaee-Kermani et al., *Cytokine* **2003**, *24*, 266), kidney (K Kitagawa et al., *Am J Pathol.* **2004**, *165*, 237; T Wada et al., *J Am Soc Nephrol* **2004**, *15*, 940), heart (S Hayashidani et al., *Circulation* **2003**, *108*, 2134), and liver (S Tsuruta et al., *Int J Mol Med.* **2004**,*14*, 837).

[0019] One study has demonstrated the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 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 aleviated (Michael L. Jones, et al., *J. Immunol.* **1992**, *149*, 2147).

[0020] Several studies have shown the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 interaction in treating cancer (reviewed in: M. J. Craig and R. D. Loberg, *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 611; I. Conti and B. Rollins, *Seminars in Cancer Biology* **2004**, *14*, 149; R. Giles and R. D. Loberg, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 659). 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 (Rosalba Salcedo, et al., *Blood* **2000**, *96*, 34 – 40). Using human clinical tumor specimens, CCR2 expression was associated with prostrate cancer progression (Y. Lu, et al. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *101*, 676). *In vitro*, MCP-1 expression has been shown to mediate prostrate cancer cell growth and invasion (Y. Lu, et al. *Prostate* **2006**, *66*, 1311); furthermore, MCP-1 expressed by prostate cancer cells induced human bone marrow progenitors for bone resorption (Y. Lu, et al., *Cancer Res.* **2007**, *67*, 3646).

[0021] Multiple studies have described the potential therapeutic value of antagonism of the MCP-1/CCR2 interaction in treating restenosis. In humans, MCP-1 levels correlate directly with risk for restenosis (F. Cipollone, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2001**, *21*, 327). Mice deficient in CCR2 or in MCP-1 showed reductions in the intimal area and in the intima/media ratio (relative to wildtype littermates) after arterial injury (Merce Roque, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 554; A. Schober, et al. *Circ. Res.* **2004**, 95, 1125; W. J. Kim, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* **2003**, *310*, 936). In mice, transfection of a dominant negative inhibitor of MCP-1 in the skeletal muscle (K. Egashira, et al. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 1167) also reduced intimal hyperplasia after arterial injury. Blockade of CCR2 using a neutralizing antibody reduced neointimal hyperplasia after stenting in primates (C. Horvath, et al. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 488).

[0022] Two reports describe the overexpression of MCP-1 rats with induced brain trauma (J. S. King, et al., *J. Neuroimmunol.* **1994**, *56*, 127, and Joan W. Berman, et al., *J. Immunol.* **1996**, *156*, 3017). In addition, studies have shown that both $CCR2^{-/-}$ (O. B. Dimitrijevic, et al. *Stroke* **2007**, *38*, 1345) and $MCP\text{-}1^{-/-}$ mice (P. M. Hughes, et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2002**, *22*, 308) are partially protected from ischemia/reperfusion injury.

[0023] It is known that monocytes/macrophages play an important role in the development of neuropathic pain (Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, *Pain* **2000**, *86*, 25). Consistent with this notion, a potential role for CCR2 in the treatment of both inflammatory and neuropathic pain has been described recently. $CCR2^{-/-}$ mice showed altered 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 (C. Abbadie, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2003**, *100*, 7947). In addition, $CCR2^{-/-}$ mice did not display significant mechanical allodynia after sciatic nerve injury. Likewise, a small molecule CCR2 antagonist reduced mechanical allodynia to ~80% of pre-injury levels after oral administration (C. Abbadie, J. A. Lindia, and H. Wang, WO PCT 110376, 2004).

[0024] One study described the critical role of MCP-1 in ischemic cardiomyopathy (N. G. Frangogiannis, et al., *Circulation* **2007**, *115*, 584). Another

study described the attenuation of experimetal heart failure following inhibition of MCP-1 (S Hayashidani et al., *Circulation* **2003**, *108*, 2134).

[0025] 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 (Mary E. Russell, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6086). The overexpression of MCP-1 has been noted in the lung endothelial cells of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (Harry N. Antoniades, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5371). Similarly, the overexpression of MCP-1 has been noted in the skin from patients with psoriasis (M. Deleuran, et al., *J. Dermatol. Sci.* **1996**, *13*, 228, and R. Gillitzer, et al., *J. Invest. Dermatol.* **1993**, *101*, 127); correlative findings with predominance of CCR2+ cells have also been reported (C. Vestergaard, et al. *Acta Derm. Venerol.* **2004**, *84*, 353). Finally, a recent report has shown that MCP-1 is overexpressed in the brains and cerebrospinal fluid of patients with HIV-1-associated dementia (Alfredo Garzino-Demo, WO 99/46991).

[0026] In addition, CCR2 polymorphism has been shown to be associated with sarcoidosis at least in one subset of patients (P. Spagnolo, et al. *Am J Respir Crit Care Med.* **2003**, *168*, 1162).

[0027] It should also be noted that CCR-2 has been implicated as a co-receptor for some strains of HIV (B. J. Doranz, et al., *Cell* **1996**, *85*, 1149). It has also been determined that the use of CCR-2 as an HIV co-receptor can be correlated with disease progression (Ruth I. Connor, et al., *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 621). This finding is consistent with the recent finding that the presence of a CCR-2 mutant, CCR2-64I, is positively correlated with delayed onset of HIV in the human population (Michael W. Smith, et al., *Science* **1997**, *277*, 959). 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 have beneficial therapeutic effects in delaying the disease progression to AIDS in HIV-infected patients.

[0028] It should be noted that CCR2 is also the receptor for the human chemokines MCP-2, MCP-3, and MCP-4 (Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, *338*, 436-

445). Since the new compounds of formula (I) described herein antagonize MCP-1 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."

[0029] Accordingly, compounds that modulate chemokine activity could demonstrate a wide range of utilities in treating inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases. Patent publication WO2005021500 A1 (incorporated herein by reference and assigned to present applicant) discloses compounds that modulate MCP-1, MCP-2, MCP-3 and MCP-4 activity via CCR2. The reference also discloses various processes to prepare these compounds including multistep syntheses that include the introduction and subsequent removal of protecting groups.

[0030] 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 improved CCR-2 inhibitory activity and selectivity for CCR-2 versus other G protein-coupled receptors (i.e. 5HT2A receptor). It is also desirable to find compounds with advantageous and improved 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);

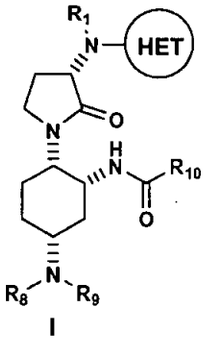
(e) factors that decrease the liability for clinical drug-drug interactions (cytochrome P450 enzyme inhibition or induction, such as CYP 2D6 inhibition, see G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, *Clin. Pharmacokinet.* **2000**, *38*, 41-57, which is hereby incorporated by reference);

(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, and/or ion-channel selectivity). It is especially desirable to find compounds having a desirable combination of the aforementioned pharmacological characteristics.

[0031] 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 compounds; and/or c) fewer process steps.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0032] The present invention provides a novel antagonist or partial agonist/antagonist of MCP-1 receptor activity: N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug, thereof, having an unexpected combination of desirable pharmacological characteristics. 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, 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)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



I

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.

[0033] The present disclosure also provides the use of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug, for the manufacture of a medicament for the treatment of inflammatory diseases, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0034] Figure 1. Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, hemi-hydrate, Form H0.5-4.

[0035] Figure 2. Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, Form N-2.

[0036] Figure 3. Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, 1.75 moles H_2O, Form H1.75-5.

[0037] Figure 4. Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-ethanol solvate, Form E-1.

[0038] Figure 5. Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-acetic acid solvate, Form HAC-1.

[0039] Figure 6. Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-*R*-propylene glycol solvate, Form RPG-3.

[0040] Figure 7. DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, hemi-hydrate, Form H0.5-4.

[0041] Figure 8. TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, hemi-hydrate, Form H0.5-4.

[0042] Figure 9. DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, Form N-2.

[0043] Figure 10. TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, Form N-2.

[0044] Figure 11. Vapor Sorption Isotherm of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, Form N-2 at 25 °C.

[0045] Figure 12. DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, 1.75 moles H_2O, Form H1.75-5.

[0046] Figure 13. TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, 1.75 moles H_2O, Form H1.75-5.

[0047] Figure 14. DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-acetic acid solvate, Form HAC-1.

[0048] Figure 15. TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-acetic acid solvate, Form HAC-1.

[0049] Figure 16. DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-ethanol solvate, Form E-1.

[0050] Figure 17. TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-ethanol solvate, Form E-1.

[0051] Figure 18. DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-R-propylene glycol solvate, Form RPG-3.

[0052] Figure 19. TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-R-propylene glycol solvate, Form RPG-3.

[0053] Figure 20. Intradermal challenge model in cynomolgus monkey: Example 1 inhibited mononuclear cell recruitment to skin.

[0054] Figure 21. 48-hour TG peritonitis in hCCR2 KI mouse: Example 1 inhibition of monocyte/macrophage infiltration into peritoneal cavity.

[0055] Figure 22. hCCR2 KI mouse EAE (experimental autoimmune encephalomyelositis): Example 1 treatment reduced clinical score.

[0056] Figure 23. Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 3– Compound 7.

[0057] Figure 24. Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 4 – Compound 8.

[0058] Figure 25. Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 4 – Compound 9.

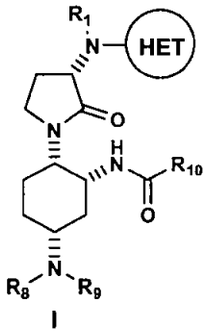
[0059] Figure 26. Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 4 – Compound 10

[0060] Figure 27. Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 5– Compound 11.

DETAILED DESCRIPTION

[0061] The present invention provides a novel antagonist or partial agonist/antagonist of MCP-1 receptor activity: N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug, thereof, having an unexpected combination of desirable pharmacological characteristics. 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, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases is also an objective of this invention. The present invention also provides a process for preparing compounds of Formula (I), including N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



I

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.

[0062] [N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, unexpectedly demonstrates a desirable combination of pharmacological characteristics including a surprisingly high degree of oral bioavailability in combination with indications that it is highly efficacious and has excellent safety criteria.

[0063] Known modulators of CCR2 receptors, such as those disclosed in patent publication WO2005021500 published March 10, 2005 (US Patent No. 7,163,937, issued January 16, 2007, assigned to present Applicant) that demonstrate an adequate degree of membrane permeability (a critical factor of oral bioavailability), are not sufficiently efficacious, as measured by their CCR2-binding ability (a 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.

[0064] In contrast, as illustrated by the data presented herein in the section titled "Comparative Pharmacological Characteristics", *infra*, the relatively polar molecule, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-

ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide demonstrates a surprisingly high degree of membrane permeability, and yet maintains potent CCR2 binding ability along with excellent ion channel selectivity.

[0065] Accordingly, the present invention provides a new chemokine modulator having improved pharmacological characteristics that is expected to be useful in treating inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases.

EMBODIMENTS

[0066] In one embodiment, the disclosure is directed to N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, and pharmaceutically acceptable salts, thereof.

[0067] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base.

[0068] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, wherein the crystalline form comprising the N-2 Form.

[0069] Another embodiment is the N-2 Form characterized by (or having) unit cell parameters substantially equal to the following:

Cell dimensions:

a = 18.7240(4)

b= 8.0171(2)

c = 19.6568(5)

$\alpha = 90$

$\beta = 114.935(2))$

$\gamma = 90$

$V(Å^3) = 2675.7(1)$

Space group $P2_12_12_1$

Molecules/unit cell 2

wherein said crystal is at a temperature of about +22°C (RT).

[0070] Another embodiment in the N-2 Form characterized by (or having) a powder x-ray diffraction pattern comprising three or more of 2θ values (CuKα λ=1.5418 Å) selected from 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 and 19.2, at a temperature of about 22°C.

[0071] Another embodiment is the N-2 Form characterized by (or having) a powder x-ray diffraction pattern further comprising four or more of 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 and 19.2 at a temperature of about 22°C.

[0072] Another embodiment is the N-2 Form characterized by (or having) fractional atomic coordinates substantially as listed in Table 3.

[0073] Another embodiment is the N-2 Form characterized by (or having) a power x ray diffraction pattern substantially according to Figure 2.

[0074] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, comprising Form H1.75-5 (1.75 moles of water), characterized by the unit cell parameters found in Table 1; 3 or 4 or more 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from Table 9; fractional atomic coordinate substantially as listed in Table 4 and/or a powder x-ray diffraction pattern substantially according to Figure 3.

[0075] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, comprising Form H0.5-4 (hemi-hydrate) characterized by the unit cell parameters found in Table 1; 3 or 4 or more 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from Table 9; fractional atomic coordinate substantially as listed in Table 2 and/or a powder x-ray diffraction pattern substantially according to Figure 1.

[0076] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, comprising Form E-1 (mono-ethanol solvate) characterized by the unit cell parameters found in Table 1; 3 or 4 or more 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from Table 9; fractional atomic coordinate substantially

as listed in Table 5 and/or a powder x-ray diffraction pattern substantially according to Figure 4.

[0077] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, comprising Form HAC-1 (mono-acetic acid solvate) characterized by the unit cell parameters found in Table 1; 3 or 4 or more 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from Table 9; fractional atomic coordinate substantially as listed in Table 6 and/or a powder x-ray diffraction pattern substantially according to Figure 5.

[0078] Another embodiment is a crystalline form patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, comprising Form IPA-1 (mono-isopropanol solvate) characterized by the unit cell parameters found in Table 1; 3 or 4 or more 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from Table 9; and/or fractional atomic coordinates substantially as listed in Table 7.

[0079] Another embodiment is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base comprising Form RPG-3 (mono-*R*-propylene glycol solvate) characterized by the unit cell parameters found in Table 1; 3 or 4 or more 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from Table 9; fractional atomic coordinate substantially as listed in Table 8 and/or a powder x-ray diffraction pattern substantially according to Figure 6.

[0080] Another embodiment is a pharmaceutical composition, comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a compound of the Examples.

[0081] Another embodiment is a method for modulation of chemokine or chemokine receptor activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0082] Another embodiment is a method for modulation of CCR-2 receptor activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0083] Another embodiment is a method for modulation of MCP-1, MCP-2, MCP-3 and MCP-4, and MCP-5 activity that is mediated by the CCR2 receptor

comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0084] Another embodiment is a method for modulation of MCP-1 activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0085] Another embodiment is a method for inhibiting CCR2 and CCR5 activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0086] Another embodiment is a method for treating disorders, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples said disorders being selected from diabetes, obesity, metabolic syndrome, stroke, neuropathic pain, ischemic cardiomyopathy, psoriasis, hypertension, scheroderma, 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.

[0087] Another embodiment is a method for treating disorders, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples, wherein said disorders are 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, and cancer.

[0088] Another embodiment is a method for treating disorders, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples, wherein said disorders are selected from diabetes,

obesity, Crohn's disease, systemic lupus erythematosus, glomerulonephritis, multiple sclerosis, atherosclerosis, restenosis, and organ transplantation.

[0089] Another embodiment is a method for treating disorders, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples, wherein said disorders are selected from multiple sclerosis, atherosclerosis, Crohn's disease, and diabetes.

[0090] Another embodiment is a method for treating disorders, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples, wherein said disorders are selected from restenosis, organ transplantation, and cancer.

[0091] Another embodiment is a method for treating diabetes, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0092] Another embodiment is a method for treating Crohns's disease, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0093] Another embodiment is a method for treating multiple sclerosis, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0094] Another embodiment is a method for treating atherosclerosis, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0095] Another embodiment is a method for treating restenosis, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0096] Another embodiment is a method for treating organ transplantation, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0097] Another embodiment is a method for treating cancer, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[0098] Another embodiment is a method for treating cancer, wherein the cancer is selected from breast cancer, liver cancer, prostate cancer and melanoma.

[0099] Another embodiment is a method for treating inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[00100] Another embodiment is a method for treating inflammatory, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases which are at least partially mediated by CCR-2, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[00101] Another embodiment is a method for modulation of CCR2 activity comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[00102] Another embodiment is a method for modulation of MIP-1β and RANTES activity that is mediated by the CCR5 receptor comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the Examples.

[00103] Another embodiment is a compound of Examples in the preparation of a medicament for the treatment of diabetes, obesity, metabolic syndrome, stroke, neuropathic pain, ischemic cardiomyopathy, psoriasis, hypertension, scheroderma, 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.

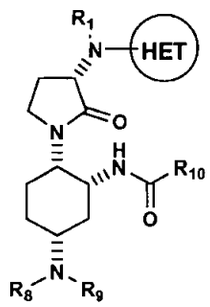
[00104] Another embodiment is a compound of the Examples for use in therapy.

[00105] The invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential attributes thereof. This invention also encompasses all combinations of alternative aspects and embodiments of the invention noted herein.

It is understood that any and all embodiments may be taken in conjunction with any other embodiment to describe additional embodiments of the present invention. Furthermore, any elements of an embodiment (including preferred aspects) are meant to be combined with any and all other elements from any of the embodiments to describe additional embodiments.

PROCESS EMBODIMENTS

[00106] The present disclosure also provides a novel process for making compounds of formula I:



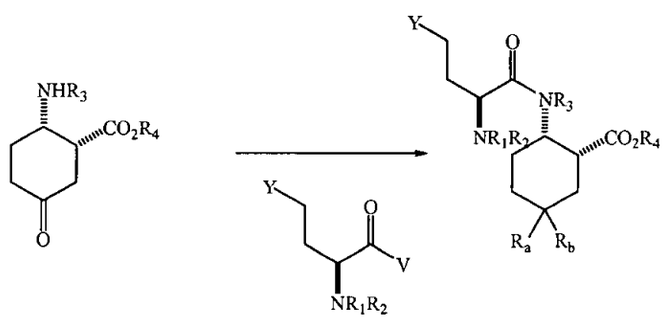
,

including N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[00107] In a 1st embodiment, the present disclosure provides a novel process for preparing a compound of formula IV,

the process comprising:

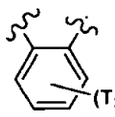
coupling an amino acid derivative of structure III, or a salt thereof, with a cyclohexanone of formula II, or a salt thereof (see preparation in WO2005021500), to afford a compound of structure IV, or a salt thereof having a substituted amide side chain



II III IV

wherein:

R_a and R_b are independently C_{1-6}alkoxy;

or R_a and R_b together with the carbon to which they are both attached combine to form a carbonyl, a thiocarbonyl, a cyclic acetal or cyclic thioacetal, wherein the cyclic acetal or cyclic thioacetal is selected from -O-Z-O- and –S-Z-S-, Z is – $(CT_1T_2)_2$, $-(CT_1T_2)_3$, or  , and T_1, T_2 and T_3 at each occurrence is independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably T_1, T_2 and T_3 are each hydrogen);

R_1, R_2 and R_3 are independently hydrogen or an amine-protecting group;

R_4 is lower C_{1-6}alkyl or optionally substituted benzyl;

Y is halogen, SMe, $S(Me)^+R_{12}$, or OSO_2R_{13};

V is OH, halogen or OSO_2R_{13};

R_{12} is hydrogen, C_{1-6}alkyl, $-(CH_2)C(O)O\ C_{1-6}$alkyl, or $-(CH_2)C(O)O\ C_{1-6}$alkyl; and

R_{13} at each occurrence is C_{1-6}alkyl.

[00108] Preferred amine-protecting groups are groups that can be removed by hydrolysis or hydrogenolysis under standard conditions. Such groups include without limitation, a carbobenzyloxy (Cbz) group, a tert-butyloxycarbonyl (BOC), a fluorenylmethyloxycarbonyl (FMOC) group, a benzyl (Bn) group or a p-methoxybenzyl (PMB) group. More preferred are Cbz, BOC, or Bn groups (especially Cbz and Bn).

[00109] In a 2nd embodiment, the present disclosure provides a novel process wherein:

R_a and R_b together with the carbon atoms to which they are both attached combine to form a carbonyl or a 1, 3-dioxolane group (especially a 1,3-dioxolane group);

R_1 is hydrogen;

R_2 is Cbz;

R_3 is hydrogen;

R_4 is C_{1-6}alkyl;

Y is S(Me); and

V is OH.

[00110] In a 3rd embodiment, where Y is -SMe, the disclosure provides a process further comprising alkylating the compound of formula IV with a group $R_{12}X$, where X is a halogen, to form a sulfonium salt thereof. The alkylating agent is preferably methyl iodide.

[00111] In a 4th embodiment, the disclosure provides a process wherein cyclohexanone of formula IV is a toluenesulfonate salt.

[00112] In a 5th embodiment, the disclosure provides a process wherein the compound of formula IV is a sulfonium salt.

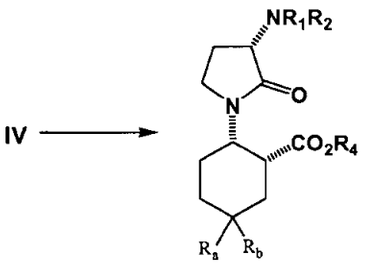
[00113] In a 6th embodiment, the disclosure provides a process wherein the coupling is conducted under an inert atmosphere, such as nitrogen or argon (preferably nitrogen) in an aprotic solvent such as proprionitrile, isopropyl acetate, n-butyl acetate, tert-butyl acetate or acetonitrile (especially acetonitrile and/or ethyl acetate).

[00114] In a 7th embodiment, the disclosure provides a process wherein the coupling can be achieved by the contacting a compound of formula II with a diimide coupling reagent in the presence of an activator, and a tertiary amine base. The diimide coupling reagent includes regeants, for example such as EDAC. Examples of activators includes HOBt ((said term includes hydrates thereof) and N',N'-4-dimethylamino-pyridine. A tertiary amine base, includes for example, triethylamine, N-N-disopropyl-N-ethyl amine and tri-n-propylamine.

[00115] In a 8th embodiment, the disclosure provides a process wherein the diimide coupling reagent is EDAC, the activator, is HOBt, (said term includes hydrates thereof) and the tertiary amine base is triethylamine.

[00116] In a 9th embodiment, disclosure provides a process wherein the mole ratios of a compound of formula II to the diimide coupling reagent to the activator to the tertiary amine about one to about 0.090 – 1.50 to about 0.95-1.50 to about 2.00 to 3.00, respectively. Said mole ratios are preferably one to about 0.095 – 1.05 to about 0.95-1.10 and to about 2.10 to 2.20, respectively.

[00117] In a 10th embodiment, the disclosure provides a novel process for preparing a compound of formula V having an ester moiety:



V

the process, comprising:

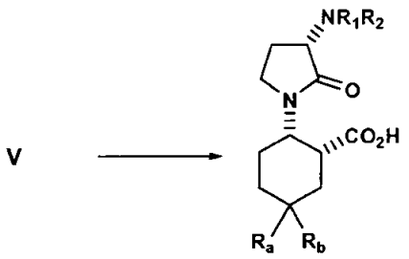
cyclizing the amino acid derivative side chain of a compound of formula IV, or a salt thereof, to afford a compound of formula V having an ester moiety.

[00118] In an 11th embodiment where R_a and R_b are independently $C_{1\text{-}6}$alkoxy, or R_a and R_b together with the carbon to which they are both attached combine to form a a thiocarbonyl, a cyclic acetal or cyclic thioacetal, the disclosure provides a process which optionally further comprises the step of hydrolyzying the R_a and R_b groups so that the combination of the R_a and R_b together with the carbon to which they are both attached form a carbonyl. Hydrolyzing can be conducted in a solvent such as acetone, butanone, acetonitrile and isopropanol, or aqueous solutions thereof, and is preferably conducted in aqueous acetone. Preferably, the hydrolysis step follows the cylization step.

[00119] In a 12th embodiment, the disclosure provides a process wherein the cyclization is conducted by combining a compound of formula IV, or a salt thereof, with a base in the presence of a solvent. Such bases may be, for example without limitation, cesium carbonate, cesium bicarbonate, potassium carbonate, sodium tert-butylate, sodium hexamethyldisilazide, and preferably cesium carbonate.

[00120] In a 13th embodiment, the disclosure provides a process wherein the cyclization is conducted under an inert atmosphere, such as nitrogen or argon (preferably nitrogen) in a solvent including, for example without limit, DMSO, DMF, DMA, N-methylpyrrolidone, sulfolane (especially DMSO and/or DMF).

[00121] In a 14th embodiment, the disclosure provides process for preparing a compound of formula VI:

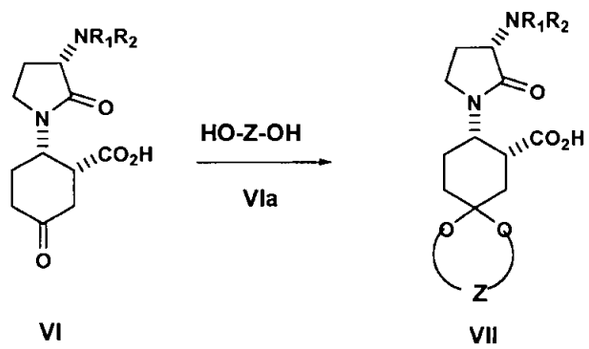


VI

the process comprising:

hydrolyzing the ester moiety of the compound of formula V with a hydrolyzing agent to form the acid of compound VI at temperatures from about -5 to about 5 °C. Ester hydrolyzing agents are well know to those of skill in the art and include alkali metal hydroxides, MOH, where M is Li, Na or K, preferably the hydrolyzing agent is aqueous NaOH. Preferably the hydrolyzing step is performed under biphasic conditions with an organic solvent that is partially miscible in water. Preferred organic solvents are acylic or cyclic ethers including THF, 2-methyl THF, 1,2-dimethoxyetahen, 1,4-dioxane, especially THF.

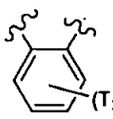
[00122] Alternatively, in a 15th embodiment, where R_a and R_b together with the atom to which they are both attached combine to form a carbonyl, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula VII:



VI VII ;

the process comprising:

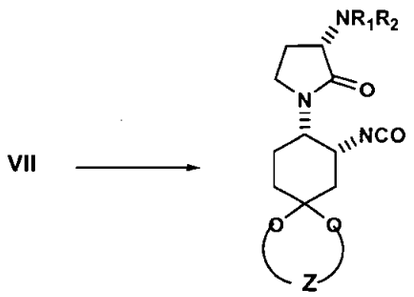
reacting a compound of formula VIa, HO-Z-OH, with a compound of formula IV (optionally *in situ*) in the presence of an acid catalyst to give a compound of formula VII,

wherein Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or  ; and

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence is independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably T_1, T_2 and T_3 are each hydrogen).

Preferably the compound of formula VIa is ethylene glycol and the acid catalyst is p-toluenesulfonic acid, or a hydrate thereof.

[00123] In a 16th embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula VIII:



VIII

the process comprising:

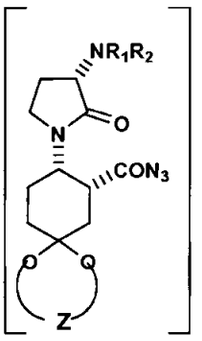
transforming the ketal of formula VII to an intermediate isocyanate of formula VIII. The transformation is preferably conducted via a Curtius rearrangement.

[00124] In a 17th embodiment, the disclosure provides a process wherein the transforming step is conducted via a Curtius rearrangement comprising the steps of :

a) mixing a substantially anhydrous solution of formula VII with a base (the base is for example, without limitation, an alkylamine, especially a tertiary amine, preferably triethylamine);

b) adding a haloformate (for example, a chloroformate, preferably i-BuO_2CCl) to the solution at a temperature of from about -10 °C to about 0 °C to form a mixed anhydride of the acid of formula VII;

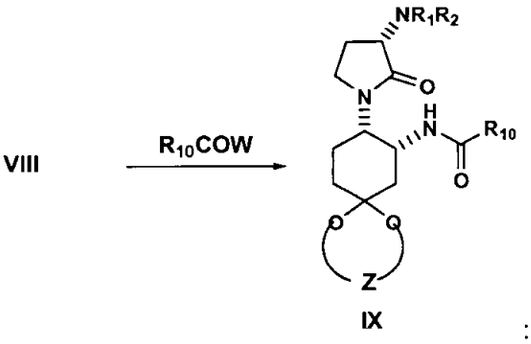
c) treating the mixed anhydride with an azide reagent (preferably NaN_3) in the presence of a phase transfer catalyst (preferably a tetralkylammonium salt such as tetrabutylammonium bromide at about 5 mol%) at a temperature of about -10 °C to about 0 °C to form the acid azide of formula VIIa:



VIIa ; and

d) heating a substantially anhydrous solution of the acyl azide of formula VIIa to form the corresponding isocyanate of formula VIII. Preferably the substantially anhydrous solution of acyl azide is dried over molecular sieves.

[00125] In a 18th embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula IX having a ketal moiety:



IX ;

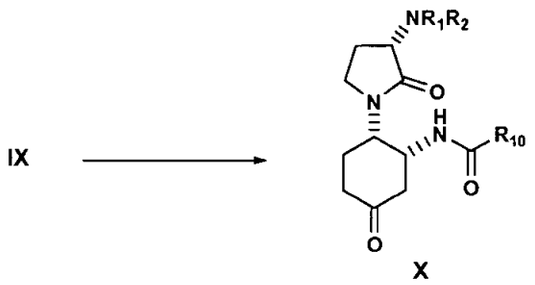
the process comprising:

contacting the isocyanate of formula VIII (optionally *in situ*) with a compound of formula $R_{10}COW$ (e.g. acetic acid) in the presence of a corresponding acid anhydride (i.e. $(R_{10}CO)_2O$) to to form the amide of formula IX wherein:

R_{10} is $C_{1\text{-}6}$alkyl (R_{10} is preferably methyl): and

W is OH or $OC_{1\text{-}6}$alkyl.

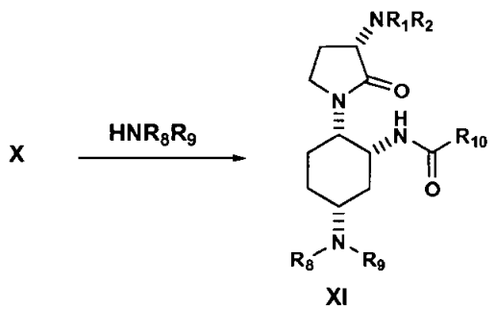
[00126] In a 19th embodiment the disclosure provides a process for preparing a compound of formula X:



the process comprising:

hydrolyzing the ketal moiety of the amide of formula IX to form a compound of formula X. Ketal hydrolyzing conditions and reagents are well known to those of skill in the art. Preferably hydrolysis is conducted by heating a solution of compound IX having a ketal moiety in an organic solvent (for example acetone) and hydrochloric acid (about 1 N) at about 45 °C to about 55 °C for about 2-4 hours.

[00127] In a 20th embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula XI:

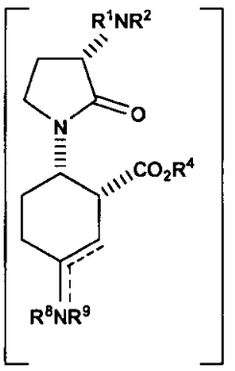


the process comprising:

reductively aminating the compound of formula X with an amine of formula HNR_8R_9 in the presence of a Lewis Acid followed by a reducing agent to form a compound of formula XI having a pyrollidonyl amine moiety.

[00128] In a 21st embodiment, the disclosure provides a process wherein reductively aminating comprises the steps of:

a) adding a Lewis Acid (preferably a titanium reagent including, without limit,$TiCl_2$(O-*iso*-propyl)$_2$) to a solution of compound X and the amine having the formula HNR_8R_9 in an aprotic solvent to form an imine-enamine of formula XA:



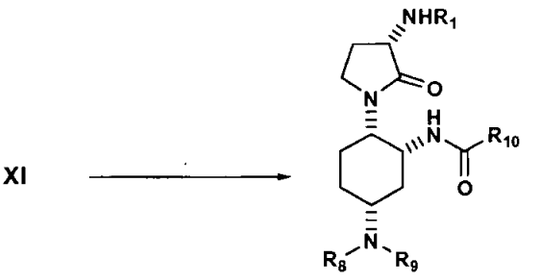
Xa ; and

b) treating the imine-enamine of formula Xa with a reducing agent (preferably borane dimethyl sulfide) to afford the compound of formula XI having a pyrollindonyl amine moiety.

In the foregoing steps, the aprotic solvent can be for example, without limitation, dichloromethane, acetonitrile, DMSO, DMF, and N-methyl-pyrrolidinone (preferably dichloromethane).

[00129] In a 22nd embodiment, the disclosure provides a process wherein the amine of formula $HN(R_8)(R_9)$ is preferably *tert*-butyl amine.

[00130] In a 23rd embodiment, the disclosure provides process for preparing a compound of formula XII:



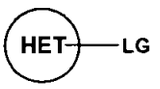
XII

the process comprising:

deprotecting the pyrollidonyl amine of formula XI to form a compound of formula XII.

[00131] In a 24th embodiment, the disclosure provides a process wherein the deprotecting step is carried out by hydrogenating a solution of the compound of formula XII in the presence of a catalyst such as palladium. Preferably the

hydrogenation is carried out at about 20 to about 40 psig in a solvent, including, without limitation, methanol, over 5% Pd/C catalyst at about 25 °C for about two to about six hours.

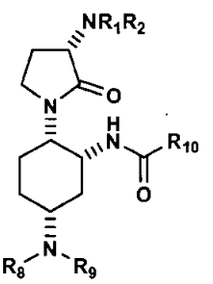
[00132] In a 25th embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula I comprising coupling the compound of formula XII with a compound of formula  to afford a compound of formula I wherein:

HET is a 3-14 membered heteroaryl ring having one to four heteroatoms selected from N, O or S (preferably one to three heteroatoms, especially one to two nitrogen atoms) in at least one of the rings (HET is preferably a 6-substituted quinazolin-4-yl , more preferably 6-trifluoromethyl-quinazolin-4-yl); and

LG is a leaving group selected from halogen or OSO_2R_{16}, wherein R_{16} is phenyl, a 5- to 7-membered heteroaryl having one or more atoms selected from N, S, or O, $C_{1\text{-}6}$alkyl, or a 3- to 7-membered cycloalkyl, all of which are optionally substituted by one to three groups selected from halogen, CF_3 and $C_{1\text{-}6}$alkyl (preferably LG is a halogen, especially chlorine).

[00133] A leaving group as used herein includes, without limitation, groups such as halogens, mesylate, nonaflates, sulfonates, tosylates and triflates. A preferred leaving group is halogen or OSO_2R_{16}, wherein R_{16} is phenyl, a 5- to 7-membered heteroaryl having one or more atoms selected from N, S or O, $C_{1\text{-}6}$alkyl, or a 3- to 7-membered cycloalkyl, all of which are optionally substituted by one to three groups selected from halogen, CF_3, and $C_{1\text{-}6}$alkyl. In the most preferred embodiment LG is a halogen, especially chlorine.

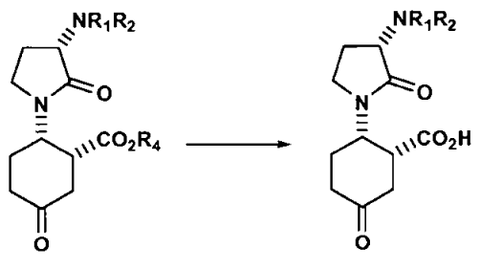
[00134] In a 26th embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula X:



XI

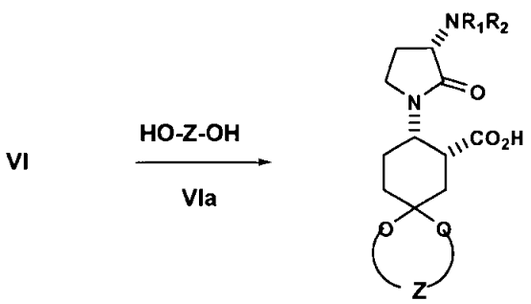
comprising the steps of:

hydrolyzing the ester moiety of the compound of formula V with a hydrolyzing agent to form the acid of compound VI at temperatures from about -5 to about 5 °C:



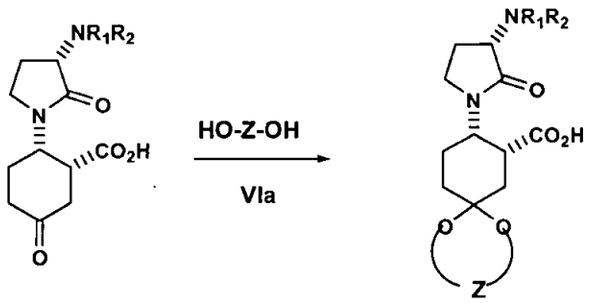
V VI ;

reacting a compound of formula VIa, HO-Z-OH, with a compound of formula IV (optionally *in situ*) in the presence of an acid catalyst to give a compound of formula VII having a carboxylic acid moiety:



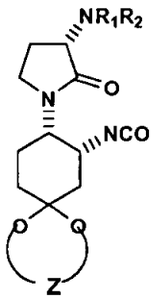
VII ;

reacting a compound of formula VIa, HO-Z-OH (preferably alkylene glycol, especially ethylene glycol), with a compound of formula IV (optionally *in situ*) in the presence of an acid catalyst (preferably p-toluenesulfonic acid, or a hydrate thereof) to give a compound of formula VII having a carboxylic acid moiety:



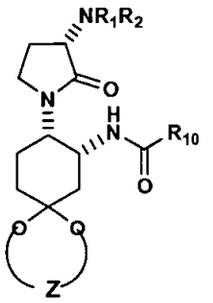
VI VII ;

transforming the carboxylic acid moiety of the ketal of formula VII to a corresponding intermediate isocyanate of formula VIII:



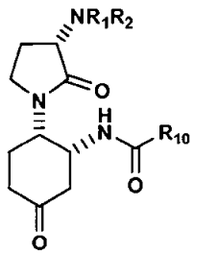
VIII;

contacting the isocyanate of formula VIII (optionally *in situ)*, with a compound of formula $R_{10}COW$ (e.g. acetic acid) in the presence of a corresponding acid anhydride (i.e. $(R_{10}CO)_2O$) to to form the amide of formula IX having a ketal moiety:



IX; and

hydrolyzing the ketal moiety of the amide of formula IX to form the compound of formula X:



X;

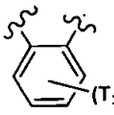
wherein:

R_1, and R_2 are independently hydrogen or an amine-protecting group;

R_4 and R_{10} are independently C_{1-6}alkyl or optionally substituted benzyl;

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

W is OH or OC_{1-6}alkyl;

Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or  ; and

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence are independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl.

[00135] In a 27th embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula XI wherein:

the compound of formula VII is (7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid, or a salt thereof;

the compound of formula VIIa is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-(azidocarbonyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

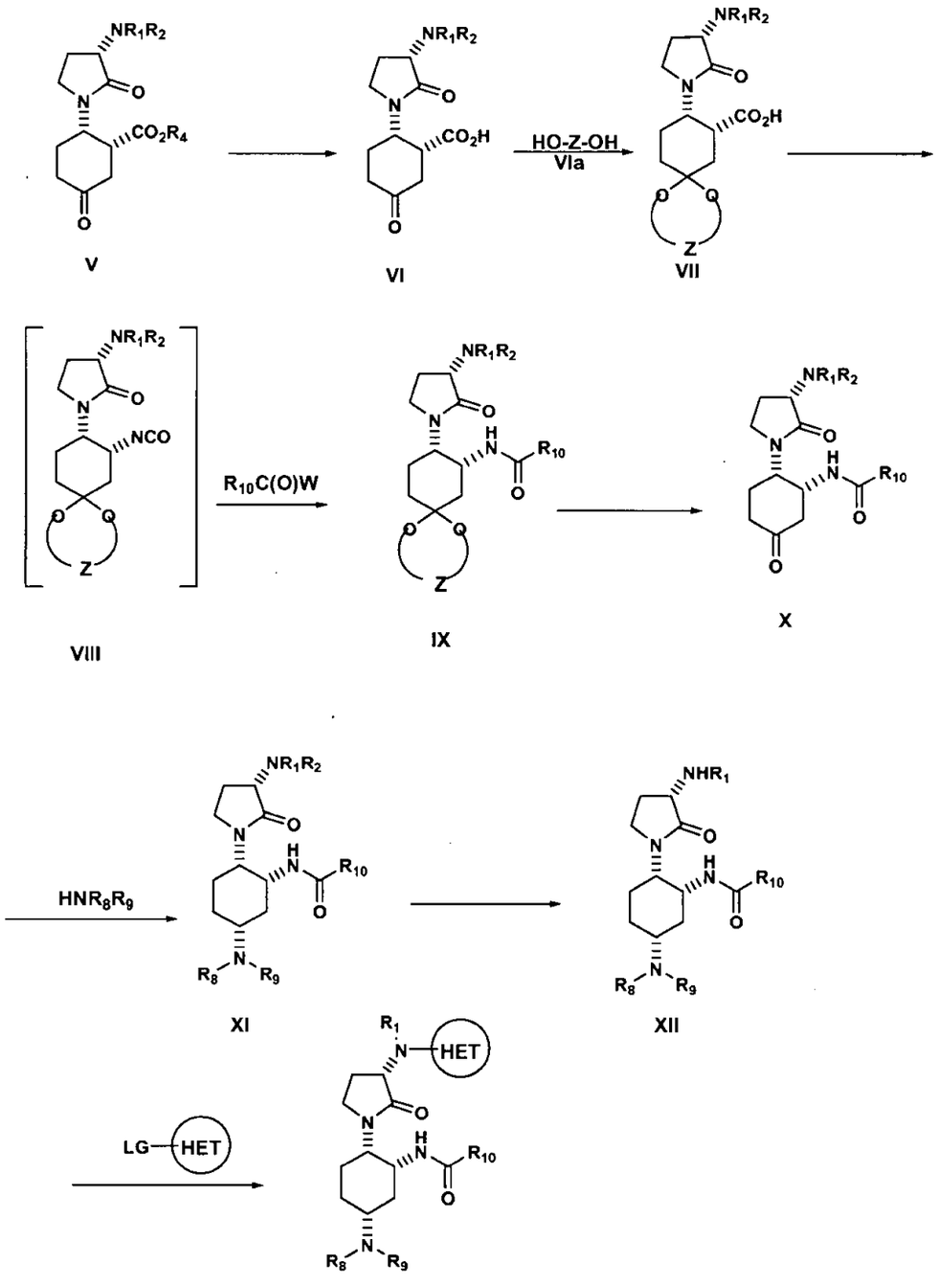
the compound of formula VIII is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-isocyanato-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

the compound of formula IX is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

the compound of formula X is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof; and

the compound of formula XI is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

[00136] In a 28th embodiment, the disclosure provides a process for preparing a compound of formula I:



the process comprising:

hydrolyzing the ester moiety of the compound of formula V with a hydrolyzing agent (preferably an alkali hydroxide, especially sodium hydroxide) to form a compound of formula VI;

reacting a compound of formula Va, HO-Z-OH, with the compound of formula VI, optionally in situ, in the presence of acid catalyst (preferably p-toluenesulfonic acid, or a hydrate thereof) to afford a compound of formula VII having a carboxylic acid moiety;

transforming the carboxylic acid moiety of the ketal of formula VII to form a corresponding intermediate isocyanate of formula VIII;

contacting the isocyanate of formula VIII, optionally *in situ*, with a compound of formula $R_{10}COW$ (preferably acetic acid) in the presence of a corresponding acid anhydride, $(R_{10}CO)_2O$ (preferably acetic anhydride), to form the amide of formula IX having a ketal moiety;

hydrolyzing the ketal moiety of the amide of formula IX to form the compound of formula X; and

reductively aminating the compound of formula X with an amine of formula HNR_8R_9 (preferably *tert*-butyl amine) in the presence of a Lewis acid (preferably a titanium reagent such as $TiCl_2$(O-iso-propyl)$_2$) to form a compound of formula XI having a pyrollidonyl amine moiety;

deprotecting the pyrollidinyl amine of formula XI to form a compound of formula XII; and

coupling the compound of formula XII with a compound of formula



to afford a compound of formula I;

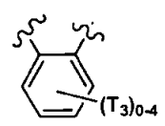
wherein:

R_1, and R_2 are independently hydrogen or an amine-protecting group;

R_4 and R_{10} are independently C_{1-6}alkyl or optionally substituted benzyl;

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

W is OH or OC_{1-6}alkyl;

Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or 

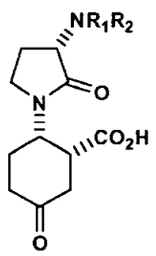
;

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence is independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably Z is $-(CH_2)_2-$);

HET is a 3-14 membered heteroaryl ring having one to four heteroatoms selected from N, O or S (preferably one to three heteroatoms, especially one to two nitrogen atoms) in at least one of the rings (HET is preferably a 6-substituted quinazolin-4-yl , more preferably 6-trifluoromethyl-quinazolin-4-yl); and

LG is a leaving group selected from halogen or OSO_2R_{16}, wherein R_{16} is phenyl, a 5- to 7-membered heteroaryl having one or more atoms selected from N, S, or O, C_{1-6}alkyl, or a 3- to 7-membered cycloalkyl, all of which are optionally substituted by one to three groups selected from halogen, CF_3 and C_{1-6}alkyl (preferably LG is a halogen, especially chlorine).

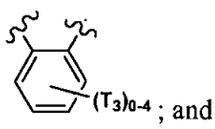
[00137] In a 29th embodiment, the disclosure provides a compound of formula VI, or a salt thereof:



VI

wherein:

R_1 and R_2 are independently selected from hydrogen and an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, and benzyl (preferably R_1 is hydrogen and R_2 is Cbz);

Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or 

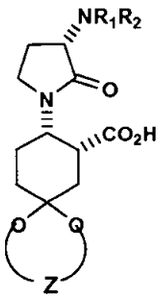
; and

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence are independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably Z is $-(CH_2)_2-$).

A preferred compound of formula VI is (1R,2S)-2-((S)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-oxocyclohexanecarboxylic acid or a salt thereof.

[00138] In a 30th embodiment, the disclosure provides a compound of formula VI that is (1R,2S)-2-((S)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-oxocyclohexanecarboxylic acid or a salt thereof.

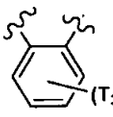
[00139] In a 31st embodiment, the disclosure provide a novel compound of formula VII, or a salt thereof:



VII

wherein:

R_1 and R_2 are independently selected from hydrogen and an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, and benzyl (preferably R_1 is hydrogen and R_2 is Cbz);

Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or 

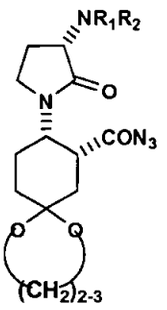
; and

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence are independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably Z is $-(CH_2)_2-$).

A preferred compound of formula VII is (7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid.

[00140] In a 32nd embodiment, the disclosure provides a compound of formula VII that is (7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid, or a salt thereof.

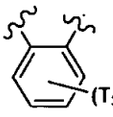
[00141] In a 33rd embodiment, the disclosure provides novel compounds of formula VIIa, or a salt thereof:



VIIa

wherein:

R_1 and R_2 are independently selected from hydrogen and an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, and benzyl (preferably R_1 is hydrogen and R_2 is Cbz);

Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or 

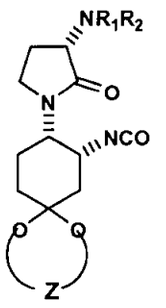
; and

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence are independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably Z is $-(CH_2)_2-$).

A preferred compound of formula VIIa is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-(azidocarbonyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate.

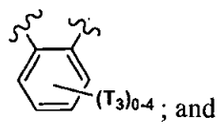
[00142] In a 34th embodiment, the disclosure provides a compound of formula VIIa that is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-(azidocarbonyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

[00143] In a 35th embodiment, the disclosure provides a compound of formula VIII, or a salt thereof:



wherein:

R_1 and R_2 are independently selected from hydrogen and an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, or benzyl (preferably R_1 is hydrogen and R_2 is Cbz);

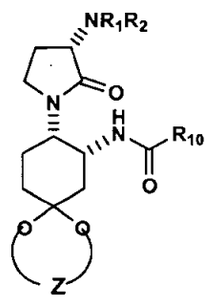
Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or  ; and

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence are independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably Z is $-(CH_2)_2-$).

A preferred compound of formula VIII is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-isocyanato-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate.

[00144] In a 36th embodiment, the disclosure provides a compound of formula VIII that is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-isocyanato-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

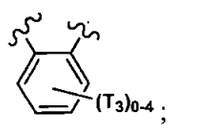
[00145] In a 37th embodiment, the disclosure provides a compound of formula IX, or a salt thereof:



IX

wherein:

R_1 and R_2 are independently selected from hydrogen and an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, or benzyl (preferably R_1 is hydrogen and R_2 is Cbz);

Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or  ;

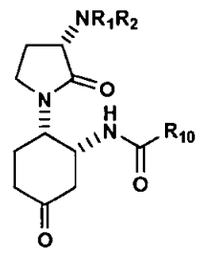
T_1, T_2 and T_3 at each occurrence are independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl (preferably Z is $-(CH_2)_2-$); and

R_{10} is C_{1-6}alkyl (preferably methyl).

A preferred compound of formula IX is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate.

[00146] In a 38th embodiment, the disclosure provides a compound of formula IX that is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

[00147] In a 39th embodiment, the disclosure provides a compound of formula X, or a salt thereof:



X

wherein:

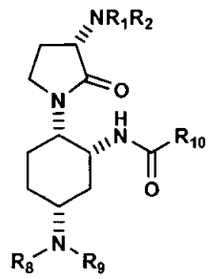
R_1 and R_2 are independently hydrogen or an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, and benzyl; and

R_{10} is $C_{1\text{-}6}$alkyl.

Preferably R_1 is hydrogen, R_2 is Cbz and R_{10} is methyl. A preferred compound of formula X is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate.

[00148] In a 40th embodiment, the disclosure provides a compound of formula X that is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

[00149] In a 40th embodiment, the disclosure provides a compound of formula XI, or a salt thereof:



XI

wherein:

R_1 and R_2 are independently hydrogen or an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, and benzyl;

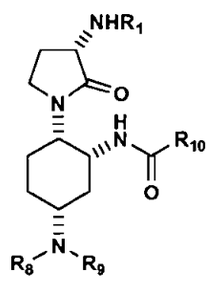
R_8 and R_9 are independently hydrogen or C_{1-6}alkyl; and

R_{10} is C_{1-6}alkyl.

Preferably R_1 is hydrogen, R_2 is Cbz, R_8 is hydrogen, R_9 is *tert*-butyl, and R_{10} is methyl. A preferred compound of formula XI is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate.

[00150] In a 41st embodiment, the disclosure provides a compound of formula XI that is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

[00151] In a 42nd embodiment, the disclosure provides a compound of formula XII, or a salt thereof:



XII

wherein:

R_1 is hydrogen or an amine-protecting group selected from BOC, Cbz, and benzyl;

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

R_{10} is C_{1-6}alkyl.

Preferably R_1 is hydrogen, R_8 is hydrogen, R_9 is tert-butyl, and R_{10} is methyl. A preferred compound of formula XII is *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-2-((3*S*)-3-amino-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)acetamide.

[00152] In a 43rd embodiment, the disclosure provides a compound of formula XII that is *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-2-((3*S*)-3-amino-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)acetamide, or a salt thereof.

[00153] In a 44th embodiment, the disclosure provides a compound selected from:

(7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-(azidocarbonyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-isocyanato-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof; and

benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

[00154] In a 45th embodiment, the disclosure provides a process wherein:

a compound of formula VII is (7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid, or a salt thereof;

a compound of formula VIIa is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-(azidocarbonyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

a compound of formula VIII is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-isocyanato-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

a compound of formula IX is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

the compound of formula X is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof; and

a compound of formula XI is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

[00155] In a 46th embodiment, the disclosure provides a process wherein a compound of formula I is N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide or a salt thereof.

[00156] 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 (including preferred 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.

DEFINITIONS

[00157] 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.

[00158] 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, "C_{1-6}alkyl" refers to straight and branched chain alkyl groups with one to six carbon atoms, such as 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(C_{0-2})alkyl or (C_{0-2})hydroxyalkyl includes hydroxy, hydroxymethyl and hydroxyethyl. Alkyl groups may be substituted with one to three groups selected from (C_{1-6})alkyl, (C_{2-6})alkenyl, hydroxy, halogen, cyano, nitro, CF_3, O(C_{1-6}alkyl), OCF_3, C(=O)H, C(=O)(C_{1-6}alkyl),

CO_2H, $CO_2(C_{1-6}alkyl)$, $NHCO_2(C_{1-6}alkyl)$, $-S(C_{1-6}alkyl)$, NH_2, $NH(C_{1-6}alkyl)$, $N(C_{1-6}alkyl)_2$, $N(CH_3)_3^+$, $SO_2(C_{1-6}alkyl)$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH_2$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH(alkyl)$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)N(C_{1-4}alkyl)_2$, C_{3-7}cycloalkyl, phenyl, benzyl, phenylethyl, phenyloxy, benzyloxy, napthyl, a four- to seven-membered heterocylo, and/ or a five- to six- membered heteroaryl. When a substituted alkyl is substituted with an aryl, heterocyclo, cycloalkyl, or heteroaryl group, said ringed systems are as defined below and thus may have zero, one, two, or three substituents, also as defined below.

[00159] 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 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 $aryl(C_{0-4})alkyl$ includes a substituted lower alkyl having at least one aryl substituent and also includes an aryl directly bonded to another group, *i.e.*, $aryl(C_0)alkyl$.

[00160] 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.

[00161] 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.

[00162] 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.*, $\{-CH_2-\}_n$, wherein *n* is 1 to 12, preferably 1-8. 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.

[00163] The term "alkoxy" refers to an oxygen atom substituted by alkyl, as defined herein. For example, the term "alkoxy" or includes the group $-O-C_{1-6}alkyl$.

[00164] 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.

[00165] 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.

[00166] The term "carbonyl" refers to a bivalent carbonyl group –C(=O)–.

[00167] 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.

[00168] 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 zero, one, two, or three substituents selected from (C_{1-4})alkyl, (C_{2-4})alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, $O(C_{1-4}alkyl)$, OCF_3, $C(=O)H$, $C(=O)(C_{1-4}alkyl)$, CO_2H, $CO_2(C_{1-4}alkyl)$, $NHCO_2(C_{1-4}alkyl)$, $S(C_{1-4}alkyl)$, NH_2, $NH(C_{1-4}alkyl)$, $N(C_{1-4}alkyl)_2$, $N(C_{1-4}alkyl)_3^+$, $SO_2(C_{1-4}alkyl)$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH_2$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH(alkyl)$, and/or $C(=O)(C_{1-4}alkylene)N(C_{1-4}alkyl)_2$. 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.

[00169] The term "halo" or "halogen" refers to chloro, bromo, fluoro and iodo.

[00170] The term "haloalkyl" means a substituted alkyl having one or more halo substituents. For example, "haloalkyl" includes mono, bi, and trifluoromethyl.

[00171] The term "haloalkoxy" means an alkoxy group having one or more halo substituents. For example, "haloalkoxy" includes OCF_3.

[00172] The term "heteroatoms" shall include oxygen, sulfur and nitrogen.

[00173] The term "aryl" refers to phenyl, biphenyl, fluorenyl, 1-naphthyl and 2-naphthyl. The term "aryl" includes such rings having zero, one, two or three substituents selected from (C_{1-4})alkyl, (C_{2-4})alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, $O(C_{1-4}alkyl)$, OCF_3, $C(=O)H$, $C(=O)(C_{1-4}alkyl)$, CO_2H, $CO_2(C_{1-4}alkyl)$,

$NHCO_2(C_{1-4}alkyl)$, $S(C_{1-4}alkyl)$, NH_2, $NH(C_{1-4}alkyl)$, $N(C_{1-4}alkyl)_2$, $N(C_{1-4}alkyl)_3^+$, $SO_2(C_{1-4}alkyl)$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH_2$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH(alkyl)$, and/or $C(=O)(C_{1-4}alkylene)N(C_{1-4}alkyl)_2$.

[00174] 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 one to four 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 one to four 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 zero, one, two or three substituents selected from $(C_{1-4})alkyl$, $(C_{2-4})alkenyl$, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, $O(C_{1-4}alkyl)$, OCF_3, $C(=O)H$, $C(=O)(C_{1-4}alkyl)$, CO_2H, $CO_2(C_{1-4}alkyl)$, $NHCO_2(C_{1-4}alkyl)$, $S(C_{1-4}alkyl)$, NH_2, $NH(C_{1-4}alkyl)$, $N(C_{1-4}alkyl)_2$, $N(C_{1-4}alkyl)_3^+$, $SO_2(C_{1-4}alkyl)$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH_2$, $C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH(alkyl)$, and/or $C(=O)(C_{1-4}alkylene)N(C_{1-4}alkyl)_2$. Exemplary heterocyclic groups include azetidinyl, pyrrolidinyl, oxetanyl, imidazolinyl, oxazolidinyl, isoxazolinyl, thiazolidinyl, isothiazolidinyl, tetrahydrofuranyl, piperidyl, piperazinyl, 2-oxopiperazinyl, 2-oxopiperidyl, 2-oxopyrrolodinyl, 2-oxoazepinyl, azepinyl, 4-piperidonyl, tetrahydropyranyl, morpholinyl, thiamorpholinyl, thiamorpholinyl sulfoxide, thiamorpholinyl sulfone, 1,3-dioxolane, quinuclidinyl. and tetrahydro-1,1-dioxothienyl and the like.

[00175] The term "heteroaryl" refers to substituted and unsubstituted aromatic 3- to 14-membered rings having one to four 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 one to four 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 zero, one, two or three substituents selected from (C_{1-4})alkyl, (C_{2-4})alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, O(C_{1-4}alkyl), OCF_3, C(=O)H, C(=O)(C_{1-4}alkyl), CO_2H, CO_2(C_{1-4}alkyl), $NHCO_2$(C_{1-4}alkyl), S(C_{1-4}alkyl), NH_2, NH(C_{1-4}alkyl), N(C_{1-4}alkyl)$_2$, N(C_{1-4}alkyl)$_3^+$, SO_2(C_{1-4}alkyl), C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH_2, C(=O)(C_{1-4}alkylene)NH(alkyl), and/or C(=O)(C_{1-4}alkylene)N(C_{1-4}alkyl)$_2$.

[00176] 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, indolizinyl, benzofuranyl, chromonyl, coumarinyl, benzopyranyl, cinnolinyl, quinoxalinyl, 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.

[00177] Where a group is referred to as "optionally substituted", the term is defined herein to include both a substituted and unsubstituted group.

[00178] 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.

[00179] 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 Steven D. Young, et al, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **1995**, 2602-2605.

[00180] 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.

[00181] 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, 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, pamoic, maleic, hydroxymaleic, phenylacetic, glutamic, benzoic, salicylic, sulfanilic, 2-acetoxybenzoic, fumaric, toluenesulfonic, methanesulfonic, ethane disulfonic, oxalic, isethionic, and the like.

[00182] 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, 1985, p. 1418, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

[00183] 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 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.

[00184] "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.

[00185] "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 MCP-1 or effective to treat or prevent disorders.

[00186] 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 it development; and/or (c) relieving the disease-state, i.e., causing regression of the disease state.

[00187] The names used herein to characterize a specific form, e.g., "N-2", 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.

[00188] The present invention provides, at least in part, crystalline forms of the free base of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-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 crystalline forms of the free base are disclosed in Example 2 as the E-1, HAC-1, IPA-1, N-2, RPG-3, H0.5-4, and H1.75-5 Forms.

[00189] 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.

[00190] 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.

[00191] 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.

[00192] 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 the compound, 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)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide 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)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide and/or reaction impurities and/or processing impurities.

[00193] 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).

[00194] 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.

[00195] 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.

[00196] The forms may be characterized and distinguished using single crystal X-ray diffraction, which is based on unit cell and intensity measurements of a single crystal of a form at a fixed analytical temperature. A detailed description of unit cell and intensity analysis is provided in Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968), Chapter 3, which is herein incorporated by reference. Alternatively, the unique arrangement of atoms in spatial relation within the crystalline lattice may be characterized according to the observed fractional atomic coordinates. See Stout & Jensen reference for experimental determination of fractional coordinates for structural analysis.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 at the same analytical temperature, and measurements for the subject form characterized as a series of 2θ values and intensities.

[00197] The term "negligible weight loss," as employed herein, as characterized by TGA indicates the presence of a neat (non-solvated) crystal form.

[00198] The term "negligible % water uptake," as employed herein, as characterized by moisture-sorption isotherm indicates that the form tested is non-hygroscopic.

[00199] In one embodiment of the invention, a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide 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.

[00200] 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.

[00201] In another embodiment, a composition is provided consisting essentially of the crystalline forms of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide. The composition of this embodiment may comprise at least 90 weight % of the form, based on its weight in the composition.

[00202] The presence of reaction impurities and/or processing impurities may be determined by analytical techniques known in the art, such as, for example, chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry or infrared spectroscopy.

[00203] 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. High throughput crystallization techniques may be employed to prepare crystalline forms including polymorphs.

[00204] Crystals of drugs, including polymorphs, methods of preparation, and characterization of drug crystals are discussed in Solid-State Chemistry of Drugs,

S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, and J.G. Stowell, 2nd Edition, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

[00205] 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.

[00206] In one method to prepare crystals, N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide 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 of the free base , which may also contain an additional amount of the compound to afford a heterogeneous mixture of the compound and a solvent 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.

[00207] 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 "Programmed cooling of batch crystallizers," J.W. Mullin and J. Nyvlt, *Chemical Engineering Science* **1971**, *26*, 369-377. 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).

[00208] 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)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide 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.

[00209] 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)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide. This may be achieved, for example, by employing in the final process step a solvent or mixture of solvents from which the free base 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.

[00210] 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.

[00211] 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.

[00212] 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, X-ray powder diffraction (PXRD) and/or thermogravimetric analysis (TGA). Specifically, 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 & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968), Chapter 3, which is herein incorporated by reference. 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 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 (usually four or more).

[00213] 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

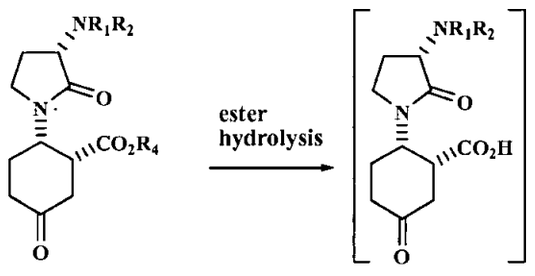
morphology. These parameters may also be used in combination to characterize the subject form.

[00214] 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 a 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° or less, preferably about 0.1° (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

Hydrolysis of ketoester V to ketoacid VI

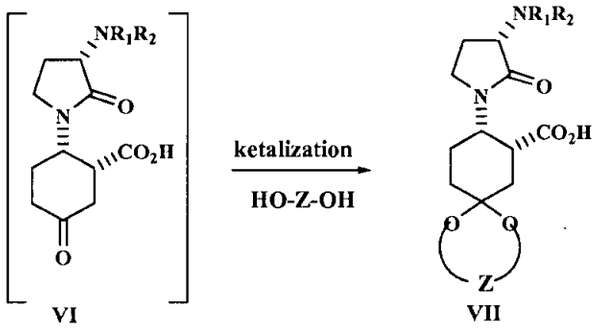


V VI

[00215] Ketoester **V** is hydrolyzed to its corresponding ketoacid **VI** by suspending **V** in an organic solvent partially miscible with water, such as acyclic or cyclic ethers including THF, 2-methyl THF, 1,2-dimethoxyethane, 1,4-dioxane, THF being preferred, and adding aqueous base such as aqueous solutions of alkali metal hydroxides MOH, where M is Li, Na or K, 1N NaOH being the preferred base, at -5°C to +5°C. The biphasic mixture is then agitated at ≤ 5 °C for at least one hour. Low temperature for the base addition and reaction is important to minimize the epimerization at the carbon adjacent to the ester group. Water-nonmiscible solvent, preferably methyl *tert*-butyl ether is then added and the layers are separated. The product is then transferred from the aqueous back to the organic solvent, preferably dichloromethane, by adjusting the pH with acid, preferably 3N HCl, and **VI** is used in solution for the next step.

Scheme 2

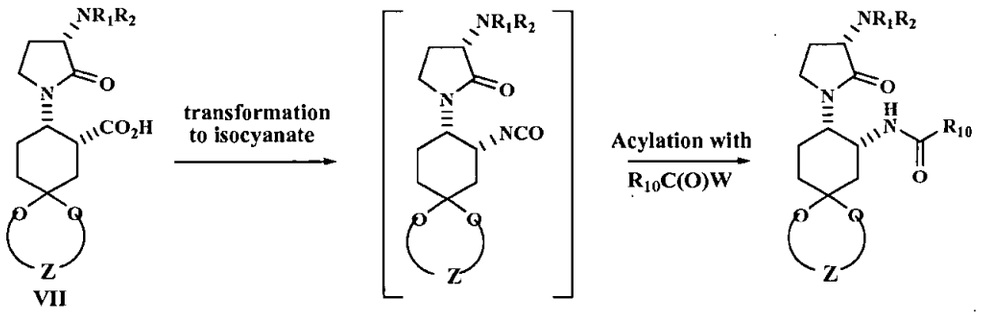
Ketalization of ketoacid VI to ketal acid VII



[00216] The solution of **VI**, preferably in dichloromethane, is exchanged via distillation into a non hygroscopic, higher boiling solvent, such as toluene, trifluorotoluene, xylenes, higher boiling esters such as n-butyl or isobutyl acetate, preferably toluene. A glycol of formula HO-Z-OH, (wherein Z is as defined *supra*) is then added, preferably ethylene glycol (1.2 eq), followed by a catalytic amount (0.5-2 M %) of an acid, preferably p-toulenesulfonic acid, and the mixture is distilled at atmospheric pressure until formation of compound **VII** is complete. The product **VII** crystallizes upon addition of ethyl acetate after cooling to approximately 70 °C. After further cooling to room temperature, **VII** is isolated by filtration and subsequent drying in about 70 % yield (for $HO(CH_2)_2OH$, R_1=H, R_2=CBz).

Scheme 3

Transformation of ketal acid VII to nonisolated ketal isocyanate VIII and then to ketal amide IX via acid activation/azidation, Curtius rearrangement and acylation

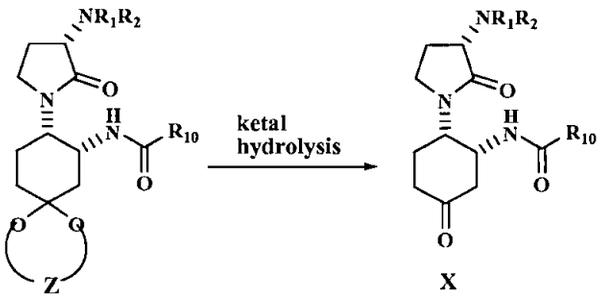


[00217] The ketoacid **VII** is first activated by transforming it to its mixed anhydride using tertiary amines, preferably triethylamine, and haloformates, preferably isobutyl chloroformate in dry solvents, such as toluene, trifluorotoluene, 1,2-dichloroethane, 1-chlorobutane, xylenes, preferably dry toluene, by addition of a haloformate to a precooled solution of **VII** and trialkylamine. The preferred temperature for mixed anhydride formation is -10°C to 0°C. After approximately 30 min, an aqueous solution of alkali metal azide, preferably ~30 wt % sodium azide and a phase transfer catalyst, such as tetralkylammonium salts, preferably tetrabutylammonium bromide (5 mol %) is added and the biphasic mixture is vigorously agitated for about 1h at -10°C to 0°C. The organic phase is then separated and the resulting acyl azide solution is dried, 4 Å molecular sieves being preferred drying agent. The Curtius rearrangement and the concomitant trapping of the isocyanate **VIII** *in situ* with a carboxylic acid to form a ketal amide **IX** is accomplished by first adding a carboxylic acid, preferably acetic acid, and its corresponding anhydride, preferably acetic anhydride, to a dry solution of the acyl azide, and then heating the mixture 80-90 °C for 1-4 hours. The use of an anhydride in conjunction with carboxylic acid is critical to minimize impurity formation. After partial removal of the solvent and carboxylic acid by distillation, the product

crystallizes upon cooling to room temperature. **IX** is isolated by filtration and drying in 65-78 % yield (for Z = $-(CH_2)_2-$, R_1=H, R_2=CBz, R_{10}=Me).

Scheme 4

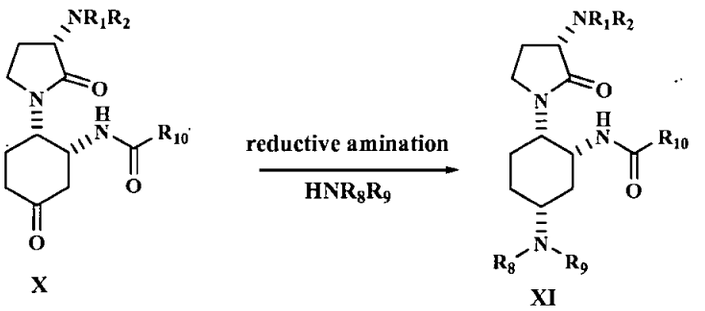
Hydrolysis of ketal amide IX to ketoamide X



[00218] The ketal hydrolysis of compound **IX** to the ketoamide **X** is accomplished by heating a solution of **IX** in organic, water miscible solvent, preferably acetone and an aqueous solution of strong acid, preferably 1N HCl, for 2-4 hrs. The preferred temperature for hydrolysis is 45-55°C. After removal of acetone, the product is extracted to dichloromethane, which is exchanged to ethyl acetate by distillation. The product **X** crystallizes from ethyl acetate upon cooling to room temperature, and is isolated by filtration and drying in 85-90 % yield (for $HO(CH_2)_2OH$, R_1=H, R_2=CBz, R_{10}=Me).

Scheme 5

Reductive amination of ketoamide X to the aminoamide XI



[00219] To a dry solution of **X**, preferably in dichloromethane, a primary or secondary amine is added, preferably *tert*-butylamine (5 eq), followed by a Lewis

acid, preferably $TiCl_2(OPr\text{-}i)_2$ (1.2 eq), at -20°C to 0°C. The resulting imine mixture is warmed to 10-20°C and borane (1.1-1.2 eq) is added as a complex with dimethyl sulfide or THF, preferably dimethyl sulfide. The reaction mixture is agitated for 4-6 h and ethyl acetate saturated with water is then added. The titanium salts are removed by filtration and the product **XI** is extracted from the organic filtrate to water as its salt with an aqueous acid, preferably 1N HCl. Dichloromethane is then added and aqueous base, preferably concentrated ammonium hydroxide is added to the agitated biphasic mixture until pH is adjusted to 8.0-8.5. The product-rich dichloromethane phase is then separated and washed twice with aq ammonium chloride solution to remove the undesired trans isomer of **XI**, and finally with water. Dichloromethane is exchanged into ethyl acetate by distillation and **XI** crystallizes from ethyl acetate upon cooling and heptane addition. **XI** is isolated by filtration and drying in 65-70 % yield (for R_1=H, R_2=CBz, R_8=H, R_9=*tert*-Bu, R_{10}=Me).

Scheme 6

Deprotection of pyrrolidonyl amine XI

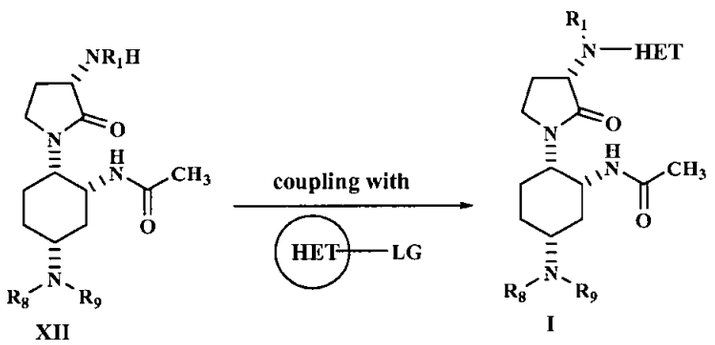


XI **XII**

[00220] Removal of the amine protecting group R_2, where R_2 is CO_2CH_2Ph or CH_2Ph, is accomplished by hydrogenating a solution of **XI** in an alcohol, preferably methanol, in the presence of Pd catalyst, preferably 5wt % Pd/C, for several hours. The catalyst is then removed by filtration, and methanol is exchanged into ethyl acetate by distillation. The product **XII**, which crystallizes from ethyl acetate upon cooling and heptane addition, is isolated by filtration and drying in 90-95 % yield (for R_1=H, R_2=CBz, R_8=H, R_9=*tert*-Bu, R_{10}=Me).

Scheme 7

Coupling of amine XII with heterocycle bearing a leaving group HET-LG



[00221] Synthesis of compound I is accomplished by coupling the pyrrolidonylamine **XII** and a heterocycle bearing a leaving group in the presence of a tertiary amine, preferably triethylamine, in a compatible solvent, such as dichloromethane, isopropanol or acetonitrile, dichloromethane being preferred. All components are therefore combined and the solution is reacted for 24-48 hrs at room temperature. A solution of previously prepared crude heterocyclic component may also be employed. After reaction completion, dichloromethane is washed with dilute acid, preferably aqueous 5 wt % acetic acid, the aqueous phase is separated and dichloromethane is then exchanged into ethyl acetate by distillation. The product **I**, which crystallizes from ethyl acetate upon cooling and heptane addition, is isolated by filtration and drying in 75-80 % yield (for R_1=H, R_8=H, R_9=*tert*-Bu, R_{10}=Me, HET=6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-yl).

[00222] For the process of this invention, starting materials are commercially available or can be readily prepared by one or 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

[00223] The following Examples illustrate embodiments of the inventive compounds and starting materials, and are not intended to limit the scope of the claims.

[00224] As appropriate, reactions were conducted under an atmosphere of dry nitrogen (or argon). For anhydrous reactions, Dri-Solv 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.

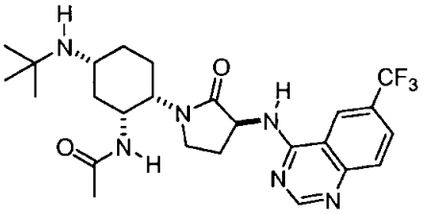
[00225] LC/MS measurements were obtained using a Shimadzu HPLC/Waters ZQ single quadropole mass spectrometer hybrid system. Data for the peak of interest are reported from positive-mode electrospray ionization. NMR (nuclear magnetic resonance) spectra were typically obtained on Bruker or JEOL 400 MHz and 500 MHz instruments in the indicated solvents. All chemical shifts are reported in ppm from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard. ^{1}H-NMR 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.

[00226] One of skill in the art will recognize the standard abbreviations utilized herein, throughout the specification. For ease of reference, the abbreviations include, but are not necessarily limited to: sat. = saturated, HPLC = high-performance liquid chromatography, AP = area percent, KF = Karl-Fischer, RT = room temperature, mmol = millimoles, HRMS = high-resolution mass spectroscopy, TBTU = O-benzotriazol-2-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate, MTBE = TBME = tert-butyl methyl ether, EDAC = N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC = N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, TEA = triethylamine, DPPA = diphenyl phosphoryl azide, IPA = isopropyl alcohol, TFA = trifluoroacetic acid, DCM = dichloromethane, THF = tetrahydrofuran, DMF = N,N-dimethylformamide, BOP = (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate, EtOAc = Ethyl acetate, DMSO = dimethylsulfoxide, °C = degrees Celsius, eq = equivalent or equivalents, g = gram or grams, mg = milligram or milligrams, mL (or ml) = milliliter or milliliters, h = hour or hours, M = molar, N = normal, min = minute or minutes, MHz = megahertz, tlc = thin layer chromatography, v/v = volume to volume ratio, and ca. = about.

[00227] "α", "β", "R" and "S" are stereochemical designations familiar to those skilled in the art.

EXAMPLE 1

N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide



[00228] **Example 1, Step 1:** (1*R*, 2*S*, 5*R*)-*tert*-Butyl 2-benzyloxycarbonylamino-7-oxo-6-aza-bicyclo[3.2.1]octane-6-carboxylate (89.6 g, 0.24 mol, see: P. H. Carter, et al. PCT application WO 2005/021500) was dissolved in ethyl acetate (1.5 L) and the resulting solution was washed with sat. $NaHCO_3$ (2 x 0.45 L) and sat. NaCl (1 x 0.45 L). The solution was dried (Na_2SO_4) and then filtered directly into a 3-necked 3 L round-bottom flask. The solution was purged with direct nitrogen injection before being charged with 10% Pd/C (13.65 g) under nitrogen atmosphere. The flask was evacuated and back-filled with hydrogen; this was repeated twice more. Hydrogen was bubbled through the solution for 30 min and then the reaction was stirred under 1 atm H_2 for 18 h. The flask was evacuated, back-filled with nitrogen, and charged with fresh catalyst (6 g of 10% Pd/C). Hydrogen was bubbled through the solution for 30 min and then the reaction was stirred under 1 atm H_2 for 18 h. The flask was evacuated and back-filled with nitrogen. The mixture was filtered through Celite; the filter pad was then washed with ethyl acetate. The filtrate (~1.6 L EtOAc volume) was diluted with acetonitrile (0.3 L) and charged sequentially with *L-N*-Cbz-methionine (68 g, 0.24 mol), TBTU (77 g, 0.24 mol), and N,N-diisopropylethylamine (42 mL, 0.24 mol). The reaction was stirred at room temperature for 4 h, during which time it changed from a suspension to a clear solution. The reaction was quenched with the addition of sat. NH_4Cl (0.75 L) and water (0.15 L); the mixture was diluted further with EtOAc (0.75 L). The phases were mixed and separated and the organic phase was washed with sat. Na_2CO_3 (2 x 0.9 L) and sat. NaCl (1 x 0.75 L). The solution was dried (Na_2SO_4), filtered, and concentrated *in vacuo* to give

(1*R*,2*S*,5*R*)- *tert*-butyl 2-((*S*)-2-(benzyloxycarbonylamino)-4-(methylthio)butanamido)-7-oxo-6-aza-bicyclo[3.2.1]octane-6-carboxylate as an oil, which was taken into the next step without further purification. LC/MS for primary peak: $[M\text{-Boc}+H]^+ = 406.3$; $[M+Na]^+ = 528.3$. ^{1}H-NMR (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.36 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.2 (m, 1H), 4.0 (m, 1H), 2.5 – 2.7 (m, 3H), 2.25 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (m, 4H), 1.9 (m, 1H), 1.7 (m, 2H), 1.54 (s, 9H). Also present are EtOAc [1.26 (t), 2.03 (s), 4.12 (q)] and *N,N,N,N*-tetramethylurea [2.83 (s)].

[00229] Example 1, Step 2: A sample of (1*R*,2*S*,5*R*)- *tert*-butyl 2-((*S*)-2-(benzyloxycarbonylamino)-4-(methylthio)butanamido)-7-oxo-6-aza-bicyclo[3.2.1]octane-6-carboxylate (0.24 mol assumed; see previous procedure) was dissolved in iodomethane (1,250 g) and stirred for 48 h at room temperature. The reaction was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in dichloromethane and concentrated *in vacuo*. This was repeated twice more. The resultant sludge was dissolved in dichloromethane (0.4 L) and poured into a rapidly stirring solution of MTBE (4.0 L). The resultant yellow solids were collected via suction filtration and dried under high vacuum to afford the sulfonium salt (179 g). This material was taken into the next step without further purification. LC/MS for primary peak: $[M\text{-}Me_2S+H]^+ = 458.4$; $[M]^+ = 520.4$. ^{1}H-NMR (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.33 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.3 – 3.45 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.78 (m, 1H), 2.0 – 2.3 (m, 4H), 1.7 (m, 2H), 1.52 (s, 9H). Also present are MTBE [1.18 (s), 3.2 (s)] and traces of *N,N,N,N*-tetramethylurea [2.81 (s)].

[00230] Example 1, Step 3: All of the sulfonium salt from the previous step (0.24 mol assumed) was dissolved in DMSO (2.0 L). The resultant solution was stirred under nitrogen at room temperature and charged with cesium carbonate (216 g) portionwise. The suspension was stirred at room temperature for 3 h and then filtered to remove the solids. The solution was divided into ~0.22 L portions and worked up as follows: the reaction mixture (~0.22 L) was diluted with ethyl acetate (1.5 L) and washed successively with water (3 x 0.5 L) and brine (1 x 0.3 L). The organic phase was dried (Na_2SO_4), filtered, and concentrated *in vacuo*. The desired (1*R*,2*S*,5*R*)-*tert*-butyl 2-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-7-oxo-6-azabicyclo[3.2.1]octane-6-carboxylate (90.8 g, 83%) was obtained as a

microcrystalline foam, free from tetramethyl urea impurity. LC/MS for primary peak: $[M\text{-}Boc+H]^+ = 358.4$; $[M+Na]^+ = 480.4$. ^{1}H-NMR (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.2 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.3 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.28 – 2.42 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.7 – 2.0 (m, 5H), 1.55 (s, 9H). If desired, this material can be isolated as a solid by dissolving in MTBE (1 volume), adding to heptane (3.3 volumes), and collecting the resultant precipitate.

[00231] Example 1, Step 4: A stirring solution of (1*R*,2*S*,5*R*)- *tert*-butyl 2-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-7-oxo-6-azabicyclo[3.2.1]octane-6-carboxylate (108 g, 0.236 mol) in THF (1 L) was charged with lithium hydroxide monohydrate (21.74 g, 0.519 mol). Water (0.3 L) was added slowly, such that the temperature did not exceed 20 °C. The reaction was stirred at room temperature overnight and the volatiles were removed *in vacuo*. The pH was adjusted to ~4 through the addition of 1N HCl (450 mL) and NaH_2PO_4. The resultant white precipitates were collected by filtration and washed with water (2 x 1 L). The solid was dissolved in dichloromethane (1.5 L) and water (~ 1 L). The organic layer was dried (Na_2SO_4), filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (0.7 L) and the resultant solution was heated at reflux for 1 h. Solids separated after cooling to RT, and were collected *via* filtration. These solids were purified by recrystallization in isopropanol to afford the desired (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)cyclohexanecarboxylic acid as a white solid (104.5 g, 93% yield). LC/MS for primary peak: $[M\text{-}tBu+H]^+ = 420.2$; $[M\text{-}Boc+H]^+ = 376.2$; $[M+H]^+ = 476.2$. ^{1}H-NMR (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.45 – 3.6 (m, 2H), 2.99 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 2.0 (m, 2H), 1.6 – 1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H).

[00232] Example 1, Step 5: A 3 L round bottom flask was charged with (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)cyclohexanecarboxylic acid (75.5 g, 0.158 mol), EDC•HCl (33.5 g, 0.175 mol), 1-hydroxybenzotriazole (23.6 g, 0.175 mol), and dichloromethane (1 L). The reaction was stirred at room temperature for 2 h, during which time it changed from a white suspension to a clear solution. Ammonia (gas) was bubbled into the solution until the pH was strongly basic (paper) and the reaction

was stirred for 10 min; this ammonia addition was repeated and the reaction was stirred for an additional 10 min. Water was added. The organic phase was washed with sat. $NaHCO_3$, NaH_2PO_4, and brine before being concentrated *in vacuo*. The residue was slurried with acetonitrile (0.5 L) and then concentrated in to give (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)cyclohexanecarboxamide as a white solid (75.9 g, ~100%), which was used in the next step without further purification. LC/MS for primary peak: $[M\text{-Boc}+H]^+ = 375.3$; $[M+H]^+ = 475.4$; $[M\text{-tBu}+H]^+ = 419.3$. ^{1}H-NMR (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.25 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.9 – 2.05 (m, 2H), 1.65 – 1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H).

[00233] Example 1, Step 6: The reaction was run in three equal portions and combined for aqueous workup. A 5 L, 3-necked round bottom flask was charged with (1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)cyclohexanecarboxamide (25.3 g, 53 mmol), acetonitrile (1.9 L), and 2.6 L of water/ice. The mixture was stirred and cooled to 0 °C. Iodobenzene diacetate (25.77 g, 80 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 h; another 0.5 eq of iodobenzene diacetate was added. The reaction was stirred for 9 h (reaction temp < 10 °C). The mixture was charged with 8 eq N,N-diisopropylethylamine and 2 eq acetic anhydride. Over the next thirty minutes, 4 eq N,N-diisopropylethylamine and 2 eq acetic anhydride were added every ten minutes, until the reaction had proceeded to completion (HPLC). The acetonitrile was removed *in vacuo*; some solid separated from the residue, and this was collected by filtration. The remaining residue was extracted with dichloromethane (3 L, then 1 L). The organic phase was washed sequentially with water, sat. $NaHCO_3$, and brine. The collected solids were added to the organic phase, along with activated carbon (15 g). The mixture was stirred for 30 minutes at 40 °C before being filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (1 L), and the resultant solution was stirred at 75 °C for 1 h before being allowed to cool to room temperature. A solid separated and was collected by filtration. This solid was purified further by recrystallization: it was first dissolved in 0.5 L CH_2Cl_2, then concentrated *in vacuo*, then re-crystallized from 1 L EtOAc; this was repeated three times. The solids obtained from the mother liquors of

the above were recrystallized three times using the same method. The combined solids were recrystallized twice more from acetonitrile (0.7 L) to provide 66 g (84%) of *tert*-butyl (1*R*,3*R*,4*S*)-3-acetamido-4-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexylcarbamate (purity >99.5% by HPLC). LC/MS for primary peak: $[M+H]^+ = 489.4$; $[M\text{-}tBu+H]^+ = 433.3$. ^{1}H-NMR (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.3 – 7.4 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.6 (m, 2H), 2.44 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.87 – 2.05 (m, 4H), 1.87 (s, 3H), 1.55 – 1.7 (m, 2H), 1.46 (s, 9H). The stereochemical fidelity of the Hofmann rearrangement was confirmed through X-ray crystal structure analysis of this compound, as shown in Figure 1.

[00234] Example 1, Step 7: To a solution of *tert*-butyl (1*R*,3*R*,4*S*)-3-acetamido-4-((*S*)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexylcarbamate (100 g, 0.205 mol) in dichloromethane (400 ml) was added TFA (400 ml) at -20 °C. The reaction solution was stirred at room temperature for 2 h. The solvent and most of TFA were removed under reduced pressure, and the residue was diluted with dichloromethane (2 L) and aqueous K_2CO_3 solution (2 L). The pH was adjusted to 10 with 1N HCl. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 1L). The combined organic layer was dried over Na_2SO_4, and concentrated to give benzyl (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminocyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate as an oil (81 g, 100% yield). This amine was used directly in the next step without further purification.

[00235] Example 1, Step 8: A solution of benzyl (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminocyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (13.3 g, 34 mmol) and 3, 5-di-*tert*-butylcyclohexa-3,5-diene-1,2-dione (7.54 g, 34 mmol) in methanol (160 ml) was stirred at room temperature for 2 h. The solution was concentrated and diluted with acetone (132 ml) and water (33 ml), followed by addition of Dowex-50WX8-200 (33 g). The reaction was stirred at room temperature for 2 h. Dowex-50WX8-200 was removed by filtration and washed with dichloromethane (300 ml). The filtrate was concentrated under vacuum to remove most of acetone. The residue was diluted with dichloromethane (200 ml) and washed with aqueous $NaHCO_3$ solution (200 ml) and brine (200 ml). The combined aqueous layers were extracted with dichloromethane (2 x 100 ml). The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and concentrated.

The product benzyl (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate was obtained as a solid (12 g, 90% yield) by crystallization in EtOAc (100 ml) and Hexane (200 ml). ^{1}H-NMR (500 MHz, *DMSO-d*$_6$) δ ppm 7.99 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H), 7.44 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H), 7.28 -7.39 (m, 5 H), 5.03 (s, 2 H), 4.50 (s, 1 H), 4.31 (d, *J*=12.10 Hz, 1 H), 4.18 (q, *J*=8.98 Hz, 1 H), 3.27 (m, 2 H), 2.82 (dd, *J*=15.12, 5.22 Hz, 1 H), 2.52 - 2.65 (m, 1 H), 2.40 (dd, *J*=12.92, 4.67 Hz, 1 H), 2.15 - 2.31 (m, 2 H), 2.09 (d, *J*=15.40 Hz, 1 H), 1.90 (m, 1 H), 1.81 (s, 3 H), 1.68 (m, 1 H). *m/z*: 388.46 [M+H].

[00236] Example 1, Step 9: To a solution of $TiCl_4$ (1M in dichloromethane, 36 ml, 36 mmol) in dichloromethane (30 ml) at 0° C was added $Ti(OiPr)_4$ (10.8 ml, 36 mmol). The mixture was then stirred at room temperature for 10 min. To a solution of benzyl (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (23.25 g, 60 mmol) in dichloromethane (600 ml) was added *tert*-butylamine (30 ml, 300 mmol) at room temperature, followed by the addition of the $TiCl_4/Ti(OiPr)_4$ solution at -50 °C. The reaction was allowed to warm slowly to room temperature. The reaction was finished after 2 h (The reaction was monitored on HPLC by quenching an HPLC sample with $NaBH_4$ in methanol). The solution was cooled to 10 °C and BH_3•SMe_2 (1M in dichloromethane, 66 ml, 66 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 5 h then quenched with Na_2CO_3 aqueous solution (300 ml). The precipitate was filtered off. The two layers were separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (600 ml). The combined dichloromethane layers were extracted with 1N HCl twice (150 ml and 15 ml). (The product and the undesired *trans* isomer were both in the acidic aqueous phase.) The combined acidic aqueous layers were neutralized with 12 M aqueous solution of NH_4OH (12 ml) to pH~8 and extracted with dichloromethane twice (600 ml, 450 ml). (The product was in organic phase, while the *trans* isomer was still in aqueous layer.) The combined organic layers were washed with NH_4Cl aqueous solution 3 times (3 x 200 ml) until there was no *trans* isomer left in organic layer. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by crystallization in EtOAc/Hexane(200 ml / 800 ml) to give the desired benzyl (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (20.80 g, 78% yield) as a white solid with 99.5% purity. ^{1}H-NMR (500

MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 8.76 (s, 1H), 7.27 - 7.46 (m, 6 H), 5.03 (m, 2 H), 4.14 (m, 1 H), 4.07 (q, *J*=8.80 Hz, 1 H), 3.83(m, 1H), 3.36 (m, 2H), 2.91 (s, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.41 - 1.74 (m, 7H), 1.04 (s, 9H). *m/z*: 445.54 [M+H].

[00237] Example 1, Step 10: To a solution of benzyl (*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (43.3 g, 98 mmol) in methanol (400 ml), 10% wet Pd/C (4.34 g) was added. The mixture was evacuated and back-filled with hydrogen with a hydrogen balloon. The mixture was stirred at room temperature for 5 h. The mixture was filtered and washed with methanol (500 ml) and concentrated under vacuum to dryness. The crude product obtained was distilled with IPA (2 x 100 ml) under reduced pressure to give product N-((1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)acetamide as an oil (30 g, 98% yield). This amine was used in the next step without further purification.

[00238] Example 1, Step 11: To a solution of N-((1*R*,2*S*,5*R*)-2-((*S*)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)acetamide (30 g, 97 mmol) in IPA (400 ml) was added TEA (27 ml, 195 mmol) and 4-chloro-6-(trifluoromethyl)quinazoline (25 g, 107 mmol; see P. H. Carter, et al. PCT application WO 2005/021500). The mixture was stirred at room temperature overnight and then stirred at 70 °C for 1h. The resulted solution was concentrated under reduced pressure to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (1 L) and extracted with acetic acid solution I (prepared by combining 700 mL of water and 22.6 mL of glacial acetic acid) twice (500 ml, 200 ml). The acidic aqueous layer (pH 4-5) was extracted with dichloromethane (2 x 300 ml). The dichloromethane layer was extracted with acetic acid solution II (300 ml; prepared by combining 300 mL water with 4 mL of glacial acetic acid). The combined acetic acid layers were basified with 1 M NaOH to pH > 12 and extracted with dichloromethane (3 x 700 ml). The combined organic layers were dried and concentrated to give the crude product as a solid (45.6 g, 93% yield). The crude product was purified by recrystallization from EtOAc (400 ml)/Hexane (900 ml) to give 42.86 g (88%) N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide with 99.7% purity. ^{1}H-NMR (500 MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 9.71 (1 H, br. s.), 9.02 (1 H, s), 8.71 (1 H, d, *J*=7.97 Hz), 8.59 (1 H, s), 8.04 (1 H, dd,

J=8.66, 1.79 Hz), 7.88 (1 H, d, *J*=8.52 Hz), 4.91 - 5.13 (1 H, m), 4.30 - 4.57 (1 H, m), 3.86 (1 H, dt, *J*=11.89, 3.71, 3.64 Hz), 3.43 - 3.57 (1 H, m), 3.35 - 3.45 (1 H, m), 3.04 (1 H, t, *J*=3.85 Hz), 2.23 - 2.40 (1 H, m), 2.05 - 2.22 (1 H, m), 1.90 - 1.98 (1 H, m), 1.86 - 1.93 (3 H, m), 1.50 - 1.78 (5 H, m), 0.98 - 1.15 (9 H, m). ^{13}C-NMR (126 MHz, *DMSO-d*$_6$) δ ppm 171.23, 169.35, 159.54, 156.87, 151.17, 128.97, 128.20, 125.76 (1 C, q, *J*=30.52 Hz), 121.55 (1 C, br. s.), 124.04 (1 C, q, *J*=272.11 Hz), 114.31, 53.26, 52.39, 50.81, 47.56, 45.70, 42.77, 34.52, 32.17, 29.14 (3 C, s), 26.49, 23.29, 20.30. ^{19}F-NMR (471 MHz, *DMSO-d*$_6$) δ ppm -60.34 (s). *m/z*: 507.0 [M+H]. Anal. Calcd for $C_{25}H_{33}N_6O_2F_3$: C, 59.27; H, 6.56; N, 16.59; F, 11.25 Found: C, 59.44; H, 6.64; N, 16.74; F, 10.99.

ALTERNATIVE PREPARATION OF EXAMPLE 1

[00239] Example 1, Alternative Preparation, Step 1: An oven-dried 3-neck round-bottom flask was equipped with a dried stir bar, a dried reflux condenser, and two septa. After cooling under N_2, the flask was charged sequentially with (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benzyloxycarbonylamino)-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)cyclohexanecarboxylic acid (60 g, 126 mmol; see Example 1, Step 4), acetonitrile (800 mL), N-methylmorpholine (27.7 mL, 252 mmol), and diphenylphosphoryl azide (29.9 mL, 139 mmol). The reaction was stirred at RT for 1 h 40 min, at which time 2-trimethylsilylethanol (90 mL, 631 mmol) was added. The reaction was set to heat, and reached reflux 30 min later. It was allowed to reflux for 1 h, at which time it was allowed to cool to 50 °C gradually and then cooled to 15 °C with external cooling. The reaction was quenched with the addition of acetic acid (1.734 mL, 30.3 mmol). The reaction was concentrated *in vacuo* and then dissolved in EtOAc (1.2 L). It was washed sequentially with water (1 x 0.3 L), sat. $NaHCO_3$ (2 x 0.3 L), 1N HCl (1 x 0.3 L), and brine (2 x 0.3 L). The organic phase was dried (Na_2SO_4), filtered, and concentrated *in vacuo*. A solid appeared very early on in the concentration process. After the volatiles were removed, 800 mL 10% EtOAc/Hexanes was added, and the mixture was stirred overnight. The solid was collected and dried to yield *tert*-butyl (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-3-((2-

trimethylsilyl)ethoxycarbonylamino)cyclohexylcarbamate (60.5 g, 102 mmol, 81 % yield). HPLC showed that the material was 72% pure, with two 12% impurities. This material was taken into the next step without purification. The filtrate was later concentrated to yield another 4.38 g of product. Total yield = 64.9 g (87%).

[00240] Example 1, Alternative Preparation, Step 2: A dry 500 mL round-bottom flask was equipped with a stir bar and charged sequentially with *tert*-butyl (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-3-((2-trimethylsilyl)ethoxycarbonylamino)cyclohexylcarbamate (60.5 g), CH_2Cl_2 (180 mL), and a solution of para-toluenesulfonic acid monohydrate (19.48 g, 102 mmol) in CH_2Cl_2 (120 mL) and methanol (30 mL). The mixture was placed on a rotary evaporator and the bulk of the CH_2Cl_2 was removed (bath temp ca. 20 °C). When the mixture began to foam, the vacuum was released, and the bath temperature increased to 46 °C (the temperature varied between 44 and 51 °C; it was controlled with the addition of external ice). The mixture was rotated at this temperature for exactly one hour (gas evolution was visible throughout) and then diluted with EtOAc (1 L). The organic phase was washed with 0.5 N NH_4OH (2 x 250 mL). The aqueous washes were combined and set aside. The organic phase was washed with sat. NH_4Cl (1 x 250 mL) and sat. NaCl (1 x 250 mL); these aqueous washes were discarded. The initial combined NH_4OH washes were back-extracted with EtOAc (1 x 250 mL), and that organic extract was washed with sat. NH_4Cl (1 x 60 mL) and sat. NaCl (1 x 60 mL). All of the organic extracts were combined, dried (Na_2SO_4), filtered, and concentrated. The residue was purified by elution through a SiO_2 plug (13 cm wide x 7.5 cm tall). The first eluant was pure EtOAc (ca. 4 L). The second eluant was 1:9 (10% NH_4OH in MeOH)/CH_2Cl_2 (ca. 5 L). The fractions containing the desired product were pooled together and evaporated to afford the desired 2-(trimethylsilyl)ethyl (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexylcarbamate (31.6 g, 64.4 mmol, 63 % yield).

[00241] Example 1, Alternative Preparation, Step 3: A stirring solution of 2-(trimethylsilyl)ethyl (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)cyclohexylcarbamate (400 mg, 0.82 mmol) in acetonitrile (3 mL) was charged sequentially with diisopropylethylamine (315.8 mg, 3 eq) and bromoacetonitrile (109.5 mg, 1.1 eq). The mixture was stirred at 40 °C for 30 h. The

solvent was removed under reduce pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography, using 1.5% of methanol in dichloromethane as the eluant. The desired 2-(trimethylsilyl)ethyl(1R,2S,5R)-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(cyanomethylamino)cyclohexylcarbamate was obtained as a white solid (400 mg, 93%). LC/MS found $[M + H]^+ = 530$.

[00242] Example 1, Alternative Preparation, Step 4: A stirring solution of 2-(trimethylsilyl)ethyl(1R,2S,5R)-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(cyanomethylamino)cyclohexylcarbamate (400 mg, 0.76 mmol) in dichloromethane (5 mL), was cooled to 0 °C and charged with m-CPBA (372.6 mg, 2.2 eq) in portions. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. Saturated $Na_2S_2O_3$ solution (3 mL) and saturated $NaHCO_3$ solution (3 mL) were added and the mixture was stirred at room temperature for 0.5h. The mixture was diluted with dichloromethane (80 mL), washed with saturated $NaHCO_3$ (20 mL) and brine (20 mL). The solution was dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue obtained was dissolved in methanol (5 mL) and the solution was charged with NH_2OH-HCl (262.7 mg, 5 eq). The mixture was stirred at 60 °C for 2.5 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with dichloromethane (80 mL) and filtered through a pad of celite. The filtrate was washed with saturated $NaHCO_3$ (2 x 20 mL). The aqueous washes were extracted with dichloromethane (30 mL). The dichloromethane layers were combined and washed with brine (30 mL). The solution was dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered, and concentrated *in vacuo* to give 2-(trimethylsilyl)ethyl (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(hydroxyamino)cyclohexylcarbamate (350 mg, 91%). LC/MS found $[M + H]^+ = 507$.

[00243] Example 1, Alternative Preparation, Step 5: A solution of 2-(trimethylsilyl)ethyl (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(hydroxyamino)cyclohexylcarbamate (350 mg, 0.69 mmol) in acetone (5 mL) was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in anhydrous THF (7 mL) and cooled to 0 °C. A solution of MeMgBr (1.1 mL, 3M in diethyl ether, 5 eq) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 1.5h. The reaction was quenched with water (5 mL) at 0 °C. The mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL) and filtered through a

pad of celite. The filtrate was washed with brine (30 mL). The solution was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in 2 ml of acetonitrile and 1 ml of CS_2 was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 hours. The solvent was removed and the crude product was purified by silica gel column chromatography, using 1.5% of methanol in dichloromethane as the eluant, to provide the desired 2-(trimethylsilyl)ethyl (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexylcarbamate (160 mg, 42%). LC/MS found $[M + H]^+ = 547$.

[00244] Example 1, Alternative Preparation, Step 6: A stirring solution of 2-(trimethylsilyl)ethyl (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexylcarbamate (100 mg, 0.183 mmol) in dichloromethane (3 mL) was charged with trifluoroacetic acid (2 mL). The reaction was stirred for 2 h at room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in dichloromethane (50 mL) and washed with saturated $NaHCO_3$ (20 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The dichloromethane layers were combined and dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered, and concentrated *in vacuo* to give benzyl (S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (66 mg, 90%). LC/MS found $[M + H]^+ = 403$.

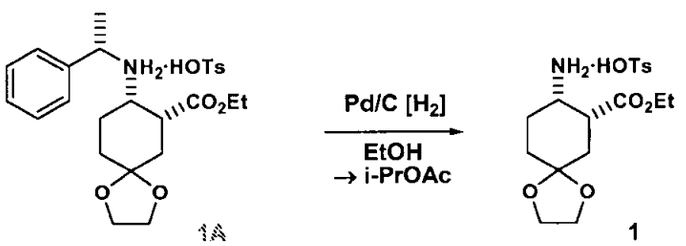
[00245] Example 1, Alternative Preparation, Step 7: A solution of benzyl (S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (22 mg, 0.055 mmol) in dichloromethane (2 mL) was charged sequentially with triethylamine (11.1 mg, 2 eq) and acetic anhydride (6.1 mg, 1.1 eq). The reaction was stirred for 1.5 h at room temperature, diluted with dichloromethane (50 mL) and washed with saturated $NaHCO_3$ (20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered, and concentrated *in vacuo* to give benzyl (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (22 mg, 90%). LC/MS found $[M + H]^+ = 445$.

[00246] Example 1, Alternative Preparation, Step 8: To a solution of benzyl (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxopyrrolidin-3-ylcarbamate (22 mg, 0.05 mmol) in methanol (2 mL) was added $Pd(OH)_2$ (20 mg of 50% wet catalyst). The flask was evacuated and back-filled with hydrogen from a

hydrogen balloon. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and the catalyst was removed by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* to provide N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)acetamide (13 mg, 85%). LC/MS found $[M + H]^+ = 311$.

[00247] Example 1, Alternative Preparation, Step 9: To a solution of N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)acetamide (70 mg, 0. 225 mmol) in isopropanol (3 mL) was added 4-chloro-6-(trifluoromethyl)quinazoline (63 mg, 1.2 eq) and triethylamine (56.9 mg, 2.5 eq). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with preparative HPLC to provide the title compound as its bis-TFA salt (110 mg, 67%). LC/MS found $[M + H]^+ = 507$.

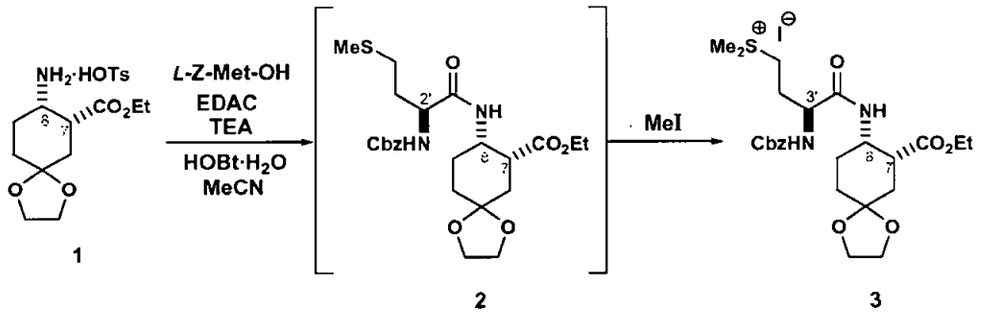
2ND ALTERNATIVE PREPARATION OF EXAMPLE 1



1A 1

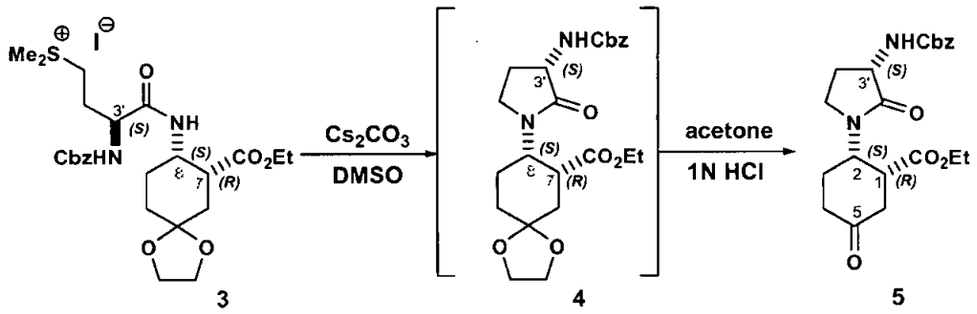
[00248] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 1a: To a hydrogenator were charged ethyl (*7R*,8*S*)-8-((*S*)-1-phenyl-ethylamino)-1,4-dioxa-spiro[4.5]decane-7-carboxylate 4-toluenesulfonate salt **1A** (1417 g, 2.8 moles, c.f.: WO2004098516, prepared analogous to US Pat.6,835,841), ethanol (200 proof, 11.4 L), and 10% Pd/C catalyst (50% wet, 284 g). The mixture was inerted with nitrogen, then pressurized with hydrogen gas (45 psig) and agitated vigorously at approx. 40 °C until starting material was consumed (HPLC). The suspension was cooled, purged with nitrogen gas and the catalyst was removed by filtration while inerted. The spent catalyst was washed with ethanol (4.3 L). The filtrate and washings were combined and concentrated under vacuum to a volume of 2–3 L while maintaining the batch between 40°–60 °C. Isopropyl acetate (5 L) was charged and the mixture was concentrated to a volume of ~2 L until most ethanol was removed (<0.5%) and residual moisture content was <1,000 ppm. Batch volume was adjusted to ~7.5 L by

the addition of isopropyl acetate. The mixture was heated to 80 °C until clear, then cooled 65°–70 °C. Seed crystals of **1** (5 g) were added and the batch was cooled to 50 °C over 2 hours, then further cooled to 20 °C over 4 hours and held for ~10 hours. The resulting slurry was filtered and the cake was washed with isopropyl acetate (2 L). The product was dried under vaccum at ~35 °C until volatiles were recduced below ~1% (LOD). Ethyl (7*R*,8*S*)-8-amino-1,4-dioxa-spiro[4.5]decane-7-carboxylate 4-toluenesulfonate salt **1** was obtained as a white, crystalline solid (936 g, 83% yield; HPLC purity: 99.8%). ^{1}H-NMR: (300MHz, $CDCl_3$) 8.14-7.89 (brs, 3H), 7.75 (d, J 9.0Hz, 2H), 7.15 (d, J 8.0Hz, 2H), 4.22-4.04 (m, 2H), 4.01-3.77 (m, 4H), 3.55-3.43 (m, 1H,), 3.20-3.13 (m, 1H), 2.40-2.27 (m, 4H), 2.21-1.94 (m, 2H), 1.81-1.51 (m, 3H), 1.23 (t, J 7.0Hz, 3H); HPLC: Waters Xterra MS C18 4.6 mm x 150 mm i.d., 3.5µm particle size, 0.05% NH4OH (5% ACN, 95% H_2O, solvent A), to 0.05% NH_4OH (95% ACN, 5% H_2O, solvent B), 5% B to 20% B in 10 minutes, changed to 95% B in 25 minutes, and then changed to 5% B in 1 minute; 11.1 minutes (aminoester **1**).



[00249] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 1b: Ethyl (7*R*,8*S*)-8-amino-1,4-dioxa-spiro[4.5]decane-7-carboxylate 4-toluenesulfonate salt **1** (450.1g; the product of reductive deprotection of a known compound – see R. J. Cherney, WO 2004/098516 and G. V. Delucca & S. S. Ko, WO 2004/110993), was combined with 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbo-diimide hydrochloride (236.3g), 1-hydroxy benzotriazole hydrate (171.9g), *N*-carbobenzyloxy-*L*-methionine (333.4g) and acetonitrile (3.1 L). To the stirred mixture was added triethylamine (249.5g) below 30 °C. Upon reaction completion (HPLC), the mixture was diluted with ethyl acetate (8.2 L) and washed with aqueous 25% potassium bicarbonate solution (2×4.5

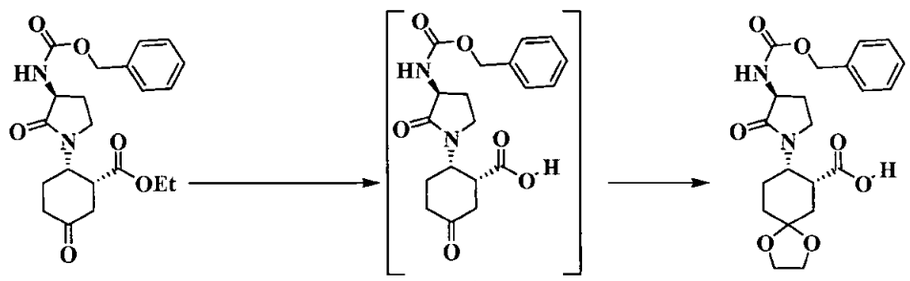
L) followed by water (4.5 L). The organic phase was separated and concentrated under reduced pressure to obtain a solution of ethyl (7*R*,8*S*)-8-((*S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-methylsulfanyl-butyrylamino)-1,4-dioxa-spiro[4.5]decane-7-carboxylate **2** (1.4 L). Methyl iodide (2.39 kg) was added, the vessel was shielded from light and the mixture was held under slow agitation for approx. 24 h. To the thick yellow precipitate was added methyl *tert*-butyl ether (2.7 L) and the mixture was held for approx. 1 h. The product was isolated by filtration and the cake was washed with methyl *tert*-butyl ether (2x1.4 L), then dried under vacuum, yielding [(*S*)-3-benzyloxy-carbonylamino-3-((7*R*,8*S*)-7-ethoxycarbonyl-1,4-dioxa-spiro[4.5]dec-8-ylcarbamoyl)-propyl]-dimethylsulfonium iodide **3** (671.4 g, ~94% yield) as an off-white solid (HPLC purity 99.9%).



3 4 5

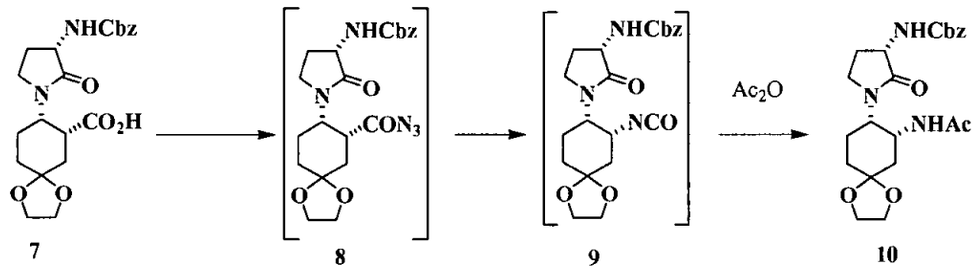
[00250] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 2: Sulfonium salt **3** (619.4 g), and cesium carbonate (416.8 g) and anhydrous dimethyl sulfoxide (6.2 L) were combined in a reactor equipped with a scrubber to neutralize volatile sulfides. Vigorous agitation was maintained until complete conversion was obtained (HPLC). Ethyl acetate (12.4 L) was added, followed by 20 % brine (3 L). The organic phase was separated, washed twice with brine (2x3 L) and evaporated to obtain a solution of ethyl (7*R*,8*S*)-8-((*S*)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-1,4-dioxa-spiro[4.5]decane-7-carboxylate **4** in ethyl acetate (~0.8 L). Acetone (2.55 L) was added, followed by aqueous 0.5 M hydrochloric acid solution (2.3 L). With good mixing, the solution was heated to 50 to 60 °C until conversion of **4** to ethyl (1*R*,2*S*)-2-((*S*)-3-benzyloxycarbonylamino-2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-5-oxo-cyclohexanecarboxylate **5** was complete (HPLC). The mixture was concentrated under reduced pressure while below 40 °C, cooled to ~30 °C, and water (4.1 L) was

added. The resulting slurry was cooled to 5 to 10 °C and agitated for ~1 hour. The product was filtered and the cake was washed with water (2x2.5 L). Upon deliquoring, the cake was dried to a constant weight below 40 °C in a vacuum oven. Cyclohexanone **5** (272g, 70% yield) was obtained (HPLC purity 98.7%).

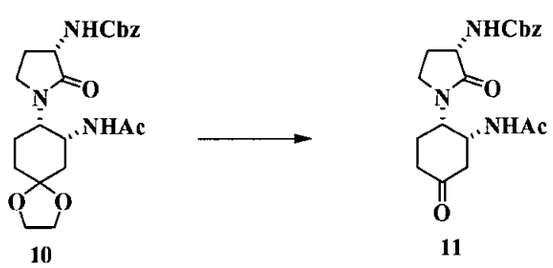


5 6 7

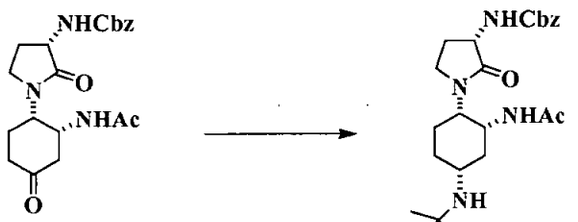
[00251] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 3: Cyclohexanone **5** (100g) was suspended in THF (500 mL) and cooled to 0 °C. 1N NaOH (271g) was added at 0-5°C and the biphasic mixture was agitated at ≤ 5 °C for at least one hour. MTBE (500 mL) was added and the layers were separated. The bottom aqueous layer was washed again with MTBE (500 mL) and the layers were separated. Dichloromethane (500 mL) was charged to the product-rich aqueous layer, and the mixture was cooled to 0 °C. 3N HCl (156 g) was charged maintaining ≤ 5 °C. After stirring for at least 10 min, the mixture was warmed to 20-25 °C, and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (100 mL). The organic layers were combined and solvent was exchanged into toluene via distillation. The toluene solution volume was adjusted to approximately 1L, and p-toluenesulfonic acid monohydrate (0.24 g) was added. Ethylene glycol (16.22 g) was added, and the mixture was distilled at atmospheric pressure until formation of compound **7** was complete and the pot volume was approximately 500-700 mL. The solution was cooled to approximately 70 °C, and ethyl acetate (500 mL) was added maintaining approximately 70 °C. The mixture was cooled and filtered to give 73 g (70 % yield) of compound **7**, (7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid.



[00252] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 4: To a slurry of compound **7** (147 g) in dry toluene (370 mL) was charged triethylamine (32.7 g) at 15-25 °C. After the slurry became a solution after 10-15 min stirring at 25°C, the flask was cooled to -10°C and isobutyl chloroformate (44.1g) was charged at -10°- 0°C. The mixture was agitated at -10°- 0°C for about 30 min. A solution of sodium azide (42 g) and tetrabutylammonium bromide (5.2 g) in water (130 mL) was added at -10°- 0°C. The biphasic slurry was vigorously agitated for at least one hour and toluene (1750 mL) followed by water (300 mL) were added. The two phases were stirred for at least 10 min and the top organic layer was separated and dried with 4 Å molecular sieves. Acetic anhydride (76 mL) and acetic acid (28 mL) were added and the solution was heated to 80-90 °C for 1-4 hours, until <2 AP of intermediate **9** was detected by HPLC. The solvent was partially distilled off to approximately two thirds of the initial volume under atmospheric pressure, the solution was cooled to ambient temperature and the resultant slurry was stirred for 16 hours. Heptane (350 mL) was slowly added and the slurry was stirred for 1h. The solids were filtered, washed with toluene/heptane 4:1 (300 mL), and dried to give 109 g (78% yield) of compound **10**, benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate.



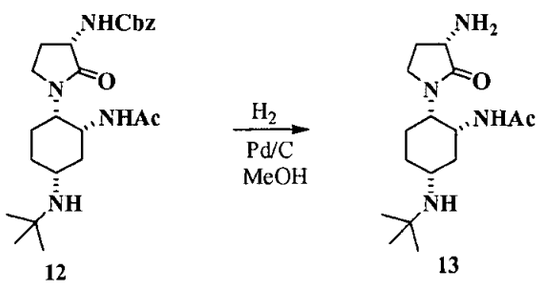
[00253] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 5: To a solution of compound **10** (109 g) in acetone (760 mL) was charged 1N HCl (760 mL). The mixture was heated to 50 °C for 2.5 hours. The acetone was distilled off under reduced pressure and the product was extracted with dichloromethane twice 1 x 1 L and 1 x 0.5 L. Dichloromethane layers were combined and dichloromethane was exchanged into ethyl acetate by distillation until the b.p. on the kettle reached 78°C and the final volume was approximately 10 mL/g compound **10** input. The ethyl acetate slurry was cooled to ambient temperature, agitated for 16 hrs and the solids were filtered and washed with ethyl acetate (400 mL). The solid was dried to give 84 g (87% yield) of compound **11**, benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate.



11 12

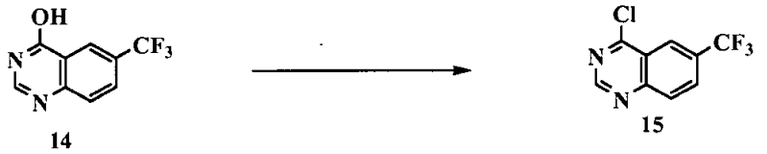
[00254] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 6: The $TiCl_2(OPr^i)_2$ reagent was pre-formed by adding $Ti(O^iPr)_4$ (11.5 mL) to a solution of 1M $TiCl_4$ in dichloromethane (39 mL) at 5-10°C and subsequent stirring at ambient temperature for 15 min. Compound **11** (25 g) was dissolved in dichloromethane (500 mL) and t-butylamine (34 mL) was added at room temperature. After 10 min the solution was cooled to -25 to -20 °C and the preformed titanium reagent solution was added at a temperature below -20°C. The mixture was allowed to warm to ambient temperature and it was agitated for 1h. A sample was taken to confirm the complete imine formation by miniquench with sodium borohydride in methanol (absence of alcohols indicated the complete consumption of the starting ketone **11**). Borane dimethyl sulfide (7.0 mL) was then added at 0-5°C and the reaction mixture was warmed to ambient temperature and stirred for at least 5 hours. Dichloromethane was partially (about half) evaporated under reduced pressure and wet ethyl acetate (300 mL, preformed by agitating ethyl acetate with water) was added within 30-60 min. The

resulting slurry was agitated for at least 4 h, the solids were filtered and washed several times with dichloromethane until no more than 5 M % of the product was retained in the cake. The filtrate and washes were combined, 1N HCl (200 mL) was added and the biphasic mixture was agitated for at least 30 min (gas evolution ceased after ~20 min). The product rich aqueous layer (upper phase) was separated and dichloromethane (500 mL) was added. Concentrated ammonium hydroxide was added to the agitated biphasic mixture until pH was adjusted to 8-8.5 (~15 mL). The organic phase was separated and washed 2 x 100 mL with 14 wt % ammonium chloride, to remove the undesired trans isomer of compound **12**, and finally with water (25 mL). Dichloromethane was exchanged into ethyl acetate by distillation under normal pressure until the b.p. on the kettle reached 78°C and the final volume was approximately 5 mL/g compound **11** input (~140 mL). The solution was cooled to ambient temperature. Heptane (250 mL) was added slowly at 40-50°C and compodun **12** started to crystallize. The slurry was agitated at room temperature for 3 hrs and the solids were filtered, washed with heptane (100 mL) and dried to give 20.1 g (70 % yield) of compound **12**, benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, as white, fluffy crystals.



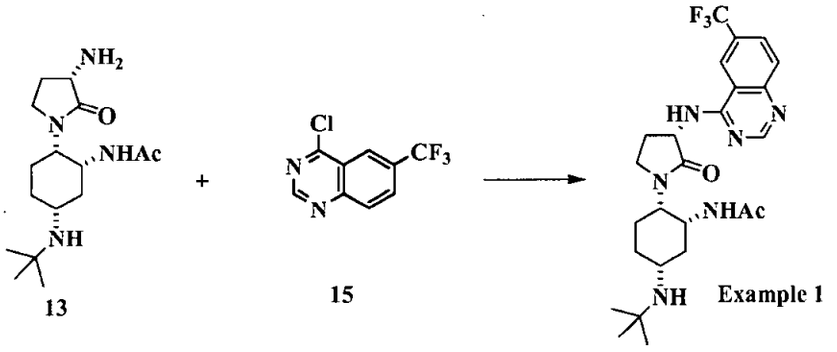
[00255] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 7: Compound **12** (20 g) was dissolved in methanol (400 mL) and 5 % Pd/C catalyst (1.8 g, 9 wt %) was added. The mixture was hydrogenated at 25 °C and 25 psig for 3h. The catalyst was removed by filtration, and the methanol was exchanged into ethyl acetate by continuous distillation. The product crystallized from ethyl acetate (160 mL) upon cooling. Heptane (160 mL) was added at 25 °C, the slurry was agitated for 1h and the product was filtered, washed with heptane and dried to give 12.8 g (94 % yield) of

compound **13**, *N*-((1*R*,2*S*,5*R*)-2-((3*S*)-3-amino-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-5-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)acetamide.



14 **15**

[00256] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 8: 6-(trifluoromethyl)-4-quinazolinol, **14** (5 g; see P. H. Carter, et al. PCT application WO 2005/021500) was suspended in dichloromethane (100 mL). N,N-diisopropylethylamine (4.2 mL, 1.05 eq) and DMF (0.4 mL, 0.2 eq) were added. Oxalyl chloride (3.0 mL, 1.5 eq) was then added to the agitated slurry at 20-25 °C under cooling (exothermic addition). The orange slurry was agitated at 30-35 °C for 2h. Steady gas evolution was observed for ~1.5 hrs at which point the slurry became an orange solution. After cooling to 20 °C, the reaction solution was added dropwise to 20 wt % aq K_2HPO_4 (50 mL) under vigorous agitation and gas evolution. The lower organic phase was separated and washed one more time with 20 wt % aq K_2HPO_4 (50 mL). The organic solution was used as is for the next step within 16h.



13 **15** **Example 1**

[00257] Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 8: To a solution of **15** in dichloromethane (22 mL, 5.5 mmol), solid **13** (1.55 g, 5 mmol) was added and the mixture was agitated at room temperature until the solids dissolved. Triethylamine (1.4 mL, 11 mmol) was added and the mixture was agitated for 24 hrs at ambient temperature. Water (10 mL) was added, the two phases were agitated for 10 min and the organic phase was separated. Dichloromethane was exchanged into ethyl acetate

by continuous distillation until the b.p. on the kettle reached 78°C and the final volume was approximately 10 mL/g compound **13** input (~15 mL). The slurry was cooled to ambient temperature, heptane (15 mL) was slowly added and the slurry was agitated for 16 h. The solids were filtered, washed with heptane/ethyl acetate 1:1 (5 mL) and dried to give 1.83 g (72 % yield) of beige crystals (form N-2 by XRD) of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, Example 1.

EXAMPLE 2

Crystal Forms of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide

[00258] Various crystal forms of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base were prepared and characterized as described below.

PROCEDURES FOR CHARACTERIZING THE FORMS

Single Crystal Data

[00259] 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 Kα radiation (λ = 1.5418 Å) at a constant temperature with the θ-2θ 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 Kα radiation (λ = 1.5418 Å). Indexing and processing of the measured intensity data were carried out with the HKL2000 software package (Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) in *Macromolecular Crystallography,* eds. Carter, W.C. Jr & Sweet, R.M. (Academic, NY), Vol. 276, pp. 307-326) 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 Kα radiation (λ

= 1.5418 Å). 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).

[00260] When indicated, crystals were cooled in the cold stream of an Oxford cryo system (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: J. Cosier and A.M. Glazer, J. Appl. Cryst., 1986, *19*, 105) during data collection.

[00261] The structures were solved by direct methods and refined on the basis of 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, 1974; Vol. IV, Tables 2.2A and 2.3.1) software package with minor local modifications or the crystallographic packages MAXUS (maXus solution and refinement software suite: S. Mackay, C.J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. maXus: a computer program for the solution and refinement of crystal structures from diffraction data or SHELXTL[4]. The derived atomic parameters (coordinates and temperature factors) were refined through full matrix least-squares. The function minimized in the refinements was $\Sigma_w(|F_o| - |F_c|)^2$. R is defined as $\Sigma ||F_o| - |F_c||/\Sigma |F_o|$ while $R_w = [\Sigma_w(|F_o| - |F_c|)^2/\Sigma_w |F_o|^2]^{1/2}$ where w is an appropriate weighting function based on errors in the 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.

X-ray Powder Diffraction Data (PXRD)

[00262] PXRD data were obtained using a Bruker C2 GADDS . The radiation was Cu Kα (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 $3 \leq 2\theta \leq 35°$ with a sample 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.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

[00263] 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 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.

Thermal Gravimetric Analysis (TGA)

[00264] TGA experiments were performed in a TA Instruments™ model Q500 or 2950. The sample (about 10-30 mg) was placed in a 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 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

[00265] The unit cell data and other properties for these examples are presented in 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 & Jensen, *X-Ray Structure Determination: a Practical Guide*, (MacMillian, 1968).

[00266] Fractional atomic coordinates for Examples 2a, b, c, d, e, f, and g, and the conditions at which they were measured are presented in Tables 2-9.

[00267] Additionally, characteristic powder x-ray diffraction peak positions (degrees 2θ±0.1)@ RT for Examples 2a, b, c, d, e, and f are presented in Table 9, all of which are based on high quality patterns collected with a diffractometer (CuKα) with a spinning capillary with 2θ calibrated with a NIST other suitable standard.

[00268] Finally, Figures 1, 2, 3, 4, 5 and 6 present XRPD patterns for Examples 2a, b, c, e, d and f, Figures 8, 10, 13, 15, 17 and 19 disclose the TGA of Examples 2a, b, c, d, e and f, respectively. Figures 7, 9, 12, 14, 16 and 18 disclose the DSC of

Examples 2a, b, c, d, e and f, respectively. Figure 11 discloses the Vapor Sorption Isotherm of Example 2b.

Form Preparation, DSC and TGA Characterization

[00269] Example 2a, Form H0.5-4: 150 mg of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base was dissolved in warm n-butyl acetate saturated with water. Heptane was added until a persistent cloud was observed. The slurry was allowed to cool to RT. Form H0.5-4 is characterized by 0.5 mole water per mole N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base. Form H0.5-4 was characterized by a DSC thermogram having a broad endotherm onset typically in the range between ca. RT and ca. 67 °C in agreement with the TGA curve; at higher temperatures other events may ensue. Form H0.5-4 was characterized by a TGA thermal curve having a weight loss typically from 0.6% to about 1.4% up to ca. 100 °C. The theoretical weight loss for Form H0.5-4 is 1.7%, however, it is not unusual for unstable hydrates to become partially dehydrated upon drying.

[00270] Example 2b, Form N-2: 1 g of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base was dissolved in 10 mL of water-free EtOAc at 77°C. The solution was cooled to 70°C. 10 mg of seeds of N-2 were added. To the slurry, 18 mL of n-heptane was added over 1 hour with a syringe pump. The slurry was cooled from 70°C to 20°C over 1 hour, and agitated at 20°C overnight. The solid was isolated by filtration, washed with 3 mL of n-heptane, dried at 50°C in a vacuum oven overnight. Form N-2 is N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, a neat form (without additional molecules of water or solvent). Form N-2 was characterized by a DSC thermogram having an endothermic onset typically between ca. 230 °C and ca. 232 °C as a single melt with no other transformations. Form N-2 was characterized by a TGA curve having negligible weight loss at up to ca. 200 °C and in agreement with the single-crystal structure.

[00271] Example 2c, Form H1.75-5: A slurry of 50 mg of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base was vigorously agitated in 1 mL water for more than 16 hours. Form H1.75-5 is characterized by 1.75 moles of water per one mole of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base. Form H1.75-5 was characterized by a DSC thermogram having an endotherm onset typically between ca. RT and ca. 70 °C in agreement with the TGA curve; at higher temperatures other events may ensue. Form H1.75-5 was characterized by TGA curve having a weight loss of ca. 4.3% to ca. 5.3% at temperatures up to ca 100 °C. Theoretical weight loss is ca. 5.9%, however, it is not unusual for unstable hydrates to become partially dehydrated upon drying.

[00272] Example 2d, HAC-1: 100 mg of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base was dissolved in 0.1 mL of HOAc at 80°C. To this, 0.2 mL of t-BuOAc was added and the solution was cooled to 20°C. The solution was evaporated to dryness. The resulting solid was agitated in heptane at 50 °C for 15 hours, followed by cooling to 20°C. HAC-1 was filtered and dried at 25°C under vacuum overnight. Form HAC-1 is characterized by 1 mole of acetic acid per one mole of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base. Form HAC-1 was characterized by a DSC thermogram having an endothermic onset typically at ca. 100 °C in agreement with the TGA curve; at higher temperatures other events may ensue. Form HAC-1 was also characterized by a TGA curve having ca. 15..3% weight loss up to ca. 200 °C. Theoretical weight loss is ca. 10.5%, however it is not unusual for minor amount of high boiling point solvents to remain associated with the solid. In cases like this, PXRD is diagnostic of form but not sensitive to small amounts of adventitious solvent.

[00273] Example 2e, Form E-1: 50 mg of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base was dissolved in <1mL of boiling ethanol. The solution was cooled to RT and allowed to slowly evaporate. Form E-1 is

characterized by 1 mole of ethanol per one mole of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base. Form E-1 was characterized by a DSC thermogram having an endothermic onset typically at ca. 100 °C in agreement with the TGA curves; at higher temperatures other events may ensue. Form E-1 was characterized by a TGA thermal curve having a weight loss of ca. 7.1% to ca. 7.6% up to ca. 150 °C. Theoretical weight loss is ca. 8.3%, however, it is not unusual for unstable solvates to become partially desolvated upon drying.

[00274] Example 2f, RPG-3: 30 to 40 mg of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base was dissolved in 2 mL of racemic propylene glycol. Water was added until a cloud was observed. The solvent was allowed to slowly evaporate to dryness. Form RPG-3 is characterized by 1 molecule of *R*-propylene glycol per one molecule of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base. Form RPG-3 was characterized by a DSC thermogram having an endothermic onset at ca. 70 °C in agreement with the TGA curve, at higher tempratures other events may ensue. Form RPG-3 was characterized by a TGA curve having a weight loss of ca.16.4% up to ca. 110 °C. Theoretical weight loss is ca. 13.1%, however it is not unusual for minor amount of high boiling-point solvents to remain associated with the solid. In cases like this, PXRD is diagnostic of form but not sensitive to small amounts of adventitious solvent.

[00275] Example 2g, Form IPA-1: 40 mg of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base was slurried in <1mL of isopropyl alcohol. The slurry was gently heated to dissolve the remaining solid. The solution was cooled to RT and allowed to slowly evaporate until crystals were observed. Form IPA-1 is characterized by 1 mole of isopropyl alcohol per one mole of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base.

TABLE 1

Unit Cell Parameters

Compound	Form	T	a(Å)	b(Å)	c(Å)	α°	β°	γ°	V(Å^3)
Exp 2a	H0.5-4	-50	17.7845(7)	7.6215(3)	20.9510(9)	90	109.062(3)	90	2684.1(2)
Exp 2b	N-2	RT	18.7240(4)	8.0171(2)	19.6568(5)	90	114.935(2)	90	2675.7(1)
Exp 2c	H1.75-5	-70	12.7648(2)	34.3194(7)	12.9659(2)	90	99.053(1)	90	5609.4(2)
Exp 2d	HAC-1	RT	7.9766(7)	11.058(2)	33.348(4)	90	90	90	2941.4(6)
Exp 2e	E-1	-50	7.9866(3)	11.2594(6)	32.680(2)	90	90	90	2938.7(2)
Exp 2f	RPG-3	-50	10.3004(3)	10.5475(4)	15.4784(6)	90.045(3)	102.476(2)	109.083(2)	1547.0(1)
Exp 2g	IPA-1	RT	8.4487(2)	11.6615(3)	31.3800(9)	90	90	90	3091.7(1)

TABLE 1 (continued)

Unit Cell Parameters

Compound	Z'	Vm	sg	dcalc
Exp 2a	2	671	$P2_1$	1.235
Exp 2b	2	669	$P2_1$	1.258
Exp 2c	4	701	$P2_1$	1.274
Exp 2d	1	735	$P2_12_12_1$	1.279
Exp 2e	1	735	$P2_12_12_1$	1.249
Exp 2f	2	774	P1	1.257
Exp 2g	1	773	$P2_12_12_1$	1.217

[00276] 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

Vm = V(unit cell) / (Z drug molecules per cell)

sg = space group

dcalc = calculated crystal density

TABLE 2

Atomic Coordinates for Example 2a, Form H0.5-4

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
F1	0.1718	0.5612	0.2388	F138	0.9730	0.9700	0.6210
F2	0.1576	0.4167	0.1518	F139	1.0220	0.7300	0.6430
F3	0.1277	0.6827	0.1463	F140	0.9470	0.7710	0.5532
N7	0.3729	0.0177	-0.0187	O137	0.5289	1.1320	0.2702
N9	0.3967	0.3613	0.0716	H10	0.3464	0.3422	0.0601
N11	0.5034	0.5324	0.1275	H16	0.1889	-0.1347	-0.0192
N12	0.1513	-0.3723	-0.0803	H85	0.2780	0.4332	0.1193
N15	0.2070	-0.0340	-0.0258	H88	0.4895	0.3182	0.0357

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
N18	0.4944	0.7660	0.2016	H90	0.2688	-0.4938	-0.1162
O23	0.3677	0.2704	-0.0786	H91	0.2791	-0.3427	-0.1635
O25	0.2371	0.2420	0.0154	H93	0.2277	0.1128	-0.0967
C82	0.2630	0.6176	0.1822	H95	0.3290	-0.0521	-0.1140
C83	0.4281	0.4888	0.1165	H99	0.3760	-0.3135	-0.0574
C84	0.3027	0.5269	0.1466	H100	0.3100	-0.3067	-0.0228
C86	0.3810	0.5754	0.1513	H102	0.5234	0.0450	0.0773
C87	0.4447	0.2515	0.0409	H103	0.4804	0.1033	0.1290
C89	0.2647	-0.3681	-0.1237	H105	0.1184	-0.0766	-0.1500
C92	0.2304	-0.0122	-0.0852	H106	0.1831	-0.0821	-0.1859
C94	0.3163	-0.0776	-0.0729	H110	0.3980	0.9063	0.2542
C96	0.4172	0.7161	0.1933	H112	0.4292	-0.1628	0.0516
C97	0.1821	0.5681	0.1800	H113	0.3692	-0.0449	0.0742
C98	0.3221	-0.2755	-0.0632	H115	0.2715	0.8230	0.2452
C101	0.4735	0.0847	0.0816	H117	0.0540	-0.3914	-0.0071
C104	0.1724	-0.1130	-0.1448	H118	0.1047	-0.5613	-0.0042
C107	0.3915	0.1858	-0.0261	H119	0.0122	-0.5664	-0.0392
C108	0.2116	0.0919	0.0195	H121	0.0157	-0.2070	-0.1065
C109	0.3748	0.8103	0.2276	H122	-0.0438	-0.3568	-0.1418
C111	0.4081	-0.0451	0.0507	H123	0.0156	-0.2818	-0.1762
C114	0.2994	0.7605	0.2220	H126	0.1446	-0.3645	-0.1779
C116	0.0592	-0.4960	-0.0309	H128	0.5835	0.7006	0.1755
C120	0.0087	-0.3106	-0.1338	H130	0.2266	0.0448	0.1189
C124	0.0696	-0.4465	-0.0977	H131	0.1603	-0.0732	0.0701
C125	0.1783	-0.3101	-0.1359	H132	0.1430	0.1249	0.0800
C127	0.5309	0.6696	0.1690	H134	0.0091	-0.6633	-0.1497
C129	0.1827	0.0426	0.0774	H135	0.1005	-0.6984	-0.1175
C133	0.0611	-0.6143	-0.1412	H136	0.0686	-0.5851	-0.1833
F4	0.9541	0.9380	0.5714	H141	0.1830	-0.4440	-0.0580
F5	0.9826	0.6800	0.5759	H14	0.6945	1.0312	0.5339
F6	1.0259	0.8300	0.6655	H21	0.7741	1.5073	0.4379
N8	0.6040	1.3694	0.4758	H28	0.7049	1.4602	0.3064
N13	0.6631	1.0203	0.5573	H29	0.6130	1.4814	0.2902
N17	0.7581	1.7462	0.3780	H32	0.5464	1.0615	0.5430
N19	0.6266	0.8793	0.6383	H34	0.6724	1.6789	0.4661
N20	0.7501	1.4082	0.4350	H35	0.5807	1.7062	0.4509
N22	0.7080	0.6517	0.7080	H38	0.8152	0.9372	0.5749
O24	0.7581	1.1336	0.4774	H41	0.5545	1.4575	0.3823
O26	0.5442	1.1244	0.4164	H44	0.5540	1.3350	0.5873
C27	0.6643	1.5023	0.3242	H45	0.6406	1.2709	0.6290
C30	0.6817	0.9034	0.6081	H48	0.6272	1.8887	0.3818
C31	0.5921	1.1293	0.5402	H49	0.5627	1.7587	0.3377
C33	0.6205	1.6624	0.4324	H52	0.6566	1.2721	0.3752
C36	0.5758	1.2019	0.4701	H55	0.6234	1.5433	0.5534
C37	0.8201	0.8496	0.6069	H56	0.6965	1.4170	0.5619

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
C39	0.7568	0.8126	0.6288	H58	0.8887	1.9136	0.4290
C40	0.6067	1.4694	0.4172	H59	0.9292	1.8759	0.3743
C42	0.8902	0.7591	0.6317	H60	0.9085	1.7203	0.4146
C43	0.6042	1.2934	0.5840	H62	0.6632	1.7578	0.2922
C46	0.7651	0.6822	0.6794	H64	0.8824	1.3038	0.5620
C47	0.6162	1.7663	0.3697	H65	0.8870	1.4370	0.5064
C50	0.8099	1.8166	0.3410	H66	0.9097	1.2396	0.5019
C51	0.6689	1.3952	0.3877	H69	0.7263	1.9822	0.2803
C53	0.7895	1.2775	0.4740	H70	0.8132	2.0339	0.2846
C54	0.6389	1.4243	0.5469	H71	0.7823	2.0761	0.3450
C57	0.8917	1.8331	0.3947	H73	0.8374	1.5813	0.3078
C61	0.6751	1.6998	0.3362	H74	0.8486	1.7393	0.2638
C63	0.8750	1.3182	0.5148	H75	0.7629	1.6701	0.2558
C67	0.9615	0.8066	0.6143	H77	0.8443	0.5011	0.7349
C68	0.7802	1.9934	0.3099	H79	0.9456	0.5638	0.6960
C72	0.8152	1.6904	0.2872	H81	0.6060	0.7320	0.7067
C76	0.8381	0.5893	0.7029	H142	0.7500	1.8390	0.4090
C78	0.8982	0.6264	0.6799	H143	0.5333	1.1298	0.3123
C80	0.6445	0.7516	0.6862	H144	0.5194	1.0278	0.2538

TABLE 3

Atomic Coordinates for Example 2b, Base Form N-2

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
N1	0.7824	1.3195	0.3238	C71	0.9289	1.4591	0.5167
N2	0.1685	0.3056	-0.0178	H72	0.9378	1.4237	0.5668
H3	0.1633	0.1989	-0.0196	H73	0.9764	1.4359	0.5102
N4	0.6223	0.8215	0.1887	C74	0.8719	1.7574	0.6080
N5	0.2627	0.4840	-0.0849	C75	0.6719	1.2862	0.4846
N6	0.6868	0.9765	0.2943	H76	0.6246	1.2933	0.4390
H7	0.7030	0.9877	0.3420	H77	0.6814	1.3914	0.5103
N8	0.4185	0.9718	0.0742	H78	0.6660	1.2009	0.5162
N9	0.0989	0.0258	-0.1003	C79	0.9173	1.6199	0.6639
N10	0.7913	1.3680	0.4754	H80	0.8851	1.5217	0.6541
H11	0.7826	1.4618	0.4918	H81	0.9305	1.6578	0.7142
N12	0.5331	0.6005	0.1813	H82	0.9647	1.5943	0.6584
N13	0.3353	0.7474	0.0475	C83	0.9176	1.9198	0.6225
H14	0.3028	0.6896	0.0583	H84	0.9680	1.8999	0.6220
N15	0.8501	1.6946	0.5311	H85	0.9252	1.9631	0.6707
N16	0.4567	1.1267	0.1887	H86	0.8887	1.9992	0.5842
O17	0.7470	1.1042	0.4435	C87	0.7960	1.7901	0.6131
O18	0.2114	0.7470	-0.1165	H88	0.7660	1.8705	0.5758
O19	0.2229	0.5239	0.0583	H89	0.8064	1.8325	0.6620
O20	0.8588	1.0890	0.3360	H90	0.7667	1.6881	0.6048

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
F21	0.5881	0.9034	0.4961	C91	0.2069	0.3753	0.0494
F22	0.4828	0.7754	0.4659	C92	0.1886	0.3981	-0.1294
F23	0.5874	0.6500	0.5199	H93	0.1617	0.4641	-0.1751
C24	0.1049	-0.1653	-0.0049	C94	0.1345	0.3960	-0.0889
H25	0.1473	-0.2167	-0.0125	H95	0.1249	0.5115	-0.0787
H26	0.0773	-0.2487	0.0097	C96	0.3636	0.8982	0.1612
H27	0.1257	-0.0826	0.0338	C97	0.0560	0.3169	-0.1396
C28	0.0052	-0.2107	-0.1371	H98	0.0300	0.3865	-0.1836
H29	-0.0334	-0.1565	-0.1806	H99	0.0226	0.3123	-0.1131
H30	-0.0204	-0.2889	-0.1178	C100	0.0655	0.1409	-0.1647
H31	0.0423	-0.2685	-0.1506	H101	0.0138	0.0994	-0.1999
C32	-0.0102	0.0236	-0.0618	C102	0.2651	0.6526	-0.0801
H33	0.0176	0.1111	-0.0276	C103	0.3727	0.8727	0.0930
H34	-0.0371	-0.0447	-0.0399	C104	0.3129	0.8065	0.1831
H35	-0.0478	0.0713	-0.1077	H105	0.2826	0.7213	0.1525
C36	0.6347	0.8573	0.2590	C106	0.4090	1.0275	0.2081
C37	0.7956	1.1614	0.3094	C107	0.1998	0.2249	-0.1544
C38	0.5429	0.6399	0.2526	H108	0.2268	0.1548	-0.1108
C39	0.5969	0.8058	0.3661	H109	0.2321	0.2314	-0.1820
H40	0.6303	0.8901	0.3943	C110	0.0479	-0.0823	-0.0781
C41	0.5928	0.7673	0.2949	C111	0.3943	0.5437	-0.0102
C42	0.7174	1.0886	0.2543	H112	0.4319	0.5306	0.0416
H43	0.7243	1.0288	0.2140	H113	0.4226	0.5469	-0.0417
C44	0.8437	1.4188	0.3806	C114	0.1202	0.1477	-0.2041
H45	0.8919	1.4020	0.3733	H115	0.0955	0.2128	-0.2496
C46	0.8266	1.6034	0.3730	H116	0.1283	0.0355	-0.2179
H47	0.7791	1.6255	0.3797	C117	0.3076	0.8411	0.2485
H48	0.8177	1.6396	0.3230	C118	0.2292	0.2619	0.1158
C49	0.5524	0.7201	0.3942	H119	0.2846	0.2720	0.1469
C50	0.6668	1.2414	0.2237	H120	0.2172	0.1487	0.0989
H51	0.6690	1.2785	0.1776	H121	0.2001	0.2924	0.1441
H52	0.6125	1.2182	0.2137	C122	0.3349	0.4024	-0.0337
C53	0.8609	1.3569	0.4595	H123	0.3502	0.3144	-0.0588
H54	0.8773	1.2398	0.4636	H124	0.3290	0.3556	0.0092
C55	0.4991	0.5496	0.2836	C125	0.3458	0.7009	-0.0200
H56	0.4668	0.4624	0.2569	H126	0.3682	0.7937	-0.0371
C57	0.7010	1.3718	0.2841	C127	0.4561	1.0941	0.1233
H58	0.6975	1.4822	0.2628	H128	0.4859	1.1659	0.1085
H59	0.6744	1.3722	0.3171	C129	0.4030	1.0567	0.2762
C60	0.9137	1.6472	0.5099	H130	0.4339	1.1390	0.3084
H61	0.9621	1.7039	0.5438	C131	0.2548	0.7395	0.2713
C62	0.7404	1.2441	0.4666	C132	0.3536	0.9679	0.2955
C63	0.5039	0.5898	0.3526	H133	0.3500	0.9907	0.3403
H64	0.4747	0.5300	0.3726	F134	0.1847	0.7359	0.2156
C65	0.5722	0.6959	0.1556	F135	0.2364	0.8060	0.3220

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
H66	0.5642	0.6734	0.1065	F136	0.2859	0.5920	0.2960
C67	0.8949	1.7014	0.4308	F137	0.1977	0.8329	0.2710
H68	0.9412	1.6866	0.4211	F138	0.2168	0.6170	0.2301
H69	0.8818	1.8193	0.4256	F139	0.2934	0.6790	0.3395
C70	0.5532	0.7632	0.4678	H140	0.8280	1.7679	0.5060
				H141	0.1330	-0.0400	-0.1062

TABLE 4

Atomic Coordinates for Example 2c, Base Form H1.75-5

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
C1	0.3942	0.1176	0.2183	C51	0.6094	0.0443	-0.0547
C2	0.2287	0.1174	0.0897	C52	0.6750	0.0382	0.0420
N3	0.1192	0.1293	0.0594	C53	0.9963	0.1572	0.4974
N4	0.1798	0.0501	0.1322	C54	0.7176	-0.0005	0.0684
N5	0.3753	0.0509	0.2822	C55	1.1985	0.0503	0.7049
N6	-0.0927	0.1070	-0.1055	C56	1.1539	0.1133	0.4965
N7	-0.3691	0.1154	-0.3165	C57	1.0229	0.1608	0.6162
N8	-0.2260	0.1440	-0.1970	C58	1.0367	0.1185	0.4572
O9	0.1323	0.1298	-0.1137	C59	0.7341	0.1669	0.3280
O10	0.0301	0.0456	0.0130	C60	1.1829	0.1168	0.6162
C11	0.0785	0.1332	-0.0419	C61	1.1435	0.1563	0.6496
C12	0.2431	0.0735	0.0697	C62	0.5636	0.1744	0.0306
C13	-0.2272	0.0747	-0.2281	C63	0.6973	0.1581	0.4320
C14	0.0812	0.0382	0.0995	C64	0.7972	0.1517	0.5115
C15	0.4135	0.0738	0.2008	C65	1.3015	0.0605	0.7775
C16	0.2774	0.1283	0.2010	C66	1.2257	0.0279	0.6122
C17	0.3592	0.0623	0.0929	C67	1.1287	0.0258	0.7652
C18	-0.3242	0.0799	-0.2978	C68	0.9017	0.0664	0.4282
C19	-0.1859	-0.0329	-0.2601	C69	0.8592	0.0308	0.4749
C20	-0.3192	0.1441	-0.2671	F70	0.7706	-0.0040	0.1659
C21	-0.1804	0.1091	-0.1748	F71	0.7890	-0.0119	0.0101
C22	-0.1842	0.0372	-0.2149	F72	0.6477	-0.0283	0.0583
C23	0.0394	0.1336	0.1281	N73	0.7366	0.2979	0.1640
C24	-0.3330	0.0112	-0.3340	N74	0.9286	0.2769	0.3415
C25	-0.2347	0.0067	-0.2683	N75	0.9490	0.3548	0.4399
C26	0.0308	0.0146	0.1792	N76	0.6679	0.2686	0.0076
C27	-0.3753	0.0465	-0.3473	N77	0.5468	0.3015	-0.1239
C28	-0.0381	0.1410	-0.0545	N78	1.1302	0.3587	0.6021
C29	0.4391	0.0161	0.3216	O79	0.7689	0.2552	0.3756
C30	0.4331	-0.0152	0.2365	O80	0.8000	0.3561	0.3182
C31	-0.0565	0.1490	0.0571	C81	0.6779	0.3005	0.0685
C32	0.5574	0.0267	0.3640	C82	0.8021	0.2636	0.1953
C33	0.3907	0.0006	0.4127	C83	0.6253	0.3363	0.0330

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
F34	-0.1107	-0.0374	-0.1835	C84	0.8293	0.2641	0.3145
F35	-0.1514	-0.0419	-0.3469	C85	0.9704	0.2829	0.4523
F36	-0.2560	-0.0605	-0.2519	C86	0.9612	0.3232	0.6101
N37	0.9782	0.0854	0.4895	C87	1.0815	0.3238	0.6395
N38	0.8832	0.1624	0.4564	C88	0.6395	0.3717	0.0871
N39	0.6198	0.1729	0.1273	C89	0.9221	0.3194	0.4932
N40	0.7167	0.1350	0.2533	C90	0.5107	0.3694	-0.1081
N41	0.5429	0.1472	-0.0401	C91	0.5605	0.3350	-0.0649
N42	1.1331	0.0855	0.6708	C92	0.6021	0.2715	-0.0843
O43	0.9140	0.1821	0.2960	C93	0.5266	0.4037	-0.0538
O44	0.8654	0.0771	0.3382	C94	0.9119	0.2659	0.1620
C45	0.8542	0.1720	0.3563	C95	0.5911	0.4051	0.0443
C46	0.5876	0.1117	-0.0112	C96	1.1535	0.3924	0.6738
C47	0.6629	0.1387	0.1561	C97	0.6068	0.4429	0.0984
C48	0.6954	0.0688	0.1114	C98	0.8832	0.3710	0.3595
C49	0.6512	0.1060	0.0865	C99	1.0912	0.2839	0.4757
C50	0.5679	0.0801	-0.0813	C100	1.1264	0.2872	0.5933
C101	0.9810	0.2861	0.2520	O151	0.4292	0.1756	0.7593
C102	0.9190	0.4094	0.3235	O152	0.3473	0.1636	0.8339
C103	1.0516	0.4113	0.6921	H153	0.4310	0.1254	0.2979
C104	1.2130	0.3807	0.7821	H154	0.4349	0.1341	0.1645
C105	1.2167	0.4208	0.6206	H155	0.2779	0.1337	0.0447
F106	0.6836	0.4427	0.1806	H156	0.2164	0.0417	0.2100
F107	0.5186	0.4543	0.1375	H157	0.3714	0.0703	0.3474
F108	0.6281	0.4715	0.0364	H158	-0.0576	0.0785	-0.0868
N109	0.3031	0.2523	0.0895	H159	0.2173	0.0675	-0.0123
N110	0.3202	0.3294	0.1970	H160	0.4992	0.0681	0.2061
N111	0.5022	0.3356	0.3522	H161	0.2372	0.1127	0.2569
N112	0.0946	0.2741	-0.0674	H162	0.2676	0.1594	0.2134
N113	-0.0336	0.2377	-0.1697	H163	0.3639	0.0302	0.0854
N114	-0.2016	0.2650	-0.2433	H164	0.4006	0.0751	0.0350
O115	0.1682	0.3314	0.0829	H165	-0.3534	0.1727	-0.2828
O116	0.1499	0.2237	0.1243	H166	-0.1099	0.0321	-0.1626
C117	0.2052	0.2373	0.0644	H167	0.0215	0.1059	0.1611
C118	0.2992	0.2930	0.2475	H168	0.0659	0.1539	0.1907
C119	-0.0515	0.3401	-0.0764	H169	-0.3750	-0.0142	-0.3730
C120	0.3416	0.2960	0.3644	H170	-0.0484	0.0061	0.1467
C121	-0.1222	0.3701	-0.0923	H171	0.0783	-0.0115	0.2000
C122	0.4698	0.2615	0.2174	H172	0.0297	0.0317	0.2489
C123	-0.1737	0.2997	-0.1931	H173	-0.4526	0.0496	-0.3983
C124	-0.0044	0.2713	-0.1206	H174	-0.0573	0.1673	-0.1021
C125	-0.2438	0.3311	-0.2090	H175	0.4770	-0.0409	0.2650
C126	-0.0754	0.3040	-0.1278	H176	0.3484	-0.0242	0.2146
C127	0.1701	0.2420	-0.0535	H177	0.4596	-0.0045	0.1679
C128	0.3488	0.2578	0.2007	H178	-0.1282	0.1348	0.0707

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
C129	0.5097	0.2640	0.3350	H179	-0.0650	0.1804	0.0686
C130	0.4624	0.2986	0.3883	H180	0.5963	-0.0009	0.3924
C131	-0.0968	0.4077	-0.0362	H181	0.5930	0.0381	0.3032
C132	0.3460	0.2683	0.0015	H182	0.5596	0.0461	0.4284
C133	-0.1317	0.2372	-0.2271	H183	0.4332	-0.0251	0.4433
C134	0.5253	0.3677	0.4289	H184	0.3902	0.0220	0.4712
C135	-0.2190	0.3662	-0.1602	H185	0.3084	-0.0081	0.3820
C136	0.2745	0.2511	-0.0941	H186	0.9987	0.0754	0.5691
C137	0.5618	0.4023	0.3689	H187	0.7487	0.1066	0.2786
C138	0.6152	0.3567	0.5186	H188	1.1096	0.0983	0.7400
C139	0.4264	0.3788	0.4754	H189	0.7448	0.0641	0.1858
C140	0.2540	0.3461	0.1186	H190	0.5192	0.0845	-0.1565
C141	0.2900	0.3831	0.0758	H191	0.5930	0.0200	-0.1086
F142	0.0020	0.4176	-0.0257	H192	1.0402	0.1792	0.4633
F143	-0.1497	0.4372	-0.0806	H193	1.1791	0.0849	0.4744
F144	-0.1239	0.4079	0.0550	H194	1.1975	0.1355	0.4619
O145	0.4346	0.1106	0.5123	H195	0.9975	0.1890	0.6409
O146	0.1371	0.2037	0.3256	H196	0.9825	0.1382	0.6530
O147	0.6629	0.2454	0.5702	H197	1.0259	0.1190	0.3726
O148	0.4523	0.2291	0.5970	H198	0.6972	0.1932	0.2915
O149	0.3986	0.3042	0.6776	H199	1.2687	0.1146	0.6366
O150	0.3459	0.1840	0.4326	H200	1.1831	0.1795	0.6123
H201	1.1631	0.1593	0.7328	H251	1.1684	0.4299	0.5453
H202	0.5306	0.2029	0.0082	H252	0.3950	0.3437	0.2241
H203	0.6519	0.1824	0.4545	H253	0.5749	0.3293	0.3230
H204	0.6483	0.1323	0.4245	H254	0.1193	0.3022	-0.0335
H205	0.8029	0.1216	0.5375	H255	0.2147	0.2880	0.2355
H206	0.7957	0.1702	0.5801	H256	0.0233	0.3437	-0.0249
H207	1.3466	0.0340	0.8006	H257	0.3083	0.3215	0.3958
H208	1.3500	0.0795	0.7383	H258	0.3160	0.2703	0.4028
H209	1.2843	0.0747	0.8476	H259	0.5050	0.2366	0.1841
H210	1.2710	0.0024	0.6388	H260	0.4927	0.2878	0.1790
H211	1.1517	0.0185	0.5635	H261	-0.3192	0.3277	-0.2606
H212	1.2687	0.0462	0.5671	H262	0.1323	0.2153	-0.0854
H213	1.1703	-0.0007	0.7926	H263	0.3327	0.2320	0.2439
H214	1.1105	0.0421	0.8313	H264	0.4885	0.2372	0.3700
H215	1.0556	0.0182	0.7149	H265	0.5951	0.2670	0.3470
H216	0.7976	0.0176	0.4203	H266	0.4874	0.2957	0.4712
H217	0.9226	0.0100	0.4973	H267	0.3419	0.2998	0.0019
H218	0.8269	0.0390	0.5453	H268	0.4278	0.2594	0.0040
H219	0.7349	0.3217	0.2190	H269	-0.1537	0.2100	-0.2663
H220	1.0259	0.3684	0.4660	H270	-0.2738	0.3905	-0.1734
H221	1.2052	0.3497	0.5802	H271	0.3087	0.2249	-0.1215
H222	0.7595	0.2370	0.1705	H272	0.2609	0.2719	-0.1576
H223	0.9510	0.2576	0.4964	H273	0.5805	0.4266	0.4203

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
H224	0.9305	0.2994	0.6498	H274	0.6328	0.3938	0.3368
H225	0.9306	0.3505	0.6365	H275	0.5006	0.4101	0.3051
H226	1.1023	0.3226	0.7234	H276	0.6311	0.3804	0.5741
H227	0.6892	0.3732	0.1634	H277	0.5931	0.3310	0.5600
H228	0.8361	0.3164	0.4802	H278	0.6878	0.3500	0.4880
H229	0.4622	0.3687	-0.1842	H279	0.4455	0.4020	0.5307
H230	0.5955	0.2449	-0.1310	H280	0.3644	0.3877	0.4139
H231	0.4887	0.4301	-0.0865	H281	0.4001	0.3535	0.5147
H232	0.9411	0.2373	0.1483	H282	0.2315	0.3935	0.0139
H233	0.9065	0.2830	0.0906	H283	0.3050	0.4046	0.1373
H234	1.1232	0.2576	0.4474	H284	0.3642	0.3778	0.0457
H235	1.1194	0.3088	0.4371	H297	0.5031	0.1166	0.5720
H236	1.2129	0.2887	0.6081	H298	0.4013	0.1383	0.4827
H237	1.1010	0.2618	0.6307	H291	0.1415	0.2116	0.2456
H238	0.9841	0.3173	0.2399	H292	0.0561	0.1944	0.3301
H239	1.0614	0.2747	0.2630	H285	0.7189	0.2533	0.6386
H240	0.8608	0.4208	0.2603	H286	0.7007	0.2488	0.5014
H241	0.9250	0.4304	0.3884	H287	0.4531	0.2087	0.6605
H242	0.9943	0.4069	0.2987	H288	0.5334	0.2354	0.5869
H243	1.0681	0.4363	0.7411	H289	0.4187	0.2763	0.6478
H244	1.0091	0.4217	0.6147	H290	0.4459	0.3091	0.7532
H245	1.0017	0.3911	0.7227	H293	0.3695	0.2054	0.4921
H246	1.2276	0.4062	0.8315	H294	0.2663	0.1913	0.3921
H247	1.1658	0.3601	0.8194	H295	0.4701	0.1653	0.8329
H248	1.2882	0.3671	0.7752	H296	0.4645	0.1639	0.6962
H249	1.2341	0.4465	0.6673	H299	0.2731	0.1523	0.8513
H250	1.2881	0.4078	0.6030	H300	0.4117	0.1542	0.8909

TABLE 5

Atomic Coordinates for Example 2e, Base Form E-1

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
F18	0.2662	0.4002	0.0274	F23	0.0301	0.3722	0.0039
F19	0.0473	0.4191	0.0033	C18	0.1648	0.3165	0.0297
F20	0.1401	0.2386	0.0059	H31	0.2375	0.5477	0.2387
O2	0.3035	0.7582	0.1985	H41	0.5018	0.4801	0.2585
O28	0.4277	0.5819	0.1087	H42	0.4761	0.3850	0.2161
N1	0.5559	0.6627	0.1978	H51	0.6480	0.5043	0.1733
N6	0.2412	0.4989	0.1766	H52	0.7376	0.5463	0.2204
N8	0.0422	0.3993	0.2139	H61	0.2881	0.5282	0.1472
N10	-0.1606	0.2714	0.1828	H91	-0.1519	0.3157	0.2435
N27	0.6744	0.6813	0.1115	H111	-0.2586	0.1707	0.1140
N29	0.9824	0.8036	0.1064	H121	-0.1207	0.1964	0.0469
C2	0.3877	0.6687	0.2028	H141	0.2343	0.4431	0.0976

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
C3	0.3235	0.5438	0.2136	H211	0.5921	0.8399	0.1984
C4	0.4822	0.4775	0.2252	H221	0.4827	0.7942	0.1303
C5	0.6231	0.5426	0.2028	H231	0.6846	0.8993	0.0877
C7	0.1130	0.4242	0.1780	H232	0.6444	0.9699	0.1348
C9	-0.0900	0.3261	0.2139	H241	0.9421	0.9813	0.1221
C11	-0.1488	0.2295	0.1107	H251	1.0517	0.8711	0.1826
C12	-0.0761	0.2450	0.0735	H252	0.8644	0.9484	0.1930
C13	0.0600	0.3235	0.0687	H261	0.8551	0.7433	0.2231
C14	0.1243	0.3844	0.1017	H262	0.8872	0.6821	0.1741
C15	-0.0857	0.2914	0.1453	H271	0.8051	0.6804	0.1028
C16	0.0498	0.3680	0.1409	H291	1.0794	0.7695	0.1261
C17	0.1207	0.3503	0.0270	H294	0.7893	0.5312	0.0656
C21	0.6470	0.7650	0.1817	H292	0.6583	0.4189	0.0854
C22	0.6168	0.7817	0.1361	H293	0.5951	0.5011	0.0421
C23	0.7030	0.8953	0.1212	H311	0.9885	0.9169	0.0098
C24	0.8922	0.8952	0.1304	H312	0.8322	0.8277	0.0324
C25	0.9185	0.8727	0.1765	H313	0.8750	0.9701	0.0523
C26	0.8353	0.7590	0.1910	H321	1.2632	0.9515	0.0466
C28	0.5782	0.5936	0.0987	H322	1.1556	1.0063	0.0897
C29	0.6596	0.5024	0.0711	H323	1.2983	0.8878	0.0951
C30	1.0633	0.8393	0.0676	H331	1.1943	0.7459	0.0197
C31	0.9326	0.8931	0.0389	H332	1.2251	0.6857	0.0690
C32	1.2044	0.9276	0.0745	H333	1.0345	0.6616	0.0430
C33	1.1314	0.7245	0.0492	H971	-0.8355	0.1305	0.1615
O99	-0.4402	0.1232	0.1894	H972	-0.7164	0.0043	0.1747
C97	-0.7313	0.0985	0.1797	H973	-0.7551	0.1157	0.2115
C98	-0.5812	0.1608	0.1676	H981	-0.5951	0.2544	0.1716
F21	0.3052	0.3620	0.0283	H982	-0.5565	0.1430	0.1349
F22	0.1907	0.2403	0.0143	H991	-0.3383	0.1855	0.1847

TABLE 6

Atomic Coordinates for Example 2d, Base Form HAC-1

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
C1	0.0418	0.3612	0.1413	H32	-0.1504	0.2133	0.0512
N2	-0.1614	0.2566	0.1827	H21	0.2024	0.4361	0.1001
N3	0.5574	0.6476	0.1969	H19	-0.2633	0.1786	0.1141
O4	0.4002	0.5938	0.1104	H15	-0.1260	0.2877	0.2400
N5	0.0480	0.3793	0.2136	H6	0.2703	0.5248	0.1514
N6	0.2349	0.4911	0.1766	H14	0.2507	0.5355	0.2354
N7	0.6581	0.6819	0.1120	H25A	0.5017	0.4595	0.2502
O9	0.3141	0.7518	0.2032	H25B	0.4643	0.3765	0.2131
C10	0.6548	0.7519	0.1823	H22A	0.6302	0.4915	0.1724
C11	0.1091	0.4116	0.1779	H22B	0.7255	0.5203	0.2124

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
C12	0.6143	0.7805	0.1389	H10	0.6208	0.8184	0.1990
C13	-0.0977	0.2822	0.1453	H12	0.4961	0.7944	0.1361
C14	0.3251	0.5321	0.2128	H31A	0.7369	0.5221	0.0663
C15	-0.0849	0.3037	0.2135	H31B	0.5607	0.5108	0.0459
C16	0.5496	0.5972	0.0993	H31C	0.6086	0.4250	0.0815
C17	0.8422	0.7397	0.1888	H17A	0.8651	0.7215	0.2164
N18	0.9734	0.7976	0.1050	H17B	0.8826	0.6751	0.1722
C19	-0.1674	0.2302	0.1113	H23A	0.6885	0.9061	0.0978
C20	0.0380	0.3268	0.0698	H23B	0.6640	0.9626	0.1405
C21	0.1085	0.3827	0.1029	H28A	0.8869	0.9177	0.1920
C22	0.6188	0.5229	0.1991	H28B	1.0495	0.8473	0.1796
C23	0.7063	0.8942	0.1260	H27	0.9448	0.9635	0.1263
C24	0.3943	0.6572	0.2042	H18	1.0626	0.7570	0.1189
C25	0.4808	0.4583	0.2218	H39A	1.2479	0.9507	0.0498
C27	0.8951	0.8864	0.1321	H39B	1.2853	0.8792	0.0894
C28	0.9305	0.8535	0.1757	H39C	1.1647	0.9911	0.0903
F29	0.2449	0.4047	0.0277	H38A	0.9706	0.9352	0.0175
C30	1.0501	0.8412	0.0669	H38B	0.8802	0.9740	0.0573
C31	0.6205	0.5052	0.0708	H38C	0.8310	0.8527	0.0360
C32	-0.1018	0.2511	0.0743	H40A	1.1575	0.7492	0.0195
C33	0.1058	0.3467	0.0300	H40B	1.0092	0.6805	0.0403
F36	0.1168	0.2494	0.0085	H40C	1.1861	0.6845	0.0608
F37	0.0041	0.4132	0.0068	H7	0.7708	0.6743	0.1022
C38	0.9217	0.9066	0.0421	H35A	-0.8134	0.1022	0.1656
C39	1.2014	0.9229	0.0747	H35B	-0.7586	0.1045	0.2107
C40	1.1073	0.7290	0.0448	H35C	-0.7035	-0.0029	0.1830
O8	-0.4446	0.1296	0.1963	H8	-0.3548	0.1817	0.1876
C26	-0.5724	0.1491	0.1735				
O34	-0.5673	0.2213	0.1458				
C35	-0.7251	0.0824	0.1840				

TABLE 7

Atomic Coordinates for Example 2g, Base Form IPA-1

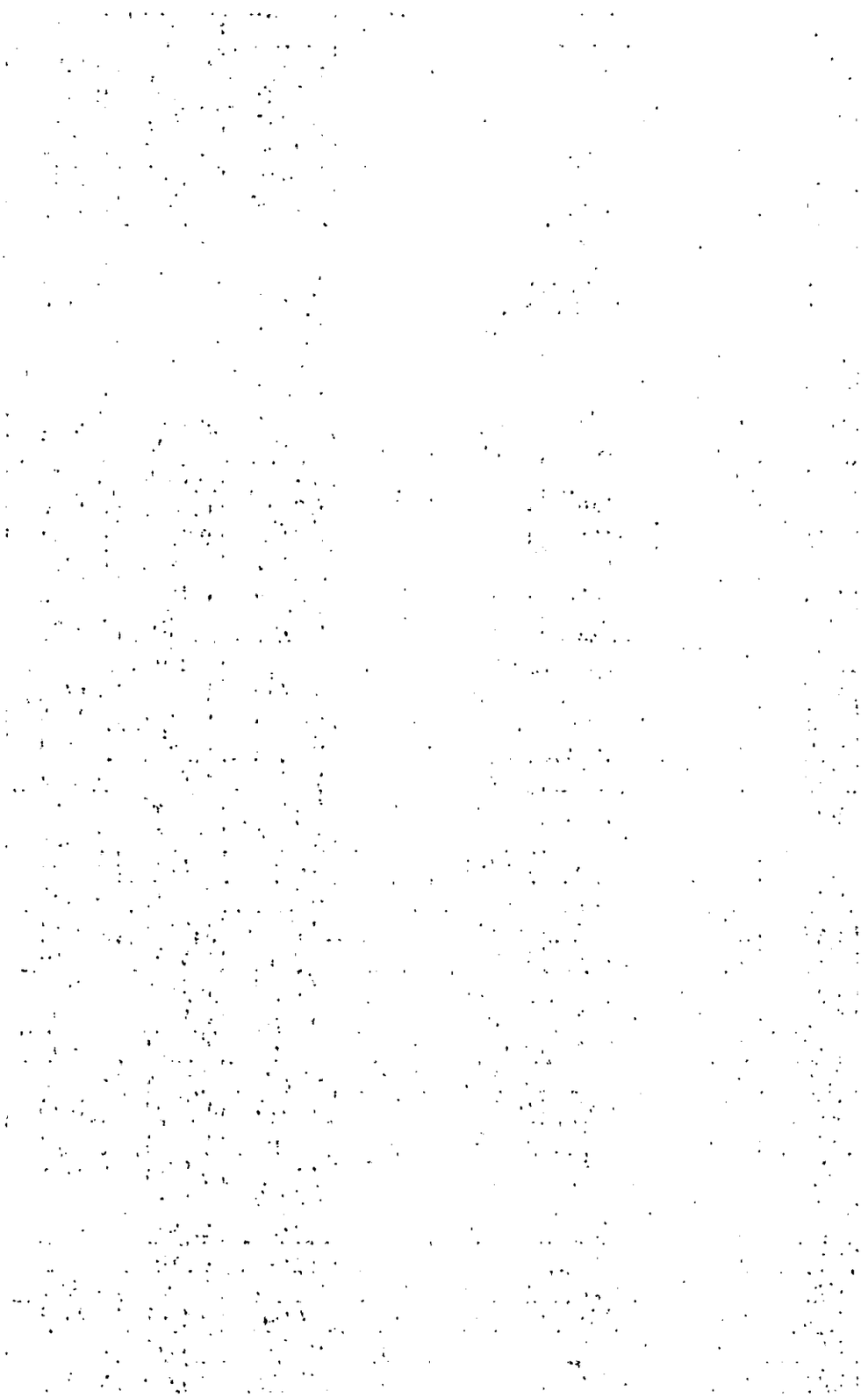
Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
F1	0.1519	0.3786	0.0243	H4B	0.8724	0.7912	0.1232
F3	-0.0140	0.2540	-0.0043	H3	0.6171	0.6809	0.1026
F2	0.0260	0.4241	0.0085	H1	0.1162	0.5505	0.1460
N4	0.8062	0.8075	0.1016	H10	0.3362	0.7935	0.1099
N3	0.5159	0.6834	0.1054	H9	0.3991	0.8799	0.1736
N2	0.3481	0.7197	0.1890	H6A	0.4782	0.9618	0.1051
N1	0.0675	0.5440	0.1700	H6B	0.5369	0.8805	0.0686
N5	-0.1311	0.4643	0.2095	H22	0.0665	0.4473	0.0929
N6	-0.2941	0.3121	0.1828	H5	0.7491	0.9735	0.1042

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
O1	0.1140	0.8031	0.1697	H21	-0.3360	0.1865	0.1167
O2	0.2925	0.5779	0.1031	H12A	0.5507	0.4357	0.0989
C10	0.4463	0.7911	0.1197	H12B	0.6252	0.5211	0.0660
C9	0.4471	0.8051	0.1677	H12C	0.4678	0.4565	0.0549
C4	0.9030	0.8194	0.0629	H8A	0.6698	0.7392	0.1786
C24	-0.0632	0.3232	0.0669	H8B	0.6137	0.8216	0.2153
C19	-0.0909	0.3946	0.1378	H16	0.0302	0.6334	0.2243
C6	0.5348	0.8912	0.0992	H13A	0.4882	0.6277	0.2283
C20	-0.2139	0.3158	0.1454	H13B	0.4421	0.5607	0.1863
C11	0.4342	0.5879	0.0964	H3B	0.9771	0.9859	0.0712
C22	-0.0159	0.3962	0.0980	H3C	1.0944	0.9144	0.0431
C5	0.7048	0.9021	0.1156	H3D	1.0915	0.8973	0.0926
C17	-0.0508	0.4684	0.1726	H23	-0.2112	0.1922	0.0537
C21	-0.2559	0.2399	0.1123	H18	-0.3052	0.3848	0.2368
C14	0.1869	0.7250	0.1863	H2A	0.7158	0.7853	0.0234
C12	0.5279	0.4917	0.0774	H2B	0.8604	0.8380	-0.0010
C8	0.6155	0.8107	0.1847	H2C	0.7518	0.9169	0.0270
C16	0.1187	0.6161	0.2052	H7A	0.6551	0.9825	0.1718
C13	0.4041	0.6134	0.2080	H7B	0.8129	0.9118	0.1736
C3	1.0281	0.9129	0.0679	H1A	1.0319	0.6803	0.0846
C23	-0.1824	0.2437	0.0749	H1B	1.0662	0.7077	0.0366
C18	-0.2485	0.3861	0.2114	H1C	0.9087	0.6458	0.0495
C2	0.7981	0.8420	0.0246	H15A	0.2542	0.5916	0.2593
C7	0.7045	0.9108	0.1635	H15B	0.2564	0.4841	0.2288
C1	0.9852	0.7023	0.0579	H3A	-0.4990	0.1985	0.1863
C15	0.2577	0.5672	0.2298	H27	-0.6926	0.2734	0.1759
C25	0.0153	0.3263	0.0246	H26A	-0.7745	0.0861	0.1320
F4	0.1640	0.2980	0.0315	H26B	-0.6492	0.1771	0.1173
F5	-0.0739	0.3770	-0.0036	H26C	-0.8259	0.2136	0.1243
F6	0.0440	0.2214	0.0112	H28A	-0.8028	0.1216	0.2237
O3	-0.5666	0.1486	0.1890	H28B	-0.9203	0.1527	0.1868
C27	-0.7093	0.1903	0.1763	H28C	-0.8515	0.2497	0.2160
C26	-0.7420	0.1648	0.1343				
C28	-0.8290	0.1780	0.2024				
C29	-0.8460	0.1070	0.1744				
C30	-0.6990	0.2550	0.1410				

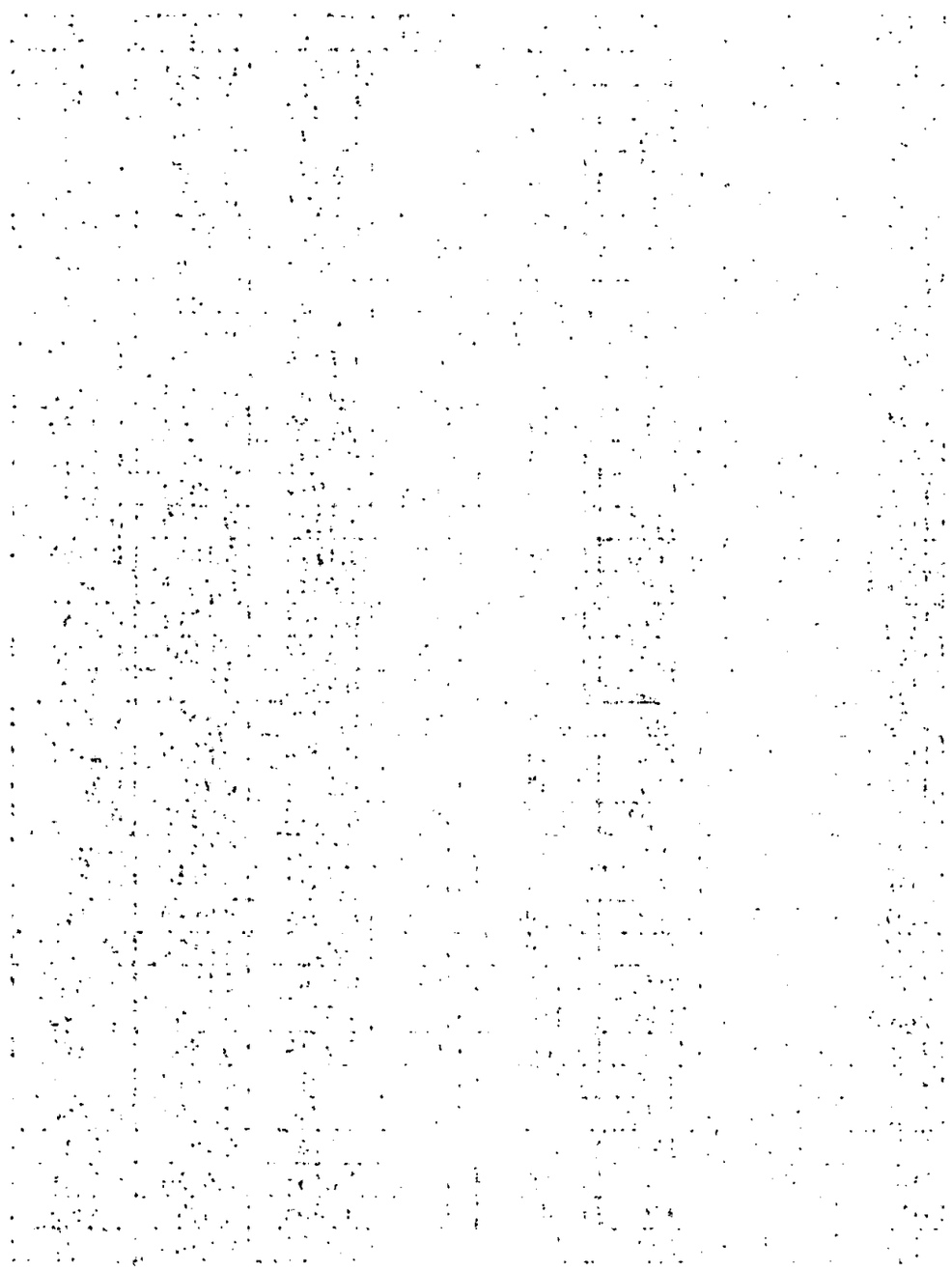
TABLE 8

Atomic Coordinates for Example 2f, Base Form RPG-3

Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
F1	1.4700	0.5720	0.6614	N2	0.6350	0.3813	0.3765
F7	1.4119	0.5575	0.7000	N6	0.2687	0.8628	0.3992
F2	1.4315	0.5398	0.7741	N4	0.3398	0.7349	0.3149



Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
F8	1.5600	0.5336	0.8131	N1	0.8898	0.3354	0.4598
F3	1.6320	0.5630	0.7860	N5	0.0527	0.9107	0.3489
F9	1.6111	0.5864	0.6960	C12	0.4202	0.2078	0.3911
N9	0.7997	-0.0295	0.8348	O1	0.6129	0.7507	0.2839
N8	0.7989	0.1232	0.9974	C10	0.7273	0.4981	0.3447
N11	1.1628	-0.0946	0.6829	C6	0.8597	0.4735	0.3332
N10	1.0937	0.0679	0.7424	C9	0.7661	0.6239	0.4071
N7	0.5331	0.0253	1.0441	C20	0.1173	0.7695	0.2548
N12	1.3802	-0.0414	0.6342	C19	0.0264	0.8385	0.2716
O3	0.8190	0.0931	0.7142	C5	0.9561	0.4627	0.4193
O4	1.0177	0.2159	0.9737	C17	0.2435	0.7914	0.3234
C34	0.7187	0.1296	0.9094	C8	0.8573	0.6109	0.4957
C45	1.3119	0.1383	0.6926	O2	0.4273	0.3887	0.2980
C37	0.6769	0.0002	0.8509	C24	-0.0460	0.6680	0.1174
C30	0.4799	0.0412	0.9508	C16	0.4606	0.7449	0.3864
C42	1.1869	0.0349	0.7058	C22	0.0802	0.6875	0.1776
C31	0.5850	0.1596	0.9161	C14	0.5786	0.7190	0.3544
C49	1.4737	0.3643	0.7029	C7	0.9892	0.5850	0.4828
C33	0.5750	-0.1179	0.8869	C23	-0.1359	0.7367	0.1342
C47	1.3487	0.2751	0.7153	C18	0.1707	0.9200	0.4061
C40	0.8584	0.0198	0.7679	C25	-0.0848	0.5788	0.0372
C32	0.4447	-0.0846	0.8933	C13	0.5736	0.6259	0.4906
C41	0.9773	-0.0327	0.7663	C21	-0.1010	0.8179	0.2096
C39	1.0115	-0.0750	0.8618	C4	0.9438	0.1985	0.3554
C35	0.9405	0.1730	1.0250	C3	0.9469	0.2256	0.4509
C38	0.8681	-0.1166	0.8863	C15	0.4317	0.6466	0.4565
C28	0.4760	0.0765	1.1130	C2	1.0956	0.2572	0.5066
C43	1.2625	-0.1234	0.6483	C11	0.4953	0.3347	0.3508
C44	1.4064	0.0935	0.6556	C1	0.8466	0.1026	0.4843
C46	1.5338	0.1870	0.6430	F4	-0.1040	0.4554	0.0598
C48	1.5649	0.3202	0.6666	F5	0.0211	0.6100	-0.0030
C36	1.0000	0.1703	1.1211	F6	-0.1869	0.5900	-0.0238
C29	0.5552	0.0482	1.2020	F10	-0.2221	0.5070	0.0190
C27	0.3192	0.0052	1.1006	F11	-0.0370	0.4791	0.0400
C26	0.5156	0.2276	1.1108	F12	-0.0360	0.6334	-0.0302
C50	1.5103	0.5068	0.7292	O7	0.3015	0.5242	0.1820
N3	0.6420	0.6560	0.4169	O8	0.5067	0.7155	0.1016
C55	0.4573	0.5719	0.0792	H12C	0.3410	0.1518	0.3473
C56	0.3131	0.5089	0.0936	H10A	0.6770	0.5138	0.2867
C54	0.4592	0.5517	-0.0152	H6A	0.8326	0.3912	0.2958
O5	1.1135	0.3136	0.8309	H6B	0.9113	0.5467	0.3027
O6	0.9224	0.3638	0.6775	H9	0.8236	0.6994	0.3801
C52	0.9658	0.4383	0.7607	H95	1.0446	0.4603	0.4067
C53	1.0998	0.4403	0.8150	H8B	0.8035	0.5371	0.5249
C51	0.9706	0.5801	0.7445	H8C	0.8845	0.6928	0.5336



Atom	X	Y	Z	Atom	X	Y	Z
H8	0.7521	0.0843	1.0354	H16	0.4967	0.8363	0.4153
H10	1.1043	0.1515	0.7516	H22	0.1413	0.6448	0.1660
H34	0.7767	0.2034	0.8813	H7A	1.0479	0.6636	0.4601
H37	0.6246	0.0147	0.7931	H77B	1.0425	0.5720	0.5399
H30	0.3926	0.0620	0.9462	H23	-0.2199	0.7261	0.0931
H31A	0.5395	0.1776	0.8580	H18	0.1897	0.9731	0.4584
H31B	0.6110	0.2396	0.9557	H13A	0.6288	0.6865	0.5425
H33A	0.5480	-0.1985	0.8476	H13B	0.5604	0.5340	0.5057
H33B	0.6213	-0.1349	0.9450	H21	-0.1626	0.8605	0.2204
H47	1.2884	0.3066	0.7391	H4A	0.8479	0.1679	0.3217
H32A	0.3953	-0.0742	0.8343	H4B	0.9856	0.1305	0.3502
H32B	0.3818	-0.1587	0.9172	H4C	0.9960	0.2797	0.3330
H41	0.9434	-0.1120	0.7240	H15A	0.3587	0.5626	0.4312
H39A	1.0471	-0.1496	0.8633	H15B	0.4034	0.6838	0.5038
H39B	1.0801	-0.0006	0.9013	H2A	1.1552	0.3410	0.4913
H38A	0.8152	-0.2110	0.8689	H2B	1.1310	0.1867	0.4955
H38B	0.8786	-0.0998	0.9495	H2C	1.0948	0.2640	0.5683
H43	1.2434	-0.2140	0.6327	H1A	0.8496	0.1213	0.5456
H46	1.5955	0.1582	0.6190	H1B	0.8758	0.0261	0.4785
H48	1.6483	0.3822	0.6582	H1C	0.7522	0.0839	0.4497
H36A	1.0650	0.1213	1.1285	H99	0.9009	0.3500	0.5070
H36B	0.9249	0.1270	1.1498	H7	0.3628	0.5029	0.2157
H36C	1.0484	0.2607	1.1471	H8A	0.5335	0.7307	0.1555
H29A	0.5101	-0.0427	1.2144	H55	0.5214	0.5322	0.1164
H29B	0.5546	0.1090	1.2479	H56A	0.2502	0.5475	0.0555
H29C	0.6509	0.0606	1.1995	H56B	0.2814	0.4136	0.0755
H27A	0.2727	0.0063	1.0399	H54A	0.4034	0.5980	-0.0510
H27B	0.2829	0.0501	1.1386	H54B	0.4208	0.4574	-0.0335
H27C	0.3022	-0.0863	1.1155	H54C	0.5546	0.5867	-0.0221
H26A	0.6150	0.2666	1.1142	H5	1.0835	0.2863	0.8748
H26B	0.4925	0.2636	1.1602	H6	0.9213	0.2865	0.6847
H26C	0.4641	0.2486	1.0564	H52	0.8933	0.3997	0.7941
H100	0.5160	-0.0550	1.0510	H53A	1.1740	0.4907	0.7866
H2	0.6741	0.3386	0.4153	H53B	1.1148	0.4884	0.8717
H4	0.3295	0.6914	0.2656	H51A	1.0458	0.6226	0.7158
H12A	0.3879	0.2319	0.4404	H51B	0.9866	0.6294	0.8002
H12B	0.4843	0.1597	0.4113	H51C	0.8826	0.5788	0.7073

TABLE 9

[00277] Characteristic powder x-ray diffraction peak positions (degrees 2θ±0.1)@ RT for Examples 2a, b, d, c, d, e, f, and g based on a high quality pattern collected

with a diffractometer (CuKα) with a spinning capillary with 2θ calibrated with a NIST other suitable standard

Exp 2a	Exp 2b	Exp 2c	Exp 2d	Exp 2e	Exp 2f	Exp 2g
5.2	5.5	5.1	5.3	5.4	6.3	6.9
7.9	9.1	6.9	9.6	9.4	9.0	8.7
17.1	12.1	7.4	13.7	11.2	11.7	9.8
17.6	14.0	10.2	14.7	13.7	15.0	10.3
19.6	19.2	18.0	19.5	19.1	17.6	11.8

COMPARATIVE PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS

[00278] Assays and data comparing the pharmacological characteristics of Example 1 and compounds found in WO2005021500 (corresponding to US Pat No.7,163,937, assigned to present Applicant) are presented below.

Human peripheral blood mononuclear cell binding ("CCR2 Binding")

[00279] *See e.g.* Yoshimura et al., *J. Immunol.* **1990**, *145*, 292. The human CCR2 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 $1x10^7$/ml in binding buffer (RPMI-1640, 0.1%BSA, 20 mM Hepes, pH 7.4). ^{125}I-MCP-1 (NEN/Perk Elmer) was diluted to 0.45 nM in binding buffer. The 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 µl were added $5x10^5$ cells, 0.15 nM ^{125}I-MCP-1, and compound 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 temperature. This was followed by adding 25 µl 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%.

hERG Flux

[00280] HEK293 cells stably-expressing hERG channels were grown (37 °C, 5% CO_2) in Dulbecco's Modified Eagle's Media supplemented with 10% Sigma fetal bovine serum, non-essential amino acids, 2mM L-glutamine and 500 μg/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 at a density of 2 x 10^4 cells per well (20 μl) in 10% serum media, and incubated for 15-24 hours at 37 °C in a 5% CO_2 incubator until a confluent monolayer of cells was obtained.

[00281] 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 the day of assay. The dye was then diluted in hERG external EP buffer (140 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1.0 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.3 and 10 mM glucose; all buffer components obtained from Sigma Chemical). This BTC dye mixture (30 μl) was added to the cells and produced a final loading concentration of 2.5 μM. Cells are incubated at 21 °C for 45 minutes.

[00282] Test compounds were diluted to 10 mM DMSO in 60 μl. These compounds were 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 μl 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 compounds were 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.

[00283] Cells loaded with dye were read on the FLIPR384 (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 K_2SO_4

and 1.3 mM Tl_2SO_4 (Sigma/Aldrich). For each plate, data were collected every second for a period of 12 seconds, at which time the Tl^+-containing stimulus buffer was added. Data collection proceeded every second for 48 seconds, and then continued every three seconds for an additional 2 minutes.

[00284] 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 Tl^+ 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 Tl^+ flux for a given condition of test compound. Potencies (IC_{50} values) of compounds were calculated from the average of triplicate wells.

Sodium channel, site 2 binding assay

[00285] See also: W. A. Catterall, et al. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 8922. 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 $MgCl_2$, 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 [^{3}H]-Batrachotoxin in a standard binding buffer and the compound to be tested at the desirable concentration. Samples 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 $CaCl_2$, 0.8mM $MgCl_2$ 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 [^{3}H]-Batrachotoxin remaining on the filters was counted using liquid scintillation spectrometers.

Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)

[00286] The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) consists of a specially formulated lecithin-based lipid combination referred to as the 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. The rate of passage of compounds through the PAMPA membrane is used to determine a permeability coefficient (Pc), which can be related to the *in vivo* passive permeability of the compound.

[00287] The permeability coefficient (Pc) of a particular compound is examined in a pH-dependent setting with apical and basolateral pH of 7.4. All experiments are conducted in triplicate determinations.

[00288] Compounds (10 mM stocks in 100% DMSO) were 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 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 μl/well). The donor, acceptor, reference, and blank plates were read in the SpectraMax UV plate reader. Data was captured by the pION software, which analyzes the spectra and generates Pc values.

CCR2 Chemotaxis

[00289] The human CCR2 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 $1x10^5$/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 μM. 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 μl of Mixture 1 in the top chamber and 225 μl 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 μl of labeled THP-1 cells alone ($5x10^4$/well) were placed into the top chamber and 225 μl 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 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.

hERG Patch Clamp

[00290] Whole-cell patch-clamp was used to directly measure hERG currents in 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 measuring inhibition of peak tail current

Sodium channel Patch Clamp

[00291] Whole-cell patch-clamp was used to directly measure inward sodium currents in HEK-293 cells expressing the human cardiac sodium channel, SCN5A. 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 frequencies of 1 Hz and 4 Hz.

Single-dose Pharmacokinetics in Rats

[00292] 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 samples (~0.3 mL) were collected from the jugular vein into K_2EDTA-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.

Single-dose Pharmacokinetics in Monkeys

[00293] 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.

Data analysis for pharmacokinetic assays

[00294] 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 (Cmax) and time for Cmax 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 (CLTp), steady-state volume of distribution (Vss), apparent elimination half-life (T1/2) and mean residence time (MRT) were estimated after IV administration.

Estimations of T1/2 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.

[00295] Find below data for each compound as measured in the assays described above.

Table 10. Comparative In Vitro Data

Compound	CCR2 Binding IC_{50} (nM)	hERG FLUX IC_{50} (nM)	Na^+ channel binding (% inhibition)	PAMPA permeability (nm/sec)
Example 12as, WO2005021500	0.27 (*1*)	2,800	Not available	Not available
Example 12aj WO2005021500	0.43 ± 0.06 (2)	770	Not available	Not available
Example 2k WO2005021500	0.88 ± 0.60 (23)	51,000	97%, 10,000 nM	529 ± 157 (*9*)
Example 12bd WO2005021500	1.15 ± 0.07 (2)	>80,000	54%, 10,000 nM	392
Example 8a WO2005021500	1.83 ± 0.80 (*12*)	>80,000	3%, 10,000 nM 33%, 30,000 nM	94 ± 58 (*10*)
Example 8e, WO2005021500	2.20 ± 0.03 (2)	>80,000	6%, 10,000 nM	2 ± 2 (*2*)
Example 9c, WO2005021500	0.96 ± 0.26 (19)	>80,000	48%, 10,000 nM 75%, 30,000 nM	145 ± 71 (*8*)
Example 1 Present Invention	2.74 ± 1.34 (15)	>80,000	13%, 10,000 nM 32%, 30,000 nM	560 ± 86 (*5*)

Table 11a. Additional Comparative In Vitro Data

Compound	CCR2 Chemotaxis IC_{50} (nM)	hERG patch clamp (% Inhib.)	Na^+ channel patch clamp (% Inhib.)
Example 2k WO2005021500	0.24 ± 0.16 (*12*)	83%, 10,000 nM	52%, 10,000 nM 90%, 30,000 nM
Example 8a WO2005021500	2.63 ± 1.24 (*4*)	4%, 10,000 nM	22%, 10,000 nM 49%, 30,000 nM
Example 9c, WO2005021500	0.21	4%, 10,000 nM	19%, 10,000 nM 39%, 30,000 nM
Example 1, Present Invention	0.75 ± 0.42 (*16*)	12%, 10,000 nM 19%, 30,000 nM	29%, 30,000 nM

Table 11b. 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 WO2005021500	2.5 / 25	40	68	9294
Example 8a WO2005021500	6 / 72	42	1.4	690
Example 9c,	4 / 43	54	14	1855

WO2005021500				
Example 1, Present Invention	2 / 10	25	79	10169

Table 11c. 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 WO2005021500	1 / 1.4	25	46	862
Example 8a WO2005021500	1 / 11	14	9.4	1896
Example 9c, WO2005021500	1 / 10	12	26	6763
Example 1, Present Invention	1 / 1	12	95	2352

UTILITY

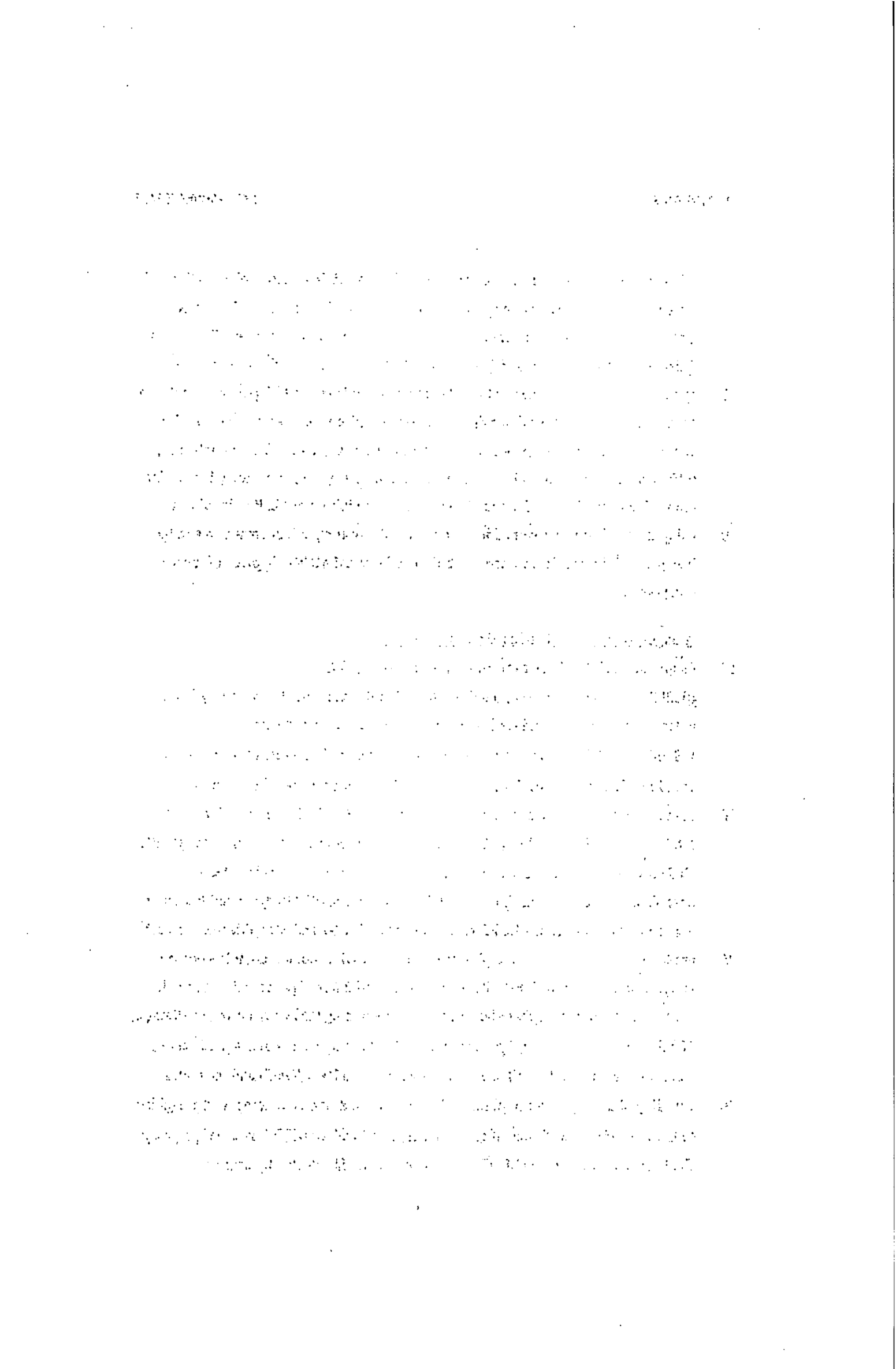
[00296] Representative compounds of the examples are shown to be modulators of chemokine receptor activity using assays know by those skilled in the art. In this section, we describe such assays and give their literature reference. More assays are described herein in the section titled "Comparative Pharmacological 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 IC_{50} of 30 μM or lower in concentration when measured in a particular assay.

Antagonism of MCP-1 Binding to Human PBMC

(Yoshimura et al., *J. Immunol.* 1990, *145*, 292)

[00297] At least one compounds described in the examples have activity in the antagonism of MCP-1 binding to human PBMC (human peripheral blood mononuclear cells) described here.

[00298] Millipore filter plates (#MABVN1250) are treated with 100 μl of binding buffer (0.5% bovine serum albumin, 20 mM HEPES buffer and 5 mM magnesium chloride in RPMI 1640 media) for thirty minutes at room temperature. To measure binding, 50 μl of binding buffer, with or without a known concentration compound, is combined with 50 μl of ^{125}-I labeled human MCP-1 (to give a final concentration of



150 pM radioligand) and 50 µl of binding buffer containing $5x10^5$ cells. Cells used for such binding assays can include human peripheral blood mononuclear cells isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation, human monocytes (Weiner et al., *J. Immunol. Methods.* **1980**, *36*, 89), or the THP-1 cell line which expresses the endogenous receptor. The mixture of compound, cells and radioligand are incubated at room temperature for thirty minutes. Plates are placed onto a vacuum manifold, vacuum applied, and the plates washed three times with binding buffer containing 0.5M NaCl. The plastic skirt is removed from the plate, the plate allowed to air dry, the wells punched out and counted. The percent inhibition of binding is calculated using the total counts obtained in the absence of any competing compound and the background binding determined by addition of 100 nM MCP-1 in place of the test compound.

Antagonism of MCP-1-induced Calcium Influx

(Sullivan, et al. Methods Mol. Biol., 114, 125-133 (1999)

[00299] At least one compounds described in the examples have activity in the antagonism of MCP-1-induced calcium influx assay described here.

[00300] Calcium mobilization is measured using the fluorescent Ca^{2+} indicator dye, Fluo-3. Cells are incubated at 8 x 10^5 cells/ml in phosphate-buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, 20 mM HEPES buffer, 5 mM glucose, 1% fetal bovine serum, 4 µM 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 endogenous CCR2 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 10^6 cells/ml. Cells are plated into 96-well, black-wall microplates.(100 µl/well) and the plates centrifuged at 200 x g for 5 minutes. Various concentrations of compound are added to the wells (50 µl/well) and after 5 minutes, 50 µl/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 (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.

Antagonism of MCP-1-induced Human PBMC Chemotaxis

(Bacon et al., *Brit. J. Pharmacol.* **1988**, *95*, 966)

[00301] At least one compounds described in the examples have activity in the antagonism of MCP-1-induced human PBMC chemotaxis assay described here.

[00302] Neuroprobe MBA96-96-well chemotaxis chamber, Polyfiltronics MPC 96 well plate, and Neuroprobe polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate PFD5 8-micron filters are warmed in a 37 ^{0}C incubator. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) (Boyum et al., *Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl.* **1968**, *97*, 31), freshly isolated via the standard ficoll density separation method, are suspended in DMEM at 1 x 10 ^{7} c/ml and warmed at 37^{0}C. A 60nM solution of human MCP-1 is also warmed at 37^{0}C. Dilutions of test compounds are made up at 2x the concentration needed in DMEM. The PBMC suspension and the 60nm MCP-1 solution are mixed 1:1 in polypropylene tubes with prewarmed DMEM with or without a dilution of the test compounds. These mixtures are warmed in a 37^{0}C tube warmer. To start the assay, add the MCP-1/compound mixture into the wells of the Polyfiltronics MPC 96 well plate that has been placed into the bottom part of the Neuroprobe chemotaxis chamber. The approximate volume is 400µl to each well and there should be a positive meniscus after dispensing. The 8 micron filter is placed gently on top of the 96 well plate, a rubber gasket is attached to the bottom of the upper chamber, and the chamber is assembled. A 200µl volume of the cell suspension/compound mixture is added to the appropriate wells of the upper chamber. The upper chamber is covered with a plate sealer, and the assembled unit is placed in a 37^{0}C incubator for 45 minutes. After incubation, the plate sealer is removed and all the remaining cell suspension is aspirated off. The chamber is disassembled and the filter gently removed. While holding the filter at a 90 degree angle, unmigrated cells are washed

away using a gentle stream of phosphate buffered saline and the top of the filter wiped with the tip of a rubber squeegee. Repeat this wash twice more. The filter is air dried and then immersed completely in Wright Geimsa stain for 45 seconds. The filter is then washed by soaking in distilled water for 7 minutes, and then a 15 second additional wash in fresh distilled water. The filter is again air dried. Migrated cells on the filter are quantified by visual microscopy.

[00303] 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.

[00304] 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.

[00305] 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.

[00306] 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.

CCR5 Binding and Functional Assays

[00307] Cell derivation and cell culture: A pool of HT1080 cells stably expressing endogenous CC chemokine receptor 5 (CCR5) were developed using the methods outlined by Harrington, Sherf, and Rundlett (see United States patents US 6,361,972 and US 6,410,266). The highest-expressing clones were isolated using repetitive flow cytometry, followed by sub-cloning. These cells were then cultured in 6-well dishes at 3 x 10^5 cells/well and transfected with a DNA vector containing the chimeric HA-tagged G protein Gqi5 (Molecular Devices; 5 micrograms of linearized vector DNA in 15 microL of Ex-Gen from Fermentes was used for the transfection). Two days after transfection, the wells were combined and plated into P100 plates. Seven days after plating, colonies were picked, expanded, and analyzed for Gqi5 content by Western blot. A clone (designated as 3559.1.6) having high expression of Gqi5 (from transfection) and of CCR5 (endogenous) was selected and used for the experiments described below. The HT1080 cells (clone 3559.1.6) were cultured with alpha-MEM supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin/glutamine, and 500 microgram/mL hygromycin B (final concentration) at 37° C with 5% CO_2 in a humidified atmosphere.

[00308] Membrane Preparation: A cell pellet containing 1 x 10^8 HT1080 cells (clone 3559.1.6) was resuspended in 5 mL of ice-cold Membrane Prep Buffer (50 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$) and homogenized at high-speed on a Polytron homogenizer for 20 sec on ice. The homogenate was diluted with another

25 mL of Membrane Prep Buffer and centrifuged for 12 min (48,000 x g at 4°C). The cell pellet was resuspended in 5 mL of Membrane Prep Buffer before being rehomogenized as described previously. The homogenate was diluted with 5 mL of Membrane Prep Buffer and assayed for CCR5 protein concentration.

[00309] Binding assay: The freshly-prepared homogenate from the Membrane Preparation described above was diluted in Binding buffer (50 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.1% BSA; one complete protease inhibitor tablet was added before assay) to achieve a final protein concentration of 10 micrograms/well (solid white 96-well plates from Corning, Inc.). This membrane preparation was mixed with WGA-SPA beads (Amerhsam; pre-soaked in Binding buffer) to give a concentration of 200 micrograms/well. The membrane/SPA bead mix (100 microliters/well) was then added to a plate that had been pre-dotted with 2 microliters DMSO containing various concentrations of test articles (pure DMSO for negative control; various concentrations of examples of this invention for test articles; 500 nM MIP-1 beta as a positive control). The binding assay was initiated through the addition of 50 microliters of [^{125}I]-MIP-1 beta (Perkin Elmer; material was diluted in Binding buffer such that the addition of 50 microliters/well gives a final concentration of 0.1 nM [^{125}I]-MIP-1 beta). The plate was sealed and allowed to stand at room temperature for 4 – 6 h before being counted on a Packard TopCount. The percentage bound for the test article was calculated, using negative and positive controls to define the window for each experiment.

[00310] Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR)-based Functional assay: 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 Fluro-4 AM fluorescent dye (prepared by dissolving 1 mg Fluro-4 AM in 440 microliters DMSO and diluting with 100 microliters of pluronic solution before diluting further with 10 mL of Hanks buffer). The cells were incubated at 37° C with 5% CO_2 for 30 min before being washed three times and suspended in Assay Buffer (20 mM HEPES, 1.2 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 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 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 relative to 0.4% DMSO/Buffer negative control.

[00311] At least one compound of the disclosure is an inhibitor of both CCR2 and CCR5 and may be used to treat diseases associated with either chemokine. The compounds of the present invention are considered dual antagonists.

[00312] Diseases or conditions of human or other species which can be treated with inhibitors of chemokine receptor function, include, but are not limited to: 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, Sjogren'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.

[00313] 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 (Ancylostona 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.

[00314] 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.

[00315] 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.

[00316] Compounds disclosed herein are useful to treat or prevent disorders 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, 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 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.

[00317] In another aspect, the compounds are useful to treat or prevent 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.

[00318] In another aspect, the compounds are used to treat or prevent inflammatory disorders selected from rheumatoid arthritis, osteoarthritis, atherosclerosis, Crohn's disease, inflammatory bowel diseases, and multiple sclerosis.

[00319] 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 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 Burketts 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, rhabdomyoscarcoma, and osteosarcoma; and

other tumors including melanoma, xenoderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, thyroid follicular cancer, and teratocarcinoma.

[00320] 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.

[00321] The present invention provides methods for the treatment of a variety of non-cancerous proliferative diseases.

[00322] 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 lipoxygenase 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, fentaynl, 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 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, hydrocodone, caramiphen, carbetapentane, or dextramethorphan; 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 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 include those that also contain one or more other active ingredients, in addition to a compound of the present disclosure.

[00323] 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 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, diphenhydramine, diphenylpyraline, tripelennamine, 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 b2-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 tenoxican), 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 and pravastatin, fluvastatin, atorvsatatin, and other statins), sequestrants (cholestyramine and colestipol), nicotonic acid, fenofibric acid

derivatives (gemfibrozil, clofibrat, fenofibrate and benzafibrate), and probucol; (k) anti-diabetic agents such as insulin, sulfonylureas, biguanides (metformin), a-glucosidase inhibitors (acarbose) and glitazones (troglitazone and pioglitazone); (l) preparations of interferons (interferon alpha-2a, interferon-2B, interferon alpha–N3, interferon beta-1a, interferon beta-1b, interferon gamma-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.

[00324] 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 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.

[00325] In treating cancer, a combination of chemotherapeutic agents and/or other treatments (e.g., radiation therapy) is often advantageous. The second (or third) agent 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 in treating the particular disease state manifested by the patient.

[00326] 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 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 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.

[00327] The second (or more) anti-cancer agents may be selected from any one or more of the following:

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 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 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 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;

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.

[00328] 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 nausea, hypersensitivity and gastric irritation, such as antiemetics, and H_1 and H_2 antihistaminics.

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.

[00329] 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.

DOSAGE AND FORMULATION

[00330] 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.

[00331] 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.

[00332] 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 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 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, 100, 300, and 600 mg administered either once or twice a day.

[00333] 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 throughout the dosage regimen.

[00334] 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 consistent with conventional pharmaceutical practices.

[00335] 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 callulose, 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 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.

[00336] 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.

[00337] 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 and polyglycolic acid, polyepsilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydropyrans, polycyanoacylates, and crosslinked or amphipathic block copolymers of hydrogels.

[00338] 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.

[00339] 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.

[00340] Liquid dosage forms for oral administration can contain coloring and flavoring to increase patient acceptance.

[00341] 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.

[00342] Suitable pharmaceutical carriers are described in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, a standard reference text in this field.

[00343] Representative useful pharmaceutical dosage-forms for administration of the compounds of this invention can be illustrated as follows:

Capsules

[00344] 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.

Soft Gelatin Capsules

[00345] A mixture of active ingredient in a digestable 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.

Tablets

[00346] 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 milligrams of starch and 98.8 milligrams of lactose. Appropriate coatings may be applied to increase palatability or delay absorption.

Injectable

[00347] 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.

Suspension

[00348] 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.

[00349] 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 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.

[00350] Where two or more of the foregoing second therapeutic agents are administered with the compound of the examples, generally the amount of each 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.

[00351] Particularly when provided as a single dosage unit, the potential exists for a chemical interaction between the combined active ingredients. For this reason, 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.

[00352] 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.

[00353] 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.

[00354] "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.

[00355] 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 its preparation.

[00356] 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 that as specifically described herein.

IN VIVO ASSAYS AND EFFICACY

[00357] N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide (also referred to as "Example 1") was evaluated in the following in vivo assays as described below.

Section 1. Example 1 blocked mononuclear cell recruitment to the skin following intradermal (ID) MCP-1 challenge in cynomolgus monkey.

[00358] Intradermal injection of MCP-1 results in the infiltration of mononuclear cells to the injection site. This model was initially developed to assess the inhibitory effect of CCR2 antagonists on the infiltration of mononuclear cells to the skin tissue

injected with human MCP-1. The cellular infiltrate can be measured semi-quantitatively by histological scoring.

Methods

[00359] Each monkey was dosed with Example 1 or its vehicle control (0.05 N HCl) once daily for three days. Example 1 was orally administered at doses of 0, 5, 10, or 20 mg/kg to groups of 4 cynomolgus monkeys (2 per sex per group). Immediately after dosing on Day 3, all animals received 2 intradermal injections of 10 μg (50 μL/injection) of human MCP-1 (R & D Systems) and 2 intradermal injections of its DPBS control (50 μl/injection) at separate sites on the dorsal thorax. Dermal biopsies of all sites were obtained at approximately 18 hours following MCP-1 (or DPBS) challenge. Biopsies were processed for semi-quantitative histological evaluation. Representative sections of skin samples were examined by light microscopy; microscopic lesions and cellular infiltration were noted and their incidences were tabulated.

[00360] In addition to biopsy analysis, blood was collected and evaluated for complete blood counts and cell differentials. Also evaluated were plasma samples for compound (and metabolite) concentrations, and serum samples for systemic MCP-1 levels.

Results

[00361] The recruitment of mononuclear cells to the skin of vehicle-treated control animals in response to MCP-1 challenge was significant (mean histologic score of 2.0 with a range of 1-3, Table 10). Example 1 at 5, 10, and 20 mg/kg inhibited this dermal mononuclear cell infiltration by 75%, 95% and 95%, respectively (Table 10 and Figure 20). The compound also blocked the infiltration of other cell types such as eosinophils and neutrophils (Table 12). The plasma concentrations of Example 1at 18 hours and their relationship to levels of inhibition and Cyno chemotaxis IC90 values are summarized in Table 12. Based on the IC50 value of 7.1 ± 2.7 nM for Example 1 in cyno chemotaxis assay, the 5, 10 and 20 mg/kg doses resulted in free plasma concentrations of 0.8-, 2.1-, and 4.3-fold the chemotaxis IC90 at 18 hours post dosing (Table 12).

TABLE 12

Summary of effects of Example 1 on infiltration of mononuclear cells and other cell types in response to MCP-1 challenge in cynomolgus monkeys [a,b]

Doses mg/kg	Free plasma concentration (nM)	Fold Chemotaxis IC90	Mononuclear cell score (range) (inhibition%)	PMN[c] score (range)	Eos[d] score (range)	Total cell score (range)
0	0	0	2.0 (1 - 3) (0%)	0.3 (0 - 1)	1.5 (0.5 - 3)	4.0 (2 -6[e])
5	99	0.8	0.5 (0 - 1) (75%)	0.1 (0 - 0.5)	1.4 (1 - 2)	2.0 (1 - 3)
10	248	2.1	0.1 (0 - 0.5) (95%)	0.1 (0 - 0.5)	0.8 (0.5 - 1)	1.0 (0.5 - 2)
20	512	4.3	0.1 (0 - 0.5) (95%)	0 (0 - 0)	0.8 (0.5 - 1)	0.9 (0.5 - 1)

[a] An arbitrary scaling system from 0 to 4 was utilized with each number representing a particular designation of inflammatory infiltrate as follows: 0, unremarkable number of inflammatory cells; 0.5, trace; 1, minimal; 2, mild; 3, moderate; 4, marked infiltration.

[b] Mean values are an average of 8 MCP-1 site biopsies, representing 2 separate biopsies from 4 monkeys per group. Ranges represent the spread of average histological scores for 2 biopsies per animal.

[c] PMN stands for polymorphonuclear cell (neutrophil).

[d] Eos is an abbreviation for eosinophils.

[e] Total score is a mathematical sum of mean values for each cell type to demonstrate the dose response.

[00362] Evaluation of changes in serum inflammatory mediators showed an increase (approximately 3-4 fold) in MCP-1 level in Example 1-treated groups relative to vehicle control. In addition, complete blood count (CBC) analysis showed

an increase (~2-fold) in neutrophils in Example 1-treated groups, relative to vehicle control, at 18 hours on Day 4 following three days of dosing.

[00363] To refine the dose (concentration) response of Example 1 in a more readily quantifiable system, we used hCCR2 KI mice to evaluate the effect of Example 1 monocyte/macrophage infiltration in thioglycollate (TG)-induced peritonitis model with flow cytometry-based methodology.

Section 2. Example 1 inhibited monocyte/macrophage infiltration in 48-hour TG peritonitis model in hCCR2 KI mouse

[00364] TG-induced peritonitis model has been used as a model of recruitment of monocytes/macrophages to inflammation site. Both in-house and published studies have demonstrated that monocyte/macrophage recruitment in this model is CCR2-dependent. *See* Boring L. et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.* J Clin Invest., 100(10):2552-61. (1997); and Kuziel, W.A. et al., *Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2.* Proc Natl Acad Sci U S A. 94(22):12053-8 (1997).

Methods

[00365] For the 48-hour TG peritonitis study, Example 1 was dosed twice a day with the first dose given one hour prior to TG injection. Total peritoneal cell counts were obtained on isolated cells by a cell counter. Blood was also collected in heparin from the retro-orbital sinus at the end of each study for flow cytometry and in EDTA for determination of drug concentration.

[00366] For flow cytometric analysis, peritoneal exudate cells ($1x10^6$) 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-hCCR2. 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 µl 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

[00367] Example 1 was evaluated in the hCCR2 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 1, 25, or 100 mg/kg BID. Forty eight hours post TG treatment, peritoneal lavage was obtained for cellular infiltrate analysis by flow cytometry.

[00368] To distinguish between the recruited monocyte/macrophages versus resident macrophages and granulocytes, staining of both F4/80 and Ly6C monocyte/macrophage surface markers was used to define the recruited monocyte/macrophages. A dose-dependent inhibition in monocyte/macrophage infiltration was observed (Figure 2i). Doses of 1, 25, and 100 mg/kg gave an inhibition of 24%, 74% and 78%, respectively. In three separate studies with multiple doses, the average EC50 for inhibition of monocyte/macrophage infiltration by this analysis was estimated to be 3.9 nM.

[00369] To assess the in vivo level of receptor occupancy by Example 1 in the 48-hour thioglycolate peritonitis model in the hCCR2 KI mouse, plasma levels of both Example 1 and mouse MCP-1 were measured. The caveat for this estimation is that only CCR2 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 Gaddum equation:

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

[00370] Since Example 1 is a competitive inhibitor of MCP-1 binding to CCR2, the amounts of both mouse MCP-1/CCR2 receptor complex and Example 1/CCR2 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 hCCR2 is 0.91 +/- 0.08 nM (n=8) which was determined in cold competition ligand binding experiments using ^{125}I-human MCP-1. The average K_i for Example 1 binding to hCCR2 is 1.3 nM. The fraction of mouse MCP-1/CCR2 receptor complexes is determined using the form of the equation described above. To determine the fraction of Example 1/CCR2 complexes the equation is re-defined as:

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

Finally, the amount of CCR2 free is determined from:

$$[CCR2]_{total} = [CCR2]_{free} + [\text{mouse MCP-1/CCR2}] + [\text{Example 1/CCR2}]$$

[00371] As shown in Table 13, the percent inhibition of monocyte/macrophage infiltration into the peritoneum at 48 hour reflects the percentage of Example 1/CCR2 receptor complex.

TABLE 13

Determination of in vivo receptor occupancy of Example 1 in blood of hCCR2 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 CCR2 binding)	% mouse MCP-1 bound CCR2	% of Example 1-bound CCR2	% free CCR2	% inhibition of monocyte/ macrophage infiltration[a]
100	0.015	53 (1.8)	0.04	97.6	2.4	78
25	0.017	14 (0.5)	0.16	91.2	8.6	74
1	0.005	1.4 (0.05)	0.26	51.4	48.3	24
0 (vehicle)	0	0	0	0	100	0

Section 3. Chronic Efficacy Studies

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Methods

[00372] To assess the effect of Example 1 on chronic models of disease, we used the EAE model of multiple sclerosis in hCCR2 KI mice. To study the effect of Example 1 on EAE model, 10 mice per group were used. On day 0, hCCR2 KI mice were immunized subcutaneously with a total of 200 µl of 300 µg myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 (Genemed Synthesis) mixed 1:1 with 300 µg Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) (Becton-Dickinson) in incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma-Aldrich). On day 0 (two hours post-immunization) and day 2, mice were injected intraperitoneally with 100 µl of 400 ng pertussis toxin. Clinical scoring began on day 10, continued three times per week throughout the study, and was based on a scale of 0-5: 0, no signs of disease; 0.5, partial tail weakness; 1, limp tail or waddling gait with tail tonicity; 1.5, waddling gait with partial tail weakness; 2, wadding gait with limp tail (ataxia); 2.5 (ataxia with partial limb paralysis; 3, full paralysis of one limb; 3.5, full paralysis of one limb with partial paralysis of a second limb; 4, full paralysis of two limbs; 4.5, moribund; 5, death. Oral dosing of Example 1 at 25 mg/kg and 55 mg/kg (BID) was initiated on day 1.

Results

[00373] Example 1 at both doses reduced the area under curve (AUC) of the clinical score by 49% ($p < 0.05$) (Figure 22). The IC50 is 3.7 nM for Example 1 in ^{125}I-mouse MCP-1 binding to hCCR2-expressing cells, hPBMCs (mimicking hCCR2 KI setting). Based on this IC50 value, the 25 and 55 mg/kg doses resulted in a free plasma trough concentration of 1- and 3-fold the binding IC90. Histological evaluation of the spinal cord on Day 22 did not demonstrate a significant difference in total inflammatory cellular infiltrate between mice treated with Example 1 versus vehicle. A marked neutrophil infiltrate was observed in mice treated with compound.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound that is N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaccutically acceptable salt thereof.

2. A compound of claim 1 that is a crystalline form of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

3. The crystalline form of claims 1-2, comprising the N-2 form.

4. The crystalline form of claims 1-3 characterized by unit cell parameters substantially equal to the following:

Cell dimensions:

a = 18.7240(4)

b= 8.0171(2)

c = 19.6568(5)

$\alpha = 90$

$\beta = 114.935(2))$

$\gamma = 90$

$V(Å^3) = 2675.7(1)$

Space group $P2_12_12_1$

Molecules/unit cell 2

wherein said crystal is at a temperature of about +22°C (RT).

5. The crystalline form of claims 1-4 characterized by a powder x-ray diffraction pattern comprising three or more of 2θ values (CuKα λ=1.5418 Å) selected from 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 and 19.2, at a temperature of about 22°C.

6. The crystalline form of claims 1-5 further characterized by a powder x-ray diffraction pattern comprising four or more of 2θ values (CuKα λ=1.5418Å) selected from 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 and 19.2 at a temperature of about 22°C.

7. The crystalline form of claims 1-6 characterized by fractional atomic coordinates substantially as listed in Table 3.

8. The crystalline form of claims 1-7 having a power x ray diffraction pattern substantially according to Figure 2.

9. A pharmaceutical composition comprising a compound of claims 1-8, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

10. A method of treating a disease in a mammal comprising administering to the mammal a therapeutically-effective amount of a compound according to claims 1-9 wherein the disease is selected from diabetes, obesity, metabolic syndrome, stroke, neuropathic pain, ischemic cardiomyopathy, psoriasis, hypertension, scheroderma, 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.

11. A method of claim 10 wherein the disease is selected from diabetes, obesity, Crohn's disease, systemic lupus erythematosus, glomerulonephritis, multiple sclerosis, atherosclerosis, restenosis, and organ transplantation.

12. A method of claims 10-11 wherein the disease is selected from multiple sclerosis, atherosclerosis, Crohn's disease, and diabetes.

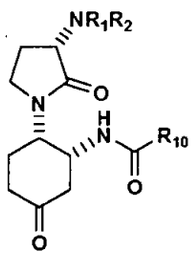
13. A method of claims 10-12 in which the disease is diabetes.

14. A method of claims 10-12 in which the disease is atherosclerosis.

15. A method of claims 10-12 in which the disease is Crohn's disease.

16. A method of claims 10-12 in which the disease is multiple sclerosis.

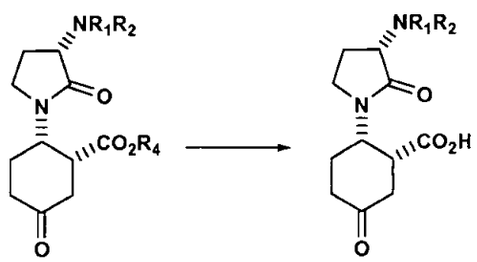
17. A process for preparing a compound having the formula (X)



X

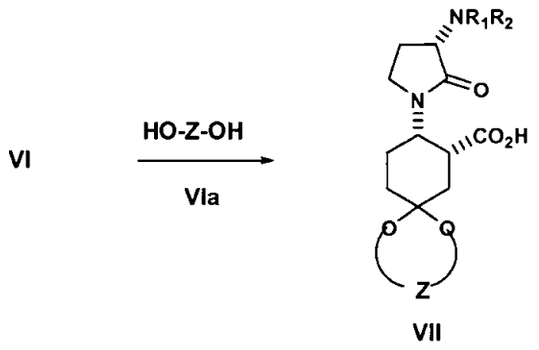
comprising the steps of:

hydrolyzing the ester moiety of the compound of formula V with a hydrolyzing agent to form the acid of compound VI at temperatures from about -5 to about 5 °C:

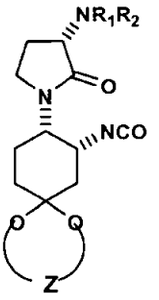


V VI

reacting a compound of formula VIa, HO-Z-OH, with a compound of formula IV (optionally *in situ*) in the presence of an acid catalyst to give a compound of formula VII having a carboxylic acid moiety:

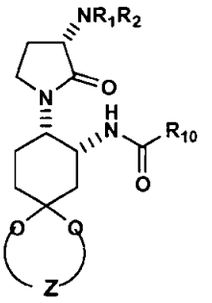


transforming the carboxylic acid moiety of the ketal of formula VII to a corresponding isocyanate of formula VIII:



VIII;

contacting the isocyanate of formula VIII with a compound of formula $R_{10}COW$ in the presence of a corresponding acid anhydride, $(R_{10}CO)_2O$, to form the amide of formula IX having a ketal moiety:



IX; and

hydrolyzing the ketal moiety of the amide of formula IX to form the compound of formula X,

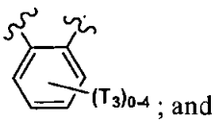
wherein:

R_1, and R_2 are independently hydrogen or an amine-protecting group;

R_4 and R_{10} are independently C_{1-6}alkyl or optionally substituted benzyl;

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

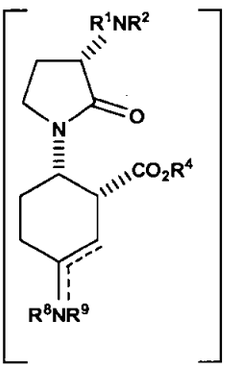
W is OH or OC_{1-6}alkyl;

Z is $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, or  ; and

T_1, T_2 and T_3 at each occurrence are independently selected from hydrogen, C_{1-4}alkyl, C_{2-4}alkenyl, halogen, hydroxy, cyano, nitro, CF_3, OC_{1-4}alkyl, OCF_3, and $C(=O)C_{1-4}$alkyl.

[00374] 18. The process according to claim 17 wherein the reductively aminating step comprises:

a) adding a Lewis Acid to a solution of compound X and the amine having the formula, HNR_8R_9, in an aprotic solvent to form an imine-enamine of formula Xa;



Xa ; and

b) treating the imine-enamine of formula Xa with a reducing agent to afford the compound of formula X having a pyrollindonyl amine moiety.

19. The process of claims 17-18 wherein:

the compound of formula VII is (7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid, or a salt thereof;

the compound of formula VIIa is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-(azidocarbonyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

the compound of formula VIII is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-isocyanato-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

the compound of formula IX is benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

the compound of formula X is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof; and

the compound of formula XI is benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

20. A compound selected from

(7*R*,8*S*)-8-((3*S*)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-oxo-1-pyrrolidinyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-7-carboxylic acid, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-(azidocarbonyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-isocyanato-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((7*R*,8*S*)-7-acetamido-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-8-yl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof;

benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*)-2-acetamido-4-oxocyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof; and

benzyl ((3*S*)-1-((1*S*,2*R*,4*R*)-2-acetamido-4-(*tert*-butylamino)cyclohexyl)-2-oxo-3-pyrrolidinyl)carbamate, or a salt thereof.

FIG. 1

Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, hemi-hydrate, Form H0.5-4

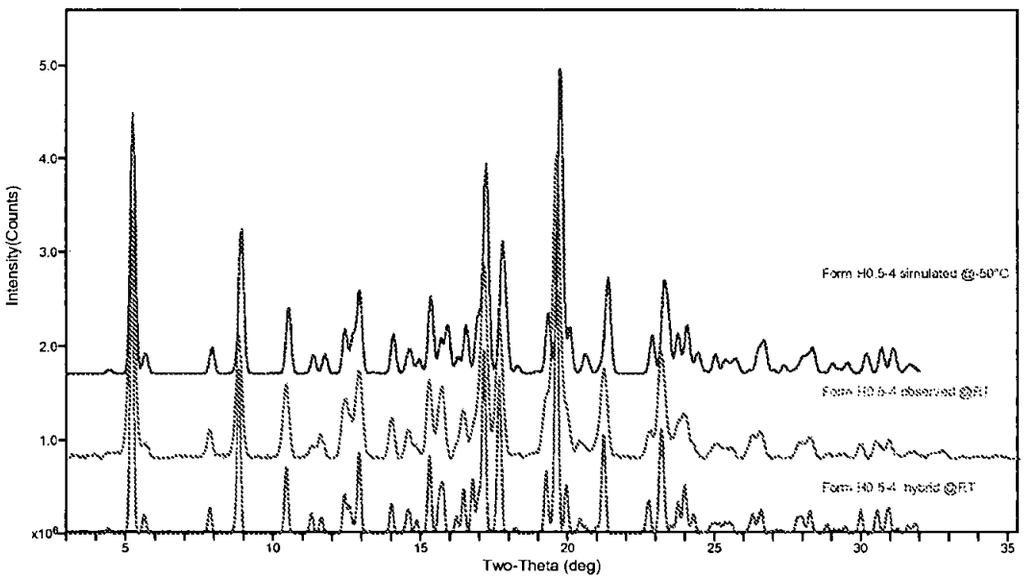


FIG. 2

Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base, Form N-2

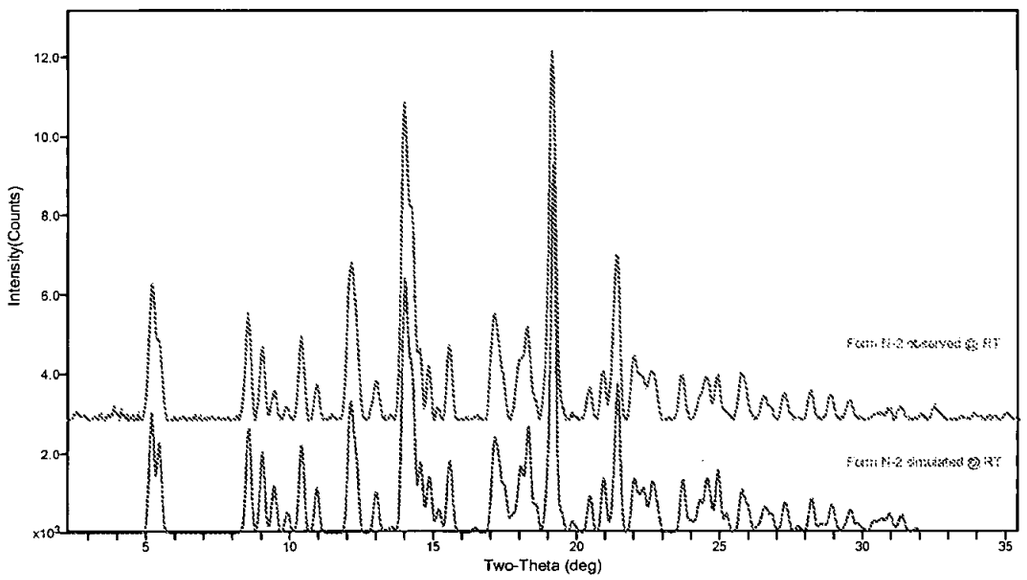


FIG. 3

Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, 1.75 moles H_2O, Form H1.75-5

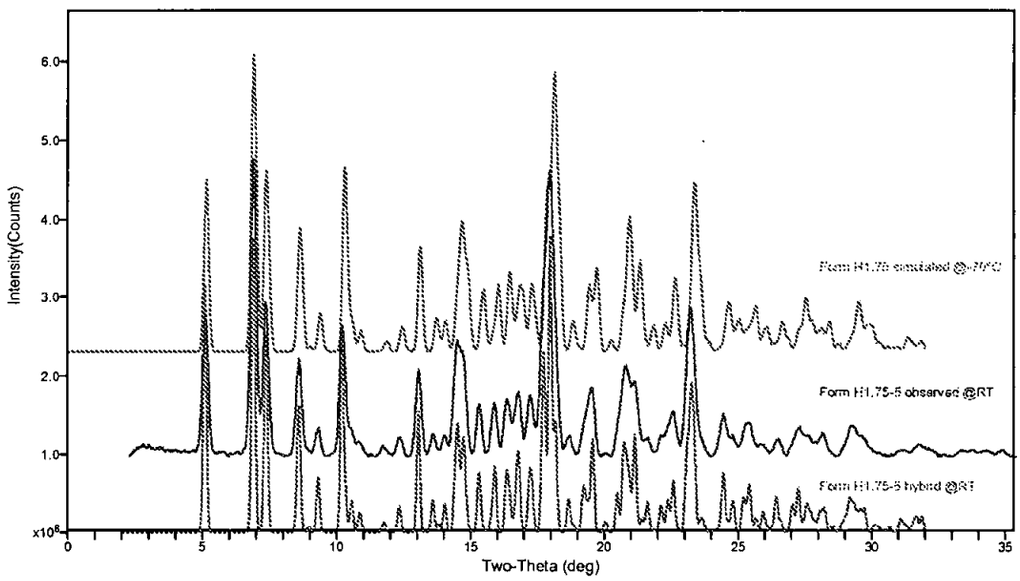


FIG. 4

Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-ethanol solvate, Form E-1

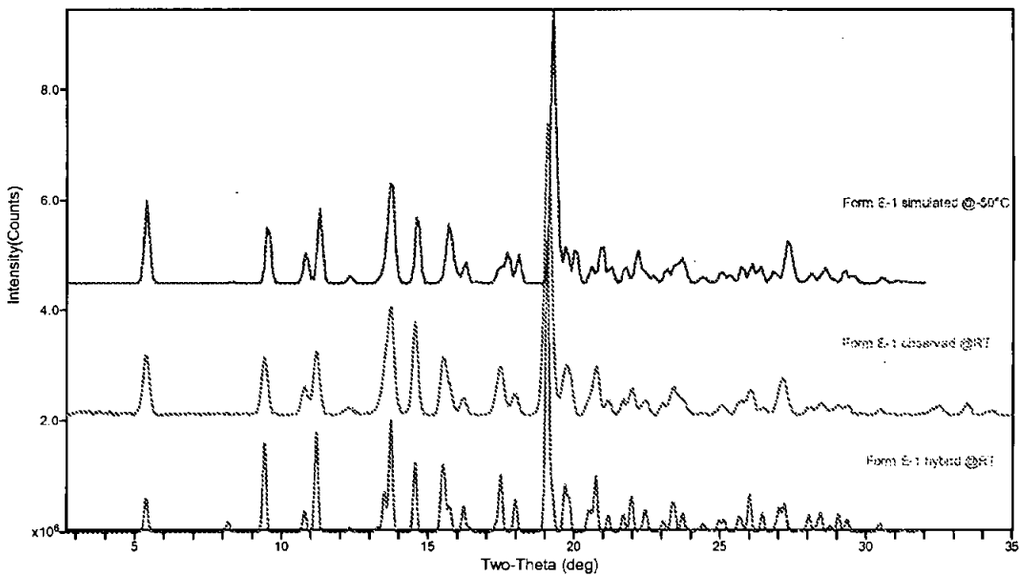


FIG. 5

Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-acetic acid solvate, Form HAC-1

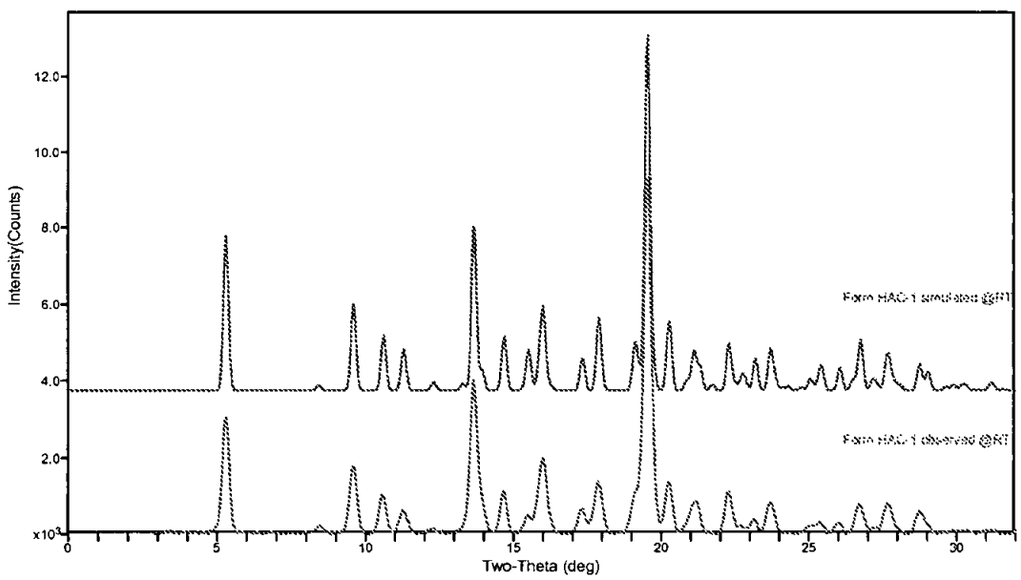


FIG. 6

Experimental and simulated powder patterns of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-*R*-propylene glycol solvate, Form RPG-3

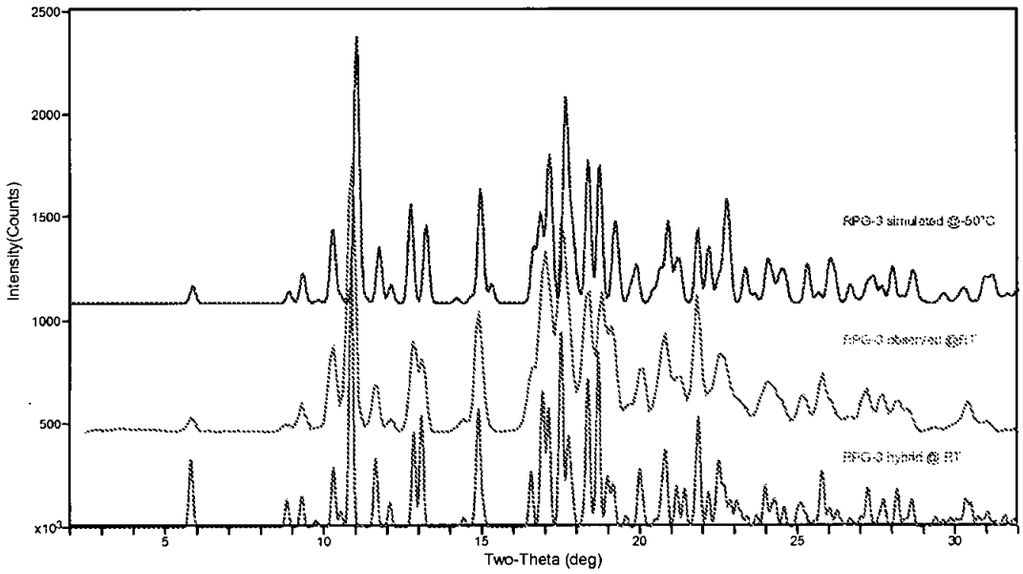


FIG. 7

DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, hemi-hydrate, Form H0.5-4

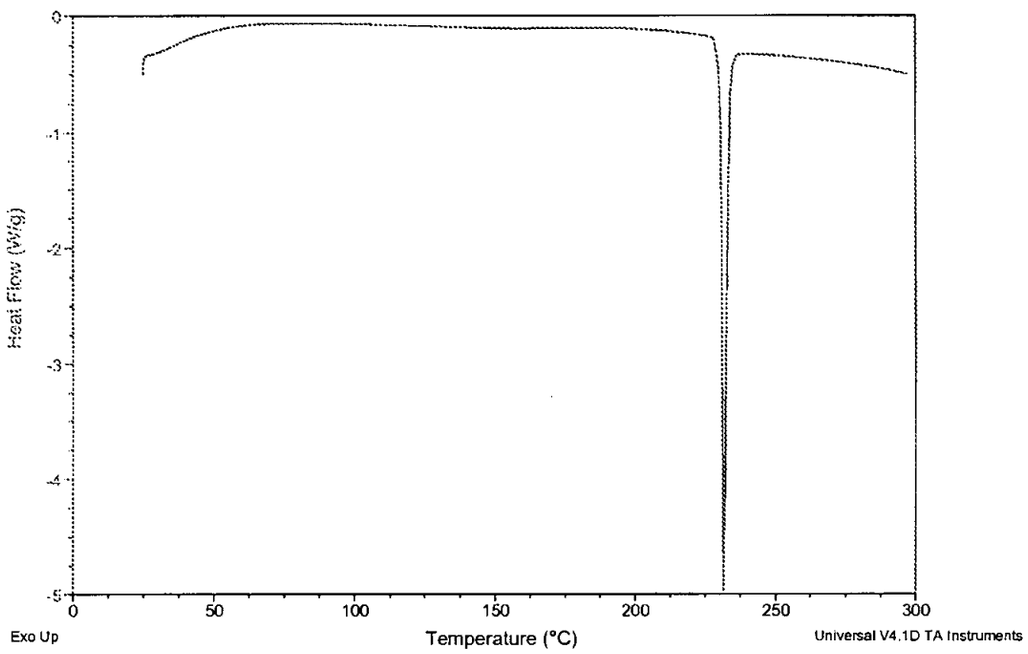


FIG. 8

TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, hemi-hydrate, Form H0.5-4

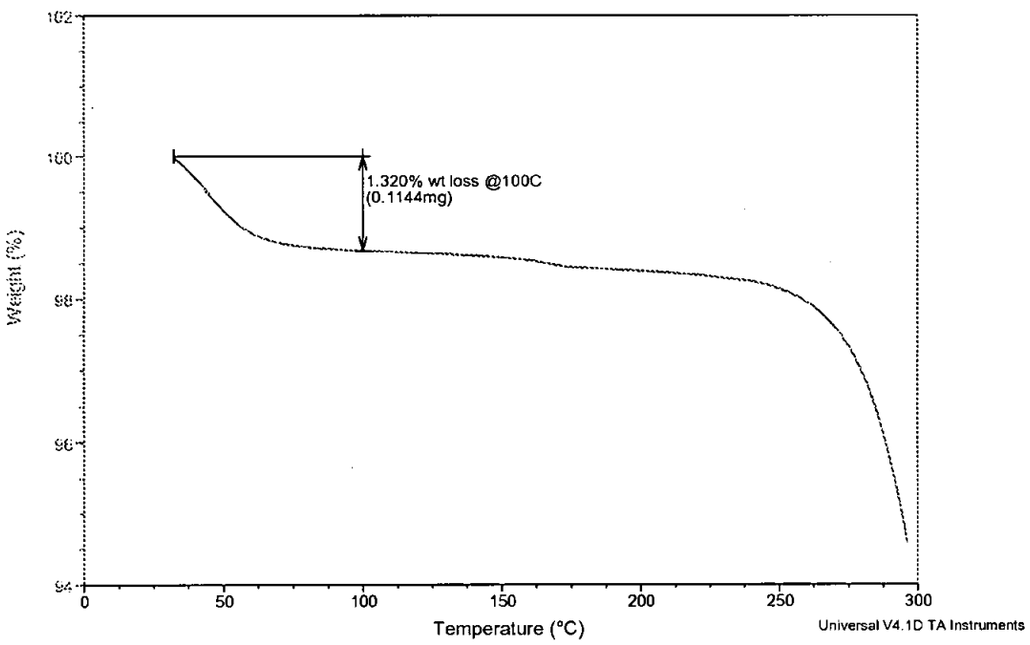


FIG. 9

DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base Form N-2

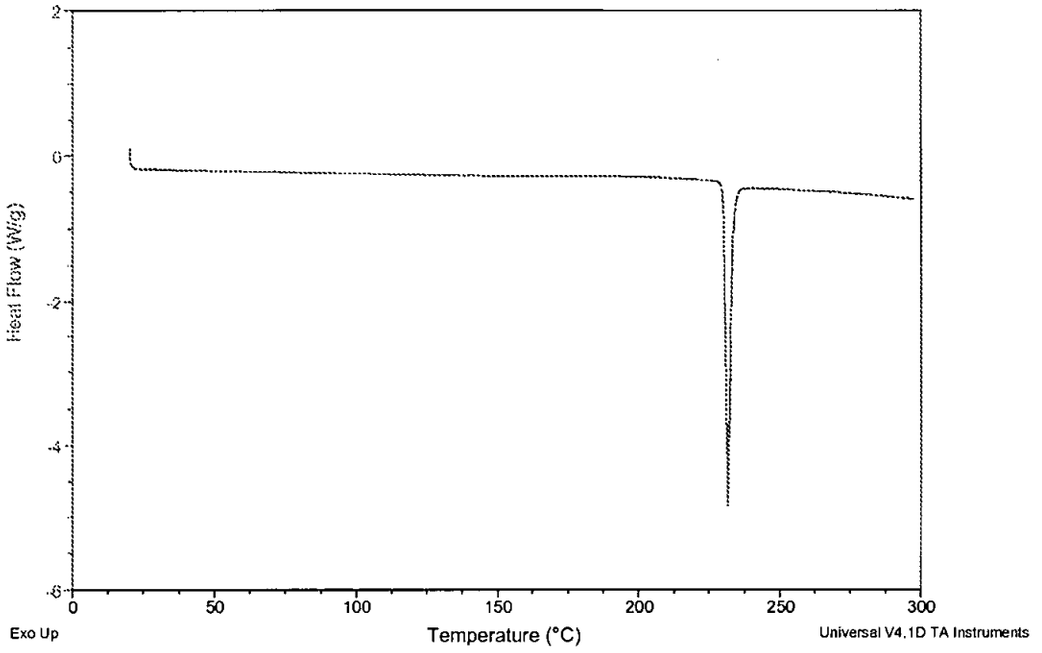


FIG. 10

TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base Form N-2

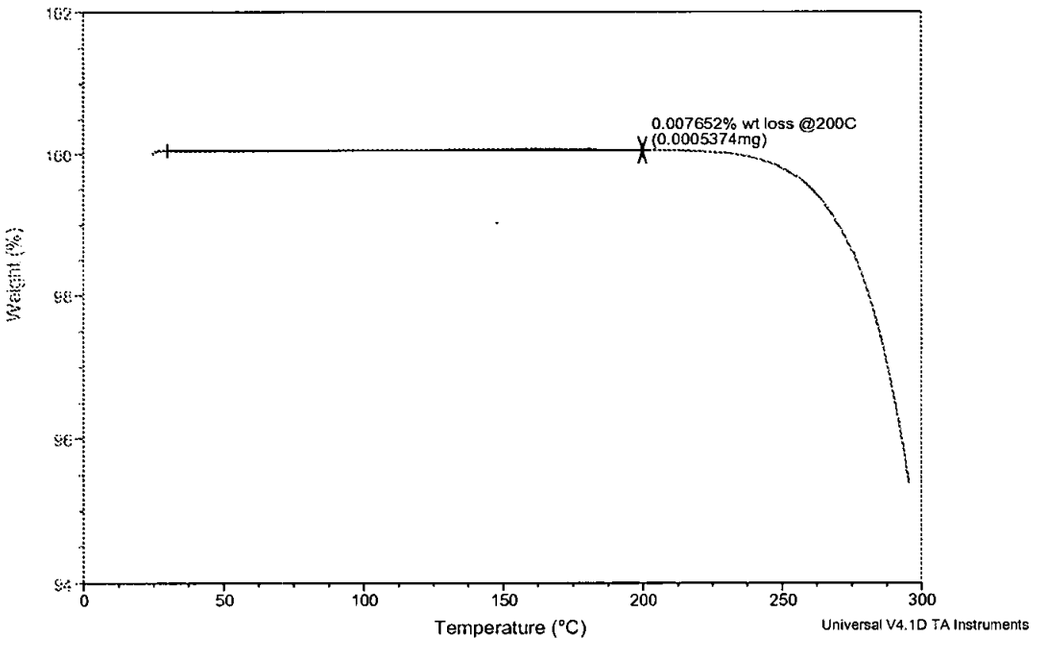
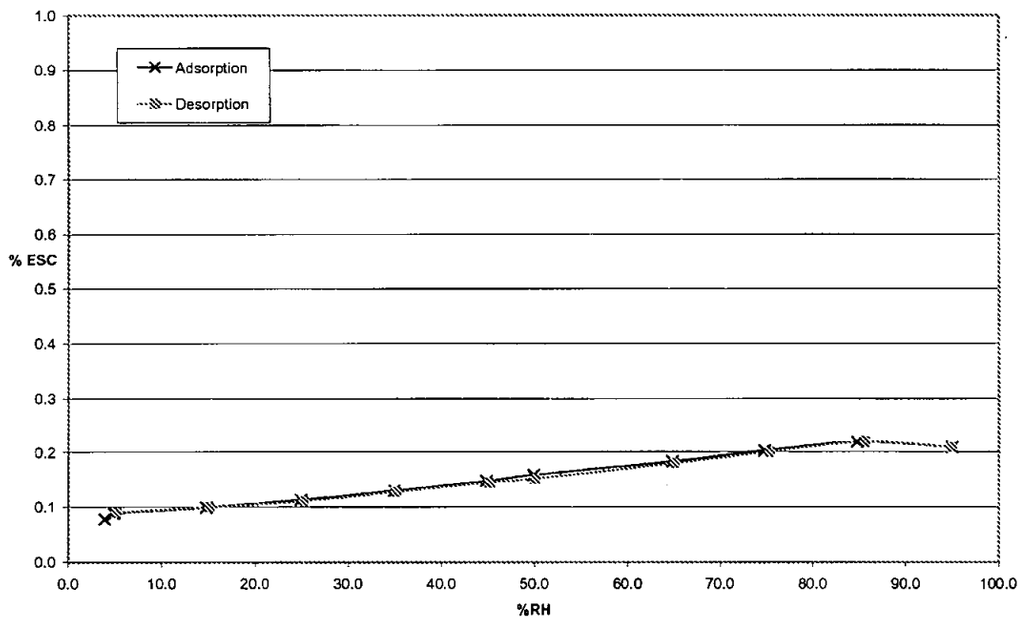


FIG. 11

Vapor Sorption Isotherm of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, free base Form N-2 at 25 °C



600191

FIG. 12

DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, 1.75 moles H_2O, Form H1.75-5

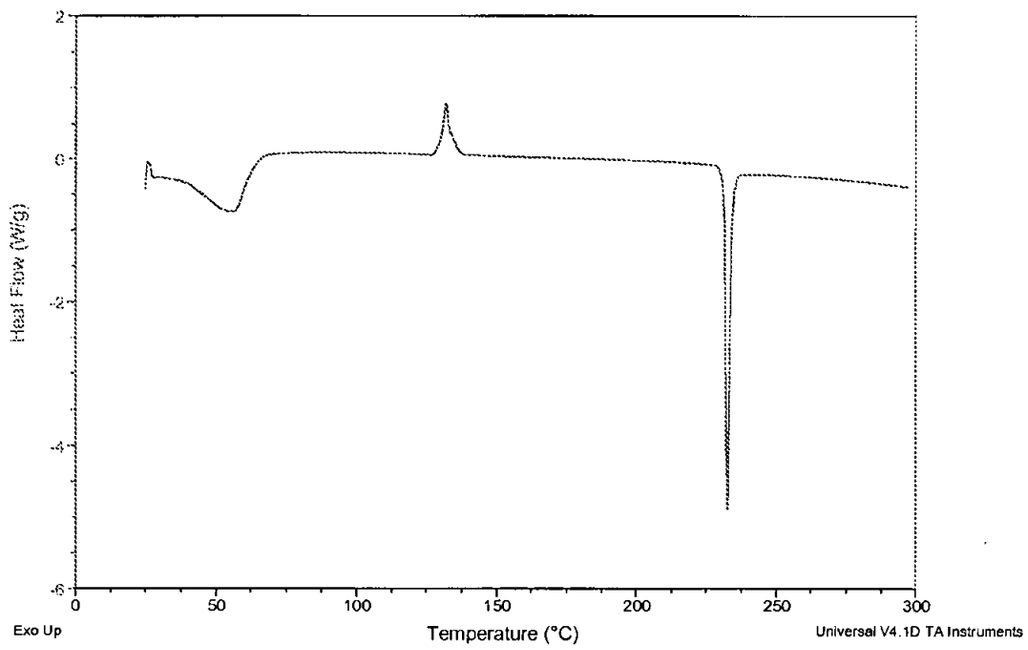


FIG. 13

TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, 1.75 moles H_2O, Form H1.75-5

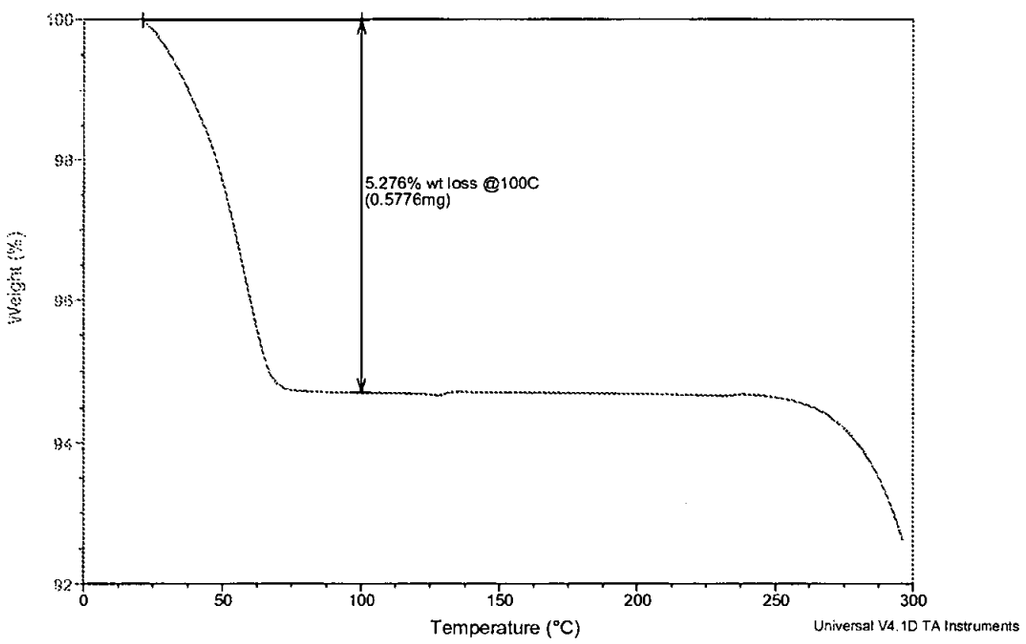


FIG. 14

DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-acetic acid solvate, Form HAC-1

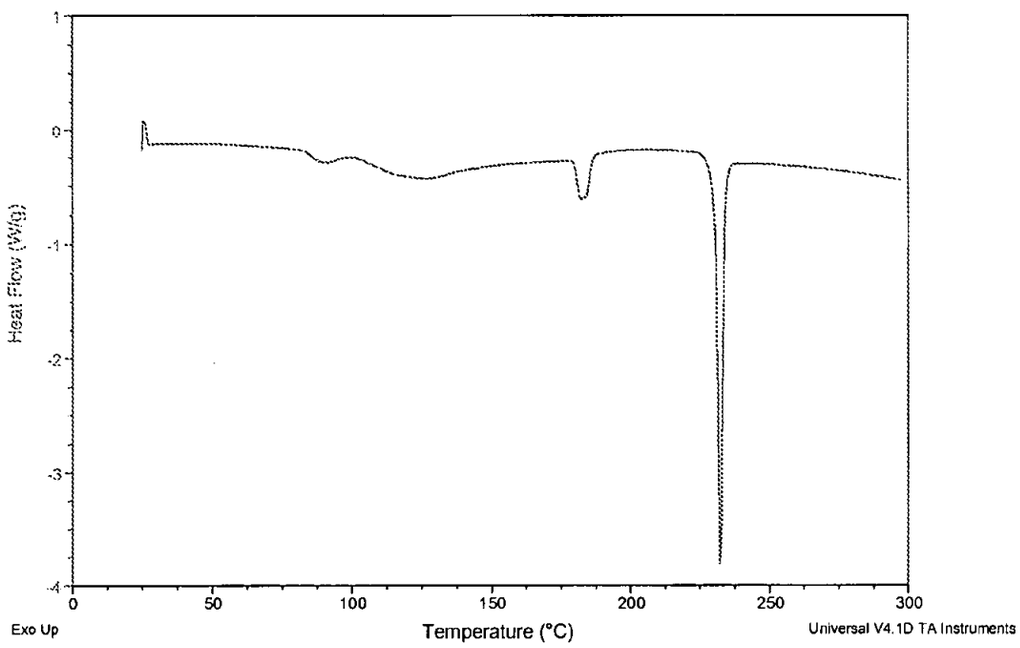


FIG. 15

TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-acetic acid solvate, Form HAC-1

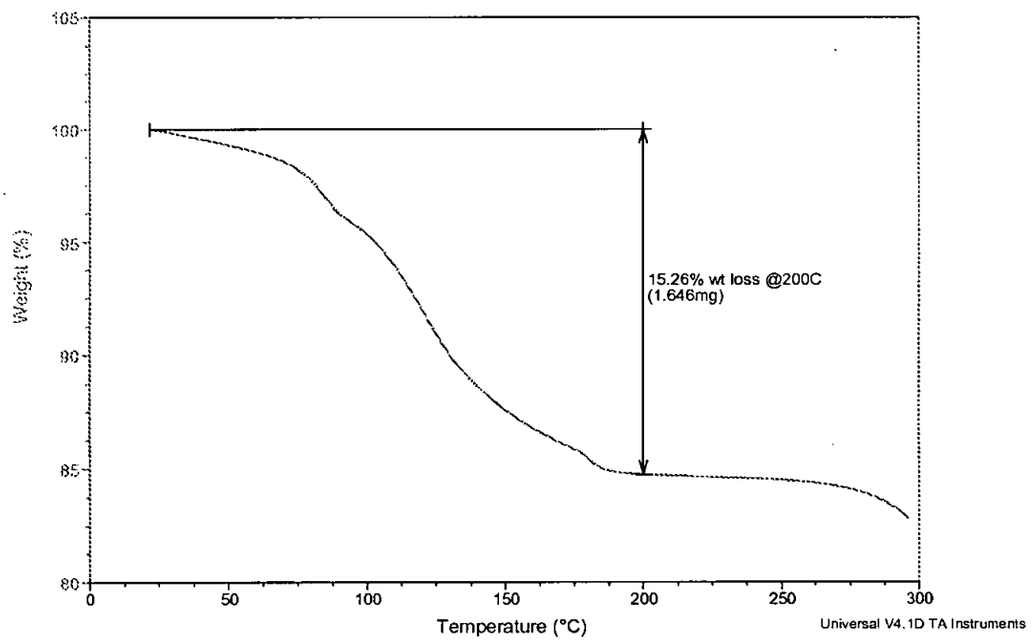


FIG. 16

DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-ethanol solvate, E-1

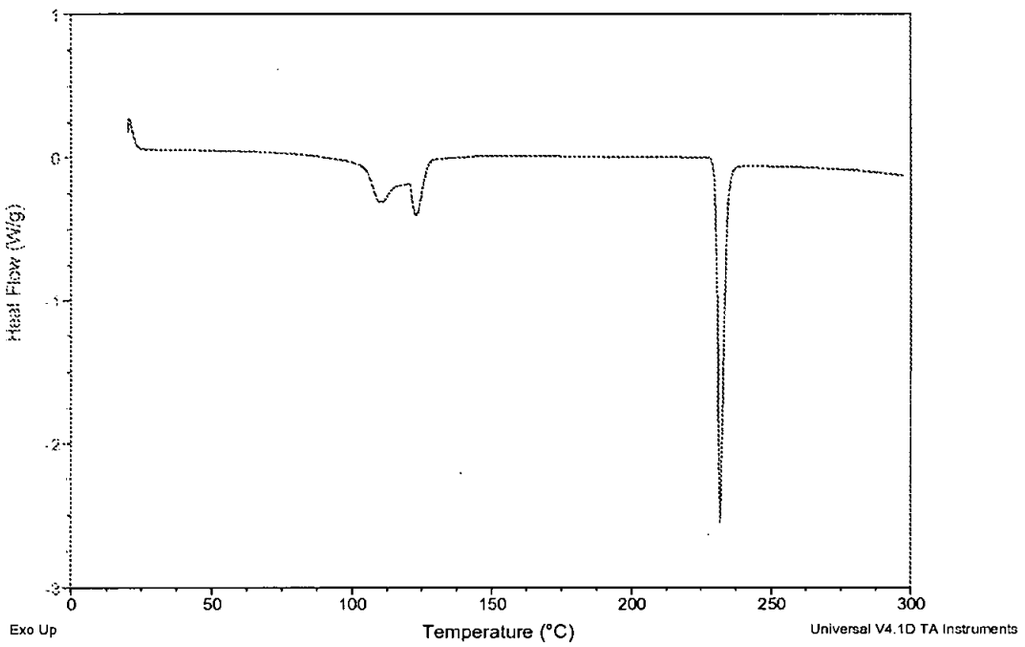


FIG. 17

TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-ethanol solvate, E-1

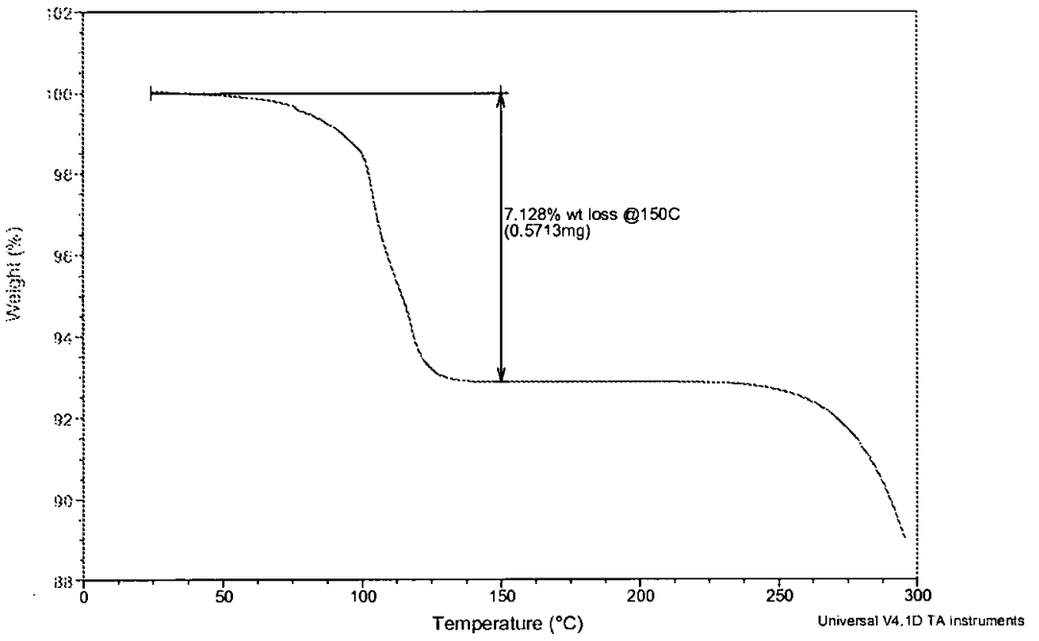


FIG. 18

DSC of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-R-propylene glycol solvate, Form RPG-3

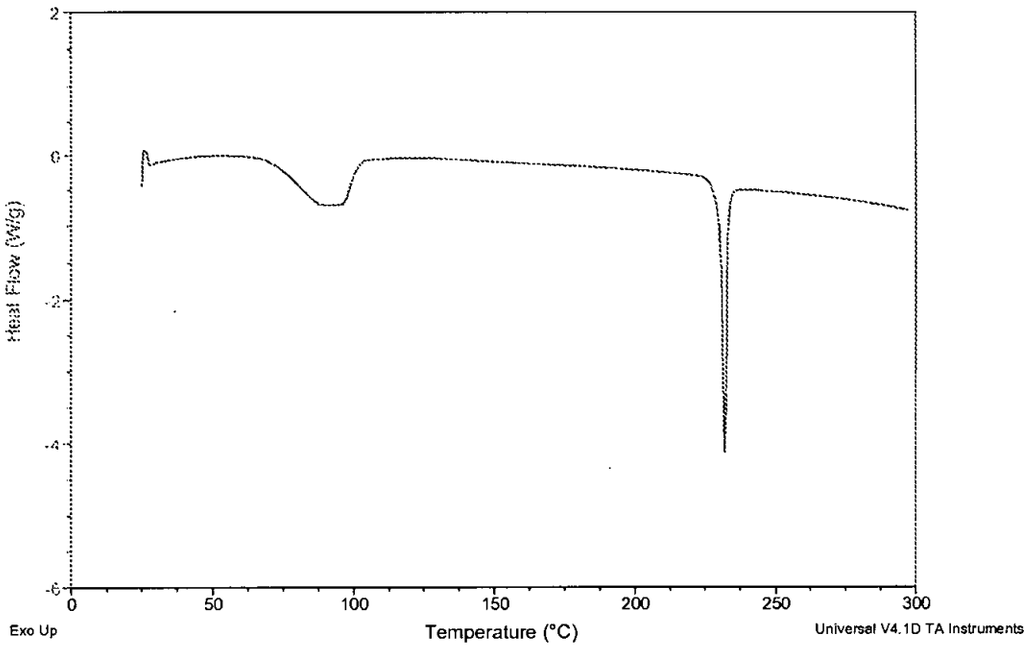


FIG. 19

TGA of N-((1R,2S,5R)-5-(*tert*-butylamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, mono-R-propylene glycol solvate, Form RPG-3

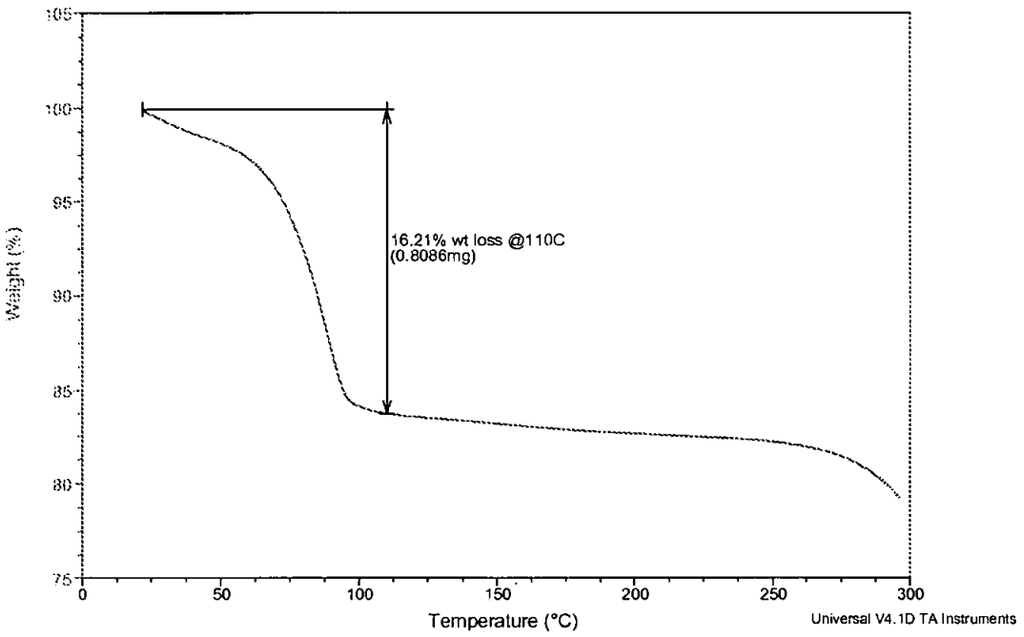


FIG. 20

Intradermal challenge model in cynomolgus monkey: Example 1 inhibited mononuclear cell recruitment to skin

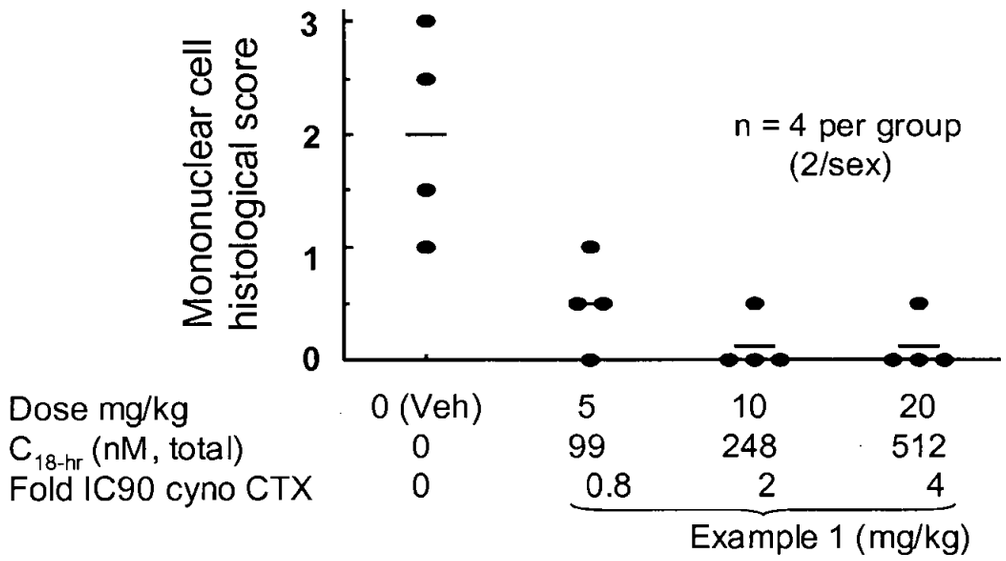


FIG. 21

48-hour TG peritonitis in hCCR2 KI mouse: Example 1 inhibition of monocyte/macrophage infiltration into peritoneal cavity

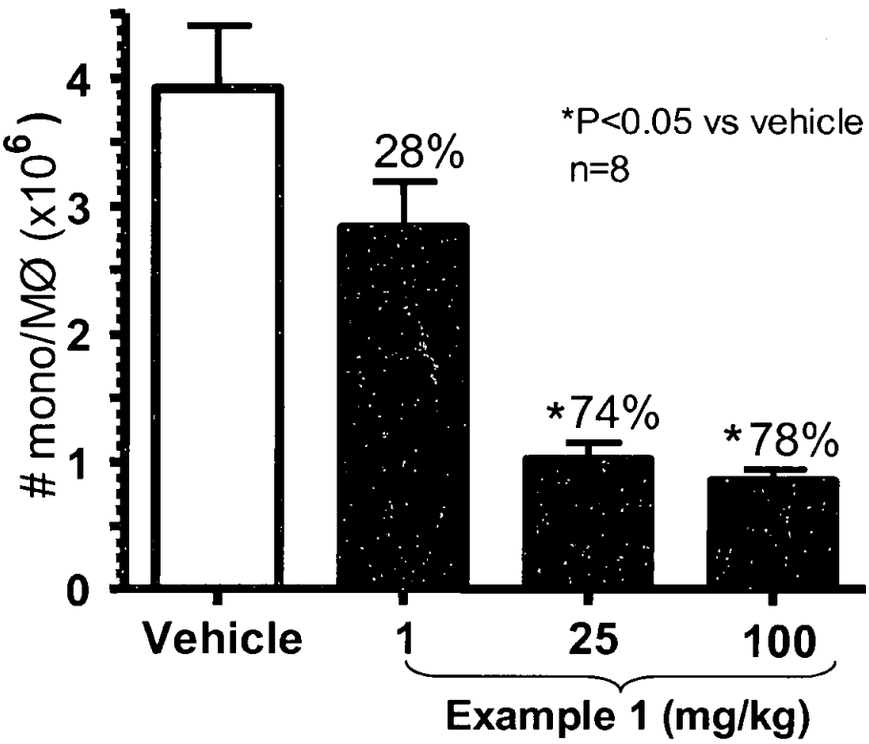


Figure 22

hCCR2 KI mouse EAE: Example 1 treatment reduced clinical score

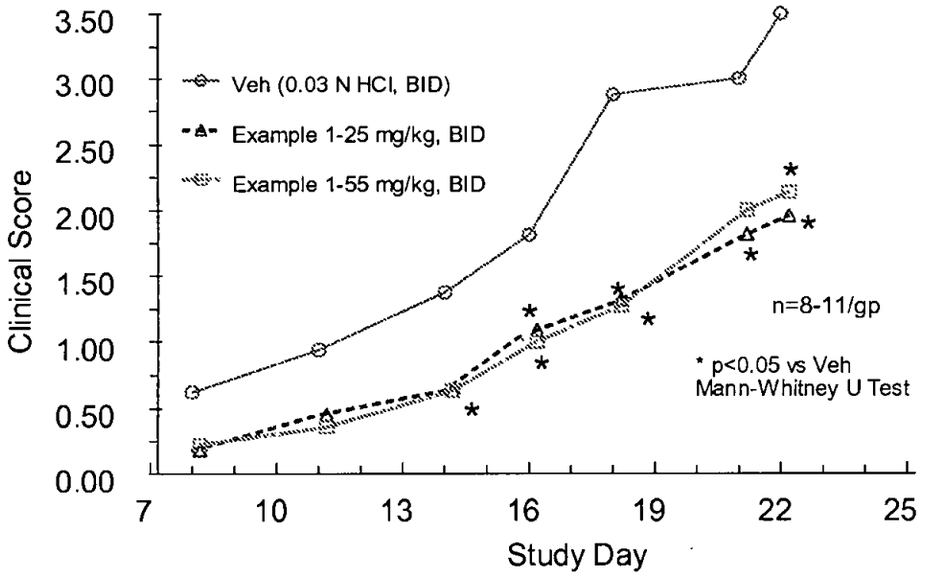


Figure 29.

Proton NMR spectra of Examp

le 1, 2nd Alternative Preparation, Step 3– Compound 7

Figure 23

Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 3– Compound 7

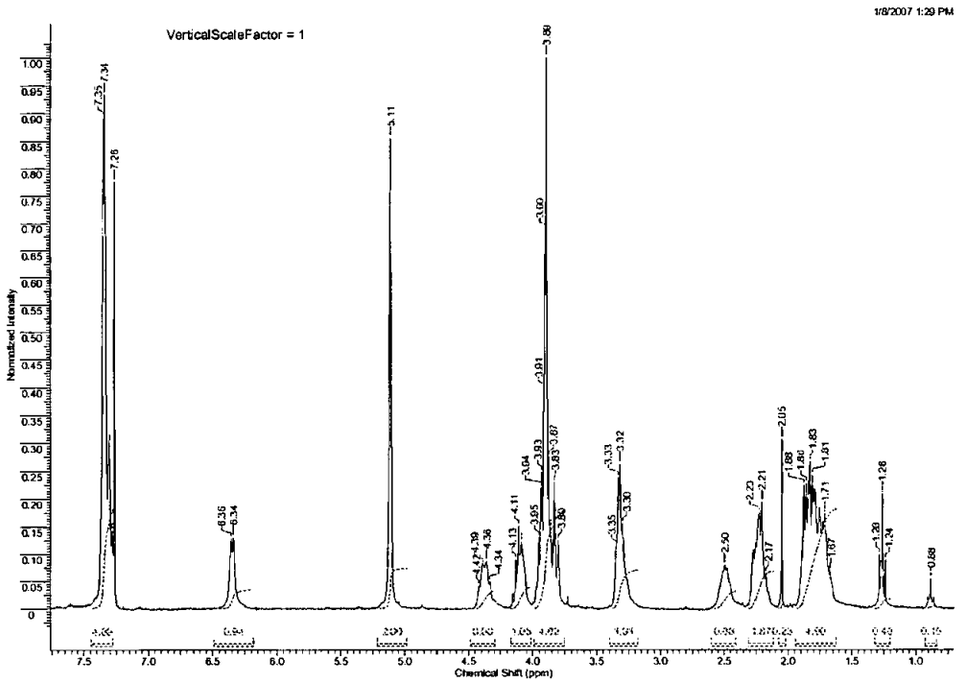


Figure 24

Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 4 – Compound 8

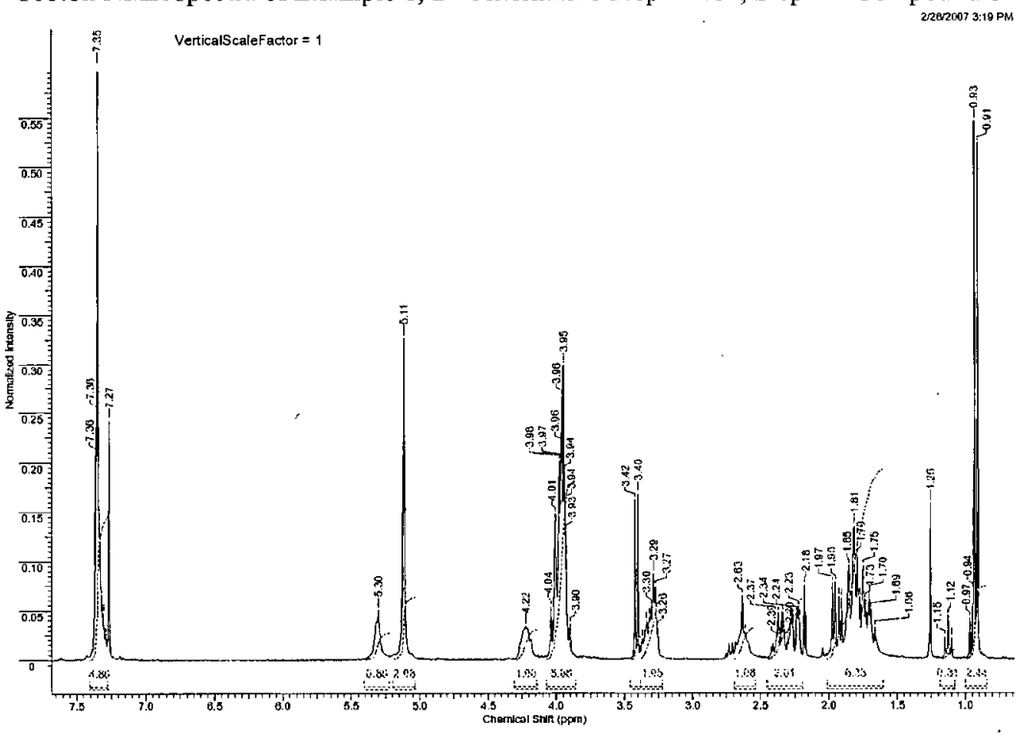


Figure 25

Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 4 – Compound 9

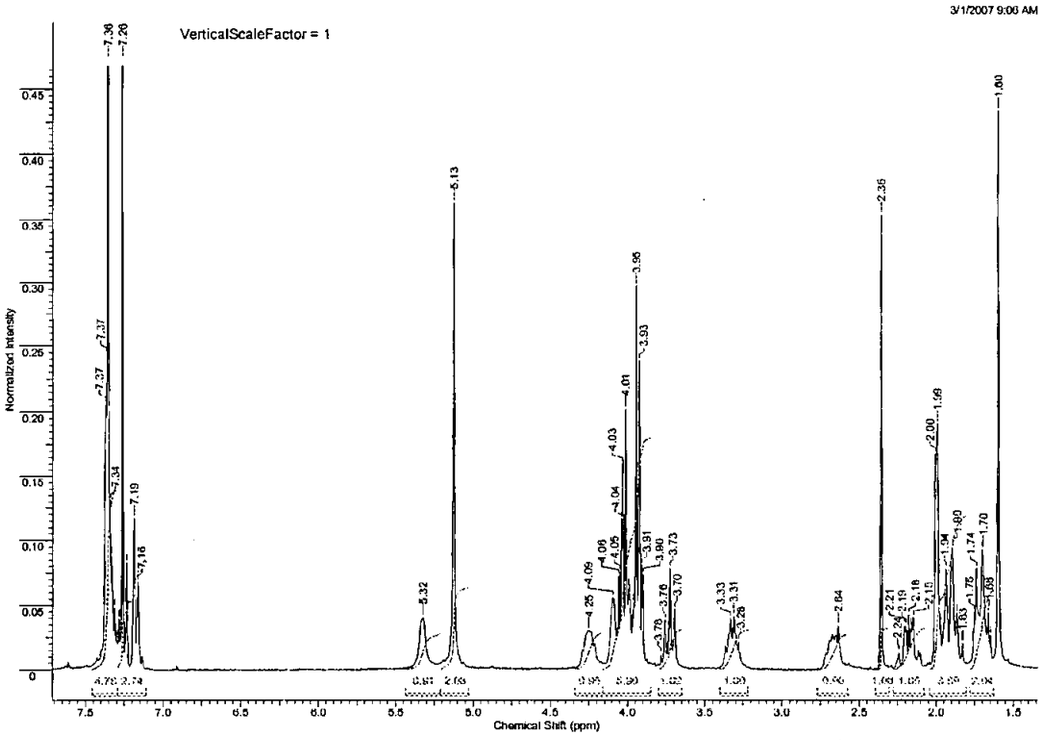


Figure 26

Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 4 – Compound 10

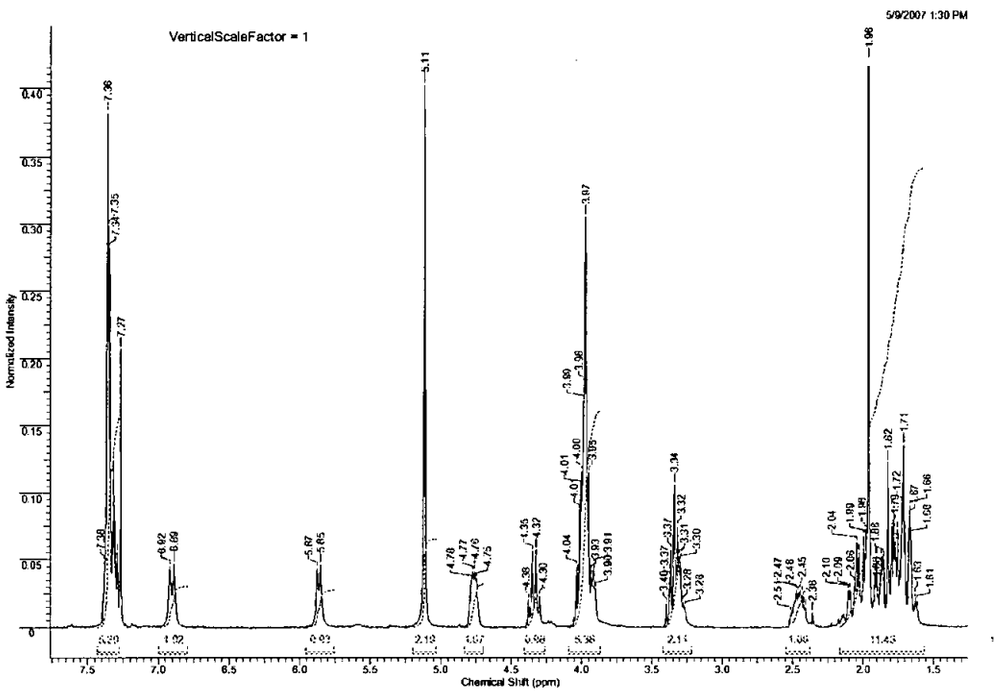
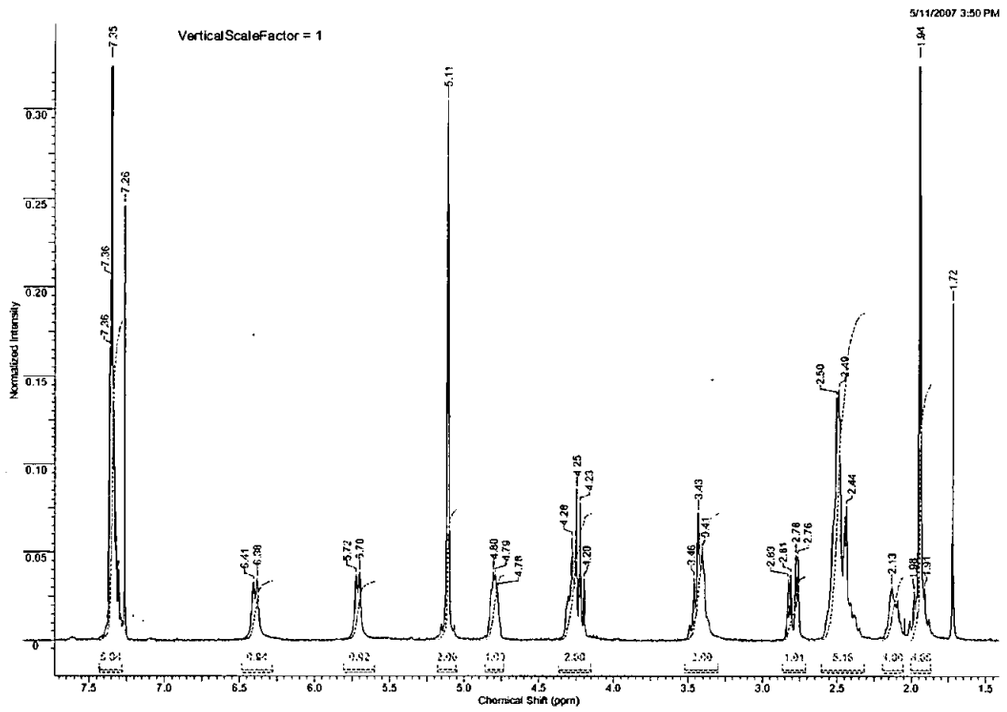


Figure 27

Proton NMR spectra of Example 1, 2nd Alternative Preparation, Step 5– Compound 11



006237

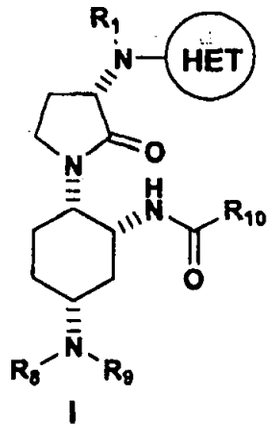
MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS Y PROCESOS

Basada en la solicitud Internacional PCT/US2007/074377

MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS Y PROCESOS

Campo de la Invención

La presente invención proporciona N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos, que tiene una combinación inesperada de características farmacológicas deseables. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas que contienen los mismos y los métodos de uso de los mismos como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares también es un objetivo de esta invención. La presente descripción también proporciona un proceso para preparar los compuestos de la fórmula (I), incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:



I

en donde R^1, R^8, R^9, R^{10} y HET son como se describen en la presente. Los compuestos que son intermediarios útiles de los procesos también se proporcionan en la presente.

Antecedentes de la Invención

Las quimiocinas son citocina quimiotácticas, de peso molecular de 6-15 kDa, que se liberan por una amplia variedad de células para atraer y activar, entre otros tipos de células, macrófagos, linfocitos T y B, eosinófilos, basófilos y neutrófilos (revisión en: Charo and Rasonhoff, New Eng. J. Med. 2006, 354, 610-621; Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445 y Rollins, Blood, 1997, 90, 909-928). Existen dos principales clases de quimiocinas, CXC y CC, dependiendo de si las primeras dos cisteínas en la secuencia de aminoácido se separan por un aminoácido sencillo (CXC) o están adyacentes (CC). Las quimiocinas CXC, tales como interleucina 8 (IL-8), proteína 2 activada por neutrófilo (NAP-2) y proteína activada estimuladora del crecimiento de melanoma (MGSA) son quimiotácticas principalmente para los neutrófilos y linfocitos T, mientras que las quimiocinas CC, tales como RANTES, MIP-1α, MIP-1β, 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 las

quimiocinas linfotactina-1, linfotactina-2, (ambas quimiocinas C), y fractalquina (una quimocina CX_3C) que no caen en ambas de las subfamilias de quimocina principales.

Las quimiocinas se enlazan a receptores de superficie celular específicos que pertenecen a la familia de proteínas de siete dominios de transmembrana acopladas a la proteína G (revisión en Horuk, Trends Pharm. Sci., 1994, 15, 159-165) que se llaman "receptores de quimiocina". En el enlace de sus ligandos similares, los receptores de quimiocina transducen una señal intracelular a través de las proteínas G triméricas asociadas, lo que resulta en, entre otras respuestas, un rápido incremento en la concentración de calcio intracelular, cambios en la forma celular, incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, desgranulación y promoción de la migración celular. Hay al menos diez receptores de quimiocina humana que se enlazan o responden a las quimiocinas CC con los siguientes patrones característicos (revisado en Zlotnik and Oshie Immunity 2000, 12, 121): CCR-1 (o "CKR-1" o "CC-CKR-1") [MIP-1α, MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch, et al., Cell 1993, 72, 415-425, and Luster, New Eng. J. Med., 1998, 338, 436-445); 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 1994, 91, 2752-2756, and Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445); CCR-3 (o "CKR-3" o "CC-CKR-3") [eotaxina-1,

eotaxina-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere, et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 16491-16494, and Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445); CCR-4 (o "CKR-4" o "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 19495-19500, and Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445); CCR-5 (o "CKR-5" o "CC-CKR-5") [MIP-1α, RANTES, MIP-1β] (Sanson, et al., Biochemistry 1996, 35, 3362-3367); CCR-6 (o "CKR-6" o "CC-CKR-6") [LARC] (Baba et al., J. Biol. Chem. 1997, 272, 14893-14898); CCR-7 (o "CKR-7" o "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie et al., J. Leukoc. Biol. 1997, 62, 634-644); CCR-8 (o "CKR-8" o "CC-CKR-8") [I-309] (Napolitano et al., J. Immunol. 1996, 157, 2759-2763); CCR-10 (o "CKR-10" o "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini et al., DNA and Cell Biol. 1997, 16, 1249-1256); y CCR-11 [MCP-1, MCP-2, y MCP-4] (Schweickert, et al., Biol. Chem 2000, 275, 90550).

Además de los receptores de quimiocina de mamíferos, los citomegalovirus de mamífero, virus del herpes y virus de viruela, han demostrado que expresan, en células infectadas, proteínas con las propiedades de enlace de los receptores de quimiocina (revisión en: Wells and Schwartz, Curr. Opin, Biotech. 1997, 8, 741-748). Las quimiocinas CC humanas, tales como RANTES y MCP-3, pueden causar una rápida movilización del calcio por medio de estos receptores viralmente codificados. La expresión del receptor puede tolerar la infección al permitir la subversión de la vigilancia y

212

respuesta del sistema inmune normal a una infección. Adicionalmente, los receptores de quimiocina humanos, tales como CXCR4, CCR2, CCR3, CCR5 y CCR8, pueden actuar como co-receptores para la infección de células de mamífero por microbios como con, por ejemplo, los virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Los receptores de quimiocina y sus similares se han implicado como mediadores importantes de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunoreguladoras, que incluyen el asma y enfermedades alérgicas, así como patologías autoinmunes tales como artritis reumatoide y esclerosis múltiple; y enfermedades metabólicas, tales como ateroesclerosis y diabetes (revisado en: Charo and Rasonhoff, New Eng. J. Med. 2006, 354, 610-621; Z. Gao and W. A. Metz, Chem. Rev. 2003, 3733; P. H. Carter, Current Opinion in Chemical Biology 2002, 6, 510; Trivedi, et al, Ann. Reports Med. Chem. 2000, 35, 191; Saunders and Tarby, Drug Disc. Today 1999, 4, 80; Premack and Schall, Nature Medicine 1996, 2, 1174). Por ejemplo, el quimioatrayente de monocito de quimiocina 1 (MCP-1) y su receptor del Receptor 2 de Quimiocina 2 CC (CCR-2) juegan un papel esencial en atraer leucocitos a los sitios de inflamación y posteriormente en activar estas células. Cuando la quimiocina MCP-1 se enlaza a CCR-2, se induce un incremento rápido en la concentración de calcio intracelular, se incrementa la expresión de las

GR213

moléculas de adhesión celular, y la promoción de la migración de leucocitos. La demostración de la importancia de la interacción MCP-1/CCR-2 se ha proporcionado por experimentos con ratones genéticamente modificados. Los ratones MCP-$1^{-/-}$ no fueron capaces de reclutar monocitos en los sitios de inflamación después de varios tipos diferentes de pruebas inmunogénicas (Bao Lu, et al., J. Exp. Med. 1998, 287, 601). Similarmente, los ratones CCR-2 -/- no fueron capaces de reclutar monocitos o producir el interferón γ cuando se aplica la prueba inmunogénica con varios agentes exógenos; por otro lado, los leucocitos de los ratones sin CCR-2 no migraron en respuesta al MCP-1 (Landin Boring, et al., J. Clin. Invest. 1997, 100, 2552), por lo que se demuestra la especificidad de la interacción MCP-1/CCR-2. Otros dos grupos han reportado independientemente resultados equivalentes con diferentes cepas de ratones CCR-2 -/- (William A. Kuziel, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 12053, y Takao Kurihara, et al., J. Exp. Med. 1997, 186, 1757). La viabilidad y generalmente la salud normal de los animales MCP-1 -/- y CCR-2 -/- es notable, en que la disrupción de la interacción MCP-1/CCR-2 no induce una crisis fisiológica. Tomados en conjunto, estos datos llevan a la conclusión de que las moléculas que bloquean las acciones de MCP-1/CCR2 serían útiles en el tratamiento de un número de trastornos inflamatorios y autoinmunes (revisado en: M. Feria and F.

Diaz-González, Exp. Opin. Ther. Patents 2006, 16, 49; and J. Dawson, W. Miltz, and C. Wiessner, C. Exp. Opin. Ther. Targets 2003, 7, 35). Esta hipótesis no se ha validado en un número de diferentes modelos de enfermedad animal, como se describe a continuación.

Se conoce que MCP-1 se sobreregula en pacientes con artritis reumatoide (Alisa Koch, et al., J. Clin. Invest. 1992, 90, 772-779). Por otro lado, varios estudios preclínicos han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la artritis reumatoide. Una vacuna de ADN que codifica MCP-1 se ha mostrado recientemente para aliviar la artritis inducida por poliadyuvantes crónicos en ratas (Sawsan Youssef, et al., J. Clin. Invest. 2000, 106, 361). Similarmente, los síntomas de la enfermedad podrían controlarse por medio de la administración directa de anticuerpos para MCP-1 a las ratas con artritis inducida por colágeno (Hiroomi Ogata, et al., J. Pathol. 1997, 282, 106), o artritis inducida por la pared celular de estreptococos (Ralph C. Schimmer, et al., J. Immunol. 1998, 160, 1466). Quizá más significativamente, un antagonista péptido de MCP-1, MCP-1(9-76), se muestra que previene tanto el inicio de la enfermedad como la reducción de los síntomas de la enfermedad (dependiendo del tiempo de administración) en el modelo de ratón MRL-1pr de artritis (Jiang-Hong Gong, et al., J. Exp.

Med. 1997, 186, 131). Adicionalmente, se ha demostrado que la administración de antagonistas CCR2 de molécula pequeña reduce el registro clínico en modelos de roedores con artritis (C. M. Brodmerkel, et al, J. Immunol. 2005, 175, 5370; and M. Xia, et al. Solicitud de Patente de EUA 0069123, 2006). La administración de un anticuerpo anti-CCR2 tuvo efectos variados en CIA de murino, dependiendo del tiempo de administración (H. Bruhl, et al. J. Immunol. 2004, 172, 890). Los estudios recientes con ratones CCR2-/- han sugerido que la eliminación de CCR2 pueden exacerbar modelos de artritis en roedores en circunstancias experimentales específicas (M. P. Quinones, et al. J. Clin. Invest. 2004, 113, 856: M. P. Quinones, et al. J. Mol. Med. 2006, 84, 503).

Se conoce que el MCP-1 se sobreregula en lesiones ateroescleróticas, y se ha mostrado que los niveles circulantes de MCP-1 se reducen a través del tratamiento con agentes terapéuticos (Abdolreza Rezaie-Majd, et al, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002, 22, 1194 - 1199). Varios estudios clave han demostrado el valor potencial terapéutico del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de la ateroesclerosis. Por ejemplo, cuando los ratones MCP-1 -/- se aparean con ratones deficientes en el receptor LDL, se observa una reducción del 83% en la deposición de lípido aórtico (Long Gu, et al., Mol. Cell 1998, 2, 275). Similarmente, cuando el MCP-1 se extirpa

genéticamente de los ratones que ya sobreexpresan la apolipoproteína B humana, los ratones resultantes se protegieron de la formación de lesión ateroesclerótica con relación a los ratones de control MCP-1 +/+ apoB (Jennifa Gosling, et al., J. Clin. Invest. 1999, 103, 773). Similarmente, cuando los ratones CCR-2 -/- se cruzan con ratones con apolipoproteína E -/-, se observa una reducción importante en la incidencia de lesiones ateroescleróticas (Landin Boring, et al. Nature 1998, 394, 894; T. C. Dawson, et al. Atherosclerosis 199, 143, 205). Finalmente, cuando los ratones E -/- con apolipoproteína se les administra un gen que codifica un antagonista péptido de CCR2, entonces el tamaño de lesión se reduce y la estabilidad de placa se incrementa (W. Ni et al. Circulation 2001, 103, 2096 – 2101). El transplante de médula ósea de ratones CCR2-/- en ratones ApoE3-Leiden inhibió la aterogénesis temprana (J. Guo, et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.. 2003, 23, 447), pero tuvo efectos mínimos en lesiones avanzadas (J. Gou, et al. Arterioscler. Thomb. Vasc. Biol.. 2005, 25, 1014).

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 típicamente muestran resistencia a la insulina como una de las características de marca de contraste de la enfermedad. La resistencia a la insulina también se asocia con el agrupamiento de anormalidades conocidas como el "síndrome metabólico" o "síndrome X", el cual incluye obesidad,

001217

ateroesclerosis, hipertensión, y dislipidemia (revisado en: Eckel, et al. Lancet 2005, 365, 1415). Es bien reconocido que la inflamación juega un papel en exacerbar el proceso de la enfermedad en la diabetes tipo 2 y las patologías del "síndrome X" (revisado en: Chen, Pharmacological Research 2006, 53, 469; Neels and Olefsky, J. Clin. Invest. 2006, 116, 33; Danadona and Aljada, Am J Cardiol. 2002 90, 27G-33G; Pickup and Crook, Diabetología 1998, 41, 1241). El MCP-1 se reconoce que juega un papel en la resistencia de la insulina inducida por obesidad. En cultivo, los preadipocitos humanos constitutivamente expresan MCP-1 (Gerhardt, Mol. Cell. Endocrinology 2001, 175, 81). El CCR2 se expresa en adipocitos; la adición de MCP-1 para adipocitos in vitro disminuye la absorción de glucosa estimulada por insulina y la expresión de varios genes adipogénicos (LpL, adipsina, GLU-4), aP2, receptor adrenérgico β3, y PPARγ) (P. Sartipy and D. Loskutoff, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1999, 96, 6902). Los pacientes con diabetes tipo 2 tuvieron niveles mayores de MCP-1 circulante que los controles no diabéticos (S. Nomura, et al. Clin. Exp. Immunol. 200, 121, 437), y la liberación de MCP-1 de tejido adiposo puede reducirse por el tratamiento con terapias anti-diabéticas tales como metformina o tiazolidindionas (J. M. Bruñí, et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005, 90, 2282). Similarmente, el MCP-1 también se sobreexpresa en modelos de obesidad experimentales de murino,

y se produjo principalmente por tejido adiposo (Sartipy and Loskutoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 7265). En ratones obesos, la expresión de MCP-1 tanto precedió como sucedió concurrentemente con el comienzo de la resistencia de insulina (H. Xu, et. J. Clin. Invest. 2003, 112, 1821). Otro estudio muestra que la expresión de MCP-1 se correlaciona positivamente con masa corporal en el tejido adiposo perigonadal de ratones (Weisberg, et al. J. Clin. Invest. 2003, 112, 1796). Consistente con éstos datos, el desarrollo de la resistencia de insulina en ratones db/db se alivió ya sea por medio de la eliminación genética de MCP-1 o por expresión inducida por el gen de un péptido negativo dominante (H. Kanda, et al. J. Clin. Invest. 2006, 116, 1494). La conversión lógica también se puede demostrar: sobreexpresión de MCP-1 en tejido adiposo promovido por la resistencia a la insulina (N. Kamei, et al. J. Biol. Chem. 2006, 281, 26602). Un resultado conflictivo que muestra que la eliminación genética de MCP-1 no afecta la resistencia a la insulina en los ratones db/db también ha aparecido (F. Y. Chow. et al., Diabetologica 2007, 50, 471). Consistente con los datos en MCP-1, los estudios directos con CCR2 (el receptor MCP-1) ha demostrado que juega un papel en la formación de obesidad y resistencia a la insulina inducida por obesidad. El mantenimiento de una dieta alta en grasa incrementa los números de monocitos inflamatorios $CCR2^{+}$

circulantes en ratones tanto tipo silvestre (C. L. Tsou, et al. J. Clin. Invest. 2007, 117, 902) como $ApoE^{-/-}$ (F. Tacke, et al. J. Clin. Invest. 2007, 117, 185). La eliminación genética de CCR2 redujo los números de macrófagos activados en tejido adiposo de murino (C. N. Lumeng, et al. Diabetes 2007, 56, 16), pero no afectó a una población de macrófagos adiposos M2 no obstante para mantener el estado "magro" (C. N. Lumeng, et al. J. Clin. Invest. 2007, 117, 175). La eliminación genética de obesidad inducida por dieta reducida por CCDR2 y sensibilidad de insulina mejorada en modelo de obesidad inducida por dieta (S. P. Weisberg, et al. J. Clin. Invest. 2006, 116, 115; P Cornelius, RP Gladue, RS Sebastián, Patente de WO 2006/013427 A2) 2006), dependiendo de las condiciones experimentales (A. Chen, et al. Obes. Res. 2005, 13, 1311). La administración de una molécula pequeña CCR2 antagonista también mejora la sensibilidad de insulina en este mismo modelo (S. P. Weisberg, et al. J. Clin. Invest. 2006, 116, 115).

Dos estudios describieron el papel importante de CCR2 en inflamación vascular inducida por hipertensión, remodelación, e hipertrofia (E Bush et al., Hipertensión 200, 36, 360; M Ishibashi, et al. Circ. Res. 2004, 94, 1203).

Se conoce que las MCP-1 se sobreregulan en esclerosis múltiple humana, y se ha mostrado que la terapia efectiva con interferón β-1b reduce la expresión de MCP-1 en células

- 007223

mononucleares de sangre periférica, lo que sugiere que la MCP-1 juega un papel en el progreso de la enfermedad (Carla Iarlori, et al., J. Neuroimmunol. 2002, 123, 170-179). Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR-2 en el tratamiento de la esclerosis múltiple; todos estos estudios se han demostrado en encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal convencional para esclerosis múltiple. La administración de anticuerpos para MCP-1 a animales con EAE, disminuye de manera importante la recurrencia de la enfermedad (K. J. Kennedy, et al., J. Neuroimmunol. 1998, 92, 98). Adicionalmente, dos reportes recientes han mostrado ahora que los ratones CCR-2 -/- son resistentes a EAE (B. T. Fife, et al., J. Exp. Med. 2000, 192, 899; Leonid Izikson, et al., J. Exp. Med. 2000, 192, 1075). Un reporte posterior extiende estas observaciones iniciales al examinar los efectos de la eliminación de CCR2 en ratones de diferentes cepas (S. Gaupp, et al. Am. J. Pathol. 2003, 162, 139). Notablemente, la administración de un antagonista CCR2 de molécula pequeña también bloqueó la progresión de la enfermedad en ratones C57BL/6 (C. M. Brodmerkel, et al. J. Immunol. 2005, 175, 5370).

Se conoce que la MCP-1 se sobreregula en pacientes que desarrollan el síndrome de obliteración de bronquiolitis después del transplante de pulmón (Martine Reynaud-Gaubert,

- 000221

et al., J. of Heart and Lung Transplant., 2002, 21, 721-730; John Belperio, et al., J. Clin. Invest. 2001, 108, 547-556). En el modelo murino del síndrome de obliteración de bronquiolitis, la administración de un anticuerpo a MCP-1 lleva al alivio de la obstrucción de las vías respiratorias; similarmente, los ratones CCR2 -/- son resistentes a la obstrucción de las vías respiratorias en el mismo modelo (John Belperio, et al., J. Clin. Invest. 2001, 108, 547-556). Estos datos sugieren que el antagonismo de MCP-1/CCR2 puede ser benéfico en el tratamiento del rechazo de órganos después del transplante. Además, los estudios han mostrado que la disrupción del eje MCP-1/CCR2 es capaz de prolongar la supervivencia del transplante de isleta (I Lee et al. J Immunol 2003, 171, 6929; R Abdi et al., J Immunol 2004, 172, 767). En modelos de injerto de ratas, CCR2 y MCP-1 se mostró para sobreregular en injertos que desarrollan vasculopatía de injerto (K Horiguchi et al., J Heart Lung Transplant. 2002, 21, 1090). En otro estudio, la terapia de gen anti-MCP-1 atenua con la vasculopatia de injerto (A Saiura et al., Artherioscler Thromb Vasc Biol 2004, 24, 1886). Un estudio descrbió la inhibición de la formación neointima de injerto de la vena experimental de MCP-1 (H Tatewaki et al., J Vasc Surg. 2007, 45, 1236).

Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el

222

tratamiento del asma. La detención de MCP-1 con un anticuerpo neutralizante en ratones con prueba inmunogénica con ovalbúmina resulta en una reducción marcada en las hiperrespuestas bronquiales y la inflamación (Jose-Angel Gonzalo, et al., J. Exp. Med. 1998, 188, 157). Se prueba que es posible reducir la inflamación alérgica de las vías respiratorias en ratones con prueba inmunogénica con huevos de Schistosoma mansoni a través de la administración de anticuerpos para MCP-1 (Nicholas W. Lukacs, et al., J. Immunol. 1997, 158, 4398). Consistente con esto, los ratones MCP-1 -/- exhiben una respuesta reducida a la prueba inmunogénica con huevos de Schistosoma mansoni (Bao Lu, et al., J. Exp. Med. 1998, 187, 601).

Otros estudios han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de enfermedades del riñón. La administración de anticuerpos para MCP-1 en un modelo murino de nefritis glomerular, resulta en una reducción marcada en la formación creciente glomerular y la deposición del colágeno de tipo I (Clare M. Lloyd, et al., J. Exp. Med. 1997, 185, 1371). Además, los ratones MCP-1 -/- con nefritis de suero nefrotóxico inducido muestran importantemente menos daño tubular que sus contrapartes MCP-1 +/+ (Gregory H. Tesch, et al., J. Clin. Invest. 1999, 103, 73).

Varios estudios han demostrado el valor terapéutico

potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico. Los ratones $CCR2^{-/-}$ muestran supervivencia prolongada y reducen la enfermedad renal con relación a su contraparte WT en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico (G. Perez de Lema, et al. J. Am. Soc. Neph. 2005, 16, 3592). Estos datos son consistentes con la actividad que modifica la enfermedad encontrada en estudios recientes en la eliminación genética de MCP-1 (S. Shimizu, et al. Rheumatology (Oxford) 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch, et al., J. Exp. Med. 1999, 190, 1813) o la administración de un antagonista péptido de CCR2 (H. Hasegawa, et al. Artritis & Rheumatism 2003, 48, 2555) en modelos de roedores de lupus.

Un incremento marcado de 30 veces en linfocitos de la lamina propria $CCR2^{+}$ se observó en los intestinos delgados de pacientes con enfermedad de Crohn con relación al íleo sin enfermedad (S. J. Connor, et al. Gut 2004, 53, 1287). También se nota, que hay una expansión en el subconjunto de monocitos $CCR2^{+}/CD14^{+}/CD56^{+}$ circulantes en pacientes con enfermedad de Crohn activa con relación a los controles. Diversos estudios en roedores han demostrado el valor terapéutico potencial de antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de enfermedad de Crohn/colitis. Los ratones $CCR2^{-/-}$ se protegieron de los efectos de la colitis inducida por sulfato de sodio de dextrano (Pietro G. Andres, et al., J. Immunol.

200, 164, 6303). La administración de un antagonista de molécula pequeña de CCR2, CCR5 y CXCR3 (afinidades de enlace de murino = 24, 236 y 369 nM, respectivamente) también se protege contra la colitis inducida por sulfato de sodio de dextrano (H. Tokuyama, et al. Int. Immunol. 2005, 17, 1023). Finalmente, los ratones MCP-1-/- mostraron daño colónico reducido substancialmente (tanto macroscópico como histológico) en un modelo inducido por hapteno de colitis (W. I. Khan, et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2006, 291, G803).

Dos reportes describen la sobreexpresión de MCP-1 en las células epiteliales intestinales y mucosa del intestino de pacientes con enfermedad del intestino inflamatorio (H. C. Reinecker, et al., Gastroenterology 1995, 108, 40 and Michael C. Grimm, et al., J. Leukoc. Biol. 1996, 59, 804).

Un estudio describió la asociación del polimorfismo del promotor en el gen MCP-1 con esceroderma (esclerosis sistémica) (S Karrer et al., J Invest Dermatol. 2005, 124, 92). En modelos relacionados de fibrosis de tejidos, la inhibición del eje CCR2/MCP-1 reduce la fibrosis en la piel (T Yamamoto and K Nishioka, J Invest Dermatol 2003, 121, 510; AM Ferreira et al., J Invest Deramtol. 2006, 126, 1900), pulmón (T Okuma et al., J Pathol. 2004, 204, 594; M Gharaee-Kermani et al., Cytokine 2003, 24, 266), riñón (K Kitagaea et al., Am J Pathol. 2004, 165, 237; T Wada et al., J Am Soc

Naphrol 2004, 15, 940), corazón (S Hayashidani et al., Circulation 2003, 108, 2134) e hígado (S Tsuruta et al., Int J Mol Med. 2004, 14, 837).

Un estudio ha demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de alveolitis. Cuando ratas con lesión pulmonar del complejo inmune IgA se tratan intravenosamente con anticuerpos sacados de rata MCP-1 (JE), los síntomas de la alveolitis se alivian parcialmente (Michael L. Jones, et al., J. Immunol. 1992, 149, 2147).

Varios estudios han demostrado el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción MCP-1/CCR2 en el tratamiento de cáncer (revisado en: M. J. Craig and R. D. Loberg, Cancer Metastasis Rev. 2006, 25, 611; I. Conti and B. Rollins, Seminars in Cáncer Biology 2004, 14, 149; R. Giles and R. D. Loberg, Curr. Cáncer Drug Targets 2006, 6, 659). Cuando ratones inmunodeficientes que portan células de carcinoma de mama humano se trataron con un anticuerpo anti-MCP-1, se observó la inhibición de micrometástasis de pulmón y el incremento en la supervivencia (Rosalba Salcedo, et al., Blood 2000, 96, 34-40). Usando especies con tumor clínico humano, la expresión CCR2 se asoció con la progresión de cáncer de próstata (Y. Lu, et l., J. Cell. Biochem. 2007, 101, 676). Se ha mostrado in vitro, la expresión MCP-1 para mediar el crecimiento y la invasión de la célula de cáncer de

007226

próstata (Y. Lu et al., Prostate 2006, 66, 1311); adicionalmente, MCP-1 expresado por las células de cáncer de próstata inducido por los progenitores de la médula ósea humana para la reabsorción del hueso (Y. Lu, et al., Cáncer Res. 2007, 67, 3646).

Estudios múltiples han descrito el valor terapéutico potencial del antagonismo de la interacción de MCP-1/CCR2 en el tratamiento de las restenosis. En humanos, los niveles de MCP-1 se correlacionan directamente con el riesgo para las restenosis (F. Cipollone, et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.. 2001, 21, 327). Los ratones deficientes en CCR2 o en MCP-1 muestran reducciones en el área íntima y en la relación íntima/media (con relación a las camadas de tipo silvestre) después de la lesión de la arteria (Merce Roque, et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002, 22, 554; A. Schober, et al. Circ. Res. 2004, 95, 1125; W. J. Kim, et al. Biochem Biophys Res Común. 2003, 310, 936). En ratones, la transfección de un inhibidor negativo dominante de MCP-1 en el músculo esqueletal (K. Egashira, et al. Circ. Res. 2002, 90, 1167) también reduce la hiperplasia íntima después de la lesión arterial. El bloqueo de CCR2 usando un anticuerpo neutralizando reduce la hiperplasia neoíntima después de que se coloca en endoprotesis vascular en primates (C. Horvath, et al. Circ. Res. 2002, 90, 488).

Dos reportes describen la sobreexpresión de ratas MCP-1

227

con trauma de cerebro inducido (J. S. King, et al., J. Neuroimmunol. 1994, 56, 127, and Joan W. Berman, et al., J. Immunol. 1996, 156, 3017). Además, los estudios han mostrado que tanto ratones $CCR2^{-/-}$ (O. B. Dimitrijevic, et al., Stroke 2007, 38, 1345) como $MCP\text{-}1^{-/-}$ (P., M. Hughes, et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 2002, 22, 308) se protegen parcialmente de la lesión por isquemia/reperfusión.

Se conoce que los monocitos/macrófagos juegan un papel importante en el desarrollo del dolor neuropático (Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, Pain 2000, 86, 25). Consistente con esta noción, un papel potencial para CCR2 en el tratamiento de tanto el dolor inflamatorio como neuropático se han descrito recientemente. Los ratones $CCR2^{-/-}$ muestran respuestas alteradas para dolor inflamatorio con relación a sus contrapartes WT, incluyendo comportamiento de dolor reducido después de la inyección de formalina entre las plantas y reduce ligeramente la alodinia mecánica después de la inyección CFA entre plantas (C. Abbadie, et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 2003, 100, 7947). Además, los ratones $CCR2^{-/-}$ no despliegan alodinia mecánica importante después de lesión de nervio ciático. De forma similar, un antagonista CCR2 de molécula pequeña reduce la alodinia mecánica a ~80% de niveles pre-lesión después de la administración oral (C. Abbadie, J. A. Lindia, and H. Wang, WO PCT 110376, 2004).

Un estudio describió el papel crítico de MCP-1 en

228

cardiomiopatía isquémica (N. G. Frangogiannis, et al., Circulation 2007, 115, 584). Otro estudio describe la atenuación de insuficiencia cardiaca experimental seguido por la inhibición de MCP-1 (S Hayashidani et al., Circulation 2003, 108, 2134).

Otros estudios han proporcionado evidencia de que la MCP-1 se sobreexpresa en varios estados de enfermedad no mencionados arriba. Estos reportes proporcionan una evidencia correlativa de que los antagonistas de MCP-1 podrían ser terapéuticos útiles para tales enfermedades. Otro estudio ha demostrado la sobreexpresión de MCP-1 en aloinjertos cardiacos de roedores, lo que sugiere un papel para la MCP-1 en la patogénesis de la arterioesclerosis de transplante (Mary E. Russell, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6086). La sobreexpresión de MCP-1 se ha notado en las células endoteliales de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Harry N. Antoniades, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 5371). Similarmente, la sobreexpresión de MCP-1 se ha notado en la piel de pacientes con psoriasis (M. Deleuran, et al., J. Dermatol. Sci. 1996, 13, 228, and R. Gillitzer, et al., J. Invest. Dermatol. 1993, 102, 127); los hallazgos correlativos con predominancia de células CCR2+ también se han reportado (C. Vestergaard, et al. Acta Derm. Venerol. 2004, 84, 353). Finalmente, un reporte reciente ha mostrado que MCP-1 se sobreexpresa en los cerebros y fluido

229

cerebroespinal de pacientes con demencia asociada con el VIH-1 (Alfredo Garzino-Demo, WO 99/46991).

Además, se ha demostrado que el polimorfismo CCR2 se asocia con la sarcoidosis al menos en un subconjunto de los pacientes (P. Spagnolo, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2003, 168, 1162).

También deberá notarse que CCR-2 se ha implicado como un co-receptor para algunas cepas de VIH (B. J. Doranz, et al., Cell 1996, 85, 1149). También se ha determinado que el uso de CCR-2 como un co-receptor del VIH está correlacionado con el progreso de la enfermedad (Ruth I. Connor, et al., J. Exp. Med. 1997, 185, 621). Este hallazgo es consistente con el reciente hallazgo de que la presencia de un mutante CCR-2, CCR2-64I, está correlacionado positivamente con el retardo en el inicio del VIH en la población humana (Michael W. Smith, et al., Science 1997, 277, 959). No obstante que la MCP-1 no se ha implicado en estos procesos, puede ser que los antagonistas de MCP-1 que actúan por medio del enlace al CCR-2 puedan tener efectos terapéuticos benéficos en el retardo del progreso de la enfermedad para el SIDA en pacientes infectados con el VIH.

Se notará que CCR-2 también es el receptor para las quimiocinas MCP-2, MCP-3 y MCP-4 (Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445). Ya que los nuevos compuestos de la fórmula (I) descritos en la presente, antagonizan la MCP-1

por el enlace al receptor CCR-2, puede ser que estos compuestos de la fórmula (I) también sean antagonistas efectivos de las acciones de MCP-2, MCP-3 y MCP-4 que están mediadas por CCR-2. En consecuencia, cuando se hace referencia a "antagonismo del MCP-1", se supone que esto es un equivalente de "antagonismo de la estimulación de quimiocina de CCR-2".

En consecuencia, los compuestos que modulan la actividad de quimiocina pueden demostrar un intervalo amplio de utilidades al tratar enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares. La Publicación de Solicitud de Patente de EUA. WO2005021500 A1 (incorporado en la presente para referencia y se asigna a la solicitud presente) describe compuestos que modulan la actividad MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4 por medio de CCR2. La referencia también describe varios procesos para preparar estos compuestos incluyendo síntesis de etapa múltiple que incluye la introducción y la eliminación posterior de grupos protectores.

Es deseable encontrar nuevos compuestos con características farmacológicas mejoradas comparadas con moduladores de la quimiocina conocida. Por ejemplo, es deseable encontrar nuevos compuestos con actividad inhibidora CCR-2 mejorada y selectividad para CCR-2 contra otros receptores acoplados a la proteína G (esto es, receptor

5HT2A). También es deseable encontrar compuestos con características ventajosas y mejoradas en una o más de las siguientes categorías:

(a) propiedades farmacológicas (esto es, solubilidad, permeabilidad, receptibilidad para formulaciones de liberación sostenida);

(b) requerimientos de dosis (por ejemplo, dosis inferiores y/o dosis una vez diaria);

(c) factores los cuales disminuyen las características a través de un pico de concentración de sangre (esto es, liberación y/o volumen de la distribución);

(d) factores que incrementan la concentración de fármaco activo al receptor (esto es, proteína enlazada, volumen de distribución);

(e) factores que disminuyen la responsabilidad de interacciones clínicas fármaco-fármaco (inhibición o inducción de la enzima P450 de citocromo, tales como inhibición de CYP 2D6, ver G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, Clin. Pharmacolkinet. 2000, 38, 41-57, la cual se incorpora en la presente para referencia);

(f) factores que disminuyen el potencial para efectos secundarios adversos (por ejemplo, receptores acoplados a la proteína G superiores a la selectividad farmacológica, reactividad metabólica o química potencial, penetración CNS limitada, selectividad del canal de ion). Es específicamente

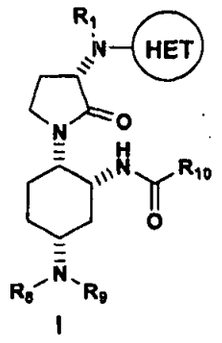
deseado encontrar compuestos que tienen una combinación deseada de las características farmacológicas antes mencionadas.

También se desea en la técnica proporcionar procesos nuevos y/o mejorados para preparar tales compuestos. Estos procesos pueden caracterizarse, sin limitación, por a) adaptación fácil para producción a grande escala, tales como planta piloto o escalas de manufactura; b) etapas de procesos y/o técnicas que faciliten mejoras en la pureza (incluyendo pureza química), estabilidad y/o facilidad de manejo de los intermediarios y/o compuestos finales; y/o c) menores etapas de proceso.

Sumario de la Invención

La presente invención proporciona antagonistas o agonistas/antagonistas parciales novedosos de la actividad del receptor MCP-1: N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o un sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptables de los mismos, que tiene una combinación inesperada de características farmacológicas deseables. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas que contienen los mismos y los métodos de uso de los mismos como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicos, cáncer y/o

cardiovasculares también es un objetivo de esta invención. La presente descripción también proporciona un proceso para preparar los compuestos de la fórmula (I), incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:



I

en donde R^1, R^8, R^9, R^{10} y 

son como se describen en la presente. Los compuestos que son intermediarios útiles de los procesos también se proporcionan en la presente.

La presente descripción también proporciona el uso de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o un sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptables, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicos, cáncer y/o cardiovasculares.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1. Patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0.5-4.

Figura 2. Patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2.

Figura 3. Patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, 1.75 moles H_2O, Forma H1.75-5.

Figura 4. Patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de mono-etanol, Forma E-1.

Figura 5. Patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de ácido mono-acético, Forma HAC-1.

Figura 6. Patrones en polvo experimentales y simulados de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-

09/ 412 19205

il)ciclohexil)acetamida, solvato de mono-R-propilen glicol, Forma RPG-3.

Figura 7. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0.5-4.

Figura 8. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, hemi-hidrato, Forma H0.5-4.

Figura 9. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2.

Figura 10. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2.

Figura 11. Isotermia de Sorción de Vapor de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, Forma N-2 a 25ºC.

Figura 12. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, 1.75 moles H_2O,

236

Forma H1.75-5.

Figura 13. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, 1.75 moles H_2O, Forma H1.75-5.

Figura 14. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de ácido mono-acético, Forma HAC-1.

Figura 15. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de ácido mono-acético, Forma HAC-1.

Figura 16. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de mono-etanol, Forma E-1.

Figura 17. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de mono-etanol, Forma E-1.

Figura 18. DSC de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de mono-R-propilen glicol, Forma RPG-3.

Figura 19. TGA de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, solvato de mono-R-propilen glicol, Forma RPG-3.

Figura 20. Modelo de desafío intradermal en monos cinomólogos: El Ejemplo 1 inhibe el reclutamiento celular mononuclear a la piel.

Figura 21. Peritonitis TG de 48 horas en ratón hCCR2 KI: Ejemplo 1 inhibición de la infiltración de monocito/macrófago en la cavidad peritoneal.

Figura 22. EAE en ratón hCCR2 KI (encefalomielositis autoinmune experimental): Ejemplo 1 tratamiento de calificación clínica reducida.

Figura 23. Espectro de RMN de protones del Ejemplo 1, 2da Preparación Alternativa, Etapa 3- Compuesto 7.

Figura 24. Espectro de RMN de protones del Ejemplo 1, 2da Preparación Alternativa, Etapa 4 - Compuesto 8.

Figura 25. Espectro de RMN de protones del Ejemplo 1, 2da Preparación Alternativa, Etapa 4 - Compuesto 9.

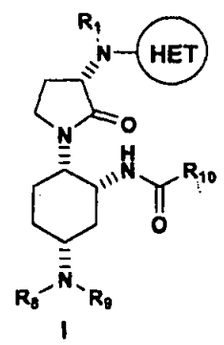
Figura 26. Espectro de RMN de protones del Ejemplo 1, 2da Preparación Alternativa, Etapa 4 - Compuesto 10.

Figura 27. Espectro de RMN de protones del Ejemplo 1, 2da Preparación Alternativa, Etapa 5- Compuesto 11.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona un antagonista o

agonistas/antagonistas parciales novedosos de la actividad del receptor MCP-1: N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o un sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptables de los mismos, que tiene una combinación inesperada de características farmacológicas deseables. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas que contienen los mismos y los métodos de uso de los mismos como agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares también es un objetivo de esta invención. La presente descripción también proporciona un proceso para preparar los compuestos de la fórmula (I), incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:



I

en donde R^1, R^8, R^9, R^{10} y HET son como se describen

en la presente. Los compuestos que son intermediarios útiles de los procesos también se proporcionan en la presente.

La N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, demuestra inesperadamente una combinación deseable de características farmacológicas incluyendo un grado alto sorpresivamente de biodisponibilidad oral en combinación con indicaciones que es altamente eficaz y tiene criterios de seguridad excelentes.

Los moduladores conocidos de los receptores CCR2, tales como aquellos descritos en la publicación de Patente WO2005021500 A1 publicado el 10 de marzo de 2005 (Patente de EUA No. 7,163,937, presentada el 16 de Enero de 2007, asignado para la Solicitud actual) que demuestra un grado adecuado de permeabilidad de membrana (un factor crítico de biodisponibilidad oral), no son suficientemente eficaces, como se mide por su capacidad de enlazar a CCR2 (una medición de eficacia), y/o carecen de criterios apropiados para seguridad como se indica por la selectividad del canal de iones como se mide por hERG y estudios del canal de iones Na+.

En contraste, como se ilustra por los datos presentados en la presente en la sección titulada "Características farmacológicas comparativas", infra, la relatividad de molécula polar, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-

oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida demuestra un grado sorpresivamente alto de permeabilidad de membrana, y todavía mantiene la capacidad de enlazar a CCR2 potente junto con selectividad del canal de iones excelente.

En consecuencia, la presente invención proporciona un modulador de quimiocina nuevo que tiene caracteristicas farmacológicas mejoradas que se esperan para ser útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabólicas, de cáncer y/o cardiovasculares.

MODALIDADES

En una modalidad, la descripción se dirige a N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, la forma cristalina comprende de la forma N-2.

Otra modalidad es una forma N-2 caracterizada porque (o tiene) parámetros de célula unitaria substancialmente igual a lo siguiente:

Dimensiones de célula:

a = 18.7240 (4)

b = 8.0171 (2)

c = 19.6568 (5)

α = 90

β = 114.935 (2))

γ = 90

V(Å^3) = 2675.7(1)

Grupo de espacio $P2_12_12_1$

Moléculas/célula unitaria 2

en donde el cristal es a una temperatura de alrededor de +22°C (TA).

Otra modalidad es una forma N-2 caracterizada por (o tiene) un patrón de difracción de polvo de rayos X que comprende tres o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados de 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 y 19.2, a una temperatura de alrededor de 22°C.

Otra modalidad es una forma N-2 caracterizada por (o tiene) un patrón de difracción de polvo de rayos X que comprende además cuatro o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados del grupo que de 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 y 19.2 a una temperatura de alrededor de 22°C.

Otra modalidad es una forma N-2 caracterizada por (o tiene) coordenadas atómicas fraccionales substancialmente como se enlistan en la Tabla 3.

Otra modalidad es una forma N-2 caracterizada por (o tiene) un patrón de difracción de polvo de rayos X substancialmente de acuerdo a la figura 2.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, sal del ácido di-bencensulfónico, que comprende la forma H1.75-5 (1.75 moles de agua), caracterizada por los parámetros de célula unitaria encontrados en la Tabla 1; 3 ó 4 o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionales substancialmente como se enlistan en la Tabla 4; y/o un patrón de difracción de polvo de rayos X substancialmente de acuerdo a la figura 3.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, que comprende la forma H0.5-4 (hemi-hidrato), caracterizada por los parámetros de célula unitaria encontrados en la Tabla 1; 3 ó 4 o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionales substancialmente como se

enlistan en la Tabla 2; y/o un patrón de difracción de polvo de rayos X substancialmente de acuerdo a la figura 1.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, que comprende la forma E-1 (solvato de mono-acetona), caracterizada por los parámetros de célula unitaria encontrados en la Tabla 1; 3 ó 4 o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionales substancialmente como se enlistan en la Tabla 5; y/o un patrón de difracción de polvo de rayos X substancialmente de acuerdo a la figura 4.

Otra modalidad es la forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, que comprende la forma (solvato de ácido mono-acético), caracterizada por los parámetros de célula unitaria encontrados en la Tabla 1; 3 ó 4 o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados de la Tabla 6; coordenadas atómicas fraccionales substancialmente como se enlistan en la Tabla 6; y/o un patrón de difracción de polvo de rayos X substancialmente de acuerdo a la figura 5.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-

5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre que comprende la forma IPA-1 (solvato de mono-isopropanol), caracterizada por los parámetros de célula unitaria encontrados en la Tabla 1; 3 ó 4 o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionales substancialmente como se enlistan en la Tabla 7.

Otra modalidad es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre que comprende la forma RPG-3 (solvato de mono-R-propilen glicol), caracterizada por los parámetros de célula unitaria encontrados en la Tabla 1; 3 ó 4 o más valores 2θ (CuKα λ = 1.5418Å) seleccionados de la Tabla 9; coordenadas atómicas fraccionales substancialmente como se enlistan en la Tabla 8 y/o un patrón de difracción de polvos de rayos X substancialmente de conformidad a la figura 6.

Otra modalidad, es una composición farmacéutica, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para la modulación de la quimiocina o la actividad del receptor de la quimiocina, que comprende administrar a un paciente que necesite del mismo

245

una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para la modulación de la actividad del receptor CCR-2 que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para la modulación de MCP-1, MCP-2, MCP-3, y MCP-4 y la actividad MCP-5 que está mediada por el receptor CCR2 que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para la modulación de la actividad MCP-1 que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para inhibir la actividad CCR2 y CCR5 que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar trastornos, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, los trastornos se seleccionan de otra modalidad es un método para tratar trastornos, que comprende administrar al paciente que necesita del mismo una cantidad

246

terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, los trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esqueroderma, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada con VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arterioesclerosis por transplante, trauma cerebral físicamente o químicamente inducido, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis de suero nefrotóxico, nefritis glomerular, asma, esclerosis múltiple, arterioesclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, restenosis, hiperplasia neoíntima venosa, hiperplasia neoíntima de injerto de diálisis, hiperplasia íntima de derivación arteriovenosa, transplante de órganos, nefropatía de aloinjerto crónico y cáncer.

Otra modalidad es un método para tratar trastornos, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en donde los trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arterioesclerosis por transplante, trauma cerebral físicamente o químicamente inducido, enfermedad

inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis de suero nefrotóxico, nefritis glomerular, asma, esclerosis múltiple, arterioesclerosis y artritis reumatoide, restenosis, transplante de órganos, y cáncer.

Otra modalidad es un método para tratar trastornos, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en donde los trastornos se seleccionan de diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, nefritis glomerular, esclerosis múltiple, arterioesclerosis, restenosis y transplante de órganos.

Otra modalidad es un método para tratar trastornos, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en donde los trastornos se seleccionan de esclerosis múltiple, arterioesclerosis, enfermedad de Crohn y diabetes.

Otra modalidad es un método para tratar trastornos, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos, en donde los trastornos se seleccionan de restenosis, transplante de órganos, y cáncer.

Otra modalidad es un método para tratar diabetes, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo

una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar la enfermedad de Crohn, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar la esclerosis múltiple, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar la ateroesclerosis, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar la restenosis, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar el transplante de órganos, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los

249

ejemplos.

Otra modalidad es un método para tratar el cáncer, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata y melanoma.

Otra modalidad es un método para tratar enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicas, cáncer y/o cardiovasculares que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un métodos para tratar enfermedades inflamatorias, alérgicas, autoinmunes, metabolicas, cáncer y/o cardiovasculares las cuales son al menos parcialmente mediadas por CCR-2, que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para la modulación de la actividad CCR2 que comprende administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un método para la modulación de la actividad MIP-1β y RANTES que es mediada por el receptor CCR5 que comprende administrar a un paciente que necesite del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de los ejemplos.

Otra modalidad es un compuesto de los ejemplos en la

preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esqueroderma, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada con VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arterioesclerosis por transplante, trauma cerebral físicamente o químicamente inducido, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis de suero nefrotóxico, nefritis glomerular, asma, esclerosis múltiple, arterioesclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, restenosis, hiperplasis neoíntima venosa, hiperplasia neoíntima de injerto de diálisis, hiperplasia íntima de derivación arteriovenosa, transplante de órganos, nefropatía de aloinjerto crónica y cáncer.

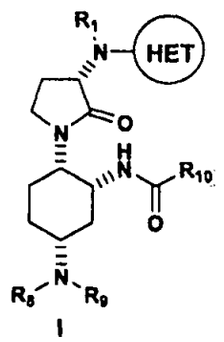
Otra modalidad es un compuesto de los ejemplos para uso en la terapia.

La invención puede abarcarse en otras formas específicas sin salirse del espíritu o atributos esenciales de la misma. Esta invención también abarca todas las combinaciones de los aspectos alternativos y modalidades de la invención notada en la presente. Se entenderá que cualesquiera y todas las modalidades pueden tomarse en conjunto con cualesquiera de

otra modalidad para describir modalidades adicionales de la presente invención. Adicionalmente, cualesquiera de los elementos de una modalidad (incluyendo aspecto preferidos) pueden combinarse con cualesquiera y todos los otros elementos de cualesquiera de las modalidades para describir modalidades adicionales.

MODALIDADES DE PROCESO

La presente descripción proporciona un proceso novedoso para hacer los compuestos de la fórmla I:



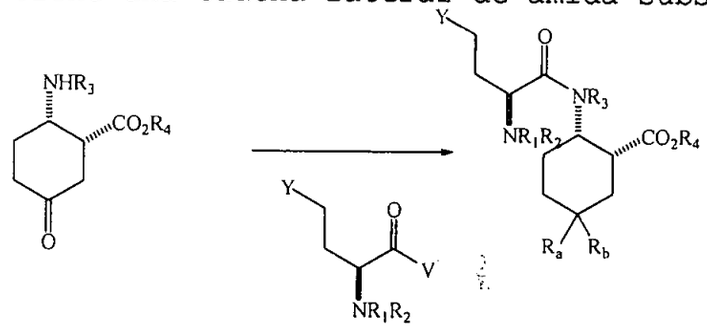
I

Incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal farmacéuticamente del mismo.

En una 1ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula IV, el proceso comprende:

acoplar un derivado de aminoácido de la estructura III, o una sal del mismo, con una ciclohexanona de la fórmula II, o una sal del mismo (ver preparación en WO2005021500), para

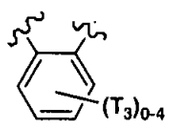
proporcionar un compuesto de la estructura IV, o una sal del mismo que tiene una cadena lateral de amida substituida



en donde:

R_a y R_b son independientemente alcoxi C_{1-6};

o R_a y R_b junto con el carbono al cual ambos se enlazan se combinan para formar un carbonilo, un tiocarbonilo, un acetal cíclico o tioacetal cíclico, en donde el acetal cíclico o tioacetal cíclico se selecciona de -O-Z-O- y -S-Z-S-, Z es $-(CT_1T_2)_2$, $-(CT_1T_2)_3$, o



y T_1, T_2 y T_3 cada que se presenta se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente T_1, T_2 y T_3 son cada uno hidrógeno);

R_1, R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo protector amina;

R_4 es alquilo C_{1-6} inferior o bencilo substituido opcionalmente;

253

Y es halógeno, SMe, $S(Me)^+R_{12}$, o OSO_2R_{13};

V es OH, halógeno o OSO_2R_{13};

R_{12} es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, $-(CH_2)C(O)O$ alquilo C_{1-6}, o $-(CH_2)C(O)O$ alquilo C_{1-6}; y

R_{13} cada que se presenta es alquilo C_{1-6}.

Los grupos protectores amina preferidos son grupos que se pueden remover por hidrólisis o hidrogenólisis bajo condiciones estándar. Tales grupos incluyen sin limitación, un grupo carbobenciloxi (Cbz), un tert-butiloxicarbonilo (BOC), un grupo fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC), un grupo bencilo (Bn) o un grupo p-metoxibencilo (PMB). Más preferidos son grupos Cbz, BOC, o Bn (especialmente Cbz y Bn).

En una 2ª modalidad, la presente descripción proporciona un proceso novedoso en donde:

R_a y R_b junto con los átomos de carbono al cual ambos se enlazan combinados para formar un carbonilo o un grupo 1,3-dioxolano (especialmente un grupo 1,3-dioxolano);

R_1 es hidrógeno;

R_2 es Cbz;

R_3 es hidrógeno;

R_4 es alquilo C_{1-6};

Y es S(Me); y

V es OH.

En una 3ª modalidad, donde Y es -SMe, la descripción proporciona un proceso que además comprende alquilación del

compuesto de la fórmula IV con un grupo $R_{12}X$, donde X es un halógeno, para formar una sal de sulfonio del mismo. El agente de alquilación es preferiblemente yoduro de metilo.

En una 4ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde ciclohexanona de la fórmula IV es una sal de toluensulfonato.

En una 5ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde el compuesto de la fórmula IV es una sal de sulfonio.

En una 6ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde el acoplamiento se conduce bajo una atmósfera inerte, tal como nitrógeno o argón (preferiblemente nitrógeno) en un solvente aprótico tal como proprionitrilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, acetato de tert-butilo o acetonitrilo (especialmente acetonitrilo y/o acetato de etilo).

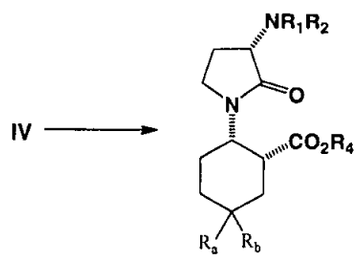
En una 7ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde el acoplamiento se puede obtener por el contacto con un compuesto de la fórmula II con un reactivo de acoplamiento diimida en la presencia de un activador, y una base de amina terciaria. El reactivo de acoplamiento diimida incluye reactivos, por ejemplo tal como EDAC. Los Ejemplos de activadores incluyen HOBt ((el término incluye hidratos del mismo) y N',N'-4-dimetilamino-piridina. Una base de amina terciaria, incluye por ejemplo, trietilamina, N-N-disopropil-

N-etil amina y tri-n-propilamina.

En una 8ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde el reactivo de acoplamiento diimida es EDAC, el activador, es HOBt, (el término incluye hidratos del mismo) y la base de amina terciaria es trietilamina.

En una 9ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde las relaciones en mol de un compuesto de la fórmula II para el reactivo de acoplamiento diimida para el activador para la amina terciaria es alrededor de uno hasta alrededor de 0.090 - 1.50 hasta alrededor de 0.95-1.50 hasta alrededor de 2.00 hasta 3.00, respectivamente. Las relaciones en mol son preferiblemente una hasta alrededor de 0.095 - 1.05 hasta alrededor de 0.95-1.10 y hasta alrededor de 2.10 hasta 2.20, respectivamente.

En una 10ª modalidad, la descripción proporciona un proceso novedoso para preparar un compuesto de la fórmula V que tiene una porción éster:



V

el proceso comprende:

ciclizar la cadena lateral del derivado de aminoácido de

un compuesto de la fórmula IV, o una sal del mismo, para proporcionar un compuesto de la fórmula V que tiene una porción éster.

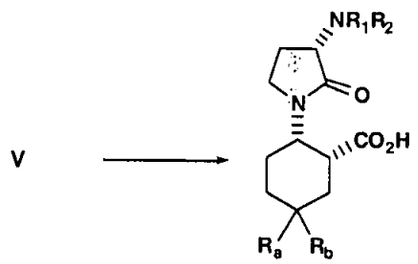
En una 11ª modalidad donde R_a y R_b son independientemente alcoxi C_{1-6}, o R_a y R_b junto con el carbono al cual ambos se enlazan combinados para formar un tiocarbonilo, un acetal cíclico o tioacetal cíclico, la descripción proporciona un proceso que además comprende opcionalmente la etapa de hidrolizar los grupos R_a y R_b de modo que la combinación de R_a y R_b junto con el carbono al cual ambos se enlazan para formar un carbonilo. La hidrolización se puede conducir en un solvente tal como acetona, butanona, acetonitrilo e isopropanol, o soluciones acuosas del mismo, y se conduce preferiblemente en acetona acuosa. Preferiblemente, la etapa de hidrólisis sigue la etapa de ciclización.

En una 12ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde la ciclización se conduce al combinar un compuesto de la fórmula IV, o una sal del mismo, con una base en la presencia de un solvente. Tales bases pueden ser, por ejemplo sin limitación, carbonato de cesio, bicarbonato de cesio, carbonato de potasio, tert-butilato de sodio, hexametildisilazida de sodio, y preferiblemente carbonato de cesio.

En una 13ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde la ciclización se conduce bajo una atmósfera

inerte, tal como nitrógeno o argón (preferiblemente nitrógeno) en un solvente que incluye, por ejemplo sin limitante, DMSO, DMF, DMA, N-metilpirrolidona, sulfolano (especialmente DMSO y/o DMF).

En una 14ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula VI:



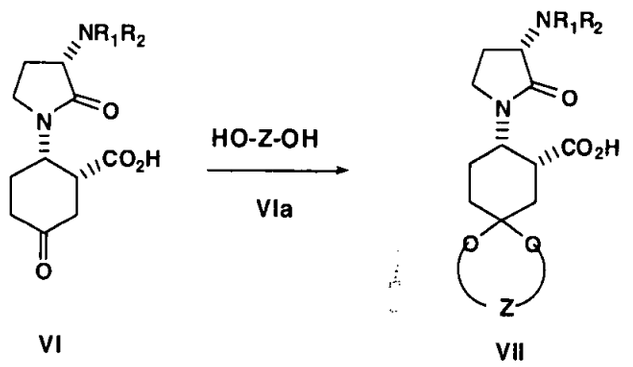
VI

el proceso comprende:

hidrolizar la porción éster del compuesto de la fórmula V con un agente de hidrolización para formar el ácido del compuesto VI a temperaturas desde alrededor de -5 hasta alrededor de 5°C. Los agentes de hidrolización de éster son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen hidróxidos de metal alcalino, MOH, donde M es Li, Na o K, preferiblemente el agente de hidrolización es NaOH acuoso. Preferiblemente la etapa de hidrolización se realiza bajo condiciones bifásicas con un solvente orgánico que es parcialmente mezclable en agua. Los solventes orgánicos preferidos son éteres acíclicos o cíclicos que incluyen THF, 2-metilo THF, 1,2-dimetoxietaen, 1,4-dioxano, especialmente THF.

258

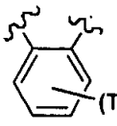
Alternativamente, en una 15ª modalidad, donde R_a y R_b junto con el átomo al cual ambos se enlazan combinados para formar un carbonilo, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula VII:



VI VII

el proceso comprende:

reaccionar un compuesto de la fórmula VIa, HO-Z-OH, con un compuesto de la fórmula IV (opcionalmente in situ) en la presencia de un catalizador ácido para dar un compuesto de la fórmula VII,

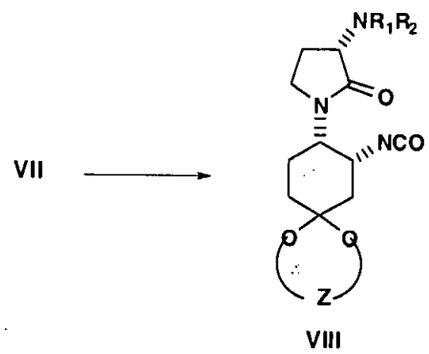
en donde Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o  y

T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente T_1, T_2 y T_3 son cada uno hidrógeno).

Preferiblemente el compuesto de la fórmula VIa es etilen glicol y el catalizador ácido es ácido p-toluensulfónico, o

un hidrato del mismo.

En una 16ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula VIII:



VIII

el proceso comprende:

transformar el cetal de la fórmula VII a un isocianato intermediario de la fórmula VIII. La transformación se conduce preferiblemente por medio de una configuración Curtius.

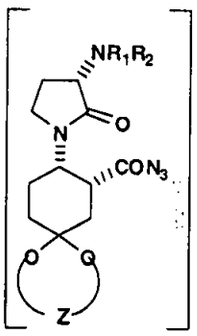
En una 17ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde la etapa de transformación se conduce por medio de una configuración Curtius que comprende las etapas de:

a) mezclar una solución substancialmente anhidra de la fórmula VII con una base (la base es por ejemplo, sin limitación, una alquilamina, especialmente una amina terciaria, preferiblemente trietilamina);

b) agregar un haloformiato (por ejemplo, un cloroformiato, preferiblemente i-BuO_2CCl) a la solución a una

temperatura desde alrededor de -10°C hasta alrededor de 0°C para formar un anhídrido mezclado del ácido de la fórmula VII;

c) tratar el anhídrido mezclado con un reactivo de azida (preferiblemente NaN_3) en la presencia de un catalizador de transferencia de fase (preferiblemente una sal de tetralquilamonio tal como bromuro de tetrabutilamonio a alrededor de 5% mol) a una temperatura de alrededor de -10°C hasta alrededor de 0°C para formar la azida ácida de la fórmula VIIa:

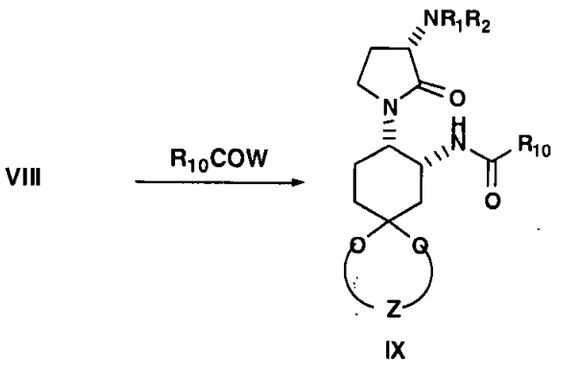


VIIa

; y

d) calentar una solución substancialmente anhidra de la azida de acilo de la fórmula VIIa para formar el isocianato correspondiente de la fórmula VIII. Preferiblemente la solución substancialmente anhidra de azida de acilo se seca sobre tamices moleculares.

En una 18ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula IX que tiene una porción cetal:



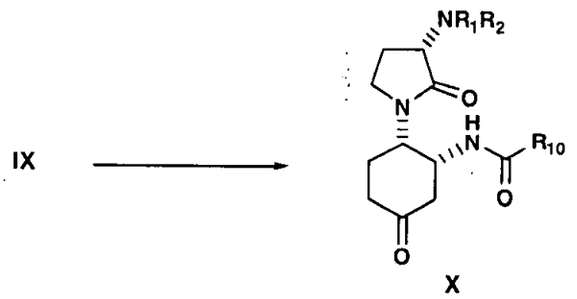
el proceso comprende:

poner en contacto el isocianato de la fórmula VIII (opcionalmente in situ) con un compuesto de la fórmula $R_{10}COW$ (por ejemplo, ácido acético) en la presencia de un anhídrido ácido correspondiente (esto es, $(R_{10}CO)_2O$) para formar la amida de la fórmula IX en donde:

R_{10} es alquilo C_{1-6} (R_{10} es preferiblemente metilo): y

W es OH o Oalquilo C_{1-6}.

En una 19ª modalidad la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula X:

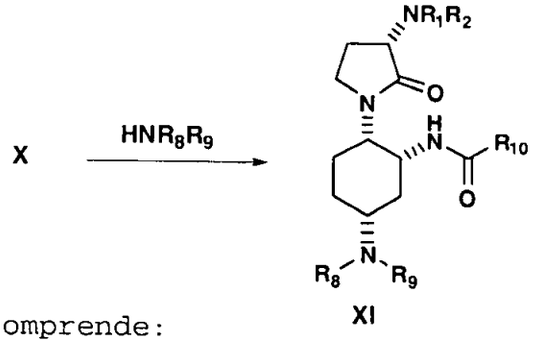


el proceso comprende:

hidrolizar la porción cetal de la amida de la fórmula IX para formar un compuesto de la fórmula X. Las condiciones y reactivos de hidrolización de cetal son bien conocidos por

aquellos expertos en la técnica. La hidrólisis preferiblemente se conduce al calentar una solución del compuesto IX que tiene una porción cetal en un solvente orgánico (por ejemplo acetona) y ácido clorhídrico (alrededor de 1 N) a alrededor de 45°C hasta alrededor de 55°C durante alrededor de 2-4 horas.

En una 20ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula XI:



XI

el proceso comprende:

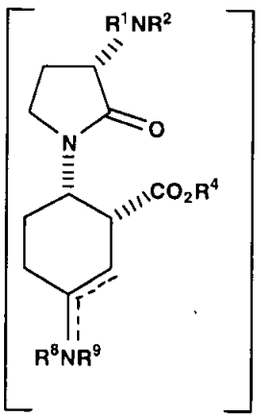
aminar reductivamente el compuesto de la fórmula X con una amina de la fórmula HNR_8R_9 en la presencia de un ácido Lewis seguido por un agente reductor para formar un compuesto de la fórmula XI que tiene una porción pirrolidonilo amina.

En una 21ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde aminar reductivamente comprende las etapas de:

a) agregar un ácido Lewis (preferiblemente un reactivo de titanio que incluye, sin limite, $TiCl_2$(O-iso-propil)$_2$) a una solución del compuesto X y la amina que tiene la fórmula HNR_8R_9 en un solvente aprótico para formar una imina-enamina

253

de la fórmula XA:



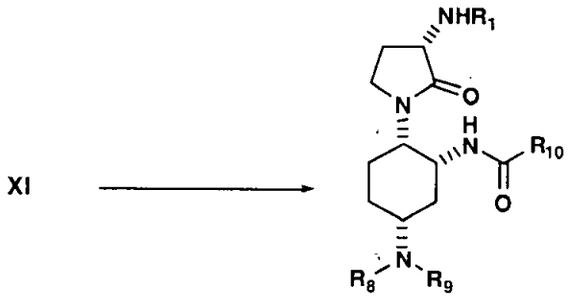
Xa ; y

b) tratar la imina-enamina de la fórmula Xa con un agente reductor (preferiblemente borano dimetil sulfuro) para proporcionar el compuesto de la fórmula XI que tiene una porción pirolindonil amina.

En las etapas anteriores, el solvente aprótico puede ser por ejemplo, sin limitación, diclorometano, acetonitrilo, DMSO, DMF, y N-metil-pirrolidinona (preferiblemente diclorometano).

En un 22ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde la amina de la fórmula $HN(R_8)(R_9)$ es preferiblemente tert-butil amina.

En una 23ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula XII:



XII

el proceso comprende:

desproteger la amina de pirollidonilo de la fórmula XI para formar un compuesto de la fórmula XII.

En una 24ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde la etapa de desprotección se lleva a cabo por hidrogenación por una solución del compuesto de la fórmula XII en la presencia de un catalizador tal como paladio. Preferiblemente la hidrogenación se lleva a cabo a alrededor de 20 hasta alrededor de 40 psig (2.812 kg/cm^2) en un solvente, incluyendo, sin limitación, metanol, sobre catalizador 5% Pd/C a alrededor de 25°C durante alrededor de dos hasta alrededor de seis horas.

En una 25ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula I que comprende acoplamiento del compuesto de la fórmula XII con un compuesto de la fórmula



para proporcionar un compuesto de la fórmula I en donde:

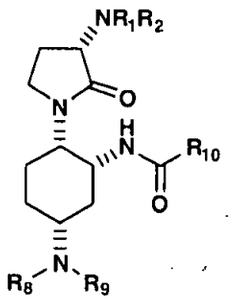
El HET es un anillo heteroarilo de 3-14 miembros que tiene uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados de N, O o S (preferiblemente uno hasta tres heteroátomos, especialmente uno hasta dos átomos de nitrógeno) en al menos uno de los anillos (HET es preferiblemente un quinazolin-4-il 6-substituido, más preferiblemente 6-trifluorometil-quinazolin-

4-il); y

LG es un grupo saliente seleccionado de halógeno o OSO_2R_{16}, en donde R_{16} es fenilo, un heteroarilo de 5 hasta 7 miembros que tiene uno o más átomos seleccionados de N, S, o O, alquilo C_{1-6}, o un cicloalquilo de 3 hasta 7 miembros, todos los cuales son substituidos opcionalmente por uno hasta tres grupos seleccionados de halógeno, CF_3 y alquilo C_{1-6} (preferiblemente LG es un halógeno, especialmente cloro).

Un grupo saliente como se usa en la presente incluye, sin limitación, grupos tal como halógenos, mesilato, nonaflatos, sulfonatos, tosilatos y triflatos. Un grupo saliente preferido es halógeno o OSO_2R_{16}, en donde R_{16} es fenilo, un heteroarilo de 5 hasta 7 miembros que tiene uno o más átomos seleccionados de N, S u O, alquilo C_{1-6}, o un cicloalquilo de 3 hasta 7 miembros, todos los cuales son substituidos opcionalmente por uno hasta tres grupos seleccionados de halógeno, CF_3, y alquilo C_{1-6}. En la modalidad más preferida LG es un halógeno, especialmente cloro.

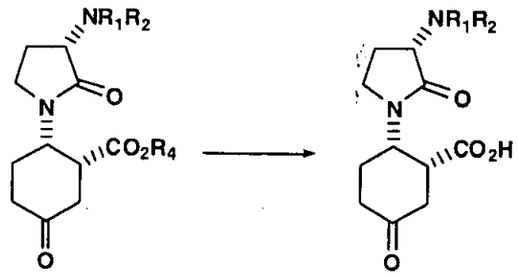
En una 26ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula X:



XI

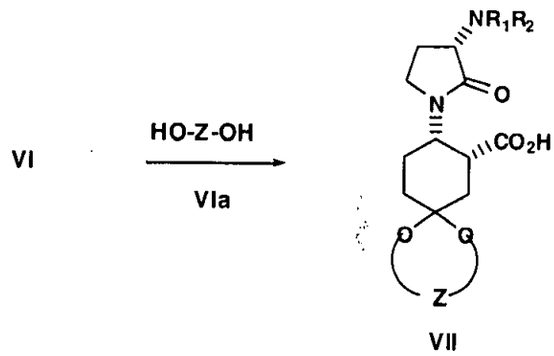
Comprende las etapas de:

hidrolizar la porción éster del compuesto de la fórmula V con un agente de hidrolización para formar el ácido del compuesto VI a temperaturas desde alrededor de -5 hasta alrededor de 5 ºC:



V VI

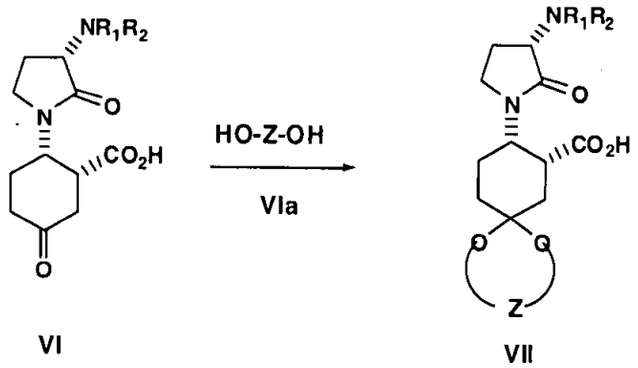
reaccionar un compuesto de la fórmula VIa, HO-Z-OH, con un compuesto de la fórmula IV (opcionalmente in situ) en la presencia de un catalizador ácido para dar un compuesto de la fórmula VII que tiene una porción de ácido carboxílico:



VII

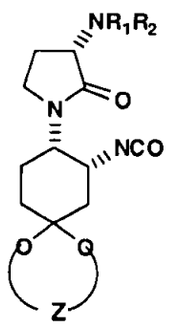
reaccionar un compuesto de la fórmula VIa, HO-Z-OH (preferiblemente alquilen glicol, especialmente etilen glicol), con un compuesto de la fórmula IV (opcionalmente in situ) en la presencia de un catalizador ácido

(preferiblemente ácido p-toluensulfónico, o un hidrato del mismo) para dar un compuesto de la fórmula VII que tiene una porción de ácido carboxílico:



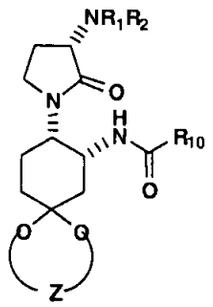
VI VII

transformar la porción de ácido carboxílico del cetal de la fórmula VII a un isocianato intermediario correspondiente de la fórmula VIII:



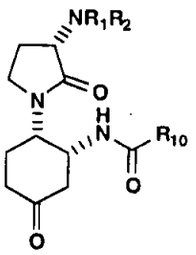
VIII;

poner en contacto el isocianato de la fórmula VIII (opcionalmente in situ), con un compuesto de la fórmula $R_{10}COW$ (por ejemplo, ácido acético) en la presencia de un anhídrido ácido correspondiente (esto es $(R_{10}CO)_2O$) para formar la amida de la fórmula IX que tiene una porción cetal:



IX; y

hidrolizar la porción cetal de la amida de la fórmula IX para formar el compuesto de la fórmula X:



X;

en donde:

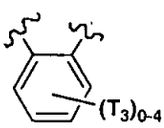
R_1, y R_2 son independientemente hidrógeno o un grupo protector amina;

R_4 y R_{10} son independientemente alquilo C_{1-6} o bencilo substituido opcionalmente;

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

W es OH o Oalquilo C_{1-6};

Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o



; y

T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan son independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y

C(=O)alquilo C_{1-4}.

En una 27ª modalidad, la descripción proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula XI en donde:

el compuesto de la fórmula VII es ácido (7R,8S)-8-((3S)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaespiro[4.5]decano-7-carboxílico, o una sal del mismo;

el compuesto de la fórmula VIIa es ((3S)-1-((7R,8S)-7-(azidocarbonil)-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

el compuesto de la fórmula VIII es ((3S)-1-((7R,8S)-7-isocianato-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

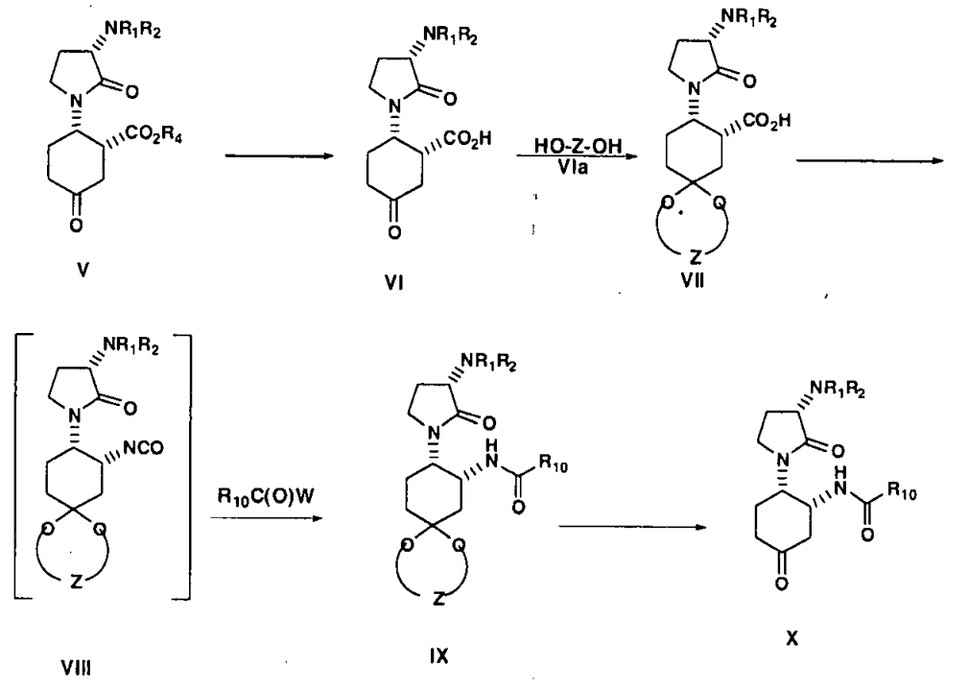
el compuesto de la fórmula IX es ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

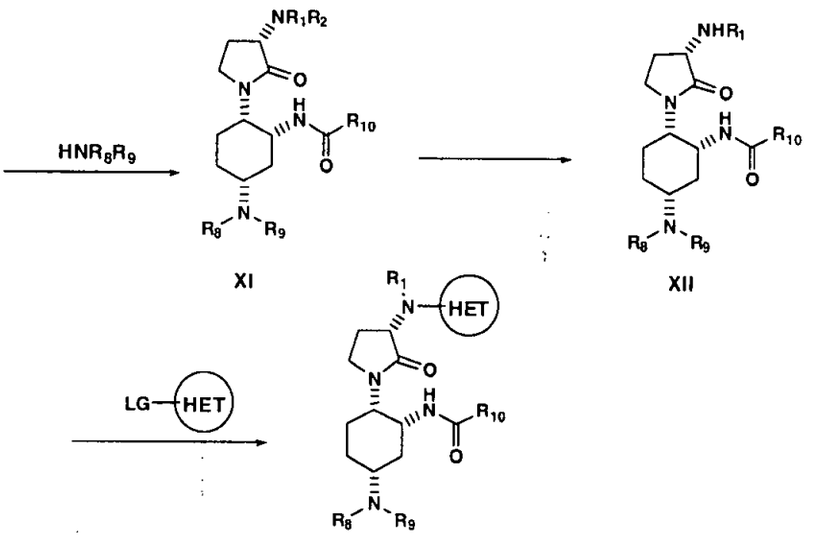
el compuesto de la fórmula X es ((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo; y

el compuesto de la fórmula XI es ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 28ª modalidad, la descripción proporciona un

proceso para preparar un compuesto de la fórmula I:





el proceso comprende:

hidrolizar la porción éster del compuesto de la fórmula

- 271

V con un agente de hidrolización (preferiblemente un hidróxido alcalino, especialmente hidróxido de sodio) para formar un compuesto de la fórmula VI;

reaccionar un compuesto de la fórmula Va, HO-Z-OH, con el compuesto de la fórmula VI, opcionalmente in situ, en la presencia de catalizador ácido (preferiblemente ácido p-toluensulfónico, o un hidrato del mismo) para proporcionar un compuesto de la fórmula VII que tiene una porción de ácido carboxílico;

transformar la porción de ácido carboxílico del cetal de la fórmula VII para formar un isocianato intermediario correspondiente de la fórmula VIII;

poner en contacto el isocianato de la fórmula VIII, opcionalmente in situ, con un compuesto de la fórmula $R_{10}COW$ (preferiblemente ácido acético) en la presencia de un anhídrido ácido correspondiente, $(R_{10}CO)_2O$ (preferiblemente anhídrido acético), para formar la amida de la fórmula IX que tiene una porción cetal;

hidrolizar la porción cetal de la amida de la fórmula IX para formar el compuesto de la fórmula X; y

aminar reductivamente el compuesto de la fórmula X con una amina de la fórmula HNR_8R_9 (preferiblemente amina tert-butilo) en la presencia de un ácido Lewis (preferiblemente un reactivo de titanio tal como $TiCl_2(O\text{-iso-propil})_2$) para formar un compuesto de la fórmula XI que tiene una porción

pirollidonil amina;

desproteger la pirollidinil amina de la fórmula XI para formar un compuesto de la fórmula XII; y

acoplar el compuesto de la fórmula XII con un compuesto de la fórmula



para proporcionar un compuesto de la fórmula I;

en donde:

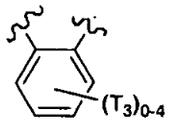
R_1, y R_2 son independientemente hidrógeno o un grupo protector amina;

R_4 y R_{10} son independientemente alquilo C_{1-6} o bencilo substituido opcionalmente;

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

W es OH o Oalquilo C_{1-6};

Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o



;

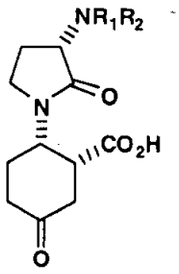
T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente Z es $-(CH_2)_2-$);

HET es un anillo heteroarilo de 3-14 miembros que tiene uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados de N, O o S (preferiblemente uno hasta tres heteroátomos, especialmente

uno hasta dos átomos de nitrógeno) en al menos uno de los anillos (HET es preferiblemente un quinazolin-4-il 6 substituido, más preferiblemente 6-trifluorometil-quinazolin-4-il); y

LG es un grupo saliente seleccionado de halógeno o OSO_2R_{16}, en donde R_{16} es fenilo, un heteroarilo de 5 hasta 7 miembros que tiene uno o más átomos seleccionados de N, S, o O, alquilo C_{1-6}, o un cicloalquilo de 3 hasta 7 miembros, todos los cuales son substituidos opcionalmente por uno hasta tres grupos seleccionados de halógeno, CF_3 y alquilo C_{1-6} (preferiblemente LG es un halógeno, especialmente cloro).

En una 29ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula VI, o una sal del mismo:

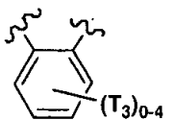


VI

en donde:

R_1 y R_2 son independientemente seleccionados de hidrógeno y un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, y bencilo (preferiblemente R_1 es hidrógeno y R_2 es Cbz);

Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o



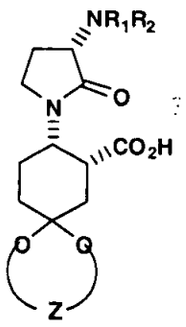
; y

T_1, T_2 y T_3 cada que se presenta son independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente Z es $-(CH_2)_2-$).

Un compuesto preferido de la fórmula VI es ácido (1R,2S)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-oxociclohexancarboxílico o una sal del mismo.

En una 30ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula VI que es ácido (1R,2S)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-oxociclohexancarboxílico o una sal del mismo.

En una 31ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto novedoso de la fórmula VII, o una sal del mismo:

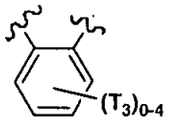


VII

en donde:

R_1 y R_2 son independientemente seleccionados de hidrógeno y un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, y bencilo (preferiblemente R_1 es hidrógeno y R_2 es Cbz);

Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o



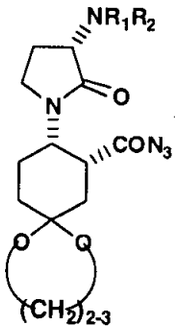
; y

T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan son independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente Z es $-(CH_2)_2-$).

Un compuesto preferido de la fórmula VII es ácido (7R,8S)-8-((3S)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaespiro[4.5]decan-7-carboxílico.

En una 32ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula VII que es ácido (7R,8S)-8-((3S)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaespiro[4.5]decan-7-carboxílico, o una sal del mismo.

En una 33ª modalidad, la descripción proporciona compuestos novedosos de la fórmula VIIa, o una sal del mismo:

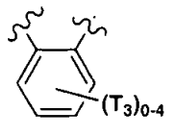


VIIa

en donde:

R_1 y R_2 son independientemente seleccionados de hidrógeno

y un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, y bencilo (preferiblemente R_1 es hidrógeno y R_2 es Cbz);



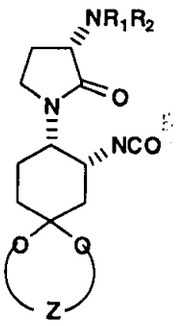
Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o; y

T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan son independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente Z es $-(CH_2)_2-$).

Un compuesto preferido de la fórmula VIIa es ((3S)-1-((7R,8S)-7-(azidocarbonil)-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.

En una 34ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula VIIa que es ((3S)-1-((7R,8S)-7-(azidocarbonil)-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 35ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula VIII, o una sal del mismo:

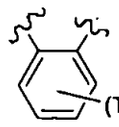


en donde:

R_1 y R_2 son independientemente seleccionados de hidrógeno

y un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, o bencilo (preferiblemente R_1 es hidrógeno y R_2 es Cbz);

Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o



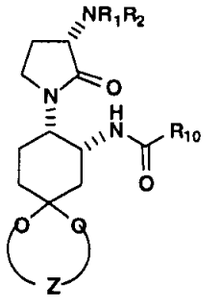
; y

T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan son independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente Z es $-(CH_2)_2-$).

Un compuesto preferido de la fórmula VIII es bencilo ((3S)-1-((7R,8S)-7-isocianato-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato.

En una 36ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula VIII que es ((3S)-1-((7R,8S)-7-isocianato-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 37ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula IX, o una sal del mismo:



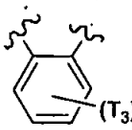
IX

en donde:

275

R_1 y R_2 son independientemente seleccionados de hidrógeno y un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, o bencilo (preferiblemente R_1 es hidrógeno y R_2 es Cbz);

Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o



;

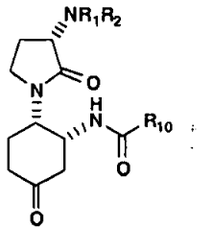
T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan son independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4} (preferiblemente Z es $-(CH_2)_2-$); y

R_{10} es alquilo C_{1-6} (preferiblemente metilo).

Un compuesto preferido de la fórmula IX es ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.

En una 38ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula IX que es ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 39ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula X, o una sal del mismo:



X

en donde:

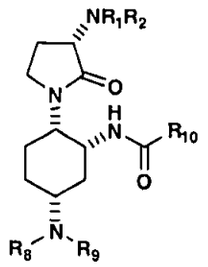
R_1 y R_2 son independientemente hidrógeno o un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, y bencilo; y

R_{10} es alquilo C_{1-6}.

Preferiblemente R_1 es hidrógeno, R_2 es Cbz y R_{10} es metilo. Un compuesto preferido de la fórmula X es ((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.

En una 40ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula X que es ((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 40ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula XI, o una sal del mismo:



XI

en donde:

R_1 y R_2 son independientemente hidrógeno o un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, y bencilo;

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

R_{10} es alquilo C_{1-6}.

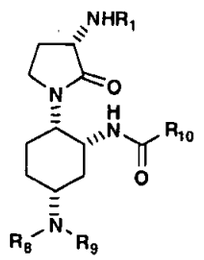
Preferiblemente R_1 es hidrógeno, R_2 es Cbz, R_8 es

230

hidrógeno, R_9 es tert-butilo, y R_{10} es metilo. Un compuesto preferido de la fórmula XI es ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.

En una 41ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula XI que es ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 42ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto de la fórmula XII, o una sal del mismo:



XII

en donde:

R_1 es hidrógeno o un grupo protector amina seleccionado de BOC, Cbz, y bencilo;

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

R_{10} es alquilo C_{1-6}.

Preferiblemente R_1 es hidrógeno, R_8 es hidrógeno, R_9 es tert-butilo, y R_{10} es metilo. Un compuesto preferido de la fórmula XII es N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-amino-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(tert-butilamino)ciclohexil)acetamida.

En una 43ª modalidad, la descripción proporciona un

compuesto de la fórmula XII que es N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-amino-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(tert-butilamino)ciclohexil)acetamida, o una sal del mismo.

En una 44ª modalidad, la descripción proporciona un compuesto seleccionado de:

Ácido (7R,8S)-8-((3S)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaespiro[4.5]decano-7-carboxílico, o una sal del mismo;

((3S)-1-((7R,8S)-7-(azidocarbonil)-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

((3S)-1-((7R,8S)-7-isocianato-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo; y

((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 45ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde:

un compuesto de la fórmula VII es ácido (7R,8S)-8-((3S)-

3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaespiro[4.5]decano-7-carboxílico, o una sal del mismo;

un compuesto de la fórmula VIIa es ((3S)-1-((7R,8S)-7-(azidocarbonil)-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

un compuesto de la fórmula VIII es ((3S)-1-((7R,8S)-7-isocianato-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

un compuesto de la fórmula IX es ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

el compuesto de la fórmula X es ((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo; y

un compuesto de la fórmula XI es ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

En una 46ª modalidad, la descripción proporciona un proceso en donde un compuesto de la fórmula I es N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida o una sal del mismo.

La presente invención puede abarcarse en otras formas específicas sin salirse del espíritu o atributos esenciales de la misma. Así, las modalidades de arriba no deberán

considerarse como limitantes. Cualesquiera y todas las modalidades de la presente invención pueden tomarse en conjunto con cualquier otra modalidad o modalidades para describir las modalidades adicionales. Cada elemento individual (incluyendo aspectos preferidos) de las modalidades es su modalidad independiente. Además, cualquier elemento de una modalidad es un medio para combinarse con cualquiera y todos los otros elementos de cualquier modalidad para describir una modalidad adicional. Además, la presente invención abarca combinaciones de diferentes modalidades, partes de las modalidades, definiciones, descripciones y ejemplos de la invención escritos en la presente.

DEFINICIONES

Las siguientes son definiciones de los términos usados en esta especificación y reivindicaciones anexadas. La definición inicial se proporciona para un grupo o término en la presente que aplica al grupo o término a través de la especificación y reivindicaciones, individualmente o como parte de otro grupo, a menos de que se indique de otra manera.

El término "alquilo" se refiere a grupos de hidrocarburos de cadena recta o ramificada que tienen 1 hasta 12 átomos de carbono, preferiblemente 1 hasta 6 átomos de carbono. Cuando los números aparecen en un subíndice después del símbolo "C", el subíndice se define más específicamente

284

el número de átomos de carbono que un grupo particular puede contener. Por ejemplo, "C_{1-6}alquilo" se refiere a grupos de alquilo de cadena recta y ramificada con uno hasta seis átomos de carbono, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, y así sucesivamente. El subíndice "0" se refiere a un enlace. Así, el término hidroxi alquilo (C_{0-2}) o hidroxialquilo (C_{0-2}) incluyen hidroxi, hidroximetilo y hidroxietilo. Los grupos alquilo pueden substituirse con uno hasta tres grupos seleccionados de alquilo (C_{1-6}), alquenilo (C_{2-6}), hidroxi, halógeno, ciano, nitro, CF_3, O(alquilo C_{1-6}), OCF_3, C(=O)H, C(=O)(alquilo C_{1-6}), CO_2H, CO_2(alquilo C_{1-6}), $NHCO_2$(alquilo C_{1-6}), -S(alquilo C_{1-6}), NH_2, NH(alquilo C_{1-6}), N(alquilo C_{1-6})$_2$, $N(CH_3)_3^+$, SO_2(alquilo C_{1-6}), C(=O)(alquileno C_{1-4})NH_2, C(=O)(alquileno C_{1-4})NH(alquilo), C(=O)(alquileno C_{1-4})N(alquilo C_{1-4})$_2$, cicloalquilo C_{3-7}, fenilo, bencilo, feniletilo, feniloxi, benciloxi, naftilo, un heterociclo de cuatro hasta siete miembros, y/o un heteroarilo de cinco o seis miembros. Cuando un alquilo substituido es substituido con un grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo, o heteroarilo, los sistemas de anillo son como se definen a continuación y así pueden tener cero, uno, dos o tres substituyentes, también como se definen a continuación.

Cuando el término "alquilo" se usa junto con otro grupo, tal como un "arilalquilo", esta conjunción se define con más

001285

especificidad en al menos uno de los substituyentes que el alquilo substituido deberá contener. Por ejemplo, "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo substituido como se define arriba en donde al menos uno de los substituyentes es un arilo, tal como bencilo. Así, el término arilalquilo (C_{0-4}) incluye un alquilo inferior substituido que tiene al menos un substituyente arilo y también incluye un arilo directamente enlazado a otro grupo, esto es, arilalquilo (C_0).

El término "alquenilo" se refiere a grupos de hidrocarburos de cadena recta o ramificada que tienen 2 hasta 12 átomos de carbono y al menos un enlace doble. Los grupos alquenilo de 2 hasta 6 átomos de carbono y que tienen un enlace doble son más preferidos. Los grupos alquenilo pueden ser substituidos como se describe arriba por los grupos alquilo.

El término "alquinilo" se refiere a grupos de hidrocarburos de cadena recta o ramificada que tienen 2 hasta 12 átomos de carbono y al menos un enlace triple. Los grupos alquinilo de 2 hasta 6 átomos de carbono y que tienen un enlace triple son más preferidos. Los grupos alquinilo pueden ser substituidos como se describe arriba por los grupos alquilo.

El término "alquileno" se refiere a grupos de hidrocarburos de cadena recta o ramificada divalente que

tienen 1 hasta 12 átomos de carbono, preferiblemente 1 hasta 8 átomos de carbono, por ejemplo, $\{-CH_2-\}_n$, en donde n es 1 hasta 12, preferiblemente 1-8. Los grupos alquileno inferiores, que son, grupos alquileno de 1 hasta 2 átomos de carbono, son más preferidos. Los términos "alquenileno" y "alquinileno" se refieren a radicales divalentes de los grupos alquenilo y alquinilo, respectivamente como se define arriba. Los grupos alquenileno pueden ser substituidos como se describe arriba por los grupos alquilo.

El término "alcoxi" se refiere a un átomo de oxígeno substituido por alquilo, como se define en la presente. Por ejemplo, el término "alcoxi" o incluye el grupo -O-alquilo C_{1-6}.

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

Se deberá entender que las selecciones para todos los grupos, incluyen por ejemplo, alcoxi, tioalquilo, y aminoalquilo, deberán hacerse por alguien de habilidad en el campo para proporcionar compuestos estables.

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

El término "acilo" se refiere a un grupo carbonilo ligado a un radical orgánico, más particularmente, el grupo

$C(=O)R_e$, así como el grupo divalente $-C(=O)R_e-$, el cual se liga a los radicales orgánicos. El grupo R_e puede seleccionarse de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, o heteroarilo como se define en la presente, o cuando sea apropiado, el grupo divalente correspondiente, por ejemplo, alquileno.

El término "cicloalquilo" se refiere a anillos de hidrocarburo parcialmente no saturados y completamente saturados (y por lo tanto incluyen "anillos de cicloalquenilo") de 3 hasta 9, preferiblemente 3 hasta 7 átomos de carbono. El término "cicloalquilo" incluye tales anillos que tienen cero, uno, dos o tres substituyentes seleccionados de alquilo (C_{1-4}), alquenilo (C_{2-4}), halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, O(alquilo C_{1-4}), OCF_3, C(=O)H, C(=O)(alquilo C_{1-4}), CO_2H, CO_2(alquilo C_{1-4}), $NHCO_2$(alquilo C_{1-4}), S(alquilo C_{1-4}), NH_2, NH(alquilo C_{1-4}), N(alquilo C_{1-4})$_2$, N(alquilo C_{1-4})$_3^+$, SO_2(alquilo C_{1-4}), C(=O)(alquileno C_{1-4})NH_2, C(=O)(alquileno C_{1-4})NH(alquilo), y/o C(=O)(alquileno C_{1-4})N(alquilo C_{1-4})$_2$. El término "cicloalquilo" también incluye tales anillos que tienen un segundo anillo fusionado de los mismos (por ejemplo, incluyendo anillos de benzo, heterociclo, o heteroarilo) o que tienen un puente carbono-carbono de 3 hasta 4 átomos de carbono.

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

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

El término "haloalcoxi" significa un grupo alcoxi que tiene uno o más substituyentes halo. Por ejemplo, "haloalcoxi" incluye OCF_3.

El término "heteroátomos" deberá incluir oxígeno, azufre y nitrógeno.

El término "arilo" se refiere a fenilo, bifenilo, fluorenilo, 1-naftilo y 2-naftilo. El término "arilo" incluye tales anillos que tienen cero, uno, dos o tres substituyentes seleccionados de alquilo (C_{1-4}), alquenilo (C_{2-4}), halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, O(alquilo C_{1-4}), OCF_3, C(=O)H, C(=O)(alquilo C_{1-4}), CO_2H, CO_2(alquilo C_{1-4}), $NHCO_2$(alquilo C_{1-4}), S(alquilo C_{1-4}), NH_2, NH(alquilo C_{1-4}), N(alquilo $C_{1-4})_2$, N(alquilo $C_{1-4})_3^+$, SO_2(alquilo C_{1-4}), C(=O)(alquileno C_{1-4})NH_2, C(=O)(alquileno C_{1-4})NH(alquilo), y/o C(=O)(alquileno C_{1-4})N(alquilo $C_{1-4})_2$.

Los términos "heterociclo" o "heterocíclico" se refieren a anillos de 3 hasta 15 miembros substituidos y no substituidos no aromáticos (los cuales pueden ser parcialmente o completamente saturados) que tienen uno hasta cuatro heteroátomos. Tales anillos pueden ser grupos monocíclicos de 3 hasta 7 miembros, grupos bicíclicos de 7 hasta 11 miembros, y grupos tricíclicos de 10 hasta15

miembros. Cada anillo del grupo heterociclo contiene un heteroátomo que puede contener uno o dos átomos de oxígeno o azufre y/o de uno hasta cuatro átomos de nitrógeno proporcionando que el número total de heteroátomos en cada anillo es cuatro o menos, y además proporciona que el anillo contiene al menos un átomo de carbono. Los anillos fusionados que completan los grupos bicíclicos o tricíclicos pueden contener solamente átomos de carbono y pueden ser saturados, parcialmente saturados o no saturados. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden ser opcionalmente oxidados y los átomos de nitrógeno pueden ser opcionalmente cuaternizados. El grupo heterociclo puede enlazarse a cualquier nitrógeno o átomo de carbono disponible. El anillo heterociclo puede contener cero, uno, dos o tres substituyentes seleccionados de alquilo (C_{1-4}), alquenilo (C_{2-4}), halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, O(alquilo C_{1-4}), OCF_3, C(=O)H, C(=O)(alquilo C_{1-4}), CO_2H, CO_2(alquilo C_{1-4}), $NHCO_2$(alquilo C_{1-4}), S(alquilo C_{1-4}), NH_2, NH(alquilo C_{1-4}), N(alquilo C_{1-4})$_2$, N(alquilo C_{1-4})$_3^+$, SO_2(alquilo C_{1-4}), C(=O)(alquileno C_{1-4})NH_2, C(=O)(alquileno C_{1-4})NH(alquilo), y/o C(=O)(alquileno C_{1-4})N(alquilo C_{1-4})$_2$. Los grupos heterocíclicos ejemplares incluyen azetidinilo, pirrolidinilo, oxetanilo, imidazolinilo, oxazolidinilo, isoxazolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, tetrahidrofuranilo, piperidilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidilo, 2-oxopirrolodinilo, 2-

oxoazepinilo, azepinilo, 4-piperidonilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, sulfóxido de tiamorfolinilo, sulfona de tiamorfolinilo, 1,3-dioxolano, quinuclidinilo y tetrahidro-1,1-dioxotienilo y similares.

El término "heteroarilo" se refiere a anillos de 3 hasta 14 miembros substituidos y no substituidos aromáticos que tienen uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados de O, S, o N en al menos uno de los anillos. Los anillos pueden ser grupos monocíclicos de 5 ó 6 miembros, grupos bicíclicos de 9 ó 10 miembros, y grupos tricíclicos de 11 hasta 14 miembros. Cada anillo del grupo heteroarilo contiene un heteroátomo que puede contener uno o dos átomos de oxígeno o azufre y/o desde uno hasta cuatro átomos de nitrógeno proporcionando 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 fusionados completan los grupos bicíclicos y tricíclicos que pueden contener solamente átomos de carbono y pueden ser saturados, parcialmente saturados o no saturados. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden ser opcionalmente oxidados y los átomos de nitrógeno pueden ser opcionalmente cuaternizados. Los grupos heteroarilo los cuales son bicíclicos o tricíclicos incluyen al menos un anillo completamente aromático pero el otro anillo o anillos fusionados pueden ser aromáticos o no aromáticos. El grupo heteroarilo puede enlazarse a cualquier nitrógeno o átomo de carbono disponible

de cada anillo. El sistema de anillo heteroarilo puede contener cero, uno, dos o tres substituyentes seleccionados de alquilo (C_{1-4}), alquenilo (C_{2-4}), halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, O(alquilo C_{1-4}), OCF_3, C(=O)H, C(=O)(alquilo C_{1-4}), CO_2H, CO_2(alquilo C_{1-4}), $NHCO_2$(alquilo C_{1-4}), S(alquilo C_{1-4}), NH_2, NH(alquilo C_{1-4}), N(alquilo C_{1-4})$_2$, N(alquilo C_{1-4})$_3^+$, SO_2(alquilo C_{1-4}), C(=O)(alquileno C_{1-4})NH_2, C(=O)(alquileno C_{1-4})NH(alquilo), y/o C(=O)(alquileno C_{1-4})N(alquilo 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, benzimidazolilo, benzopiranilo, indolizinilo, benzofuranilo, cromonilo, coumarinilo, benzopiranilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridilo, dihidroisoindolilo, tetrahidroquinolinilo y similares. Los grupos heteroarilo particulares incluyen, por ejemplo, quinazolin-4-ilo 6 substituido y 6-trifluorometil-quinazolin-4-ilo.

En donde un grupo es opcionalmente substituido, este deberá incluir grupos substituidos y no substituidos.

Los compuestos descritos en la presente pueden tener

202

centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención contienen un átomo asimétricamente substituido puede ser aislado en formas óptimamente activas o racémicas. Se conoce en el arte que para preparar formas ópticamente activas, tales como por la resolución de formas racémicas o por síntesis de materiales de partida ópticamente activos. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlace doble C=N, y similares pueden también presentarse en los compuestos descritos en la presente y similares pueden también presentarse en los compuestos descritos en la presente y todos los isómeros estables se contemplan en la presente invención. Los isómeros geometricos cis y trans de los compuestos de la presente invención se describe y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas de isómeros separados. Todas las formas quirales, diaestereoméricas, racémicas y todas las formas isoméricas de una estructura se entiende, al menos la estereoquímica específica o forma isomérica es especialmente indicada.

Un enantiómero de los compuestos descritos en la presenten pueden exhibir actividad superior comparada con el otro. Así, todas las estereoquímicas se consideran como parte de la presente invención. Cuando se requiere, la separación del material racémico se lleva a cabo por HPLC usando una columna quiral o por una resolución usando un agente de resolución tal como cloruro canfónico como en Steven D. Young

et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 2602-2605.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que son, dentro del alcance del juicio médico sólido, apropiados para usarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesiva, en proporción con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en la presente, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en donde el compuesto precursor se modifica al hacer sales ácidas o base de los mismos. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácido mineral u orgánico de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de los ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, 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, maléico, hidroximaléico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metansulfónico, etandisulfónico, oxálico, isetiónico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto precursor que contiene una porción básica o ácida por métodos de química convencional. Generalmente, tales sales pueden prepararse al hacer reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, un medio no acuoso tal como éter, acetato etílico, etanol, isopropanol, o acetonitrilo se prefieren. Las listas de sales apropiadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, la descripción de la cual se incorpora en la presente para referencia.

Ya que los profármacos se conocen por aumentar las numerosas cualidades deseables de los farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, manufactura, etc.), los compuestos de la presente invención pueden suministrarse

en forma de profármacos. De esta manera, la presente invención se pretende que cubra profármacos de los compuestos actualmente reivindicados, métodos de suministro de los mismos y composiciones que contienen los mismos. "Profármacos" se pretende que incluyan cualesquiera de los portadores covalentemente enlazados que liberan un fármaco precursor activo de la presente invención in vivo cuando tal profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de la presente invención se preparan al modificar grupos funcionales presentes en los compuestos de tal manera que las modificaciones se desdoblan ya sea por manipulación de rutina o in vivo, al compuesto precursor. Los profármacos incluyen compuestos de la presente invención en donde un grupo hidroxi, amino, o sulfhidrilo se enlaza a cualquier grupo que, cuando el profármaco de la presente invención se administra un sujeto mamífero, se desdobla para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre, o sulfhidrilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados de acetato, formiato y benzoato de grupos funcionales alcohol y amina en los compuestos de la presente invención.

"Compuesto estable" y "estructura estable" significan para indicar un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir aislado hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción, y la formulación en un agente

terapéuticamente eficaz. La presente invención se pretende para abarcar compuestos estables.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se pretende que incluya una cantidad de un compuesto de la presente invención solo o 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 efectivos para inhibir MCP-1 o efectivos para tratar o prevenir trastornos.

Como se usa en la presente, "tratamiento o "tratado" cubre el tratamiento de un estado de enfermedad en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) evitar que el estado de enfermedad se presente en un mamífero, en particular, cuando tal mamífero está predispuesto a tal estado de enfermedad pero no se le ha diagnosticado aún que lo tiene; (b) inhibir el estado de enfermedad, esto es, detener su desarrollo; y/o (c) aliviar el estado de enfermedad, esto es, causar la regresión del estado de enfermedad.

Los nombres usados en la presente para designar una forma específica, por ejemplo, "N-2", no deberán considerarse limitantes con respecto a cualquier otra substancia que posee características físicas y químicas idénticas o similares, preferiblemente deberá entenderse que estas designaciones son meramente idénticas a aquellas que deberán interpretarse de

conformidad a la caracterización de información también presente en la presente.

La presente invención proporciona, al menos en parte, formas cristalinas de la base libre de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, como un material novedoso, en particular, en una forma farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades preferidas, las formas cristalinas de la base libre son en forma substancialmente pura. Las modalidades preferidas de la base libre se describen en el ejemplo 2 como las formas E-1, HAC-1, IPA-1, N-2, RPG-3, H0.5-4 y H1.75-5.

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

Como se usa en la presente "solvato" se refiere a una forma cristalina de una molécula, átomo, y/o iones que contienen además moléculas de un solvente o solventes incorporados en la estructura cristalina. Las moléculas de solvente en el solvato pueden presentarse en un arreglo regular y/o un arreglo no ordenado. El solvato puede comprender ya sea una cantidad estoiquiometrica o no estoiquiometrica de las moléculas de solvente. Por ejemplo, un solvato con una cantidad no estoiquiometrica de moléculas

238

de solvente pueden resultar de menos parcial del solvente del solvato.

Como se usa en la presente "amorfo" se refiere a una forma sólida de una molécula, átomo, y/o iones que no son cristalinos. Un sólido amorfo no exhibe un patrón de difracción de rayos X definitivo.

Como se usa en la presente, "substancialmente puro," cuando se usa en referencia a una forma cristalina, significa un compuesto que tiene una pureza mayor que 90 % en peso, incluyendo más que 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y 99 % en peso, y también incluyen igual hasta alrededor de 100 % en peso del compuesto I, basado en el peso del compuesto. El material restante comprende otras formas del compuesto, y/o impurezas de reacción y/o procesos de impurezas de su preparación. Por ejemplo, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, puede considerarse substancialmente puro que tiene una pureza mayor que 90 % en peso, como se mide significa que son en este tiempo conocidos y generalmente aceptados en el arte, donde el menos restante es de 10 % en peso del material que comprende otras formas de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, y/o impurezas de

reacción y/o impurezas del proceso.

Las muestras de las formas cristalinas pueden proporcionarse con homogeneidad de fases substancialmente pura, indicando la presencia de una cantidad dominante de una forma cristalina sencilla de y opcionalmente cantidades menores de una o más otras de las formas cristalinas. La presencia de más de una forma cristalina de una muestra puede determinarse por técnicas tales como difracción de polvo de rayos X (PXRD) o espectroscopia de resonancia magnética nuclear de estado sólido (SSNMR). Por ejemplo, la presencia de picos extra en la comparación de un patrón PXRD medido experimentalmente con un patrón PXRD simulado puede indicar más de una forma cristalina en la muestra. El PXRD simulado puede calcularse de datos de rayos X de cristal sencillos. Ver Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns," Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (April 1963).

Preferiblemente, la forma cristalina tiene la homogeneidad de fases substancialmente pura como se indica por menos de 10%, preferiblemente menos de 5%, y más preferiblemente menos de 2% del área del pico total en el patrón PXRD medido experimentalmente elevado de los picos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado. Más preferida es una forma cristalina que tiene la homogeneidad de fases substancialmente pura con menos de 1% del área del

pico total en el patrón PXRD medido experimentalmente elevado de los picos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado.

Los procedimientos para la preparación de las formas cristalinas se conocen en el arte. Las formas cristalinas pueden prepararse por una variedad de métodos, incluyendo por ejemplo, cristalización o recristalización de un solvente adecuado, sublimación, crecimiento de una fusión, transformación de estado sólido a otra fase, cristalización de un fluido supercrítico, y rocío de chorro. Las técnicas para la cristalización o recristalización de las formas cristalinas de una mezcla de solvente incluyen, por ejemplo, evaporación del solvente, disminución de la temperatura de la mezcla del solvente, cristal de semilla una mezcla del solvente supersaturado de la molécula y/o sal, secado por congelado de la mezcla de solvente, la adición de antisolventes (contra-solventes) a la mezcla de solvente.

Las formas pueden caracterizarse y distinguirse usando difracción de rayos X de cristal sencillo, los cuales se basan en mediciones de células unitarias de un cristal sencillo de una forma a una temperatura analítica fija. Una descripción detallada de células unitarias se proporciona en Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968), cápitulo 3, el cual se incorpora para referencia. Alternativamente, el arreglo único

- 006391

de los átomos en la relación espacial dentro del reticulado cristalino puede caracterizarse de conformidad a las coordenadas atómicas de las fracciones observadas. Otro medio de caracterización de la estructura cristalina es por análisis de difracción de polvo de rayos X en el cual el perfil de difracción experimental u observado se compara a un perfil simulado que representa el material de polvo puro, ambos se corren en la misma temperatura analítica, y se miden para someter la forma caracterizada a una serie de valores 2θ.

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

El término "reabsorción de % de agua insignificante," como se emplea en la presente, se caracteriza por la isotermia de absorción de humedad que indica que la forma de prueba no es higroscópica.

En una modalidad de la invención, una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, se proporciona en la forma substancialmente pura. Esta forma cristalina puede emplearse en composiciones farmacéuticas las cuales opcionalmente incluyen uno o más de otros componentes seleccionados, por ejemplo, del grupo que consiste de

003112

excipientes, portadores, y uno de los otros ingredientes farmacéuticos activos o entidades químicas activas de diferentes estructuras moleculares.

Preferiblemente, la forma cristalina tiene homogeneidad de fases substancialmente pura como se indica por menos de 10%, preferiblemente menos de 5%, y más preferiblemente menos de 2% del área del pico total en el patrón PXRD medido experimentalmente elevado de los picos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado. Más preferida es una forma cristalina que tiene homogeneidad de fases substancialmente pura con menos de 1% del área del pico total en el patrón PXRD medido experimentalmente elevado de los picos extra que están ausentes del patrón de PXRD simulado.

En otra modalidad, una composición se proporciona que consiste esencialmente de las formas cristalinas de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal. La composición de esta modalidad puede comprender al menos 90 % en peso de la forma, basada en su peso en la composición.

La presencia de impurezas de reacción y/o impurezas del proceso puede determinarse por técnicas analíticas conocidas en el arte, tales como, por ejemplo, cromatografía, espectroscopia de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa o espectroscopia infrarroja.

40313

Las formas cristalinas pueden prepararse por una variedad de métodos, incluyendo por ejemplo, cristalización o recristalización de un solvente adecuado, sublimación, crecimiento de una fusión, transformación de estado sólido a otra fase, cristalización de un fluido supercrítico, y rocío de chorro. Las técnicas para la cristalización o recristalización de las formas cristalinas de una mezcla de solvente incluyen, por ejemplo, evaporación del solvente, disminución de la temperatura de la mezcla del solvente, cristal de semilla, una mezcla de solvente supersaturado de la molécula y/o sal, secado por congelado de la mezcla de solvente, la adición de antisolventes (contra-solventes) a la mezcla de solvente. Las técnicas de cristalización de alto rendimiento pueden emplearse para preparar las formas cristalinas incluyendo polimorfos.

Los cristales de fármacos, incluyendo polimorfos, métodos de preparación, y caracterización de cristales de fármaco se describen en Solid-State Chemistry of Drugs, S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, and J.G. Stowell, 2nd Edition, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

Para las técnicas de cristalización que emplean el solvente, la elección del solvente o solventes depende típicamente de uno o más factores, tales como la solubilidad del compuesto, técnica de cristalización, y presión de vapor del solvente. Las combinaciones de los solventes pueden

emplearse; por ejemplo, el compuesto puede solubilizarse en un primer solvente para proporcionar una solución, seguida por la adición de un antisolvente para disminuir la solubilidad del compuesto en la solución y para proporcionar la formación de los cristales. Un "antisolvente" es un solvente en el cual el compuesto tiene menos solubilidad. Los solventes adecuados para preparar cristales incluyen solventes polares y no polares.

En un método para preparar cristales, N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, se suspende y/o agita en un solvente adecuado para proporcionar una mezcla espesa, la cual puede calentarse para promover la disolución. El término "mezcla espesa," como se usa en la presente, significa una solución saturada, la cual puede también contener una cantidad adicional del sólido para proporcionar una mezcla heterogénea a una temperatura dada. Los solventes adecuados en este aspecto incluyen, por ejemplo, solventes apróticos polares y solventes próticos polares, y mezclas de dos o más de estos como se discute en la presente.

Los cristales de semilla pueden agregarse a cualquier mezcla de cristalización para promover la cristalización. Como deberá ser claro para aquellos de habilidad en el arte, el sembrado se usa un medio para controlar el crecimiento de

una forma cristalina particular o como un medio para controlar la distribución del tamaño de partícula del producto cristalino. En consecuencia, el cálculo de la cantidad de las semillas necesarias depende del tamaño de la semilla disponible y el tamaño deseado de una partícula de producto promedio como se describe, por ejemplo, en "Programmed cooling of batch crystallizers," J.W. Mullin and J. Nyvlt, Chemical Engineering Science (1971) 26:369-377. En general, las semillas de tamaño pequeño son necesarias para controlar efectivamente el crecimiento de los cristales en el lote. Las semillas de tamaño pequeño pueden generarse por el tamizado, molido o micronizado de los cristales más grandes, o por micro-cristalización de las soluciones. Se deberá tener cuidado en el molido o micronizado de los cristales que no resulte en ningún cambio en cristalinidad de la forma de cristal deseada (esto es, cambio a amorfo o a otro polimorfo).

Una mezcla fría puede filtrarse bajo vacío, y los sólidos aislados pueden lavarse con un solvente adecuado, tal como solvente de recristalización frío, y se seca bajo una purga de nitrógeno para proporcionar la forma cristalina deseada. Los sólidos aislados pueden analizarse por una técnica de espectroscopia adecuada o analítica, tal como SSNMR, DSC, PXRD, o similares, para asegurar la formación de la forma cristalina preferida del producto. La forma

cristalina resultante es típicamente producida en una cantidad de más de alrededor de 70 % en peso de rendimiento aislado, pero preferiblemente mayor a 90 % en peso basado en el peso de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal, originalmente empleado en el procedimiento de cristalización. El producto puede ser co-molido o pasado a través de tamiz de malla para desaglomerar el producto, si es necesario.

Las formas cristalinas pueden prepararse directamente del medio de reacción de la etapa de proceso final para preparar N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre o sal. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, por emplearse en la etapa del proceso final un solvente o mezcla de los solventes a partir de los cuales el compuesto puede cristalizarse. Alternativamente, las formas cristalinas pueden obtenerse por destilación o técnicas de adición del solvente. Los solventes adecuados para este propósito incluyen cualquiera de aquellos solventes descritos en la presente, incluyendo solventes próticos polares, tales como alcoholes, y solventes apróticos polares, tales como cetonas.

A manera de guía general, la mezcla de reacción puede filtrarse para remover cualquier impureza innecesaria, sales

inorgánicas, y similares, seguido por lavado con solvente de reacción o cristalización. La solución resultante puede concentrarse para remover los constituyentes del exceso de solvente o gas. Si la destilación se emplea, la cantidad última del destilado colectado puede variar, dependiendo de los factores del proceso incluyendo, por ejemplo, tamaño de recipiente, capacidad de agitación, y similares. A manera de guía general, la solución de reacción puede destilarse hasta alrededor de 1/10 del volumen original antes de que el reemplazo del solvente se lleve a cabo. La reacción puede mostrarse y ensayarse para determinar el grado de la reacción y el % en peso del producto de conformidad con las técnicas de proceso estándar. Si se desea, el solvente de reacción adicional puede agregarse o removerse para optimizar la concentración de reacción. Preferiblemente, la concentración final se ajusta hasta alrededor de 50 % en peso en cuyo punto una mezcla espesa resulta típicamente.

Puede ser preferible agregar solventes directamente al recipiente de reacción sin destilar la mezcla de reacción. Los solventes preferidos para este propósitos son aquellos los cuales pueden participar últimamente en el reticulado cristalino, como se discute arriba en la conexión con el intercambio de solvente. Aunque la concentración final puede variar dependiendo de la pureza deseada, recuperación y similares, la concentración final de la base libre en la

CC 393

solución es preferiblemente alrededor de 4% hasta alrededor de 7%. La mezcla de reacción puede agitarse siguiendo la adición del solvente y calentamiento simultáneamente. A manera de ilustración, la mezcla de reacción puede agitarse durante alrededor de 1 hora mientras se calienta hasta alrededor de 70°C. La reacción se filtra preferiblemente caliente y se lava con ya sea el solvente de reacción, el solvente agregado o una combinación de los mismos. Los cristales de semilla pueden agregarse a cualquier solución de cristalización para iniciar la cristalización.

Las diversas formas descritas en la presente pueden distinguirse una de otra a través del uso de diversas técnicas analíticas conocidas por alguien de habilidad ordinaria en el arte. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, difracción de polvo de rayos X (PXRD), calorimetría de barrido diferencial (DSC) y/o análisis termogravimétrico (TGA). Alternativamente, las formas pueden caracterizarse y distinguirse usando difracción de rayos X de cristal sencillo, las cuales se basan en células unitarias medidas de un cristal sencillo de una forma dada a una temperatura analítica fija. Una descripción detallada de células unitarias se proporciona en Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968), Chapter 3, el cual se incorpora para referencia. Específicamente, el arreglo único de átomos en la

relación espacial dentro del reticulado cristalino puede caracterizarse de conformidad a las coordenadas atómicas fraccionadas observadas. Otros medios de caracterización de la estructura cristalina por análisis de difracción de polvo de rayos X en los cuales el perfil de difracción observado se compara a un perfil simulado generado de los datos de estructura de cristal sencilla. Las medidas de la difracción de polvo de rayos X para la forma sometida se caracterizan como una serie de valores 2θ (usualmente cuatro o más).

Otro medio de caracterización de la forma puede usarse, tal como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR), calorimetría de barrido diferencial (DSC), termografía y examen aproximado de la morfología cristalina o amorfa. Estos parámetros pueden también usarse en combinación para caracterizar la forma objetivo.

Alguien de habilidad ordinaria en el arte apreciará que un patrón de difracción de rayos X puede obtenerse con un error de medición que depende de las condiciones de medición empleadas. En particular, se conoce generalmente que las intensidades en el patrón de difracción de rayos X pueden fluctuar dependiendo de las condiciones de medición empleadas y la forma o morfología del cristal. Deberá entenderse, además que las intensidades relativas pueden también variarse

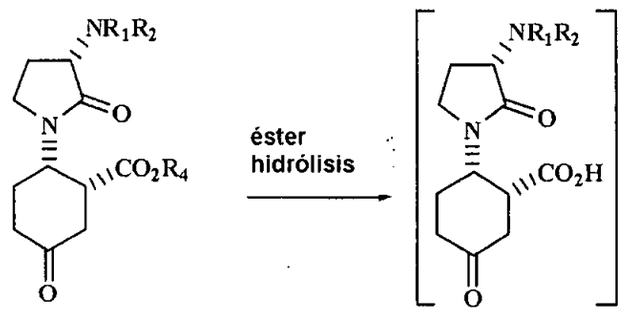
000310

dependiendo de las condiciones experimentales y en consecuencia, el orden exacto de la intensidad no deberá tomarse en cuenta. Adicionalmente, un error de medición del ángulo de difracción para un patrón de difracción de rayos X convencionales es típicamente alrededor de valores 0.2° 2θ o menos, preferiblemente alrededor de valores 0.1° 2θ (como se discute en la presente de aquí en adelante), y tal grado del error de medición deberá tomarse en cuenta como referente a los ángulos de difracción anteriormente mencionados. Consecutivamente, se deberá entender que las formas de cristal de la presente invención no se limitan a formas de cristal que proporcionan patrones de difracción de rayos X completamente idénticos a los patrones de difracción de rayos X detallados en las figuras acompañadas descritas en la presente. Cualquier forma de cristal que proporcione patrones de difracción de rayos X substancialmente idénticos a aquellos descritos en las figuras anexas están dentro del alcance de la presente invención. La habilidad para determinar identidades substanciales de los patrones de difracción de rayos X está dentro del alcance de alguien de habilidad ordinaria en el arte.

Esquema de Reacción 1

Hidrólisis del cetoéster V al cetoácido VI

SINTESIS



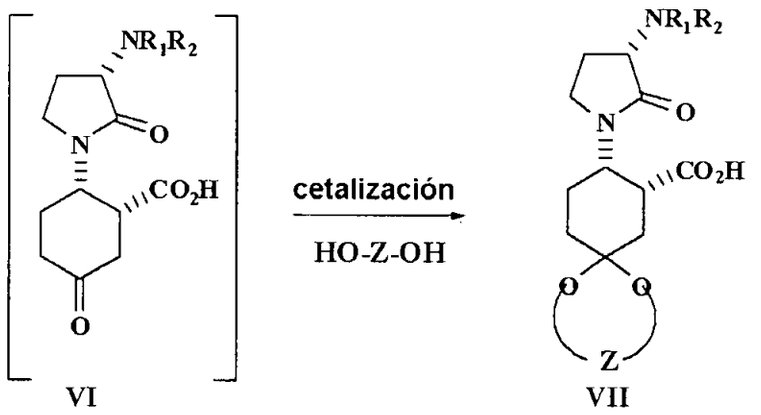
V VI

El cetoéster V se hidrolizó a su cetoácido VI correspondiente al suspender V en un solvente orgánico parcialmente miscible con agua, tal como éteres acrílicos o cíclicos incluyendo THF, 2-metil THF, 1,2-dimetoxietano, 1,4-dioxano, THF siendo preferido, y agregar base acuosa tal como soluciones acuosas de MOH de hidróxidos de metal alcalino, donde M es Li, Na o K, 1N NaOH siendo la base preferida, a -5°C hasta +5°C. La mezcla bifásica se agita entonces a ≤ 5°C durante al menos una hora. La temperatura baja para la adición y reacción de la base es importante para minimizar la epimerización en el carbono adyacente al grupo éster. El solvente no miscible en agua, preferiblemente éter de metil tert-butilo se agrega entonces y las capas se separan. El producto se transfiere entonces del acuoso de nuevo al solvente orgánico, preferiblemente diclorometano, al ajustar el pH con ácido, preferiblemente HCl 3N, y VI se usa en la solución para la siguiente etapa.

312

Esquema de Reacción 2

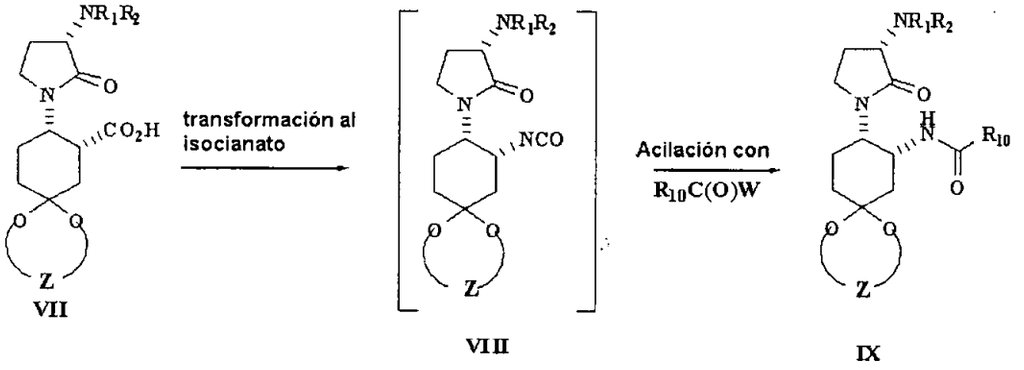
Cetalización del cetoácido VI al ácido cetal VII



La solución de VI, preferiblemente en diclorometano, se intercambia por medio de destilación en un solvente de alta ebullición, no higroscópico, tal como tolueno, trifluorotolueno, xilenos, ésteres de ebullición superiores tal como acetato de n-butilo o isobutilo, preferiblemente tolueno. Un glicol de la fórmula HO-Z-OH, (en donde Z es como se define supra) se agrega entonces, preferiblemente etilen glicol (1.2 eq), seguido por una cantidad catalítica (0.5-2 M %) de un ácido, preferiblemente ácido p-toulensulfónico, y la mezcla se destila a presión atmosférica hasta que la formación del compuesto VII se completa. El producto VII cristaliza durante la adición de acetato de etilo después de enfriar a aproximadamente 70°C. Después de enfriar además hasta temperatura ambiente, VII se aísla por filtración y secado posterior en alrededor de 70% de rendimiento (para $HO(CH_2)_2OH$, R_1=H, R_2=CBz).

Esquema de Reacción 3

Transformación del ácido cetal VII al isocianato de cetal no aislado VIII y luego a la amida cetal IX por medio de activación/azidación ácida, reconfiguración y acilación Curtius

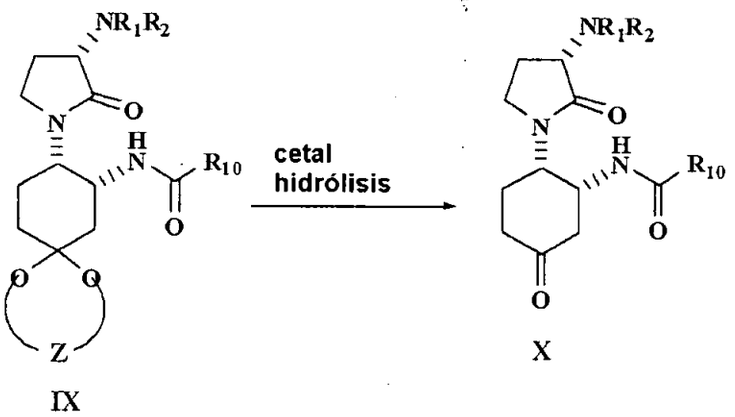


El cetoácido VII se activa primero al transformarlo a su anhídrido mezclado usando aminas terciarias, preferiblemente trietilamina, y haloformiatos, preferiblemente cloroformiato de isobutilo en solventes secos, tales como tolueno, trifluorotolueno, 1,2-dicloroetano, 1-clorobutano, xilenos, preferiblemente tolueno seco, por la adición de un haloformiato a una solución previamente enfriada de VII y trialquilamina. La temperatura preferida para al formación de anhídrido mezclado es de -10°C hasta 0°C. Después de aproximadamente 30 min, una solución acuosa de azida de metal alcalino, preferiblemente ~30 % en peso de sodio azida y un catalizador de transferencia de fase, tales como sales de tetralquilamonio, preferiblemente bromuro de tetrabutilamonio (5 mol %) se agrega y la mezcla bifásica se agita

vigorosamente durante alrededor de 1h a -10°C hasta 0°C. La fase orgánica se separa entonces y la solución de acil azida resultante se seca, tamices moleculares 4 Å molecular siendo el agente secante preferido. La reconfiguración Curtius y el atrapado concomitante del isocianato VIII in situ con un ácido carboxílico para formar una amida cetal IX se realiza al agregar primero un ácido carboxílico, preferiblemente ácido acético, y su correspondiente anhídrido, preferiblemente anhídrido acético, a una solución seca del acil azida, y luego calentar la mezcla 80-90°C por 1-4 horas. El uso de un anhídrido en conjunto con ácido carboxílico es crítico para minimizar la formación de impureza. Después de la remoción parcial del solvente y ácido carboxílico por destilación, el producto cristaliza durante el enfriamiento a temperatura ambiente. El IX se aísla por filtración y secado en 65-78 % de rendimiento (para Z = -$(CH_2)_2$-, R_1=H, R_2=CBz, R_{10}=Me).

Esquema de Reacción 4

Hidrólisis de la amida cetal IX a la cetoamida X



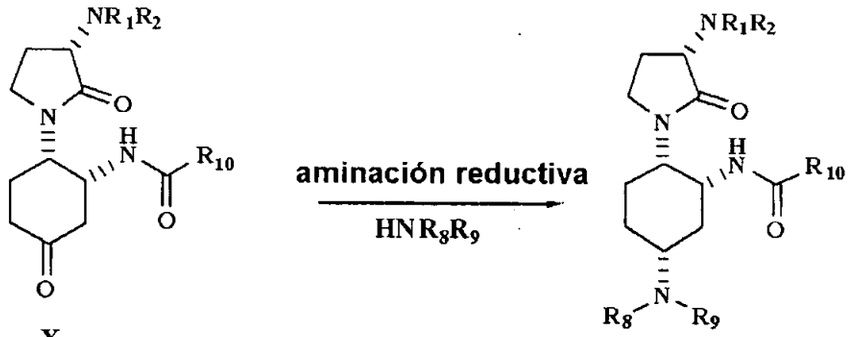
IX X

La cetal hidrólisis del compuesto IX a la cetoamida X se

realiza al calentar un solución de IX en un solvente miscible en agua, orgánico, preferiblemente acetona y una solución acuosa de ácido fuerte, preferiblemente HCl 1N, por 2-4 hrs. La temperatura preferida para la hidrólisis es 45-55°C. Después de remover la acetona, el producto se extrajo para diclorometano, que se intercambia por acetato de etilo por destilación. El producto X se cristaliza a partir del acetato de etilo durante el enfriamiento a temperatura ambiente, y se aísla por filtración y secado en 85-90% de rendimiento (para $HO(CH_2)_2OH$, R_1=H, R_2=CBz, R_{10}=Me).

Esquema de Reacción 5

Aminación reductiva de cetoamida X para la aminoamida XI

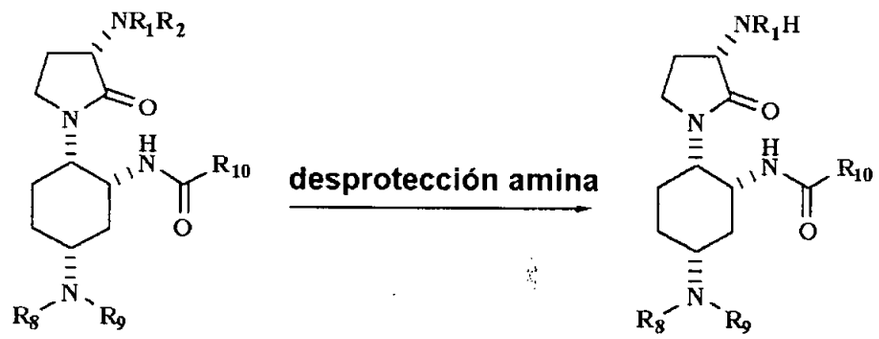


A una solución seca de X, preferiblemente en diclorometano, se agrega una amina primaria o secundaria, preferiblemente tert-butilamina (5 eq), seguido por un ácido Lewis, preferiblemente $TiCl_2(OPr\text{-}i)_2$ (1.2 eq), a -20°C hasta 0°C. La mezcla de imina resultante se calienta hasta 10-20°C y el borano (1.1-1.2 eq) se agrega como un complejo con sulfuro de dimetilo o THF, preferiblemente sulfuro de dimetilo. La

mezcla de reacción se agita durante 4-6 h y el acetato de etilo saturado con agua se agrega entonces. Las sales de titanio se remueven por filtración y el producto XI se extrae del filtrado orgánico al agua como su sal con un ácido acuoso, preferiblemente HCl 1N. El diclorometano se agrega entonces y la base acuosa, preferiblemente hidróxido de amonio concentrado se agrega a la mezcla bifásica agitada hasta que el pH se ajusta hasta 8.0-8.5. La fase de diclorometano rica en producto se separa entonces y se lava dos veces con solución de cloruro de amonio acuosa para remover los trans isómeros indeseados de XI, y finalmente con agua. El diclorometano se intercambia en acetato de etilo por destilación y XI cristaliza del acetato de etilo durante el enfriamiento y la adición de heptano. El XI se aísla por filtración y se seca en 65-70 % de rendimiento (para R_1=H, R_2=CBz, R_8=H, R_9=tert-Bu, R_{10}=Me).

Esquema de Reacción 6

Desprotección de pirrolidonil amina XI



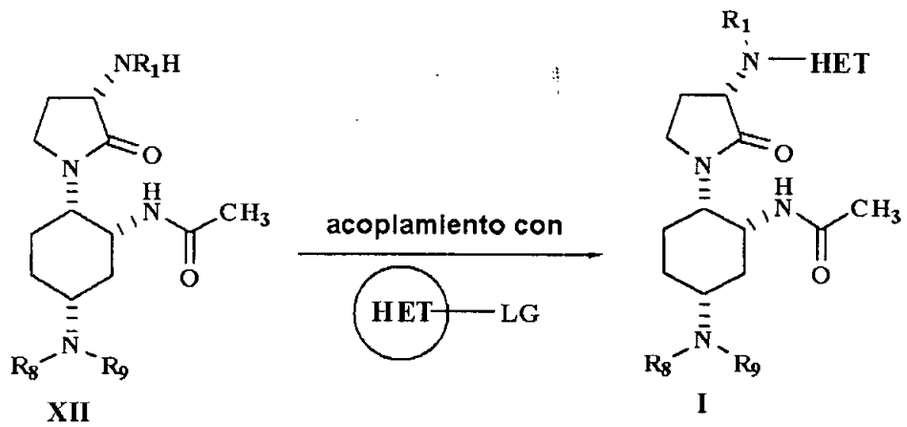
XI XII

La remoción del grupo protector amina R_2, donde R_2 es

CO_2CH_2Ph o CH_2Ph, se realiza al hidrogenar un solución de XI en un alcohol, preferiblemente metanol, en presencia de catalizador Pd, preferiblemente Pd/C al 5% en peso, durante varias horas. El catalizador se remueve entonces por filtración, y el metanol se intercambia en acetato de etilo por destilación. El producto XII, que se cristaliza del acetato de etilo durante el enfriamiento y adición de heptano, se aísla por filtración y se seca en 90-95 % de rendimiento (para R_1=H, R_2=CBz, R_8=H, R_9=tert-Bu, R_{10}=Me).

Esquema de Reacción 7

Acoplamiento de amina XII con heterocicloque porta un grupo saliente HET-LG



La síntesis del compuesto I se realiza al acoplar la pirrolidonilamina XII y un heterociclo que porta un grupo saliente en presencia de una amina terciaria, preferiblemente trietilamina, en un solvente compatible, tal como diclorometano, isopropanol o acetonitrilo, el diclorometano siendo preferido. Todos los componentes se combinan por lo

318

tanto y la solución se hace reaccionar durante 24-48 hrs a temperatura ambiente. Un solución del componente heterocíclico crudo previamente preparado también puede emplearse. Después de completar la reacción, el diclorometano se lava con ácido diluido, preferiblemente ácido acético al 5 % en peso, la fase acuosa se separa y el diclorometano se intercambia entonces en acetato de etilo por destilación. El producto I, que se cristaliza del acetato de etilo durante el enfriamiento y la adición de heptano, se aísla por filtración y se seca 75-80 % de rendimiento (para R_1=H, R_8=H, R_9=tert-Bu, R_{10}=Me, HET=6-(trifluorometil)quinazolin-4-il).

Para los procesos de esta invención, los materiales de partida son comercialmente disponibles o pueden prepararse fácilmente por alguien de habilidad ordinaria en el arte. Los solventes, temperaturas, presiones, materiales de partida que tienen los grupos deseados, y otras condiciones de reacción, pueden fácilmente seleccionarse como sea apropiado por alguien de habilidad ordinaria en el arte. Los procesos pueden hacerse en escala con objeto de preparar grandes cantidades del compuesto de la fórmula I, tal como en una facilidad de producción comercial.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran las modalidades de los compuestos inventivos y materiales de partida, y no se pretenden como limitantes del alcance de las

reivindicaciones.

Como sea apropiado, las reacciones se conducen bajo una atmósfera de nitrógeno seco (o argón). Para reacciones anhidras, los solventes Dri-Solv del EM se emplearon. Para otras reacciones, solventes de grado reactivo o solventes de grado HPLC se utilizaron. A menos de que se indique de otra manera, todos los reactivos comercialmente obtenidos se usaron como se reciben.

Las mediciones CL/EM se obtuvieron utilizando un sistema híbrido de espectrómetro de masas de cuatro polos sencillo Waters ZQ/HPLC Shimadzu. Los datos para el pico de interés se reportaron a partir de la ionización de electrorocío de modo positivo. El espectro RMN (resonancia magnética nuclear) se obtuvo típicamente en los instrumentos Bruker o JEOL 400 MHz y 500 MHz en los solventes indicados. Todos los giros químicos se reportaron en ppm de tetrametilsilano con la resonancia del solvente como el estándar interno. Los datos espectrales ^{1}H-RMN se reportaron típicamente como sigue: giro químico, multiplicidad (s = singlete, br s = singlete amplio, d = doblete, dd = doblete de dobletes, t = triplete, q = cuarteto, sep = septeto, m = multiplete, app = aparente), constantes de acoplamiento (Hz), e integración.

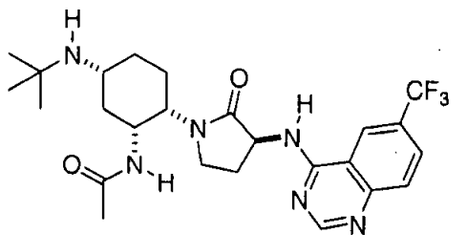
Alguien de habilidad en el arte deberá reconocer las abreviaturas estándar utilizadas en la presente. Para facilitar la referencia, las abreviaturas incluyen, pero no

necesariamente limitan a: sat. = saturado, HPLC = cromatografía líquida de alta resolución, PA = porcentaje de área, KF = Karl-Fischer, T.A. = temperatura ambiente, mmol = milimoles, EMAR = espectroscopía de masa de alta resolución, TBTU = tetrafluoroborato de O-benzotriazol-2-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio, MTBE = TBME = tert-butil metil éter, EDAC = clorohidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, EDC = N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilocarbodimida, TEA = trietilamina, DPPA = difenil fosforil azida, IPA = alcohol de isopropilo, TFA = ácido trifluoroacético, DCM = diclorometano, THF = tetrahidrofurano, DMF = N,N-dimetilformamida, BOP = hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio, EtOAc = Acetato de etilo, DMSO = dimetilsulfóxido, °C = grados celsius, eq = equivalente o equivalentes, g = gramo o gramos, mg = miligramo o miligramos, mL (o ml) = mililitro o mililitros, h = hora o horas, M = molar, N = normal, min = minuto o minutos, MHz = megahertz, tlc = cromatografía de capa delgada, v/v = volumen a relación de volumen.

"α", "β", "R" y "S" son desginaciones estereoquímicas familiares a aquellas de habilidad en el arte.

N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida

EJEMPLO 1



Ejemplo 1, Etapa 1: El 2-benciloxicarbonilamino-7-oxo-6-aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R, 2S, 5R)-tert-Butilo (89.6 g, 0.24 mol, ver: P. H. Carter, et al. PCT solicitud WO 2005/021500) se disolvió en acetato de etilo (1.5 L) y la solución resultante se lavó con $NaHCO_3$ sat. (2 x 0.45 L) y NaCl sat. (1 x 0.45 L). La solución se secó (Na_2SO_4) y luego se filtró directamente en un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 3L. La solución se purgó con inyección de nitrógeno directa antes de cargarse con 10% Pd/C (13.65 g) bajo una atmósfera de nitrógeno. El matraz se evacuó y se volvió a llenar con hidrógeno; esto se repitió dos veces más. El hidrógeno se burbujeó a través de la solución durante 30 minutos y luego la reacción se agitó bajo 1 atm H_2 durante 18 horas. El matraz se evacuó, se volvió a llenar con nitrógeno, y se cargó con catalizador fresco (6 g de 10% Pd/C). El hidrógeno se burbujeó a través de la solución durante 30 minutos y luego la reacción se agitó bajo 1 atm H_2 durante 18 horas. El matraz se evacuó y se volvió a llenar con nitrógeno. La mezcla se filtró a través de celite; la almohadilla filtro luego se lavó con acetato de etilo. El filtrado (~1.6 L EtOAc volumen) se diluyó con acetonitrilo

(0.3 L) y se cargó secuencialmente con L-N-Cbz-metionina (68 g, 0.24 mol), TBTU (77 g, 0.24 mol), y N,N-diisopropiletilamina (42 mL, 0.24 mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, durante el tiempo esto se cargó de una suspensión a una solución clara. La reacción se apagó con la adición de NH_4Cl saturado (0.75 L) y agua (0.15 L); la mezcla se diluyó además con EtOAc (0.75 L). Las fases se mezclaron y se separaron y la fase orgánica se lavó con Na_2CO_3 sat. (2 x 0.9 L) y NaCl sat. (1 x 0.75 L). La solución se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró in vacuo para dar 2-((S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(metilotio)butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-tert-butilo como un aceite, el cual se tomó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM para el pico primario: $[M-Boc+H]^+$ = 406.3; $[M+Na]^+$ = 528.3. ^{1}H-RMN (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.36 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.2 (m, 1H), 4.0 (m, 1H), 2.5 - 2.7 (m, 3H), 2.25 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (m, 4H), 1.9 (m, 1H), 1.7 (m, 2H), 1.54 (s, 9H). También se presentan EtOAc [1.26 (t), 2.03 (s), 4.12 (q)] y N,N,N,N-tetrametilurea [2.83 (s)].

Ejemplo 1, Etapa 2: Una muestra de 2-((S)-2-(benciloxicarbonilamino)-4-(metiltio)butanamido)-7-oxo-6-aza-biciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-tert-butilo (0.24 mol asumido; ver procedimiento previo) se disolvió en yodometano (1.250 g) y se agitó durante 48 h a temperatura

401323

ambiente. La reacción se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en diclorometano y se concentró in vacuo. Esto se repitió dos veces más. El lodo resultante se disolvió en diclorometano (0.4 L) y se vació en una solución agitada rápidamente de MTBE (4.0 L). Los sólidos amarillos resultantes se colectaron por medio de filtración de succión y se secaron bajo alto vacío para proporcionar la sal de sulfonio (179 g). Este material se tomó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM para el pico primario: [M-Me_2S+H]$^+$ = 458.4; [M]$^+$ = 520.4. ^{1}H-RMN (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.33 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.3 - 3.45 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.78 (m, 1H), 2.0 - 2.3 (m, 4H), 1.7 (m, 2H), 1.52 (s, 9H). También se presentan MTBE [1.18 (s), 3.2 (s)] y los trazos de N,N,N,N-tetrametilourea [2.81 (s)].

Ejemplo 1, Etapa 3: Todas las sales de sulfonio de la etapa previa (0.24 mol asumir) se disolvieron en DMSO (2.0 L). La solución resultante se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente y se cargó con carbonato de cesio (216 g) en porciones. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y luego se filtró para remover los sólidos. La solución se dividió en ~0.22 L porciones y se preparó como sigue: la mezcla de reacción (~0.22 L) se diluyó con acetato de etilo (1.5 L) y se lavó sucesivamente con agua (3 x 0.5 L) y salmuera (1 x 0.3 L). La fase orgánica se secó

-00032

(Na_2SO_4), se filtró y se concentró in vacuo. El 2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabiciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-tert-butilo deseado (90.8 g, 83%) se obtuvo como una espuma microcristalina, libre de impureza de tetrametilo urea. CL/EM para el pico primario: $[M-Boc+H]^+$ = 358.4; $[M+Na]^+$ = 480.4. ^{1}H-RMN (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.2 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.3 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.28 - 2.42 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.7 - 2.0 (m, 5H), 1.55 (s, 9H). Si se desea, este material puede aislarse como un sólido por disolverse en MTBE (1 volumen), agregarse a heptano (3.3 volumen), y colectarse el precipitado resultante.

Ejemplo 1, Etapa 4: Una solución agitada de 2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-7-oxo-6-azabiciclo[3.2.1]octano-6-carboxilato de (1R,2S,5R)-tert-butilo (108 g, 0.236 mol) en THF (1 L) se cargó con monohidrato de hidróxido de litio (21.74 g, 0.519 mol). Agua (0.3 L) se agregó lentamente, tal que la temperatura no excedió 2°C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y los volátiles se removieron in vacuo. El pH se ajustó hasta ~4 a través de la adición de 1N HCl (450 mL) y NaH_2PO_4. Los precipitados blancos resultantes se colectaron por filtración y se lavaron con agua (2 x 1 L). El sólido se disolvió en diclorometano (1.5 L) y agua (~ 1 L).

La capa orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en EtOAc (0.7 L) y la solución resultante se calentó a reflujo durante 1 h. Los sólidos se separaron después de enfriarse a T.A., y se colectaron por medio de filtración. Estos sólidos se purificaron por recristalización en isopropanol para proporcionar el ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico como un sólido blanco (104.5 g, 93% de rendimiento). CL/EM para el pico primario: $[M-tBu+H]^+$ = 420.2; $[M-Boc+H]^+$ = 376.2; $[M+H]^+$ = 476.2. ^{1}H-RMN (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.45 - 3.6 (m, 2H), 2.99 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 2.0 (m, 2H), 1.6 - 1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H).

Ejemplo 1, Etapa 5: Un matraz de fondo redondo de 3 L se cargó con ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (75.5 g, 0.158 mol), EDC•HCl (33.5 g, 0.175 mol), 1-hidroxibenzotriazol (23.6 g, 0.175 mol), y diclorometano (1 L). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, durante el tiempo esto se cargó de una suspensión blanca a una solución clara. El amoniaco (gas) se burbujeó en la solución hasta que el pH se hizo fuertemente básico (papel) y la reacción se agitó durante 10 minutos; esta adición de amoniaco se repitió y la

GDC326

reacción se agitó durante 10 minutos adicionales. El agua se agregó. La fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ saturado, NaH_2PO_4, y salmuera antes de concentrarse in vacuo. El residuo se hizo mezcla espesa con acetonitrilo (0.5 L) y luego se concentró para dar (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butoxicarbonilamino)ciclohexanecarboxamida como un sólido blanco (75.9 g, ~100%), el cual se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM para el pico primario: $[M-Boc+H]^+$ = 375.3; $[M+H]^+$ = 475.4; $[M-tBu+H]^+$ = 419.3. ^{1}H-RMN (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.25 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.9 - 2.05 (m, 2H), 1.65 - 1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H).

Ejemplo 1, Etapa 6: La reacción se corrió en tres porciones iguales y combinó para el trabajo acuoso. Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos, 5 L se cargó con (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butoxicarbonilamino)ciclohexancarboxamida (25.3 g, 53 mmol), acetonitrilo (1.9 L), y 2.6 L de agua/hielo. La mezcla se agitó y enfrió a 0°C. El diacetato de yodobenceno (25.77 g, 80 mmol) se agregó y la reacción se agitó durante 2 h; otros 0.5 eq de diacetato de yodobenceno se agregó. La reacción se agitó durante 9 h (temperatura de reacción < 10°C). La mezcla se cargó con 8 eq de N,N-

327

diisopropiletilamina y 2 eq de anhídrido acético. Durante los siguientes treinta minutos, 4 eq de N,N-diisopropiletilamina y 2 eq de anhídrido acético se agregaron cada diez minutos, hasta que la reacción había procedido a la terminación (HPLC). El acetonitrilo se removió in vacuo; un poco de sólido se separó del residuo, y esto se colectó por filtración. El residuo restante se extrajo con diclorometano (3 L, luego 1 L). La fase orgánica se lavó secuencialmente con agua, $NaHCO_3$ saturado, y salmuera. Los sólidos colectados se agregaron a la fase orgánica, junto con carbóno activado (15 g). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 40°C antes de filtrarse y concentrarse in vacuo. El residuo se disolvió en EtOAc (1 L), y la solución resultante se agitó a 75°C durante 1 h antes de permitirse a enfriar a temperatura ambiente. Un sólido se separa y se colecta por filtración. Este sólido se purificó además por recristalización: esto se disolvió primero en CH_2Cl_2 0.5 L, luego se concentró in vacuo, luego se re-cristalizó de EtOAc 1 L; esto se repitió tres veces. Los sólidos obtenidos de los licores madre de lo anterior se re-cristalizaron tres veces usando el mismo método. Los sólidos combinados se re-cristalizaron dos veces más de acetonitrilo (0.7 L) para proporcionar 66 g (84%) de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de tert-butilo (pureza >99.5% por HPLC). CL/EM para el pico primario: $[M+H]^+$ = 489.4; $[M-tBu+H]^+$

= 433.3. ^{1}H-RMN (400 MHz, d_4-MeOH): δ 7.3 - 7.4 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.6 (m, 2H), 2.44 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.87 - 2.05 (m, 4H), 1.87 (s, 3H), 1.55 - 1.7 (m, 2H), 1.46 (s, 9H). La fidelidad estereoquímica del cambio de Hofmann se confirmó a través de Análisis de estructura de cristal de rayos X de este compuesto, como se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 1, Etapa 7: A una solución de (1R,3R,4S)-3-acetamido-4-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de tert-butilo (100 g, 0.205 mol) en diclorometano (400 ml) se agregó TFA (400 ml) a -20°C. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El solvente y más de TFA se removieron bajo presión reducida, y el residuo se diluyó con diclorometano (2 L) y solución de K_2CO_3 acuoso (2 L). El pH se ajustó hasta 10 con 1N HCl. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 1L). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, y se concentró para dar (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo como un aceite (81 g, 100% de rendimiento). Esta amina se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo 1, Etapa 8: A una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-aminociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (13.3 g, 34 mmol) y 3,5-di-tert-butilciclohexa-

030329

3,5-dieno-1,2-diona (7.54 g, 34 mmol) en metanol (160 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución se concentró y se diluyó con acetona (132 ml) y agua (33 ml), seguido por adición de Dowex-50WX8-200 (33 g). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El Dowex-50WX8-200 se removió por filtración y se lavó con diclorometano (300 ml). El filtrado se concentró bajo vacío para remover más de la acetona. El residuo se diluyó con diclorometano (200 ml) y se lavó con una solución de $NaHCO_3$ acuoso (200 ml) y salmuera (200 ml). Las capas acuosas combinadas se extrajeron con diclorometano (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El producto de (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo se obtuvo como un sólido (12 g, 90% de rendimiento) por cristalización en EtOAc (100 ml) y Hexano (200 ml). ^{1}H-RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 7.99 (d, J=9.35 Hz, 1 H), 7.44 (d, J=8.80 Hz, 1 H), 7.28 - 7.39 (m, 5 H), 5.03 (s, 2 H), 4.50 (s, 1 H), 4.31 (d, J=12.10 Hz, 1 H), 4.18 (q, J=8.98 Hz, 1 H), 3.27 (m, 2 H), 2.82 (dd, J=15.12, 5.22 Hz, 1 H), 2.52 - 2.65 (m, 1 H), 2.40 (dd, J=12.92, 4.67 Hz, 1 H), 2.15 - 2.31 (m, 2 H), 2.09 (d, J=15.40 Hz, 1 H), 1.90 (m, 1 H), 1.81 (s, 3 H), 1.68 (m, 1 H). m/z: 388.46 [M+H].

Ejemplo 1, Etapa 9: A una solución de $TiCl_4$ (1M en diclorometano, 36 ml, 36 mmol) en diclorometano (30 ml) a 0°C

se agregó $Ti(OiPr)_4$ (10.8 ml, 36 mmol). La mezcla luego se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. A una solución de (S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (23.25 g, 60 mmol) en diclorometano (600 ml) se agregó tert-butilamina (30 ml, 300 mmol) a temperatura ambiente, seguido por la adición de la solución de $TiCl_4/Ti(OiPr)_4$ a -50°C. La reacción se permitió calentar lentamente a temperatura ambiente. La reacción se finalizó después de 2 h (La reacción se monitoreó en HPLC por apagar una muestra HPLC con $NaBH_4$ en metanol). La solución se enfrió a 10°C y $BH_3 \bullet SMe_2$ (1M en diclorometano, 66 ml, 66 mmol) se agregó. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h luego se apagó con una solución de Na_2CO_3 acuoso (300 ml). El precipitado se filtró completamente. Las dos capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (600 ml). Las capas de diclorometano combinadas se extrajeron con 1N HCl dos veces (150 ml y 15 ml). (El producto y el trans isómero indeseado fueron ambos en la fase acuosa ácida). Las capas acuosas acidicas combinadas se neutralizaron con 12 M solución acuosa de NH_4OH (12 ml) hasta pH~8 y se extrajeron con diclorometano dos veces (600 ml, 450 ml). (El producto se hizo fase orgánica, mientras el trans isómeros todavía estaba en la capa acuosa.) Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de NH_4Cl 3 veces (3 x 200 ml) hasta que el trans isómero no se dejo en la capa orgánica. La capa

orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo se purificó por cristalización en EtOAc/Hexano(200 ml / 800 ml) para dar el (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butiloamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (20.80 g, 78% de rendimiento) como un sólido blanco con 99.5% de pureza. ^{1}H-RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 8.76 (s, 1H), 7.27 - 7.46 (m, 6 H), 5.03 (m, 2 H), 4.14 (m, 1 H), 4.07 (q, J=8.80 Hz, 1 H), 3.83(m, 1H), 3.36 (m, 2H), 2.91 (s, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.41 - 1.74 (m, 7H), 1.04 (s, 9H). m/z: 445.54 [M+H].

Ejemplo 1, Etapa 10: A una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butiloamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (43.3 g, 98 mmol) en metanol (400 ml), 10% en peso Pd/C (4.34 g) se agregó. La mezcla se evacuó y se volvió a llenar con hidrógeno con un globo de hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla se filtró y se lavó con metanol (500 ml) y se concentró bajo vacío hasta secarse. El producto crudo obtenido se destiló con IPA (2 x 100 ml) bajo presión reducida para dar el producto N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butiloamino)ciclohexil)acetamida como un aceite (30 g, 98% de rendimiento). Esta amina se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo 1, Etapa 11: A una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-

butiloamino)ciclohexil)acetamida (30 g, 97 mmol) en IPA (400 ml) se agregó TEA (27 ml, 195 mmol) y 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (25 g, 107 mmol; ver P. H. Carter, et al. Solicitud PCT WO 2005/021500). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se agitó a 70°C durante 1h. La solución resultante se concentró bajo presión reducida hasta secarse. El residuo se disolvió en diclorometano (1 L) y se extrajo con una solución de ácido acético I (preparada por combinar 700 mL de agua y 22.6 mL de ácido acético glacial) dos veces (500 ml, 200 ml). La capa acuosa acidica (pH 4-5) se extrajo con diclorometano (2 x 300 ml). La capa de diclorometano se extrajo con una solución de ácido acético II (300 ml; preparada por combinar 300 mL agua con 4 mL de ácido acético glacial). Las capas de ácido acético combinadas se hicieron básicas con 1 M NaOH hasta pH > 12 y se extrajeron con diclorometano (3 x 700 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron y se concentron para dar el producto crudo como un sólido (45.6 g, 93% de rendimiento). El producto crudo se purificó por recristalización de EtOAc (400 ml)/Hexano (900 ml) para dar 42.86 g (88%) N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida con 99.7% de pureza. ^{1}H-RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 9.71 (1 H, br. s.), 9.02 (1 H, s), 8.71 (1 H, d, J=7.97 Hz), 8.59 (1 H, s), 8.04 (1 H, dd, J=8.66, 1.79

Hz), 7.88 (1 H, d, J=8.52 Hz), 4.91 - 5.13 (1 H, m), 4.30 - 4.57 (1 H, m), 3.86 (1 H, dt, J=11.89, 3.71, 3.64 Hz), 3.43 - 3.57 (1 H, m), 3.35 - 3.45 (1 H, m), 3.04 (1 H, t, J=3.85 Hz), 2.23 - 2.40 (1 H, m), 2.05 - 2.22 (1 H, m), 1.90 - 1.98 (1 H, m), 1.86 - 1.93 (3 H, m), 1.50 - 1.78 (5 H, m), 0.98 - 1.15 (9 H, m). ^{13}C-RMN (126 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 171.23, 169.35, 159.54, 156.87, 151.17, 128.97, 128.20, 125.76 (1 C, q, J=30.52 Hz), 121.55 (1 C, br. s.), 124.04 (1 C, q, J=272.11 Hz), 114.31, 53.26, 52.39, 50.81, 47.56, 45.70, 42.77, 34.52, 32.17, 29.14 (3 C, s), 26.49, 23.29, 20.30. ^{19}F-RMN (471 MHz, DMSO-d_6) δ ppm -60.34 (s). m/z: 507.0 [M+H]. Análisis calculado para $C_{25}H_{33}N_6O_2F_3$: C, 59.27; H, 6.56; N, 16.59; F, 11.25 Encontrado: C, 59.44; H, 6.64; N, 16.74; F, 10.99.

PREPARACION ALTERNATIVA DEL EJEMPLO 1

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 1: Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos secado al horno se equipó con una barra de agitación seca, un condensaro de flujo seco, y dos septos. Después de enfriarse bajo N_2, el matraz se cargó secuencialmente con ácido (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(benciloxicarbonilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butoxicarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (60 g, 126 mmol; ver Ejemplo 1, Etapa 4), acetonitrilo (800 mL), N-metilmorfolina (27.7 mL, 252 mmol), y difenilfosforil azida (29.9 mL, 139 mmol). La reacción se agitó a temperatura

ambiente durante 1 h 40 min, tiempo en el cual 2-trimetilsililetanol (90 mL, 631 mmol) se agregó. La reacción se agrupo para calentarse, y alcanzo reflujo 30 minutos más tarde. Esto se permitió poner a reflujo durante 1 h, tiempo en el cual esto se permitió enfriar a 50ºC gradualmente y luego se enfrió a 15ºC con enfriamiento externo. La reacción se apagó con la adición de ácido acético (1.734 mL, 30.3 mmol). La reacción se concentró in vacuo y luego se disolvió en EtOAc (1.2 L). Esto se lavó secuencialmente con agua (1 x 0.3 L), $NaHCO_3$ sat. (2 x 0.3 L), 1N HCl (1 x 0.3 L), y salmuera (2 x 0.3 L). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró, y se concentró in vacuo. Un sólido apareció muy tempranamente en el proceso de concentración. Después de que los volátiles se removieron, 800 mL 10% EtOAc/Hexanos se agregó, y la mezcla se agitó durante la noche. El sólido se colectó y se secó para proporcionar (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-((2-trimetilsilil)etoxicarbonilamino)ciclohexilcarbamato de tert-butilo (60.5 g, 102 mmol, 81 % de rendimiento). HPLC mostró que el material fue 72% puro, con dos impurezas del 12%. Este material se tomó en la siguiente etapa sin purificación. El filtrado se concentró más tarde para proporcionar otros 4.38 g del producto. Rendimiento total = 64.9 g (87%).

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 2: Un matraz de fondo redondo de 500 ml seco se equipó con una barra de

030535

agitación y se cargó secuencialmente con (1R,3R,4S)-4-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-3-((2-trimetilsilil)etoxicarbonilamino)ciclohexilcarbamato de tert-butilo (60.5 g), CH_2Cl_2 (180 mL), y una solución de monohidrato de ácido para-toluensulfónico (19.48 g, 102 mmol) en CH_2Cl_2 (120 mL) y metanol (30 mL). La mezcla se colocó en un evaporador rotatorio y el volumen de CH_2Cl_2 se removió (temperatura de baño ca. 20ºC). Cuando la mezcla se hizo espuma, el vacío se re-liberó, y la temperatura del baño se incrementó a 46ºC (la temperatura varió de entre 44 y 51ºC; esto se controló con la adición de hielo externo). La mezcla se giro a esta temperatura durante exactamente una hora la evolución del gas fue visible a través de esto) y luego se diluyó con EtOAc (1 L). La fase orgánica se lavó con 0.5 N NH_4OH (2 x 250 mL). Los lavados acuosos se combinaron y se agruparon a un lado. La fase orgánica se lavó con NH_4Cl sat. (1 x 250 mL) y NaCl sat. (1 x 250 mL); estos lavados acuosos se descartaron. Los lavados de NH_4OH combinados iniciales se volvieron a extraer con EtOAc (1 x 250 mL), y que el extracto orgánico se lavó con NH_4Cl sat. (1 x 60 mL) y NaCl sat. (1 x 60 mL). Todos los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron, y se concentraron. El residuo se purificó por elusión a través de un tapón SiO_2 (13 cm ancho x 7.5 cm alto). El primer eluyente fue EtOAc puro (ca. 4 L). El segundo eluyente fue 1:9 (10% NH_4OH en MeOH)/CH_2Cl_2

(ca. 5 L). Las fracciones que contienen el producto deseado se vaciaron juntas y se evaporaron para proporcionar el (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo deseado (31.6 g, 64.4 mmol, 63 % de rendimiento).

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 3: Una solución agitada de (1R,2S,5R)-5-amino-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (400 mg, 0.82 mmol) en acetonitrilo (3 mL) se cargó secuencialmente con diisopropiletilamina (315.8 mg, 3 eq) y bromoacetonitrilo (109.5 mg, 1.1 eq). La mezcla se agitó a 40°C durante 30 h. El solvente se removió bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice, usando 1.5% de metanol en diclorometano como eluyente. El (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(cianometilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo deseado se obtuvo como un sólido blanco (400 mg, 93%). CL/EM encontrado $[M + H]^+ = 530$.

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 4: Una solución agitada de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(cianometilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (400 mg, 0.76 mmol) en diclorometano (5

mL), se enfrió a 0°C y se cargó con m-CPBA (372.6 mg, 2.2 eq) en porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La solución de $Na_2S_2O_3$ saturado (3 mL) y la solución de $NaHCO_3$ saturado (3 mL) se agregaron y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0.5h. La mezcla se diluyó con diclorometano (80 mL), se lavó con $NaHCO_3$ saturado (20 mL) y salmuera (20 mL). La solución se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró in vacuo. El residuo obtenido se disolvió en metanol (5 mL) y la solución se cargó con NH_2OH-HCl (262.7 mg, 5 eq). La mezcla se agitó a 60°C durante 2.5 h. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con diclorometano (80 mL) y se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se lavó con $NaHCO_3$ saturado (2 x 20 mL). Los lavados acuosos se extrajeron con diclorometano (30 mL). Las capas de diclorometanos se combinaron y se lavaron con salmuera (30 mL). La solución se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró in vacuo para dar (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(hidroxiamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (350 mg, 91%). CL/EM encontrado $[M + H]^+ = 507$.

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 5: A una solución de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(hidroxiamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (350 mg, 0.69 mmol) en acetona (5 mL) se

338

agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en THF anhidro (7 mL) y se enfrió a 0°C. A una solución de MeMgBr (1.1 mL, 3M en dietil éter, 5 eq) se agregó gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5h. La reacción se apagó con agua (5 mL) a 0°C. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (100 mL) y se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se lavó con salmuera (30 mL). La solución se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró, y se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en 2 ml de acetonitrilo y 1 ml de CS_2 se agregó. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 horas. El solvente se removió y el producto crudo se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice, usando 1.5% de metanol en diclorometano como eluyente, para proporcionar el (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo deseado (160 mg, 42%). CL/EM encontrado $[M + H]^+ = 547$.

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 6: Una solución agitada de (1R,2S,5R)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butilamino)ciclohexilcarbamato de 2-(trimetilsilil)etilo (100 mg, 0.183 mmol) en diclorometano (3 mL) se cargó con ácido trifluoroacético (2 mL). La reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y se concentró in vacuo. El residuo se

339

disolvió en diclorometano (50 mL) y se lavó con $NaHCO_3$ saturado (20 mL). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 30 mL). Las capas de diclorometano se combinaron y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron, y se concentraron in vacuo para dar (S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (66 mg, 90%). CL/EM encontrado $[M + H]^+ = 403$.

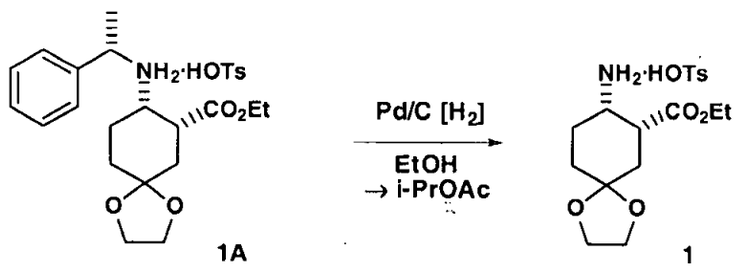
Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 7: A una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-amino-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (22 mg, 0.055 mmol) en diclorometano (2 mL) se cargó secuencialmente con trietilamina (11.1 mg, 2 eq) y anhidrido acético (6.1 mg, 1.1 eq). La reacción se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano (50 mL) y se lavó con $NaHCO_3$ saturado (20 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró in vacuo para dar (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (22 mg, 90%). CL/EM encontrado $[M + H]^+ = 445$.

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 8: A una solución de (S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxopirrolidin-3-ilcarbamato de bencilo (22 mg, 0.05 mmol) en metanol (2 mL) se agregó $Pd(OH)_2$ (20 mg de 50% en peso catalizado). El matraz se evacuó y se volvió a llenar con hidrógeno de un globo de

hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y el catalizador se removió por filtración. El filtrado se concentró in vacuo para proporcionar N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butilamino)ciclohexil)acetamida (13 mg, 85%). CL/EM encontrado $[M + H]^+ = 311$.

Ejemplo 1, Preparación alternativa, Etapa 9: A una solución de N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-amino-2-oxopirrolidin-1-il)-5-(tert-butilamino)ciclohexil)acetamida (70 mg, 0. 225 mmol) en isopropanol (3 mL) se agregó 4-cloro-6-(trifluorometil)quinazolina (63 mg, 1.2 eq) y trietilamina (56.9 mg, 2.5 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. El solvente se removió bajo presión reducida. El residuo se purificó con HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del título como su sal bis-TFA (110 mg, 67%). CL/EM encontrado $[M + H]^+ = 507$.

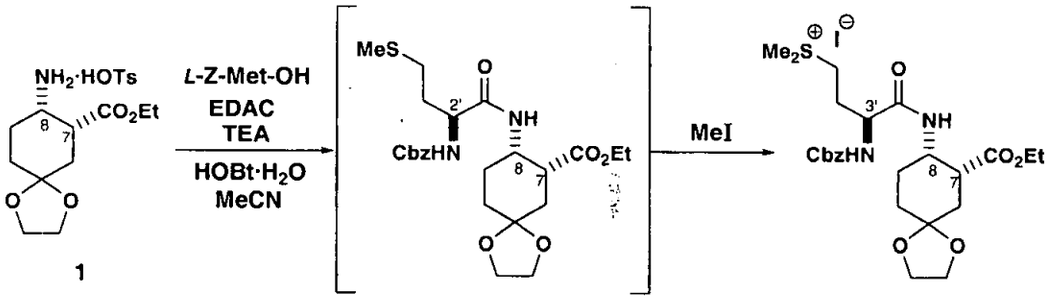
2ª PREPARACIÓN ALTERNATIVA DEL EJEMPLO 1



Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Estapa 1a: A un hidrogenador se le cargaron sal de 4-toluensulfonato de

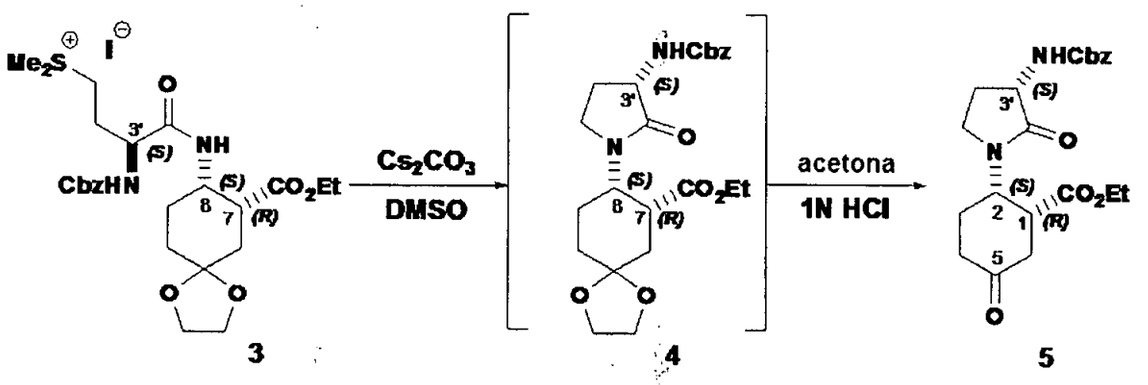
(7R,8S)-8-((S)-1-fenil-etilamino)-1,4-dioxa-espiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 1A (1417 g, 2.8 moles, c.f.: WO2004098516, preparado análogamente a Pat. E.U.A 6,835,841), etanol (200 proof, 11.4 L), y 10% Pd/C catalizador (50% de húmedad, 284 g). La mezcla se hizo inerte con nitrógeno, luego se presurizó con gas de hidrógeno (45 psig (3.163 kg/cm^2)) y agitó vigorosamente a aproximadamente 40°C hasta que el material de partida se consumió (HPLC). La suspensión se enfrió, purgó con gas de nitrógeno y el catalizador se removió por filtración mientras fue inerte. El catalizador gastado se lavó con etanol (4.3 L). El filtrado y los lavados se combinaron y concentraron bajo vacío a un volúmen de 2-3 L mientras mantuvieron el lote entre 40°-60°C. El acetato de isopropilo (5 L) se cargó y la mezcla se concentró a un volúmen de ~2 L hasta que más etanol se removió (<0.5%) y contenido de húmedad residual fue <1,000 ppm. El volumen del lote se ajustó a ~7.5 L por la adición de acetato de isopropilo. La mezcla se calentó a 80°C hasta que está transparente, luego se enfrió 65°-70°C. Los cristales de semilla de 1 (5 g) se agregaron y el lote se enfrió a 50°C durante 2 horas, luego se enfrió además a 20°C durante 4 horas y conservando durante ~10 horas. La mezcla espesa resultante se filtró y la torta se lavó con acetato de isopropilo (2 L). El producto se secó bajo vacío a ~35°C hasta que los volátiles se redujeron abajo ~1% (LOD). La sal

4-toluensulfonato de (7R,8S)-8-amino-1,4-dioxa-espiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 1 se obtuvo como un sólido blanco, cristalino (936 g, 83% de rendimiento; HPLC pureza: 99.8%). ^{1}H-RMN: (300MHz, $CDCl_3$) 8.14-7.89 (brs, 3H), 7.75 (d, J 9.0Hz, 2H), 7.15 (d, J 8.0Hz, 2H), 4.22-4.04 (m, 2H), 4.01-3.77 (m, 4H), 3.55-3.43 (m, 1H,), 3.20-3.13 (m, 1H), 2.40-2.27 (m, 4H), 2.21-1.94 (m, 2H), 1.81-1.51 (m, 3H), 1.23 (t, J 7.0Hz, 3H); HPLC: Waters Xterra EM C18 4.6 mm x 150 mm i.d., 3.5mm tamaño de partícula, 0.05% NH_4OH (5% ACN, 95% H_2O, solvente A), a 0.05% NH_4OH (95% ACN, 5% H_2O, solvente B), 5% B a 20% B en 10 minutos, cambiado a 95% B en 25 minutos, y luego cambiado a 5% B en 1 minuto; 11.1 minutos (aminoéster 1).



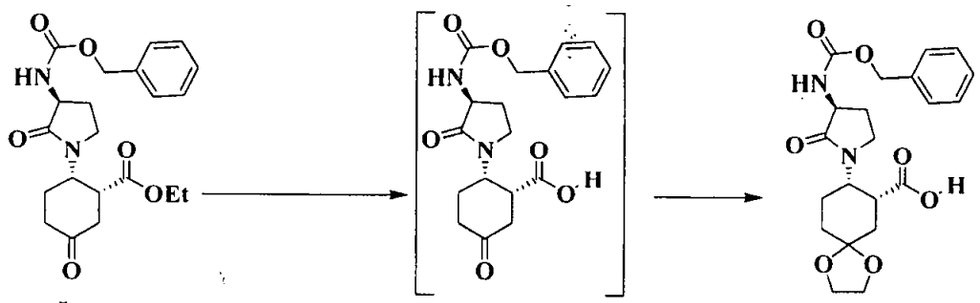
Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 1b: La sal de 4-toluensulfonato de (7R,8S)-8-amino-1,4-dioxa-espiro[4.5]decano-7-carboxilato 1 (450.1g; el producto de la desprotección reductiva de un compuesto conocido - ver R. J. Cherney, WO 2004/098516 y G. V. Delucca & S. S. Ko, WO 2004/110993), se combinó con clorohidrato de 1-etil-3-(3-

dimetil-amino-propil)carbo-diimida (236.3g), hidrato de 1-hidroxi benzotriazol (171.9g), N-carbobenciloxi-L-metionina (333.4g) y acetonitrilo (3.1 L). A la mezcla agitada se agregó trietilamina (249.5 g) de bajo de 30°C. Mientras se completó la reacción (HPLC), la mezcla se diluyó con acetato de etilo (8.2 L) y se lavó con una solución de bicarbonato de potasio acuoso 25% (2×4.5 L) seguido por agua (4.5 L). La fase orgánica se separó y se concentró bajo presión reducida para obtener una solución de (7R,8S)-8-((S)-2-benciloxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butirilamino)-1,4-dioxa-espiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 2 (1.4 L). el yoduro de metilo (2.39 kg) se agregó, el recipiente se protegió de la luz y la mezcla se mantuvo bajo agitación lenta durante aproximadamente 24 h. Al precipitado amarillo espeso se agregó éter de metil tert-butilo (2.7 L) y la mezcla se mantuvo durante aproximadamente 1 h. El producto se aisló por filtración y la torta se lavó con éter de metil tert-butilo (2x1.4 L), luego se secó bajo vacío, proporcionando yoduro de [(S)-3-benciloxi-carbonilamino-3-((7R,8S)-7-etoxicarbonil-1,4-dioxa-espiro[4.5]dec-8-ilcarbamoil)-propil]-dimetilsulfonio 3 (671.4 g, ~94% de rendimiento) como un sólido blanco opaco (HPLC pureza 99.9%).



Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 2: La sal de sulfonio 3 (619.4 g), y carbonato de cesio (416.8 g) y sulfóxido de dimetilo anhidro (6.2 L) se combinaron en un reactor equipado con un limpiador para neutralizar los sulfuros volátiles. La agitación vigorosa se mantuvo hasta que la conversión completa se obtuvo (HPLC). Acetato de etilo (12.4 L) se agregó, seguido por 20 % salmuera (3 L). La fase orgánica se separó, se lavó dos veces con salmuera (2x3 L) y se evaporó para obtener a una solución de (7R,8S)-8-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-1,4-dioxa-espiro[4.5]decano-7-carboxilato de etilo 4 en acetato de etilo (~0.8 L). Acetona (2.55 L) se agregó, seguido por una solución de ácido clorhídrico acuoso 0.5 M (2.3 L). Con buen mezclado, la solución se calentó hasta 50 hasta 60°C hasta que la conversión de 4 a (1R,2S)-2-((S)-3-benciloxicarbonilamino-2-oxo-pirrolidin-1-il)-5-oxo-ciclohexanocarboxilato de etilo 5 se completó (HPLC). La mezcla se concentró bajo presión reducida de bajo de 40°C, se

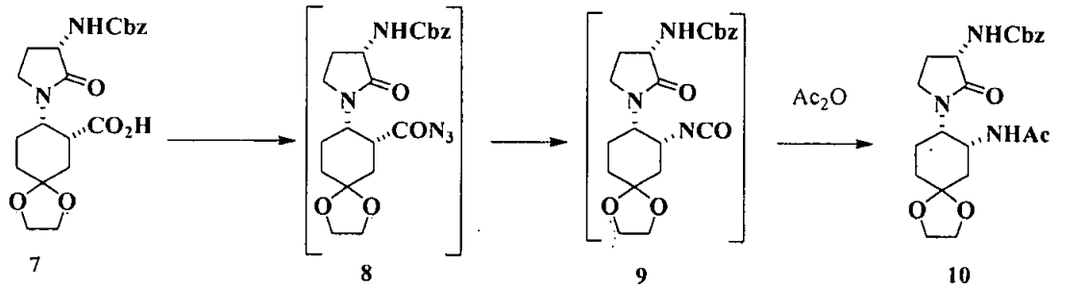
enfrió a ~30 °C, y agua (4.1 L) se agregó. La mezcla espesa resultante se enfrió de 5 hasta 10°C y se agitó durante ~1 hora. El producto se filtró y la torta se lavó con agua (2x2.5 L). Durante la deslicorización, la torta se secó hasta un peso constante de bajo de 40°C en un horno al vacío. La ciclohexanona 5 (272g, 70% de rendimiento) se obtuvo (HPLC pureza 98.7%).



Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 3: La ciclohexanona 5 (100g) se suspendió en THF (500 mL) y se enfrió a 0°C. 1N NaOH (271g) se agregó a 0-5°C y la mezcla bifasica se agitó a ≤ 5 °C durante al menos una hora. El MTBE (500 mL) se agregó y las capas se separaron. La capa acuosa del fondo se lavó nuevamente con MTBE (500 mL) y las capas se separaron. Diclorometano (500 mL) se cargó al producto-capa acuosa rica, y la mezcla se enfrió a 0°C. 3N HCl (156 g) se cargó mantenido ≤ 5 °C. Después de agitarse durante al menos 10 min, la mezcla se calentó a 20-25°C, y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (100

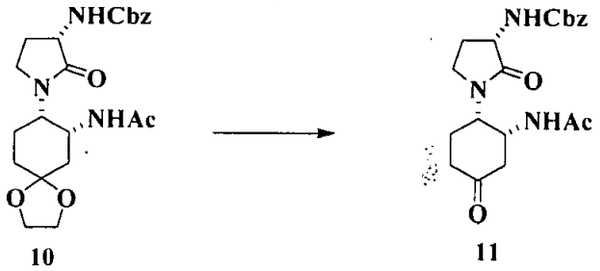
010346

mL). Las capas orgánicas se combinaron y el solvente se cambió en tolueno por medio de la destilación. El volumen de la solución de tolueno se ajustó hasta aproximadamente 1L, y monohidrato de ácido p-toluensulfónico (0.24 g) se agregó. Etilen glicol (16.22 g) se agregó, y la mezcla se destiló a presión atmosferica hasta que la formación del compuesto 7 se completó y el volumen superior fue aproximadamente de 500-700 mL. La solución se enfrió a aproximadamente 70°C, y acetato de etilo (500 mL) se agregó mantenido aproximadamente 70°C. La mezcla se enfrió y se filtró para dar 73 g (70 % de rendimiento) del compuesto 7, ácido (7R,8S)-8-((3S)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaespiro[4.5]decano-7-carboxílico.



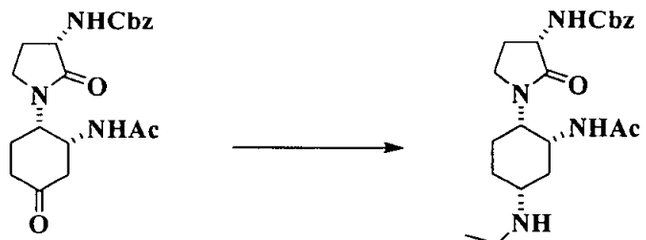
Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 4: A una mezcla espesa del compuesto 7 (147 g) en tolueno seco (370 mL) se cargó trietilamina (32.7 g) a 15-25°C. Después de que la mezcla espesa se volvió una solución después de 10-15 minutos de agitación a 25°C, el matraz se enfrió a -10°C y cloroformiato de isobutilo (44.1g) se cargó a -10°- 0°C. La

mezcla se agitó a -10°- 0°C durante alrededor de 30 min. A una solución de azida de sodio (42 g) y bromuro de tetrabutilamonio (5.2 g) en agua (130 mL) se agregó a -10°-0°C. La mezcla espesa bifásica se agitó vigorosamente durante al menos una hora y tolueno (1750 mL) seguido por agua (300 mL) se agregaron. Las dos fases se agitaron durante al menos 10 minutos y la capa orgánica superior se separó y se secó con tamiz molecular 4Å. El anhídrido acético (76 mL) y ácido acético (28 mL) se agregaron y la solución se calentó hasta 80-90°C durante 1-4 horas, hasta que <2 AP del intermediario 9 se detectó por HPLC. El solvente se destiló completamente parcialmente hasta aproximadamente dos tercios del volumen inicial bajo una presión atmósferica, la solución se enfrió a temperatura ambiente y la mezcla espesa resultante se agitó durante 16 horas. Heptano (350 mL) se agregó lentamente y la mezcla espesa se agitó durante 1h. Los sólidos se filtraron, se lavaron con tolueno/heptano 4:1 (300 mL), y se secaron para dar 109 g (78% de rendimiento) del compuesto 10, ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.



10 11

Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 5: A una solución del compuesto 10 (109 g) en acetona (760 mL) se cargó 1N HCl (760 mL). La mezcla se calentó hasta 50°C durante 2.5 horas. La acetona se destiló completamente bajo presión reducida y el producto se extrajo con diclorometano dos veces 1 x 1 L y 1 x 0.5 L. Las capas de diclorometano se combinaron y diclorometano se cambió en acetato de etilo por destilación hasta que los p.b. en el recipiente alcanzo 78°C y el volumen final fue de aproximadamente 10 mL/g compuesto 10 consumo. La mezcla espesa de acetato de etilo se enfrió a temperatura ambiente, se agitó durante 16 hrs y los sólidos se filtraron y se lavaron con acetato de etilo (400 mL). El sólido se secó para dar 84 g (87% de rendimiento) del compuesto 11, ((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo.

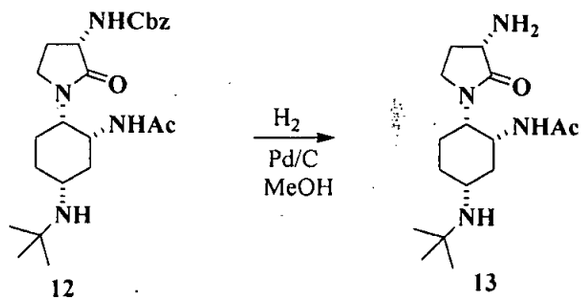


11 12

Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 6: el reactivo $TiCl_2(OPr^i)_2$ se pre-formó por agregar $Ti(O^iPr)_4$ (11.5 mL) a una solución de 1M $TiCl_4$ en diclorometano (39 mL) a 5-10°C y subsecuentemente se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. El compuesto 11 (25 g) se disolvió en

diclorometano (500 mL) y t-butilamina (34 mL) se agregó a temperatura ambiente. Después de 10 minutos la solución se enfrió a -25 hasta -20°C y la solución del reactivo de titanio preformada se agregó a una temperatura de bajo de -20°C. La mezcla se permitió calentar a temperatura ambiente y esto se agitó durante 1h. Una muestra se tomó para confirmar que la formación de imina se completó por minoapagarse con borohidruro de sodio en metanol (la ausencia de alcoholes indicando la consumación completa de la cetona de partida 11). El sulfuro de dimetil borano (7.0 mL) luego se agregó a 0-5°C y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante al menos 5 horas. Diclorometano se evaporó parcialemnte (alrededor de la mitad) bajo presión reducida y acetato de etilo húmedo (300 mL, se preformó por agitación de acetato de etilo con agua) se agregó dentro de 30-60 min. La mezcla espesa resultante se agitó durante al menos 4 h, los sólidos se filtraron y se lavaron varias veces con diclorometano hasta que no más de 5 M % del producto se retiene en la torta. El filtrado y lavados se combinaron, 1N HCl (200 mL) se agregó y la mezcla bifasica se agitó durante al menos 30 min (la evolución de gas ceso después de ~20 min). El producto de capa acuosa rica (fase superior) se separó y diclorometano (500 mL) se agregó. Hidróxido de amonio concentrado se agregó a la mezcla bifásica agitada hasta que el pH se ajustó hasta 8-8.5 (~15 mL). La fase

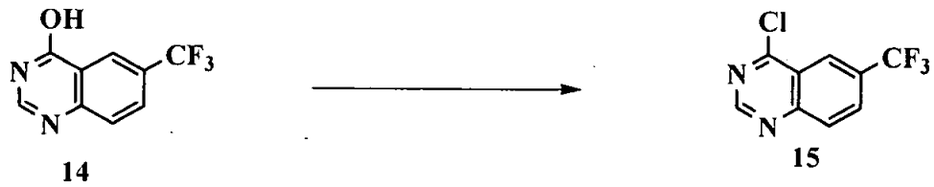
orgánica se separó y se lavó 2 x 100 mL con 14 % en peso cloruro de amonio, para remover el trans isómero no deseado del compuesto 12, y finalmente con agua (25 mL). Diclorometano se cambió en acetato de etilo por destilación bajo presión normal hasta que los p.b. en el recipiente alcanzo 78°C y el volumen final fue de aproximadamente 5 mL/g compuesto 11 consumo (~140 mL). La solución se enfrió a temperatura ambiente. Heptano (250 mL) se agregó lentamente a 40-50°C y compuesto 12 inicio la cristalización. La mezcla espesa se agitó a temperatura ambiente durante 3 hrs y los sólidos se filtraron, se lavaron con heptano (100 mL) y se secaron para dar 20.1 g (70 % de rendimiento) del compuesto 12, ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, como cristales esponjosos blancos.



12 13

Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 7: El compuesto 12 (20 g) se disolvió en metanol (400 mL) y 5 % Catalizador Pd/C (1.8 g, 9 % en peso) se agregó. La mezcla se hidrogeno a 25°C y 25 psig (1.7575 kg/cm^2) durante 3h. El catalizador se removió por filtración, y el metanol se cambió

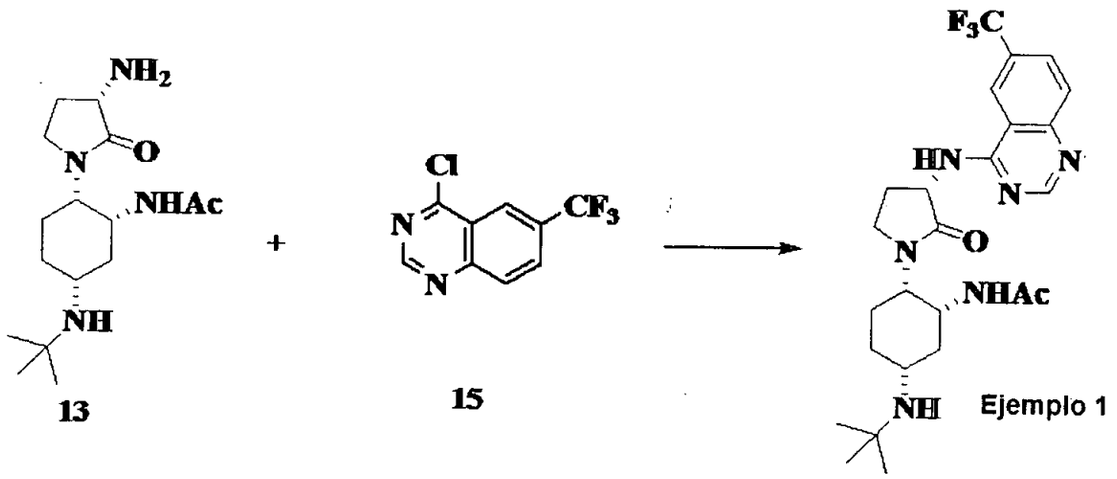
en acetato de etilo por destilación continua. El producto se cristalizo a partir de acetato de etilo (160 mL) durante el enfriamiento. Heptano (160 mL) se agregó a 25°C, la mezcla espesa se agitó durante 1h y el producto se filtró, se lavó con heptano y se secó para dar 12.8 g (94 % de rendimiento) del compuesto 13, N-((1R,2S,5R)-2-((3S)-3-amino-2-oxo-1-pirrolidinil)-5-(tert-butilamino)ciclohexil)acetamida.



14 15

Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 8: 6-(trifluorometil)-4-quinazolinol, 14 (5 g; ver P. H. Carter, et al. PCT application WO 2005/021500) se suspendió en diclorometano (100 mL). N,N-diisopropiletilamina (4.2 mL, 1.05 eq) y DMF (0.4 mL, 0.2 eq) se agregaron. Cloruro de oxalilo (3.0 mL, 1.5 eq) luego se agregó a la mezcla espesa agitada a 20-25°C bajo enfriamiento (adición exotérmica). La mezcla espesa anaranjada se agitó a 30-35°C durante 2h. La evolución de gas estudiada se observó durante ~1.5 hrs en cuyo punto la mezcla espesa se volvió una solución anaranjada. Después de enfriarse a 20°C, la solución de reacción se agregó gota a gota hasta 20% en peso K_2HPO_4 acuoso (50 mL) bajo agitación vigorosa y evolución de gas. La fase orgánica inferior se separó y se lavó un tiempo más con 20 %

en peso K_2HPO_4 acuoso (50 mL). La solución orgánica se usó como es durante la siguiente etapa dentro de 16h.



Ejemplo 1, 2ª Preparación alternativa, Etapa 8: A una solución de 15 en diclorometano (22 mL, 5.5 mmol), sólido 13 (1.55 g, 5 mmol) se agregó y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que los sólidos se disolvieron. Trietilamina (1.4 mL, 11 mmol) se agregó y la mezcla se agitó durante 24 hrs a temperatura ambiente. Agua (10 mL) se agregó, las dos fases se agitaron durante 10 minutos y la fase orgánica se separó. El diclorometano se cambió en acetato de etilo por destilación continua hasta que los p.b. en el recipiente alcanzo 78°C y el volumen final fue de aproximadamente 10 mL/g compuesto 13 consumo (~15 mL). La mezcla espesa se enfrió a temperatura ambiente, heptano (15 mL) se agregó lentamente y la mezcla espesa se agitó durante 16 h. Los sólidos se filtraron, se lavaron con heptano/acetato de etilo 1:1 (5 mL) y se secaron para dar 1.83 g (72 % de rendimiento)

de cristales beige (forma N-2 por XRD) de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, Ejemplo 1.

EJEMPLO 2

Formas de Cristal de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida

Diversas formas de cristal de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, incluyendo la base libre se prepararon y caracterizaron como se describe abajo.

PROCEDIMIENTOS PARA CARACTERIZAR LAS FORMAS

Datos de Cristal Sencillo

Los datos se colectaron en un difractómetro de serie Bruker-Nonius (BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA) CAD4. Los parámetros de celdas unitarias se obtuvieron a través de análisis de mínimos cuadrados de los ajustes de difractómetro experimental de 25 reflecciones de ángulo alto. Las intensidades se midieron usando radiación Cu Ka (λ = 1.5418 Å) a una temperatura constante con la técnica de barrido variable θ-2θ y se colectaron solamente por factores de polarización Lorentz. Las cuentas de respaldo se colectaron en los extremos de lo

barrido por la mitad del tiempo de lo barrido. Alternativamente, los datos de cristal sencillo se colectaron en un sistema Bruker-Nonius Kappa CCD 2000 usando radiación Cu Ka (λ = 1.5418 Å). El índice y procesamiento de los datos de intensidad medidos se llevaron a cabo con el paquete de software HKL2000 (Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) en Macromolecular Crystallography, eds. Carter, W.C. Jr & Sweet, R.M. (Academic, NY), Vol. 276, pp. 307-326) en el conjunto de programa de colección. (Collect Data collection and processing user interface: Collect: Data collection software, R. Hooft, Nonius B.V., 1998.). Alternativamente, los datos de cristal sencillo se colectaron en un sistema Bruker-AXS APEX2 CCD usando radiación Cu Kα (λ = 1.5418 Å). El índice y procesamiento de los datos de intensidad medidos se llevaron a cabo con el conjunto paquete/programa de software APEX2 (APEX2 Data collection and processing user interface: APEX2 User Manual, v1.27; BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA).

Cuando se indica, los cristales se enfriaron en la corriente fría de un sistema Oxford cryo (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: J. Cosier and A.M. Glazer, J. Appl. Cryst., 1986, 19, 105) durante la colección de datos.

Las estructuras se solucionan por métodos directos y se refinan con base en las reflexiones observadas usando ya sea el paquete de software SDP (SDP, siglas en inglés de Paquete

-430355

de Determinación de Estructura, Enraf.Nonius, Bohemia NY 11716. Factores de dispersión, incluyendo f' y f'', en el softaware SDP se toman de las "International Tables for Crystallography", Kynoch Press, Bromingham, Inglaterra, 1974; Vol IV, Tablas 2.2A y 2.3.1) con modificaciones locales menores o el paquete cristalográfico, MAXUS (conjunto de software de solución y refinamiento maXus: S. Mackay, C.J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. MaXus: un programa de computadora para la solución y refinamiento de estructuras de cristal de datos de difracción o SHELXTL[4]. Los parámetros atómicos derivados (coordenadas y factores de temperatura) se refinan a través de la matriz completa por mínimos cuadrados. La función minimizada en los refinamientos fue $\Sigma_w(|F_o|-|F_c|)^2$. R se define como $\Sigma||F_o|-|F_c||/\Sigma|F_o|$ mientras que $R_w=[\Sigma_w(|F_o|-|F_c|)_2/\Sigma_w|Fo|^2]^{1/2}$ donde w es una función de peso apropiada basada en errores en las intensidades observadas. Se examinan los mapas de diferencias en todas las etapas de refinamiento. Se introducen los hidrógenos en posiciones idealizadas con factores de temperatura isotrópicos, pero los parámetros de hidrógeno no varían.

Datos de Difracción de polvo de rayos X (PXRD)

Los datos PXRD se obtuvieron usando un Bruker C2 GADDS. La radiación fue Cu Kα (40 KV, 50mA). La distancia del detector muestra fue 15 cm. Las muestras de polvo se

000356

colocaron en capilares de vidrio sellado de 1mm o menos en diámetro; la capilaridad se giró durante la colección de datos. Los datos se colectaron por $3 \leq 2\theta \leq 35°$ con un tiempo de la exposición de la muestra de al menos 2000 segundos. Los arcos de difracción de dos dimensiones resultantes se integraron para crear un patrón PXRD de 1 dimensión tradicional con un tamaño de etapa de 0.02 grados 2θ en el intervalo de 3 hasta 35 grados 2θ.

Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Los experimentos DSC se realizaron en un TA Instruments™ modelo Q1000 o 2920. La muestra (alrededor de 2-6 mg) se pesó en una plancha de aluminio y se registra exactamente hasta una centésima de un miligramo, y se transfiere al DSC. El instrumento se purgó con gas de nitrógeno a 50 mL/min. Los datos se colectaron entre temperatura ambiente y 300°C a relación de calentamiento 10°C/min. El diagrama se hizó con los picos endotérmicos que apuntan hacia abajo.

Análisis Termo Gravimétrico (TGA)

Los experimentos TGA se realizaron en un TA Instruments™ modelo Q500 o 2950. La muestra (alrededor de 10-30 mg) se colocó en una plancha de platino previamente tarada. El peso de la muestra se midió exactamente y se registró a una milésima de un miligramo por el instrumento. El horno se purgó con gas de nitrógeno a 100 mL/min. Los datos se colectaron entre temperatura ambiente y 300°C a relación de

calentamiento 10°C/min.

PREPARACIÓN Y ANALISIS DE LAS FORMAS

Los datos celulares unitarios y otras propiedades para estos ejemplos se presentan en la Tabla 1. Los parámetros de celdas unitarias se obtuvieron de análisis cristalográfico de rayos X de cristal sencillo. Una cuenta detallada de células unitarias se puede encontrar en el Capitulo 3 de Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: a Practical Guide, (MacMillian, 1968).

Las coordenadas atómicas fraccionarias para los Ejemplos 2a, b, c, d, e, f, g, y h, y las condiciones las cuales se miden se presentan en las Tablas 2-9.

Adicionalmente, las posiciones de pico de difracción de rayos X en polvo característico (grados 2θ±0.1)@ TA para los Ejemplos 2a, b, c, d, e y f, se presentan en la Tabla 10, todos los cuales se basan en los patrones de alta calidad colectados con un difractómetro (CuKα) con una capilaridad de barrido con 2θ calibrado con un NIST u otro estandar adecuado.

Finalmente, las Figuras 1-6 presentan patrones XRPD para los Ejemplos 2a, b, c, d, e y f, figuras 8, 10, 13, 15, 17 y 19 se describe en TGA de los ejemplos 2a, b, c, d, e y f, respectivamente. Las figuras 7, 9, 12, 14, 16 y 18 describe el DSC de los ejemplos 2a, b, c, d, e y f, respectivamente. La figura 11 describe la isotermia de sorpción de vapor del

Ejemplo 2b.

Forma de Preparación, Caracterización DSC y TGA

Ejemplo 2a, Forma H0.5-4: 150 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se disolvió en acetato de n-butilo saturado caliente con agua. Heptano se agregó hasta que se observa una turbiedad persistente. La mezcla espesa se permitió enfriar a temperatura ambiente. La Forma H0.5-4 se caracterizó por 0.5 mol agua por mol N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma H0.5-4 se caracterizó por un termograma DSC que tiene un inicio endotérmico amplio típicamente en el intervalo de entre temperatura ambiente ca. y 67°C ca. en el convenio en la curva TGA; a temperaturas más altas en otros eventos pueden ocurrir. La Forma H0.5-4 se caracterizó por una curva termal TGA que tiene típicamente menos peso desde 0.6% hasta alrededor de 1.4% hasta 100°C ca. La perdida de peso teoretical para la forma H0.5-4 es 1.7%, sin embargo, esto no es usual para hidratos inestables para llevar a ser parcialmente deshidratado durante el secado.

Ejemplo 2b, Forma N-2: 1 g de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se

disolvió en 10 mL de agua-libre EtOAc a 77°C. La solución se enfrió a 70°C. 10 mg de las semillas de N-2 se agregaron. A la mezcla espesa, 18 mL de n-heptano se agregó durante 1 hora con una bomba de jeringa. La mezcla espesa se enfrió de 70°C hasta 20°C durante 1 hora, y se agitó a 20°C durante la noche. El sólido se aisló por filtración, se lavó con 3 mL de n-heptano, se secó a 50°C en un horno al vacío durante la noche. La Forma N-2 es N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre, una forma pura (dentro de las moléculas de agua o solvente). La Forma N-2 se caracterizó por un termograma DSC que tiene un inicio endotérmico típicamente entre ca. 230°C y ca. 232°C como un punto sencillo sin otras transformacions. La Forma N-2 se caracterizó por una curva TGA que tiene perdida de peso insignificante hasta 200°C ca. y de acuerdo con la estructura de cristal sencilla.

Ejemplo 2c, Forma H1.75-5: Una mezcla espesa de 50 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se agitó vigorosamente en 1 mL agua durante más de 16 horas. La Forma H1.75-5 se caracterizó por 1.75 moles de agua por un mol de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-

361

il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma H1.75-5 se caracterizó por un termograma DSC que tiene un inicio edotermico típicamente entre temperatura ambiente ca. y 70°C ca. de acuerdo con la curva TGA; a temperaturas más altas en otros eventos pueden ocurrir. La Forma H1.75-5 se caracterizó por una curva TGA que tiene una pérdida de peso de 4.3% ca. hasta 5.3% ca. a temperaturas de hasta 100°C ca.. La perdida de peso teórica es 5.9% ca., sin embargo, esto no es usual para hidratos inestables para llevar a ser parcialmente deshidratado durante el secado.

Ejemplo 2d, HAC-1: 100 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se disolvió en 0.1 mL de HOAc a 80°C. A esto, 0.2 mL de t-BuOAc se agregó y la solución se enfrió a 20°C. La solución se evaporó hasta secarse. El sólido resultante se agitó en heptano a 50°C durante 15 horas, seguido por enfriamiento a 20°C. HAC-1 se filtró y se secó a 25°C bajo vacío durante la noche. La Forma HAC-1 se caracterizó por 1 mol de ácido acético por un mol de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma HAC-1 se caracterizó por un termograma DSC que tiene un inicio endotérmico típicamente a 100°C ca. en el convenio en la curva TGA; a temperaturas más altas en otros eventos

pueden ocurrir. La Forma HAC-1 también se caracterizó por una curva TGA que tiene ca. 15.3% perdida de peso de hasta 200°C ca. La pérdida de peso teorética es 10.5% ca., sin embargo esto no es usual durante cantidades menores de solvente de punto de ebullición altos para asociar los restos con el sólido. En casos similares a estos, PXRD se diagnóstica de la forma, pero no es sensible a pequeñas cantidades de solvente adventicio.

Ejemplo 2e, Forma E-1: 50 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se disolvió en <1mL de etanol hervido. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se permitió evaporar lentamente. La Forma E-1 se caracterizó por 1 mole de etanol por un mole de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma E-1 se caracterizó por un termograma DSC que tiene un inicio endotérmico típicamente a 100°C ca. en el convenio en la curva TGAs; a temperaturas más altas en otros eventos pueden ocurrir. La Forma E-1 se caracterizó por una curva termal TGA que tiene una pérdida de peso de 7.1% ca. hasta 7.6% ca. hasta 150°C ca. La pérdida de peso teorética es 8.3% ca., sin embargo, esto no es inusual para solvatos inestables para llegar a ser parcialmente desolvatados durante el secado.

Ejemplo 2f, RPG-3: 30 hasta 40 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se disolvió en 2 mL de propilen glicol racémico. El agua se agregó hasta una nube se observó. El solvente se permitió evaporar lentamente hasta secarse. La Forma RPG-3 se caracterizó por 1 molécula de R-propilen glicol por una molécule de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre. La Forma RPG-3 se caracterizó por un termograma DSC que tiene un inicio endotérmico a 70°C ca. en el convenio en la curva TGA, a temperatura altas otros eventos pueden resultar. La Forma RPG-3 se caracterizó por una curva TGA que tiene una pérdida de peso de 16.4% ca. hasta 110°C ca. La pérdida de peso teorética es ca. 13.1%, sin embargo esto no es usual durante cantidades menores de solventes de punto de ebullición alto para asociar los restos con el sólido. En casos similares a estos, PXRD es un diagnóstico de la forma pero no es sensitiva a cantidades pequeñas del solvente adventicio.

Ejemplo 2g, Forma IPA-1: 40 mg de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre se hicieron mezcla espesa en <1mL de alcohol de isopropilo. La

mezcla espesa se calentó suavemente para disolver el sólido restante. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se permitió evaporar lentamente hasta que los cristales se observaron. La Forma IPA-1 se caracterizó por 1 mole de alcohol de isopropilo por un mole de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, base libre.

TABLA 1

Parámetros de célula unitaria

Compuesto	Forma	T	a(Å)	b(Å)	c(Å)	α°	β°	γ°	V(Å^3)
Ej. 2a	H0.5-4	-50	17.7845(7)	7.6215(3)	20.9510(9)	90	109.062(3)	90	2684.1(2)
Ej. 2b	N-2	RT	18.7240(4)	8.0171(2)	19.6568(5)	90	114.935(2)	90	2675.7(1)
Ej. 2c	H1.75-5	-70	12.7648(2)	34.3194(7)	12.9659(2)	90	99.053(1)	90	5609.4(2)
Ej. 2d	HAC-1	RT	7.9766(7)	11.058(2)	33.348(4)	90	90	90	2941.4(6)
Ej. 2e	E-1	-50	7.9866(3)	11.2594(6)	32.680(2)	90	90	90	2938.7(2)
Ej. 2f	RPG-3	-50	10.3004(3)	10.5475(4)	15.4784(6)	90.045(3)	102.476(2)	109.083(2)	1547.0(1)
Ej. 2g	IPA-1	RT	8.4487(2)	11.6615(3)	31.3800(9)	90	90	90	3091.7(1)

-022365

TABLA 1 (continuación)

Parámetros de celda unitaria

Compuesto	Z'	Vm	sg	dcalc
Ej. 2a	2	671	$P2_1$	1.235
Ej. 2b	2	669	$P2_1$	1.258
Ej. 2c	4	701	$P2_1$	1.274
Ej. 2d	1	735	$P2_12_12_1$	1.279
Ej. 2e	1	735	$P2_12_12_1$	1.249
Ej. 2f	2	774	P1	1.257
Ej. 2g	1	773	$P2_12_12_1$	1.217

Las variables usadas en la tabla 1 se definieron a continuación:

T = temperatura en centígrados para los datos cristaligráficos (T.A. es temperatura ambiente la cual es alrededor de +22°C)

V = volumen de la celda unitaria

Z' = número de moléculas de fármaco por unidad asimétrica

Vm = V(celda unitaria)/(Moléculas de fármaco Z por célula)

sg = grupo de espacio

dcalc = densidad de cristal calculada

- 000365

TABLA 2

Coordenadas atómicas para el ejemplo 2a, Forma H0.5-4

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	0.1718	0.5612	0.2388	F138	0.9730	0.9700	0.6210
F2	0.1576	0.4167	0.1518	F139	1.0220	0.7300	0.6430
F3	0.1277	0.6827	0.1463	F140	0.9470	0.7710	0.5532
N7	0.3729	0.0177	-0.0187	O137	0.5289	1.1320	0.2702
N9	0.3967	0.3613	0.0716	H10	0.3464	0.3422	0.0601
N11	0.5034	0.5324	0.1275	H16	0.1889	-0.1347	-0.0192
N12	0.1513	-0.3723	-0.0803	H85	0.2780	0.4332	0.1193
N15	0.2070	-0.0340	-0.0258	H88	0.4895	0.3182	0.0357
N18	0.4944	0.7660	0.2016	H90	0.2688	-0.4938	-0.1162
O23	0.3677	0.2704	-0.0786	H91	0.2791	-0.3427	-0.1635
O25	0.2371	0.2420	0.0154	H93	0.2277	0.1128	-0.0967
C82	0.2630	0.6176	0.1822	H95	0.3290	-0.0521	-0.1140
C83	0.4281	0.4888	0.1165	H99	0.3760	-0.3135	-0.0574
C84	0.3027	0.5269	0.1466	H100	0.3100	-0.3067	-0.0228
C86	0.3810	0.5754	0.1513	H102	0.5234	0.0450	0.0773
C87	0.4447	0.2515	0.0409	H103	0.4804	0.1033	0.1290
C89	0.2647	-0.3681	-0.1237	H105	0.1184	-0.0766	-0.1500
C92	0.2304	-0.0122	-0.0852	H106	0.1831	-0.0821	-0.1859
C94	0.3163	-0.0776	-0.0729	H110	0.3980	0.9063	0.2542
C96	0.4172	0.7161	0.1933	H112	0.4292	-0.1628	0.0516
C97	0.1821	0.5681	0.1800	H113	0.3692	-0.0449	0.0742
C98	0.3221	-0.2755	-0.0632	H115	0.2715	0.8230	0.2452
C101	0.4735	0.0847	0.0816	H117	0.0540	-0.3914	-0.0071

C104	0.1724	-0.1130	-0.1448	H118	0.1047	-0.5613	-0.0042
C107	0.3915	0.1858	-0.0261	H119	0.0122	-0.5664	-0.0392
C108	0.2116	0.0919	0.0195	H121	0.0157	-0.2070	-0.1065
C109	0.3748	0.8103	0.2276	H122	-0.0438	-0.3568	-0.1418
C111	0.4081	-0.0451	0.0507	H123	0.0156	-0.2818	-0.1762
C114	0.2994	0.7605	0.2220	H126	0.1446	-0.3645	-0.1779
C116	0.0592	-0.4960	-0.0309	H128	0.5835	0.7006	0.1755
C120	0.0087	-0.3106	-0.1338	H130	0.2266	0.0448	0.1189
C124	0.0696	-0.4465	-0.0977	H131	0.1603	-0.0732	0.0701
C125	0.1783	-0.3101	-0.1359	H132	0.1430	0.1249	0.0800
C127	0.5309	0.6696	0.1690	H134	0.0091	-0.6633	-0.1497
C129	0.1827	0.0426	0.0774	H135	0.1005	-0.6984	-0.1175
C133	0.0611	-0.6143	-0.1412	H136	0.0686	-0.5851	-0.1833
F4	0.9541	0.9380	0.5714	H141	0.1830	-0.4440	-0.0580
F5	0.9826	0.6800	0.5759	H14	0.6945	1.0312	0.5339
F6	1.0259	0.8300	0.6655	H21	0.7741	1.5073	0.4379
N8	0.6040	1.3694	0.4758	H28	0.7049	1.4602	0.3064
N13	0.6631	1.0203	0.5573	H29	0.6130	1.4814	0.2902
N17	0.7581	1.7462	0.3780	H32	0.5464	1.0615	0.5430
N19	0.6266	0.8793	0.6383	H34	0.6724	1.6789	0.4661
N20	0.7501	1.4082	0.4350	H35	0.5807	1.7062	0.4509
N22	0.7080	0.6517	0.7080	H38	0.8152	0.9372	0.5749
O24	0.7581	1.1336	0.4774	H41	0.5545	1.4575	0.3823
O26	0.5442	1.1244	0.4164	H44	0.5540	1.3350	0.5873
C27	0.6643	1.5023	0.3242	H45	0.6406	1.2709	0.6290
C30	0.6817	0.9034	0.6081	H48	0.6272	1.8887	0.3818

C31	0.5921	1.1293	0.5402	H49	0.5627	1.7587	0.3377
C33	0.6205	1.6624	0.4324	H52	0.6566	1.2721	0.3752
C36	0.5758	1.2019	0.4701	H55	0.6234	1.5433	0.5534
C37	0.8201	0.8496	0.6069	H56	0.6965	1.4170	0.5619
C39	0.7568	0.8126	0.6288	H58	0.8887	1.9136	0.4290
C40	0.6067	1.4694	0.4172	H59	0.9292	1.8759	0.3743
C42	0.8902	0.7591	0.6317	H60	0.9085	1.7203	0.4146
C43	0.6042	1.2934	0.5840	H62	0.6632	1.7578	0.2922
C46	0.7651	0.6822	0.6794	H64	0.8824	1.3038	0.5620
C47	0.6162	1.7663	0.3697	H65	0.8870	1.4370	0.5064
C50	0.8099	1.8166	0.3410	H66	0.9097	1.2396	0.5019
C51	0.6689	1.3952	0.3877	H69	0.7263	1.9822	0.2803
C53	0.7895	1.2775	0.4740	H70	0.8132	2.0339	0.2846
C54	0.6389	1.4243	0.5469	H71	0.7823	2.0761	0.3450
C57	0.8917	1.8331	0.3947	H73	0.8374	1.5813	0.3078
C61	0.6751	1.6998	0.3362	H74	0.8486	1.7393	0.2638
C63	0.8750	1.3182	0.5148	H75	0.7629	1.6701	0.2558
C67	0.9615	0.8066	0.6143	H77	0.8443	0.5011	0.7349
C68	0.7802	1.9934	0.3099	H79	0.9456	0.5638	0.6960
C72	0.8152	1.6904	0.2872	H81	0.6060	0.7320	0.7067
C76	0.8381	0.5893	0.7029	H142	0.7500	1.8390	0.4090
C78	0.8982	0.6264	0.6799	H143	0.5333	1.1298	0.3123
C80	0.6445	0.7516	0.6862	H144	0.5194	1.0278	0.2538

368

TABLA 3

Coordenadas atómicas para el ejemplo 2b, Base Forma N-2

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
N1	0.7824	1.3195	0.3238	C71	0.9289	1.4591	0.5167
N2	0.1685	0.3056	-0.0178	H72	0.9378	1.4237	0.5668
H3	0.1633	0.1989	-0.0196	H73	0.9764	1.4359	0.5102
N4	0.6223	0.8215	0.1887	C74	0.8719	1.7574	0.6080
N5	0.2627	0.4840	-0.0849	C75	0.6719	1.2862	0.4846
N6	0.6868	0.9765	0.2943	H76	0.6246	1.2933	0.4390
H7	0.7030	0.9877	0.3420	H77	0.6814	1.3914	0.5103
N8	0.4185	0.9718	0.0742	H78	0.6660	1.2009	0.5162
N9	0.0989	0.0258	-0.1003	C79	0.9173	1.6199	0.6639
N10	0.7913	1.3680	0.4754	H80	0.8851	1.5217	0.6541
H11	0.7826	1.4618	0.4918	H81	0.9305	1.6578	0.7142
N12	0.5331	0.6005	0.1813	H82	0.9647	1.5943	0.6584
N13	0.3353	0.7474	0.0475	C83	0.9176	1.9198	0.6225
H14	0.3028	0.6896	0.0583	H84	0.9680	1.8999	0.6220
N15	0.8501	1.6946	0.5311	H85	0.9252	1.9631	0.6707
N16	0.4567	1.1267	0.1887	H86	0.8887	1.9992	0.5842
O17	0.7470	1.1042	0.4435	C87	0.7960	1.7901	0.6131
O18	0.2114	0.7470	-0.1165	H88	0.7660	1.8705	0.5758
O19	0.2229	0.5239	0.0583	H89	0.8064	1.8325	0.6620
O20	0.8588	1.0890	0.3360	H90	0.7667	1.6881	0.6048
F21	0.5881	0.9034	0.4961	C91	0.2069	0.3753	0.0494
F22	0.4828	0.7754	0.4659	C92	0.1886	0.3981	-0.1294
F23	0.5874	0.6500	0.5199	H93	0.1617	0.4641	-0.1751

C24	0.1049	-0.1653	-0.0049	C94	0.1345	0.3960	-0.0889
H25	0.1473	-0.2167	-0.0125	H95	0.1249	0.5115	-0.0787
H26	0.0773	-0.2487	0.0097	C96	0.3636	0.8982	0.1612
H27	0.1257	-0.0826	0.0338	C97	0.0560	0.3169	-0.1396
C28	0.0052	-0.2107	-0.1371	H98	0.0300	0.3865	-0.1836
H29	-0.0334	-0.1565	-0.1806	H99	0.0226	0.3123	-0.1131
H30	-0.0204	-0.2889	-0.1178	C100	0.0655	0.1409	-0.1647
H31	0.0423	-0.2685	-0.1506	H101	0.0138	0.0994	-0.1999
C32	-0.0102	0.0236	-0.0618	C102	0.2651	0.6526	-0.0801
H33	0.0176	0.1111	-0.0276	C103	0.3727	0.8727	0.0930
H34	-0.0371	-0.0447	-0.0399	C104	0.3129	0.8065	0.1831
H35	-0.0478	0.0713	-0.1077	H105	0.2826	0.7213	0.1525
C36	0.6347	0.8573	0.2590	C106	0.4090	1.0275	0.2081
C37	0.7956	1.1614	0.3094	C107	0.1998	0.2249	-0.1544
C38	0.5429	0.6399	0.2526	H108	0.2268	0.1548	-0.1108
C39	0.5969	0.8058	0.3661	H109	0.2321	0.2314	-0.1820
H40	0.6303	0.8901	0.3943	C110	0.0479	-0.0823	-0.0781
C41	0.5928	0.7673	0.2949	C111	0.3943	0.5437	-0.0102
C42	0.7174	1.0886	0.2543	H112	0.4319	0.5306	0.0416
H43	0.7243	1.0288	0.2140	H113	0.4226	0.5469	-0.0417
C44	0.8437	1.4188	0.3806	C114	0.1202	0.1477	-0.2041
H45	0.8919	1.4020	0.3733	H115	0.0955	0.2128	-0.2496
C46	0.8266	1.6034	0.3730	H116	0.1283	0.0355	-0.2179
H47	0.7791	1.6255	0.3797	C117	0.3076	0.8411	0.2485
H48	0.8177	1.6396	0.3230	C118	0.2292	0.2619	0.1158
C49	0.5524	0.7201	0.3942	H119	0.2846	0.2720	0.1469

C50	0.6668	1.2414	0.2237	H120	0.2172	0.1487	0.0989
H51	0.6690	1.2785	0.1776	H121	0.2001	0.2924	0.1441
H52	0.6125	1.2182	0.2137	C122	0.3349	0.4024	-0.0337
C53	0.8609	1.3569	0.4595	H123	0.3502	0.3144	-0.0588
H54	0.8773	1.2398	0.4636	H124	0.3290	0.3556	0.0092
C55	0.4991	0.5496	0.2836	C125	0.3458	0.7009	-0.0200
H56	0.4668	0.4624	0.2569	H126	0.3682	0.7937	-0.0371
C57	0.7010	1.3718	0.2841	C127	0.4561	1.0941	0.1233
H58	0.6975	1.4822	0.2628	H128	0.4859	1.1659	0.1085
H59	0.6744	1.3722	0.3171	C129	0.4030	1.0567	0.2762
C60	0.9137	1.6472	0.5099	H130	0.4339	1.1390	0.3084
H61	0.9621	1.7039	0.5438	C131	0.2548	0.7395	0.2713
C62	0.7404	1.2441	0.4666	C132	0.3536	0.9679	0.2955
C63	0.5039	0.5898	0.3526	H133	0.3500	0.9907	0.3403
H64	0.4747	0.5300	0.3726	F134	0.1847	0.7359	0.2156
C65	0.5722	0.6959	0.1556	F135	0.2364	0.8060	0.3220
H66	0.5642	0.6734	0.1065	F136	0.2859	0.5920	0.2960
C67	0.8949	1.7014	0.4308	F137	0.1977	0.8329	0.2710
H68	0.9412	1.6866	0.4211	F138	0.2168	0.6170	0.2301
H69	0.8818	1.8193	0.4256	F139	0.2934	0.6790	0.3395
C70	0.5532	0.7632	0.4678	H140	0.8280	1.7679	0.5060
				H141	0.1330	-0.0400	-0.1062

AR 037371

TABLA 4

Coordenadas atómicas para el ejemplo 2c, Base Forma H1.75-5

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C1	0.3942	0.1176	0.2183	C51	0.6094	0.0443	-0.0547
C2	0.2287	0.1174	0.0897	C52	0.6750	0.0382	0.0420
N3	0.1192	0.1293	0.0594	C53	0.9963	0.1572	0.4974
N4	0.1798	0.0501	0.1322	C54	0.7176	-0.0005	0.0684
N5	0.3753	0.0509	0.2822	C55	1.1985	0.0503	0.7049
N6	-0.0927	0.1070	-0.1055	C56	1.1539	0.1133	0.4965
N7	-0.3691	0.1154	-0.3165	C57	1.0229	0.1608	0.6162
N8	-0.2260	0.1440	-0.1970	C58	1.0367	0.1185	0.4572
O9	0.1323	0.1298	-0.1137	C59	0.7341	0.1669	0.3280
O10	0.0301	0.0456	0.0130	C60	1.1829	0.1168	0.6162
C11	0.0785	0.1332	-0.0419	C61	1.1435	0.1563	0.6496
C12	0.2431	0.0735	0.0697	C62	0.5636	0.1744	0.0306
C13	-0.2272	0.0747	-0.2281	C63	0.6973	0.1581	0.4320
C14	0.0812	0.0382	0.0995	C64	0.7972	0.1517	0.5115
C15	0.4135	0.0738	0.2008	C65	1.3015	0.0605	0.7775
C16	0.2774	0.1283	0.2010	C66	1.2257	0.0279	0.6122
C17	0.3592	0.0623	0.0929	C67	1.1287	0.0258	0.7652
C18	-0.3242	0.0799	-0.2978	C68	0.9017	0.0664	0.4282
C19	-0.1859	-0.0329	-0.2601	C69	0.8592	0.0308	0.4749
C20	-0.3192	0.1441	-0.2671	F70	0.7706	-0.0040	0.1659
C21	-0.1804	0.1091	-0.1748	F71	0.7890	-0.0119	0.0101

C22	-0.1842	0.0372	-0.2149	F72	0.6477	-0.0283	0.0583
C23	0.0394	0.1336	0.1281	N73	0.7366	0.2979	0.1640
C24	-0.3330	0.0112	-0.3340	N74	0.9286	0.2769	0.3415
C25	-0.2347	0.0067	-0.2683	N75	0.9490	0.3548	0.4399
C26	0.0308	0.0146	0.1792	N76	0.6679	0.2686	0.0076
C27	-0.3753	0.0465	-0.3473	N77	0.5468	0.3015	-0.1239
C28	-0.0381	0.1410	-0.0545	N78	1.1302	0.3587	0.6021
C29	0.4391	0.0161	0.3216	O79	0.7689	0.2552	0.3756
C30	0.4331	-0.0152	0.2365	O80	0.8000	0.3561	0.3182
C31	-0.0565	0.1490	0.0571	C81	0.6779	0.3005	0.0685
C32	0.5574	0.0267	0.3640	C82	0.8021	0.2636	0.1953
C33	0.3907	0.0006	0.4127	C83	0.6253	0.3363	0.0330
F34	-0.1107	-0.0374	-0.1835	C84	0.8293	0.2641	0.3145
F35	-0.1514	-0.0419	-0.3469	C85	0.9704	0.2829	0.4523
F36	-0.2560	-0.0605	-0.2519	C86	0.9612	0.3232	0.6101
N37	0.9782	0.0854	0.4895	C87	1.0815	0.3238	0.6395
N38	0.8832	0.1624	0.4564	C88	0.6395	0.3717	0.0871
N39	0.6198	0.1729	0.1273	C89	0.9221	0.3194	0.4932
N40	0.7167	0.1350	0.2533	C90	0.5107	0.3694	-0.1081
N41	0.5429	0.1472	-0.0401	C91	0.5605	0.3350	-0.0649
N42	1.1331	0.0855	0.6708	C92	0.6021	0.2715	-0.0843
O43	0.9140	0.1821	0.2960	C93	0.5266	0.4037	-0.0538
O44	0.8654	0.0771	0.3382	C94	0.9119	0.2659	0.1620
C45	0.8542	0.1720	0.3563	C95	0.5911	0.4051	0.0443
C46	0.5876	0.1117	-0.0112	C96	1.1535	0.3924	0.6738
C47	0.6629	0.1387	0.1561	C97	0.6068	0.4429	0.0984

C48	0.6954	0.0688	0.1114	C98	0.8832	0.3710	0.3595
C49	0.6512	0.1060	0.0865	C99	1.0912	0.2839	0.4757
C50	0.5679	0.0801	-0.0813	C100	1.1264	0.2872	0.5933
C101	0.9810	0.2861	0.2520	O151	0.4292	0.1756	0.7593
C102	0.9190	0.4094	0.3235	O152	0.3473	0.1636	0.8339
C103	1.0516	0.4113	0.6921	H153	0.4310	0.1254	0.2979
C104	1.2130	0.3807	0.7821	H154	0.4349	0.1341	0.1645
C105	1.2167	0.4208	0.6206	H155	0.2779	0.1337	0.0447
F106	0.6836	0.4427	0.1806	H156	0.2164	0.0417	0.2100
F107	0.5186	0.4543	0.1375	H157	0.3714	0.0703	0.3474
F108	0.6281	0.4715	0.0364	H158	-0.0576	0.0785	-0.0868
N109	0.3031	0.2523	0.0895	H159	0.2173	0.0675	-0.0123
N110	0.3202	0.3294	0.1970	H160	0.4992	0.0681	0.2061
N111	0.5022	0.3356	0.3522	H161	0.2372	0.1127	0.2569
N112	0.0946	0.2741	-0.0674	H162	0.2676	0.1594	0.2134
N113	-0.0336	0.2377	-0.1697	H163	0.3639	0.0302	0.0854
N114	-0.2016	0.2650	-0.2433	H164	0.4006	0.0751	0.0350
O115	0.1682	0.3314	0.0829	H165	-0.3534	0.1727	-0.2828
O116	0.1499	0.2237	0.1243	H166	-0.1099	0.0321	-0.1626
C117	0.2052	0.2373	0.0644	H167	0.0215	0.1059	0.1611
C118	0.2992	0.2930	0.2475	H168	0.0659	0.1539	0.1907
C119	-0.0515	0.3401	-0.0764	H169	-0.3750	-0.0142	-0.3730
C120	0.3416	0.2960	0.3644	H170	-0.0484	0.0061	0.1467
C121	-0.1222	0.3701	-0.0923	H171	0.0783	-0.0115	0.2000
C122	0.4698	0.2615	0.2174	H172	0.0297	0.0317	0.2489
C123	-0.1737	0.2997	-0.1931	H173	-0.4526	0.0496	-0.3983

C124	-0.0044	0.2713	-0.1206	H174	-0.0573	0.1673	-0.1021
C125	-0.2438	0.3311	-0.2090	H175	0.4770	-0.0409	0.2650
C126	-0.0754	0.3040	-0.1278	H176	0.3484	-0.0242	0.2146
C127	0.1701	0.2420	-0.0535	H177	0.4596	-0.0045	0.1679
C128	0.3488	0.2578	0.2007	H178	-0.1282	0.1348	0.0707
C129	0.5097	0.2640	0.3350	H179	-0.0650	0.1804	0.0686
C130	0.4624	0.2986	0.3883	H180	0.5963	-0.0009	0.3924
C131	-0.0968	0.4077	-0.0362	H181	0.5930	0.0381	0.3032
C132	0.3460	0.2683	0.0015	H182	0.5596	0.0461	0.4284
C133	-0.1317	0.2372	-0.2271	H183	0.4332	-0.0251	0.4433
C134	0.5253	0.3677	0.4289	H184	0.3902	0.0220	0.4712
C135	-0.2190	0.3662	-0.1602	H185	0.3084	-0.0081	0.3820
C136	0.2745	0.2511	-0.0941	H186	0.9987	0.0754	0.5691
C137	0.5618	0.4023	0.3689	H187	0.7487	0.1066	0.2786
C138	0.6152	0.3567	0.5186	H188	1.1096	0.0983	0.7400
C139	0.4264	0.3788	0.4754	H189	0.7448	0.0641	0.1858
C140	0.2540	0.3461	0.1186	H190	0.5192	0.0845	-0.1565
C141	0.2900	0.3831	0.0758	H191	0.5930	0.0200	-0.1086
F142	0.0020	0.4176	-0.0257	H192	1.0402	0.1792	0.4633
F143	-0.1497	0.4372	-0.0806	H193	1.1791	0.0849	0.4744
F144	-0.1239	0.4079	0.0550	H194	1.1975	0.1355	0.4619
O145	0.4346	0.1106	0.5123	H195	0.9975	0.1890	0.6409
O146	0.1371	0.2037	0.3256	H196	0.9825	0.1382	0.6530
O147	0.6629	0.2454	0.5702	H197	1.0259	0.1190	0.3726
O148	0.4523	0.2291	0.5970	H198	0.6972	0.1932	0.2915
O149	0.3986	0.3042	0.6776	H199	1.2687	0.1146	0.6366

-BC6375

O150	0.3459	0.1840	0.4326	H200	1.1831	0.1795	0.6123
H201	1.1631	0.1593	0.7328	H251	1.1684	0.4299	0.5453
H202	0.5306	0.2029	0.0082	H252	0.3950	0.3437	0.2241
H203	0.6519	0.1824	0.4545	H253	0.5749	0.3293	0.3230
H204	0.6483	0.1323	0.4245	H254	0.1193	0.3022	-0.0335
H205	0.8029	0.1216	0.5375	H255	0.2147	0.2880	0.2355
H206	0.7957	0.1702	0.5801	H256	0.0233	0.3437	-0.0249
H207	1.3466	0.0340	0.8006	H257	0.3083	0.3215	0.3958
H208	1.3500	0.0795	0.7383	H258	0.3160	0.2703	0.4028
H209	1.2843	0.0747	0.8476	H259	0.5050	0.2366	0.1841
H210	1.2710	0.0024	0.6388	H260	0.4927	0.2878	0.1790
H211	1.1517	0.0185	0.5635	H261	-0.3192	0.3277	-0.2606
H212	1.2687	0.0462	0.5671	H262	0.1323	0.2153	-0.0854
H213	1.1703	-0.0007	0.7926	H263	0.3327	0.2320	0.2439
H214	1.1105	0.0421	0.8313	H264	0.4885	0.2372	0.3700
H215	1.0556	0.0182	0.7149	H265	0.5951	0.2670	0.3470
H216	0.7976	0.0176	0.4203	H266	0.4874	0.2957	0.4712
H217	0.9226	0.0100	0.4973	H267	0.3419	0.2998	0.0019
H218	0.8269	0.0390	0.5453	H268	0.4278	0.2594	0.0040
H219	0.7349	0.3217	0.2190	H269	-0.1537	0.2100	-0.2663
H220	1.0259	0.3684	0.4660	H270	-0.2738	0.3905	-0.1734
H221	1.2052	0.3497	0.5802	H271	0.3087	0.2249	-0.1215
H222	0.7595	0.2370	0.1705	H272	0.2609	0.2719	-0.1576
H223	0.9510	0.2576	0.4964	H273	0.5805	0.4266	0.4203
H224	0.9305	0.2994	0.6498	H274	0.6328	0.3938	0.3368
H225	0.9306	0.3505	0.6365	H275	0.5006	0.4101	0.3051

H226	1.1023	0.3226	0.7234	H276	0.6311	0.3804	0.5741
H227	0.6892	0.3732	0.1634	H277	0.5931	0.3310	0.5600
H228	0.8361	0.3164	0.4802	H278	0.6878	0.3500	0.4880
H229	0.4622	0.3687	-0.1842	H279	0.4455	0.4020	0.5307
H230	0.5955	0.2449	-0.1310	H280	0.3644	0.3877	0.4139
H231	0.4887	0.4301	-0.0865	H281	0.4001	0.3535	0.5147
H232	0.9411	0.2373	0.1483	H282	0.2315	0.3935	0.0139
H233	0.9065	0.2830	0.0906	H283	0.3050	0.4046	0.1373
H234	1.1232	0.2576	0.4474	H284	0.3642	0.3778	0.0457
H235	1.1194	0.3088	0.4371	H297	0.5031	0.1166	0.5720
H236	1.2129	0.2887	0.6081	H298	0.4013	0.1383	0.4827
H237	1.1010	0.2618	0.6307	H291	0.1415	0.2116	0.2456
H238	0.9841	0.3173	0.2399	H292	0.0561	0.1944	0.3301
H239	1.0614	0.2747	0.2630	H285	0.7189	0.2533	0.6386
H240	0.8608	0.4208	0.2603	H286	0.7007	0.2488	0.5014
H241	0.9250	0.4304	0.3884	H287	0.4531	0.2087	0.6605
H242	0.9943	0.4069	0.2987	H288	0.5334	0.2354	0.5869
H243	1.0681	0.4363	0.7411	H289	0.4187	0.2763	0.6478
H244	1.0091	0.4217	0.6147	H290	0.4459	0.3091	0.7532
H245	1.0017	0.3911	0.7227	H293	0.3695	0.2054	0.4921
H246	1.2276	0.4062	0.8315	H294	0.2663	0.1913	0.3921
H247	1.1658	0.3601	0.8194	H295	0.4701	0.1653	0.8329
H248	1.2882	0.3671	0.7752	H296	0.4645	0.1639	0.6962
H249	1.2341	0.4465	0.6673	H299	0.2731	0.1523	0.8513
H250	1.2881	0.4078	0.6030	H300	0.4117	0.1542	0.8909

000377

TABLA 5

Coordenadas atómicas para el ejemplo 2e, Base Forma E-1

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F18	0.2662	0.4002	0.0274	F23	0.0301	0.3722	0.0039
F19	0.0473	0.4191	0.0033	C18	0.1648	0.3165	0.0297
F20	0.1401	0.2386	0.0059	H31	0.2375	0.5477	0.2387
O2	0.3035	0.7582	0.1985	H41	0.5018	0.4801	0.2585
O28	0.4277	0.5819	0.1087	H42	0.4761	0.3850	0.2161
N1	0.5559	0.6627	0.1978	H51	0.6480	0.5043	0.1733
N6	0.2412	0.4989	0.1766	H52	0.7376	0.5463	0.2204
N8	0.0422	0.3993	0.2139	H61	0.2881	0.5282	0.1472
N10	-0.1606	0.2714	0.1828	H91	-0.1519	0.3157	0.2435
N27	0.6744	0.6813	0.1115	H111	-0.2586	0.1707	0.1140
N29	0.9824	0.8036	0.1064	H121	-0.1207	0.1964	0.0469
C2	0.3877	0.6687	0.2028	H141	0.2343	0.4431	0.0976
C3	0.3235	0.5438	0.2136	H211	0.5921	0.8399	0.1984
C4	0.4822	0.4775	0.2252	H221	0.4827	0.7942	0.1303
C5	0.6231	0.5426	0.2028	H231	0.6846	0.8993	0.0877
C7	0.1130	0.4242	0.1780	H232	0.6444	0.9699	0.1348
C9	-0.0900	0.3261	0.2139	H241	0.9421	0.9813	0.1221
C11	-0.1488	0.2295	0.1107	H251	1.0517	0.8711	0.1826
C12	-0.0761	0.2450	0.0735	H252	0.8644	0.9484	0.1930
C13	0.0600	0.3235	0.0687	H261	0.8551	0.7433	0.2231
C14	0.1243	0.3844	0.1017	H262	0.8872	0.6821	0.1741
C15	-0.0857	0.2914	0.1453	H271	0.8051	0.6804	0.1028

C16	0.0498	0.3680	0.1409	H291	1.0794	0.7695	0.1261
C17	0.1207	0.3503	0.0270	H294	0.7893	0.5312	0.0656
C21	0.6470	0.7650	0.1817	H292	0.6583	0.4189	0.0854
C22	0.6168	0.7817	0.1361	H293	0.5951	0.5011	0.0421
C23	0.7030	0.8953	0.1212	H311	0.9885	0.9169	0.0098
C24	0.8922	0.8952	0.1304	H312	0.8322	0.8277	0.0324
C25	0.9185	0.8727	0.1765	H313	0.8750	0.9701	0.0523
C26	0.8353	0.7590	0.1910	H321	1.2632	0.9515	0.0466
C28	0.5782	0.5936	0.0987	H322	1.1556	1.0063	0.0897
C29	0.6596	0.5024	0.0711	H323	1.2983	0.8878	0.0951
C30	1.0633	0.8393	0.0676	H331	1.1943	0.7459	0.0197
C31	0.9326	0.8931	0.0389	H332	1.2251	0.6857	0.0690
C32	1.2044	0.9276	0.0745	H333	1.0345	0.6616	0.0430
C33	1.1314	0.7245	0.0492	H971	-0.8355	0.1305	0.1615
O99	-0.4402	0.1232	0.1894	H972	-0.7164	0.0043	0.1747
C97	-0.7313	0.0985	0.1797	H973	-0.7551	0.1157	0.2115
C98	-0.5812	0.1608	0.1676	H981	-0.5951	0.2544	0.1716
F21	0.3052	0.3620	0.0283	H982	-0.5565	0.1430	0.1349
F22	0.1907	0.2403	0.0143	H991	-0.3383	0.1855	0.1847

TABLA 6

Coordenadas atómicas para el ejemplo 2d, Base Forma HAC-1

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
C1	0.0418	0.3612	0.1413	H32	-0.1504	0.2133	0.0512
N2	-0.1614	0.2566	0.1827	H21	0.2024	0.4361	0.1001

379

N3	0.5574	0.6476	0.1969	H19	-0.2633	0.1786	0.1141
O4	0.4002	0.5938	0.1104	H15	-0.1260	0.2877	0.2400
N5	0.0480	0.3793	0.2136	H6	0.2703	0.5248	0.1514
N6	0.2349	0.4911	0.1766	H14	0.2507	0.5355	0.2354
N7	0.6581	0.6819	0.1120	H25A	0.5017	0.4595	0.2502
O9	0.3141	0.7518	0.2032	H25B	0.4643	0.3765	0.2131
C10	0.6548	0.7519	0.1823	H22A	0.6302	0.4915	0.1724
C11	0.1091	0.4116	0.1779	H22B	0.7255	0.5203	0.2124
C12	0.6143	0.7805	0.1389	H10	0.6208	0.8184	0.1990
C13	-0.0977	0.2822	0.1453	H12	0.4961	0.7944	0.1361
C14	0.3251	0.5321	0.2128	H31A	0.7369	0.5221	0.0663
C15	-0.0849	0.3037	0.2135	H31B	0.5607	0.5108	0.0459
C16	0.5496	0.5972	0.0993	H31C	0.6086	0.4250	0.0815
C17	0.8422	0.7397	0.1888	H17A	0.8651	0.7215	0.2164
N18	0.9734	0.7976	0.1050	H17B	0.8826	0.6751	0.1722
C19	-0.1674	0.2302	0.1113	H23A	0.6885	0.9061	0.0978
C20	0.0380	0.3268	0.0698	H23B	0.6640	0.9626	0.1405
C21	0.1085	0.3827	0.1029	H28A	0.8869	0.9177	0.1920
C22	0.6188	0.5229	0.1991	H28B	1.0495	0.8473	0.1796
C23	0.7063	0.8942	0.1260	H27	0.9448	0.9635	0.1263
C24	0.3943	0.6572	0.2042	H18	1.0626	0.7570	0.1189
C25	0.4808	0.4583	0.2218	H39A	1.2479	0.9507	0.0498
C27	0.8951	0.8864	0.1321	H39B	1.2853	0.8792	0.0894
C28	0.9305	0.8535	0.1757	H39C	1.1647	0.9911	0.0903
F29	0.2449	0.4047	0.0277	H38A	0.9706	0.9352	0.0175
C30	1.0501	0.8412	0.0669	H38B	0.8802	0.9740	0.0573

CSP380

C31	0.6205	0.5052	0.0708	H38C	0.8310	0.8527	0.0360
C32	-0.1018	0.2511	0.0743	H40A	1.1575	0.7492	0.0195
C33	0.1058	0.3467	0.0300	H40B	1.0092	0.6805	0.0403
F36	0.1168	0.2494	0.0085	H40C	1.1861	0.6845	0.0608
F37	0.0041	0.4132	0.0068	H7	0.7708	0.6743	0.1022
C38	0.9217	0.9066	0.0421	H35A	-0.8134	0.1022	0.1656
C39	1.2014	0.9229	0.0747	H35B	-0.7586	0.1045	0.2107
C40	1.1073	0.7290	0.0448	H35C	-0.7035	-0.0029	0.1830
O8	-0.4446	0.1296	0.1963	H8	-0.3548	0.1817	0.1876
C26	-0.5724	0.1491	0.1735				
O34	-0.5673	0.2213	0.1458				
C35	-0.7251	0.0824	0.1840				

TABLA 7

Coordenadas atómicas para el ejemplo 2g, Base Forma IPA-

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	0.1519	0.3786	0.0243	H4B	0.8724	0.7912	0.1232
F3	-0.0140	0.2540	-0.0043	H3	0.6171	0.6809	0.1026
F2	0.0260	0.4241	0.0085	H1	0.1162	0.5505	0.1460
N4	0.8062	0.8075	0.1016	H10	0.3362	0.7935	0.1099
N3	0.5159	0.6834	0.1054	H9	0.3991	0.8799	0.1736
N2	0.3481	0.7197	0.1890	H6A	0.4782	0.9618	0.1051
N1	0.0675	0.5440	0.1700	H6B	0.5369	0.8805	0.0686
N5	-0.1311	0.4643	0.2095	H22	0.0665	0.4473	0.0929

N6	-0.2941	0.3121	0.1828	H5	0.7491	0.9735	0.1042
O1	0.1140	0.8031	0.1697	H21	-0.3360	0.1865	0.1167
O2	0.2925	0.5779	0.1031	H12A	0.5507	0.4357	0.0989
C10	0.4463	0.7911	0.1197	H12B	0.6252	0.5211	0.0660
C9	0.4471	0.8051	0.1677	H12C	0.4678	0.4565	0.0549
C4	0.9030	0.8194	0.0629	H8A	0.6698	0.7392	0.1786
C24	-0.0632	0.3232	0.0669	H8B	0.6137	0.8216	0.2153
C19	-0.0909	0.3946	0.1378	H16	0.0302	0.6334	0.2243
C6	0.5348	0.8912	0.0992	H13A	0.4882	0.6277	0.2283
C20	-0.2139	0.3158	0.1454	H13B	0.4421	0.5607	0.1863
C11	0.4342	0.5879	0.0964	H3B	0.9771	0.9859	0.0712
C22	-0.0159	0.3962	0.0980	H3C	1.0944	0.9144	0.0431
C5	0.7048	0.9021	0.1156	H3D	1.0915	0.8973	0.0926
C17	-0.0508	0.4684	0.1726	H23	-0.2112	0.1922	0.0537
C21	-0.2559	0.2399	0.1123	H18	-0.3052	0.3848	0.2368
C14	0.1869	0.7250	0.1863	H2A	0.7158	0.7853	0.0234
C12	0.5279	0.4917	0.0774	H2B	0.8604	0.8380	-0.0010
C8	0.6155	0.8107	0.1847	H2C	0.7518	0.9169	0.0270
C16	0.1187	0.6161	0.2052	H7A	0.6551	0.9825	0.1718
C13	0.4041	0.6134	0.2080	H7B	0.8129	0.9118	0.1736
C3	1.0281	0.9129	0.0679	H1A	1.0319	0.6803	0.0846
C23	-0.1824	0.2437	0.0749	H1B	1.0662	0.7077	0.0366
C18	-0.2485	0.3861	0.2114	H1C	0.9087	0.6458	0.0495
C2	0.7981	0.8420	0.0246	H15A	0.2542	0.5916	0.2593
C7	0.7045	0.9108	0.1635	H15B	0.2564	0.4841	0.2288
C1	0.9852	0.7023	0.0579	H3A	-0.4990	0.1985	0.1863

C15	0.2577	0.5672	0.2298	H27	-0.6926	0.2734	0.1759
C25	0.0153	0.3263	0.0246	H26A	-0.7745	0.0861	0.1320
F4	0.1640	0.2980	0.0315	H26B	-0.6492	0.1771	0.1173
F5	-0.0739	0.3770	-0.0036	H26C	-0.8259	0.2136	0.1243
F6	0.0440	0.2214	0.0112	H28A	-0.8028	0.1216	0.2237
O3	-0.5666	0.1486	0.1890	H28B	-0.9203	0.1527	0.1868
C27	-0.7093	0.1903	0.1763	H28C	-0.8515	0.2497	0.2160
C26	-0.7420	0.1648	0.1343				
C28	-0.8290	0.1780	0.2024				
C29	-0.8460	0.1070	0.1744				
C30	-0.6990	0.2550	0.1410				

TABLA 8

Coordenadas atómicas para el ejemplo 2f, Base Forma RPG-3

Átomo	X	Y	Z	Átomo	X	Y	Z
F1	1.4700	0.5720	0.6614	N2	0.6350	0.3813	0.3765
F7	1.4119	0.5575	0.7000	N6	0.2687	0.8628	0.3992
F2	1.4315	0.5398	0.7741	N4	0.3398	0.7349	0.3149
F8	1.5600	0.5336	0.8131	N1	0.8898	0.3354	0.4598
F3	1.6320	0.5630	0.7860	N5	0.0527	0.9107	0.3489
F9	1.6111	0.5864	0.6960	C12	0.4202	0.2078	0.3911
N9	0.7997	-0.0295	0.8348	O1	0.6129	0.7507	0.2839
N8	0.7989	0.1232	0.9974	C10	0.7273	0.4981	0.3447
N11	1.1628	-0.0946	0.6829	C6	0.8597	0.4735	0.3332

383

N10	1.0937	0.0679	0.7424	C9	0.7661	0.6239	0.4071
N7	0.5331	0.0253	1.0441	C20	0.1173	0.7695	0.2548
N12	1.3802	-0.0414	0.6342	C19	0.0264	0.8385	0.2716
O3	0.8190	0.0931	0.7142	C5	0.9561	0.4627	0.4193
O4	1.0177	0.2159	0.9737	C17	0.2435	0.7914	0.3234
C34	0.7187	0.1296	0.9094	C8	0.8573	0.6109	0.4957
C45	1.3119	0.1383	0.6926	O2	0.4273	0.3887	0.2980
C37	0.6769	0.0002	0.8509	C24	-0.0460	0.6680	0.1174
C30	0.4799	0.0412	0.9508	C16	0.4606	0.7449	0.3864
C42	1.1869	0.0349	0.7058	C22	0.0802	0.6875	0.1776
C31	0.5850	0.1596	0.9161	C14	0.5786	0.7190	0.3544
C49	1.4737	0.3643	0.7029	C7	0.9892	0.5850	0.4828
C33	0.5750	-0.1179	0.8869	C23	-0.1359	0.7367	0.1342
C47	1.3487	0.2751	0.7153	C18	0.1707	0.9200	0.4061
C40	0.8584	0.0198	0.7679	C25	-0.0848	0.5788	0.0372
C32	0.4447	-0.0846	0.8933	C13	0.5736	0.6259	0.4906
C41	0.9773	-0.0327	0.7663	C21	-0.1010	0.8179	0.2096
C39	1.0115	-0.0750	0.8618	C4	0.9438	0.1985	0.3554
C35	0.9405	0.1730	1.0250	C3	0.9469	0.2256	0.4509
C38	0.8681	-0.1166	0.8863	C15	0.4317	0.6466	0.4565
C28	0.4760	0.0765	1.1130	C2	1.0956	0.2572	0.5066
C43	1.2625	-0.1234	0.6483	C11	0.4953	0.3347	0.3508
C44	1.4064	0.0935	0.6556	C1	0.8466	0.1026	0.4843
C46	1.5338	0.1870	0.6430	F4	-0.1040	0.4554	0.0598
C48	1.5649	0.3202	0.6666	F5	0.0211	0.6100	-0.0030
C36	1.0000	0.1703	1.1211	F6	-0.1869	0.5900	-0.0238

C29	0.5552	0.0482	1.2020	F10	-0.2221	0.5070	0.0190
C27	0.3192	0.0052	1.1006	F11	-0.0370	0.4791	0.0400
C26	0.5156	0.2276	1.1108	F12	-0.0360	0.6334	-0.0302
C50	1.5103	0.5068	0.7292	O7	0.3015	0.5242	0.1820
N3	0.6420	0.6560	0.4169	O8	0.5067	0.7155	0.1016
C55	0.4573	0.5719	0.0792	H12C	0.3410	0.1518	0.3473
C56	0.3131	0.5089	0.0936	H10A	0.6770	0.5138	0.2867
C54	0.4592	0.5517	-0.0152	H6A	0.8326	0.3912	0.2958
O5	1.1135	0.3136	0.8309	H6B	0.9113	0.5467	0.3027
O6	0.9224	0.3638	0.6775	H9	0.8236	0.6994	0.3801
C52	0.9658	0.4383	0.7607	H95	1.0446	0.4603	0.4067
C53	1.0998	0.4403	0.8150	H8B	0.8035	0.5371	0.5249
C51	0.9706	0.5801	0.7445	H8C	0.8845	0.6928	0.5336
H8	0.7521	0.0843	1.0354	H16	0.4967	0.8363	0.4153
H10	1.1043	0.1515	0.7516	H22	0.1413	0.6448	0.1660
H34	0.7767	0.2034	0.8813	H7A	1.0479	0.6636	0.4601
H37	0.6246	0.0147	0.7931	H77B	1.0425	0.5720	0.5399
H30	0.3926	0.0620	0.9462	H23	-0.2199	0.7261	0.0931
H31A	0.5395	0.1776	0.8580	H18	0.1897	0.9731	0.4584
H31B	0.6110	0.2396	0.9557	H13A	0.6288	0.6865	0.5425
H33A	0.5480	-0.1985	0.8476	H13B	0.5604	0.5340	0.5057
H33B	0.6213	-0.1349	0.9450	H21	-0.1626	0.8605	0.2204
H47	1.2884	0.3066	0.7391	H4A	0.8479	0.1679	0.3217
H32A	0.3953	-0.0742	0.8343	H4B	0.9856	0.1305	0.3502
H32B	0.3818	-0.1587	0.9172	H4C	0.9960	0.2797	0.3330
H41	0.9434	-0.1120	0.7240	H15A	0.3587	0.5626	0.4312

385

H39A	1.0471	-0.1496	0.8633	H15B	0.4034	0.6838	0.5038
H39B	1.0801	-0.0006	0.9013	H2A	1.1552	0.3410	0.4913
H38A	0.8152	-0.2110	0.8689	H2B	1.1310	0.1867	0.4955
H38B	0.8786	-0.0998	0.9495	H2C	1.0948	0.2640	0.5683
H43	1.2434	-0.2140	0.6327	H1A	0.8496	0.1213	0.5456
H46	1.5955	0.1582	0.6190	H1B	0.8758	0.0261	0.4785
H48	1.6483	0.3822	0.6582	H1C	0.7522	0.0839	0.4497
H36A	1.0650	0.1213	1.1285	H99	0.9009	0.3500	0.5070
H36B	0.9249	0.1270	1.1498	H7	0.3628	0.5029	0.2157
H36C	1.0484	0.2607	1.1471	H8A	0.5335	0.7307	0.1555
H29A	0.5101	-0.0427	1.2144	H55	0.5214	0.5322	0.1164
H29B	0.5546	0.1090	1.2479	H56A	0.2502	0.5475	0.0555
H29C	0.6509	0.0606	1.1995	H56B	0.2814	0.4136	0.0755
H27A	0.2727	0.0063	1.0399	H54A	0.4034	0.5980	-0.0510
H27B	0.2829	0.0501	1.1386	H54B	0.4208	0.4574	-0.0335
H27C	0.3022	-0.0863	1.1155	H54C	0.5546	0.5867	-0.0221
H26A	0.6150	0.2666	1.1142	H5	1.0835	0.2863	0.8748
H26B	0.4925	0.2636	1.1602	H6	0.9213	0.2865	0.6847
H26C	0.4641	0.2486	1.0564	H52	0.8933	0.3997	0.7941
H100	0.5160	-0.0550	1.0510	H53A	1.1740	0.4907	0.7866
H2	0.6741	0.3386	0.4153	H53B	1.1148	0.4884	0.8717
H4	0.3295	0.6914	0.2656	H51A	1.0458	0.6226	0.7158
H12A	0.3879	0.2319	0.4404	H51B	0.9866	0.6294	0.8002
H12B	0.4843	0.1597	0.4113	H51C	0.8826	0.5788	0.7073

356

TABLA 9

Las características de las posiciones del pico de difracción de de polvos de rayos X (grados 2θ±0.1)@ temperatura ambiente para los ejemplos 2a, b, d, c, d, e, f, y g basados en un patrón de alta calidad colectado con un difractometro (CuKα) con un hilado capilar con 2θ calibrado con un NIST u otro estándar adecuado

Ej. 2a	Ej. 2b	Ej. 2c	Ej. 2d	Ej. 2e	Ej. 2f	Ej. 2g
5.2	5.5	5.1	5.3	5.4	6.3	6.9
7.9	9.1	6.9	9.6	9.4	9.0	8.7
17.1	12.1	7.4	13.7	11.2	11.7	9.8
17.6	14.0	10.2	14.7	13.7	15.0	10.3
19.6	19.2	18.0	19.5	19.1	17.6	11.8

CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS COMPARATIVAS

Los ensayos y datos que comparan las características farmacológicas del Ejemplo 1 y los compuestos encontrados en WO2005021500 (correspondiente a la Patente E.U.A. No. 7,163,937 asignada al Solicitante actual) se presentan abajo.

Enlace celular mononuclear de sangre periférica humana **("enlace CCR2")**

Ver también: Yoshimura et al., J. Immunol. 1990, 145, 292. El ensayo de enlace CCR2 humano se establció con células mononucleares de sangre periférica humanas (hPBMCs) usando

387

MCP-1 ^{125}I-humano como el ligando marcador. Las hPBMCs se aislaron del leucopaquete humano (Biological Specialty Inc.) usando un protocolo estándar con Ficoll-Hypaque (Mediatech Cellgro). Las hPBMCs aisladas se lavaron y diluyeron hasta $1x10^7$/ml en solución amortiguadora de enlace (RPMI-1640, 0.1%BSA, 20 mM Hepes, pH 7.4). La ^{125}I-MCP-1 (NEN/Perk Elmer) se diluyó hasta 0.45 nM en solución amortiguadora. El compuesto se diluyó en solución amortiguadora de enlace a 3 veces las concentraciones finales usadas en el ensayo de enlace. El ensayo de enlace se ralizó usando una placa filtro de 96 pozos (Millipore). El enlace ^{125}I-MCP-1 total se evaluó como sigue: a cada reacción de un volumen total de 150 µl se le agregaron $5x10^5$ células, 0.15 nM ^{125}I-MCP-1, y el compuesto de tal manera que la concentración final está en el intervalo desde 0 hasta 100 nM. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido por tres lavados con RPMI-1640, 0.1% BSA, 0.4 M NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.4 usando una filtración de múltiple al vacío (Millipore). Después del lavado, la placa se secó al aire durante 60 minutos a temperatura ambiente. Esto se siguió por agregar 25 µl de Microscint 20 en cada pozo. La placa se selló T y contó en el Trilux durante 1 minuto. Se determinó el enlace no específico en presencia de 300 nM MCP-1 frío (PeproTech Inc.). El ^{125}I-MCP-1 se calcula como la diferencia entre el enlace total y no específico. Todas las condiciones se probaron por

388

duplicado. El IC50 se define como la concentración de compuesto de competencia requerido para reducir el enlace específico por el 50%.

Flujo hERG

Se hacen crecer canales hERG que expresan establemente células HEK293 (37°C, 5% CO_2) en Medio Eagle Modificado de Dulbecco complementado con suero de bovino fetal al 10% Sigma, aminoácidos no esenciales, 2mM L-glutamina y 500 µg/ml de G418, en un incubador. La solución amortiguadora de disociación se usó para extraer las células de los matraces, que luego se colocaron en placas negras/transparentes recubiertas con poli-D-lisina Corning de 384 pozos a una densidad de 2 x 10^4 células por pozo (20 µl) en medio de suero al 10%, y se incuba durante 15-24 horas a 37°C en un incubador de CO_2 al 5% hasta que se obtuvo una monocapa confluente de células.

Una solución de reserva 2 mM de pigmento BTC-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) se preparó en DMSO al 100% y luego se agregó 1:1 al ácido plurónico al 10% (p/v) en DMSO el día del ensayo. El pigmento se diluyó entonces en solución amortiguadora EP externa hERG (140 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1.0 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.3 y 10 mM glucosa; todos los componentes de la solución amortiguadora obtenidos de Sigma Chemical). Esta mezcla de pigmento BTC (30 µl) se agregó a las células y produce una concentración de carga

final de 2.5 µM. Las células se incubaron a 21°C durante 45 minutos.

Los compuestos de prueba se diluyeron hasta 10 mM DMSO en 60 µl. Estos compuestos se diluyeron entonces en serie a una relación 1:2 en DMSO en columnas 1-10 y 11-20 de una placa de 384 pozos. Las placas lista para ensayo se generaron al estampar 2.5 µl de la placa de DMSO diluida en serie, que se preparó en el Velocity 11 BioCel. Las placas acuosas se crearon al agregar 48 µl de la solución amortiguadora EP y luego se diluyeron 30 - 45 minutos antes de que el ensayo se leyera en el FLIPR. Después de cargar el pigmento, los compuestos acuosos diluidos se agregaron a las células de las tres placas de replicado (10 µl) proporcionando un intervalo de concentración de diez puntos de 80 µM hasta 0.156 nM. La concentración de DMSO final en el ensayo es del 1%. Las placas acuosas listas para el ensayo se prepararon y diluyeron en un manejador líquido Cybio.

Las células cargadas con el pigmento se leyeron en el FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que excitan el pigmento usando la línea 488 nm de un láser de argón. La emisión se filtró usando un filtro de paso de banda 540 ± 30 nm. Los canales hERG se estimularon al abrir por la adición de 20 µl/pozo de solución amortiguadora EP que contiene 66 mM K_2SO_4 y 1.3 mM Tl_2SO_4 (Sigma/Aldrich). Para cada placa, los

datos se colectaron cada segundo durante un periodo de 12 segundos, en cuyo tiempo la solución amortiguadora de estímulo que contiene Tl^+ se agregó. La colección de datos procede cada segundo durante 48 segundos, y luego continua cada tres segundos durante 2 minutos adicionales.

El intervalo dinámico del ensayo se determinó de pozos en blanco y totales. Los pozos totales (columnas 21 y 22) definen la activación hERG máxima para la placa (sin compuesto de prueba presente), y los pozos en blanco (columnas 23 y 24) definen el 100% de inhibición hERG. Los pozos en blanco contiene 400 nM de cualquiera de los inhibidores de dofetiluro hERG estándar (Ficker et al., 1998) o E-4031. Los puntos de datos crudos en cada pozos de muestra se corrigieron primero para variación de célula/señal, respaldo de control negativo (blancos), y normalizado de controles positivos (totales) usando el software FLIPR en línea. Las curvas de respuesta de concentración del compuesto de prueba para los datos de flujo hERG Tl^+ se ajustaron primero usando el Ajuste Excel (ID Business Solutions Limited, Surrey, RU) con una ecuación lógica de sitio sencillo, Y= A + ((B-A)/1 + ((C/X) ^ D))) donde A= inhibición máxima. Los datos se analizaron al ajustar las amplitudes máximas de cambio en al fluorescencia para el flujo Tl^+ para una condición dada del compuesto de prueba. Las potencias (valores IC_{50}) de los compuestos se calcularon del promedio de

pozos triplicados.

Ensayo de enlace de sitio 2, canal de sodio

Ver también: W. A. Catterall, et al. J. Biol. Chem. 1981, 256, 8922. La solución amortiguadora de enlace estándar contiene 50 mM HEPES, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 130 mM cloruro de colina, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucosa, 40 µg/mL LqT. Las reacciones de enlace se iniciaron al agregar sinaptosomas (preparadas de cerebro de rata Wistar) a la mezcla de reacción que contiene 5 nM [^{3}H]-Batracotoxina en una solución amortiguadora de enlace estándar y el compuesto a probarse a la concentración deseable. Las muestras se mezclaron entonces e incubaron a 37°C durante 60 minutos. Las reacciones se detuvieron al agregar solución amortiguadora de lavado enfriada en hielo que contiene 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 de suero de bovino. Las sinaptosomas se colectaron inmediatamente en filtros de fibra de vidrio y se lavan 3 veces con soluciones amortiguadoras de lavado. La radioactividad de la [^{3}H]-Batracotoxina que se mantiene en los filtros se contó usando espectrómetros de escintilación líquida.

Ensayo de Permeabilidad de Membrana Artificial Paralelo **(PAMPA)**

El ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralelo (PAMPA) consiste de una combinación de lípidos

basada en lecitina especialmente formulada referida como el lípido del tracto gastrointestinal (GIT). El lípido GIT se usa para formar una membrana en un ensamble de placa intercalado similar al que se usa en los ensayos Caco-2. El lípido GIT es muy semejane a la composición y desempeño de la membrana in vivo como se mide por compuestos estándar que se conocen que se absorben pasivamente en humanos. El PAMPA se usa ampliamente como un modelo in vitro para separación por exclusión de permeabilidad de compuestos descubiertos. La relación de paso de los compuestos a través de la membrana PAMPA se usa para determinar el coeficiente de permeabilidad (Pc), que puede relacionarse a la permeabilidad pasiva in vivo del compuesto.

El coeficiente de permeabilidad (Pc) de un compuesto particular se examina en un ajuste dependiente del pH con un pH de la punta y basolateral de 7.4. Todos los experimentos se conducen en determinaciones por triplicado.

Los compuestos (soluciones de reserva 10 mM en 100% DMSO) se diluyeron 1:100 en solución amortiguadora de pozo donador pH 7.4 (pION CAT # 110151), proporcionando una solución de ensayo 100 µM en DMSO al 1%. El compuesto diluido en la solución amortiguadora de pozo donador se transfirió a una placa Whatman Unifilter y se filtra antes de dispensar 200 µl en el pozo donador de la placa de ensayo (pION CAT #110163). La membrana PAMPA se formó al pipetear 4 µl de

393

solución de lípido (pION CAT #110169) en la placa filtro (VWR CAT #13503). La membrana se cubrió entonces con 200 µl de solución amortiguadora de pozo aceptor a pH 7.4 (pION CAT #110139). La placa de ensayo PAMPA (lado donador y lado aceptor) se combinó y permitió incubar a temperatura ambiente durante 4 horas. La placa se desmonta y las placas de espectrofotómetro (VWR CAT #655801) se llenan (150 µl/pozo). Las placas donadora, aceptora, referencia, y blanco se leyeron en el lector de placa SpectraMax UV. Los datos se capturaron por el software pION, que analiza los espectros y genera valores Pc.

Quimiotaxis CCR2

El ensayo de quimiotaxis CCR2 humano se condujo con la línea celular monocítica humana, THP-1. Las células THP-1 se etiquetaron primero con el pigmento fluorescente Calcein-AM en RPMI-1640 libre de BSA, libre de fenol rojo (pH 7.4) a 37°C durante 30 minutos con mezclado suave cada 15 minutos. Las células etiquetadas se lavan entonces y se vuelven a suspender a $1x10^5$/ml en solución amortiguadora de quimiotaxis (RPMI-1640 libre de fenol rojo, 0.1% BSA, pH 7.4). El compuesto de prueba se diluyó en solución amortiguadora de quimiotaxis de tal manera que la concentración de ensayo final está en el intervalo desde 0.01 nM hasta 1 µM. El ligando MCP-1 (PeproTech Inc.) se diluyó a 20 nM en solución amortiguadora de quimiotaxis. Para realizar el ensayo, un

volumen igual de las diluciones de compuesto de prueba se mezclaron con un volumen igual de células THP-1 etiquetadas (Mezcla 1), y un volumen igual de diluciones de compuesto de prueba se mezcló con un volumen igual de ligando MCP-1 diluido (Mezcla 2). Ambas mezclas se incubaron independientemente a 37°C durante 10 minutos seguido por agitación suave. La quimiotaxis inducida por MCP-1 se midió entonces en una placa de quimiotaxis (Becton Dickinson) al colocar 50 µl de la Mezcla 1 en la cámara superior y 225 µl de la Mezcla 2 en la cámara del fondo. La placa se cubrió con una tapa y se incuba a 37°C durante 30 minutos. 30 minutos más tarde, la placa se leyó en un Cytofluor. Todas las condiciones se probaron por duplicado. Para la señal de determinación de ruido, se colocaron 50 µl de células THP-1 etiquetadas solas ($5x10^4$/pozo) en la cámara superior y 225 µl de ligando MCP-1 solo se colocó en la cámara del fondo (concentración final de 10 nM). La inhibición alcanzada por concentraciones en grado del compuesto de prueba se calculó como un porcentaje del control MCP-1 libre de compuesto. El IC50 se define como la concentración del compuesto de prueba requerida para alcanzar el 50% de inhibición de quimiotaxis celular.

Pinzamiento Zonal de Membrana (Patch Clamp) hERG

El pinzamiento zonal de membrana de célula completa se usó para medir directamente las corrientes hERG en células

LOC395

HEK-293 que expresan establemente la subunidad α del canal de potasio hERG clonada. El compuesto se probó en una solución amortiguadora acuosa con pH 7.4 a temperatura ambiente. Los pulsos de prueba repetitivos (0.05 Hz) se aplicaron desde un potencial de espera de -80 mV hasta +20 mV durante 2 segundos y las corrientes de la cola se sacan siguiendo los pulsos de prueba por colocado en etapas del voltaje hasta -65 mV. Los efectos del compuesto se calcularon al medir la inhibición de la corriente de cola pico.

Pinzamiento Zonal del canal de sodio

Se usó el pinzamiento zonal de célula completa para medir directamente las corrientes de sodio que ingresan en células HEK-293 que expresan el canal de sodio cardiaco humano, SCN5A. El compuesto se probó en una solución amortiguadora acuosa libre de proteína. Para determinar la inhibición en estado de estudio, se sacan las corrientes de sodio cada 5 segundos usando el siguiente protocolo de voltaje: las células se mantienen a un potencial de -90 mV y se colocan en etapas a -20 mV por 60 ms. Los efectos se calcularon al medir la inhibición de la corriente pico durante el pulso de prueba hasta -20 mV. Se evaluó la dependencia a la relación de la inhibición por la estimulación a frecuencia de 1 Hz y 4 Hz.

Farmacocinética de Dosis Sencilla en Ratas

Se usaron ratas Sprague-Dawley (250-300 g) para los

336

estudios farmacocinéticos. Las ratas se ayunaron durante la noche antes de la dosificación PO y se alimentan 4 horas después de la dosis. Se colectaron las muestras de sangre (~0.3 mL) de la vena yugular en tubos que contienen K_2EDTA y luego se centrifugan a 4°C (1500-2000xg) para obtener el plasma. En un estudio de biodisponibilidad oral, 2 grupos de animales (N=2-3 por grupo) reciben el compuesto de prueba ya sea como una infusión intravenosa (IV) (durante 10 min) por medio de la vena yugular o por alimentación oral. Se obtienen muestras sanguíneas en serie a 0.17 (sólo para IV), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h después de la dosis. Las muestras de plasma, obtenidas por centrifugación a 4°C (1500-2000xg), se almacenaron a -20°C hasta el analisis por CL/EM/EM.

Farmacocinética de Dosis Sencilla en Monos

La farmacocinética de varios compuestos de prueba se evaluaron en monos cinomólogos macho en un diseño de cruza. Los monos se hicieron ayunar durante la noche antes de la dosificación PO y se alimentan 4 horas después de la dosificación. Un grupo de 1-3 animales (3 a 5 kg) reciben el compuesto por infusión IV (durante 10 minutos) por medio de la vena femoral y por alimentación oral, con lavados de 1 semana entre los tratamientos. Las muestras sanguíneas en serie (~0.3 mL) se colectaron de la arteria femoral a 0.17 (sólo IV), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h después de

000397

la dosis, y se centrifugan a 4°C (1500-2000xg) para obtener plasma. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el análisis por CL/EM/EM.

Análisis de Datos para ensayos farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos se obtienen por análisis sin compartimientos de la concentración de plasma contra datos de tiempo (software KINETICA™, Versión 4.2, InnaPhase Corporation, Filadelfia, PA). La concentración pico (Cmax) y el tiempo para Cmax se registraron directamente de observaciones experimentales. El área bajo la curva del tiempo cero para el último tiempo en muestra (AUC(0-T)) se calculó usando una combinación de sumas lineales y trapezoidales log. La liberación de plasma total (CLTp), volumen de distribución en estado de estudio (Vss), vida media de eliminación aparente (T1/2) y tiempo de residencia media (MRT) se estimaron después de la administración IV. Las estimaciones de T1/2 se hicieron usando un mínimo de 3 puntos con concentraciones cuantificables. La biodisponibilidad oral absoluta (F) se estimó como la relación de valores AUC normalizados por dosis después de las dosis oral e IV.

Abajo se encuentran datos para cada compuesto como se mide en los ensayos descritos arriba.

Tabla 10. Datos Comparativos In Vitro

Compuesto	IC_{50} de enlace CCR2 (nM)	IC_{50} de FLUJO hERG (nM)	Enlace de canal Na^+ (% de inhibición)	Permeabilidad PAMPA (nm/seg)
Ejemplo 12as, WO2005021500	0.27 (1)	2,800	No disponible	No disponible
Ejemplo 12aj WO2005021500	0.43 ± 0.06 (2)	770	No disponible	No disponible
Ejemplo 2k WO2005021500	0.88 ± 0.60 (23)	51,000	97%, 10,000 nM	529 ± 157 (9)
Ejemplo 12bd WO2005021500	1.15 ± 0.07 (2)	>80,000	54%, 10,000 nM	392
Ejemplo 8a WO2005021500	1.83 ± 0.80 (12)	>80,000	3%, 10,000 nM 33%, 30,000 nM	94 ± 58 (10)
Ejemplo 8e, WO2005021500	2.20 ± 0.03 (2)	>80,000	6%, 10,000 nM	2 ± 2 (2)
Ejemplo 9c, WO2005021500	0.96 ± 0.26 (19)	>80,000	48%, 10,000 nM 75%, 30,000 nM	145 ± 71 (8)
Ejemplo 1 Presente Invención	2.74 ± 1.34 (15)	>80,000	13%, 10,000 nM 32%, 30,000 nM	560 ± 86 (5)

Tabla 11a. Datos Comparativos Adicionales In Vitro

Compuesto	IC_{50} de quimiotaxis CCR2 (nM)	pinzamiento zonal de membrana hERG (% Inhib.)	pinzamiento zonal de membrana del canal Na^+ (% Inhib.)
Ejemplo 2k WO2005021500	0.24 ± 0.16 (12)	83%, 10,000 nM	52%, 10,000 nM 90%, 30,000 nM
Ejemplo 8a WO2005021500	2.63 ± 1.24 (4)	4%, 10,000 nM	22%, 10,000 nM 49%, 30,000 nM

Ejemplo 9c, WO2005021500	0.21	4%, 10,000 nM	19%, 10,000 nM 39%, 30,000 nM
Ejemplo 1, Presente Invención	0.75 ± 0.42 (16)	12%, 10,000 nM 19%, 30,000 nM	29%, 30,000 nM

Tabla 11b. Datos Farmacocinéticos In Vivo Comparativos en la Rata

Compuesto	Dosis IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	AUC Oral (nM*h)
Ejemplo 2k WO2005021500	2.5 / 25	40	68	9294
Ejemplo 8a WO2005021500	6 / 72	42	1.4	690
Ejemplo 9c, WO2005021500	4 / 43	54	14	1855
Ejemplo 1, Presente Invención	2 / 10	25	79	10169

Tabla 11c. Datos Farmacocinéticos In Vivo Comparativos en el Mono

Compuesto	Dosis IV/PO (mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	F%	AUC Oral (nM*h)
Ejemplo 2k WO2005021500	1 / 1.4	25	46	862
Ejemplo 8a WO2005021500	1 / 11	14	9.4	1896
Ejemplo 9c, WO2005021500	1 / 10	12	26	6763

Ejemplo 1, Presente Invención	1 / 1	12	95	2352

UTILIDAD

Los compuestos representativos de los ejemplos se muestra que son moduladores de la actividad del receptor de quimiocina usando ensayos conocidos por aquellos expertos en el arte. En esta sección, se describen estos ensayos y se dan sus referencias en la literatura. Más ensayos se describen en la presente en la sección titulada "Características Farmacológicas Comparativas", supra. Al exhibir la actividad en estos ensayos del antagonismo de MCP-1, los compuestos de los ejemplos se espera que sean útiles en el tratamiento de enfermedades humanas asociadas con las quimiocinas y sus receptores similares. La definición de actividad en estos ensayos es un compuesto que demuestra un IC_{50} de 30 μM o inferior en la concentración, cuando se mide en un ensayo particular.

Antagonismo del enlace MCP-1 al PBMC humano.

(Yoshimura et al., J. Immunol. 1990, 145, 292)

Al menos unos compuestos descritos en los ejemplos tienen actividad en el antagonismo del enlace MCP-1 al PBMC humano (células mononucleares de sangre periférica humana) aquí descritas.

Se tratan placas con filtros Millipore (#MABVN1250) con

100 µl de solución amortiguadora de enlace (albúmina de suero de bovino al 0.5%, solución amortiguadora 20 mM HEPES y cloruro de magnesio 5mM en medio RPMI 1640) durante treinta minutos a temperatura ambiente. Para medir el enlace, 50µl de solución amortiguadora de enlace con o sin un compuesto de concentración conocida se combinan con 50µl de MCP-1 humano etiquetado con ^{125}-I (para dar una concentración final de radioligando 150pM) y 50µl de solución amortiguadora de enlace que contiene $5x10^5$ células. Las células usadas para tales ensayos de enlace pueden incluir células mononucleares de sangre periférica humana aisladas por centrifugación con gradiente Ficoll-Hypaque, monocitos humanos (Weiner et al., J. Immunol. Methods. 1980, 36, 89), o la línea celular THP-1 que expresa el receptor endógeno. La mezcla de compuesto, células y radioligando se incuban a temperatura ambiente por treinta minutos. Se colocan las placas en un múltiple a vacío, se aplica vacío, y las placas se lavan tres veces con solución amortiguadora de enlace que contiene 0.5M NaCl. La cubierta plástica se retira de la placa, se deja secar la placa al aire, se perforan los pozos y se cuentan. El porcentaje de inhibición de enlace se calcula usando las cuentas totales obtenidas en ausencia de cualquier compuesto en competencia y el enlace de respaldo determinado por la adición de 100 nM MCP-1 en lugar del compuesto de prueba.

Antagonismo de la entrada de flujo de Calcio Inducida por MCP-1

(Sullivan et al. Methods Mol. Biol., 114, 125-133 (1999)

Al menos uno de los compuestos descritos en los ejemplos tiene actividad en el antagonismo del ensayo de la entrada de flujo de calcio inducido por MCP-1 aquí descrito.

Se mide la movilización de calcio usando un colorante indicador de Ca^{2+} fluorescente, Fluo-3. Se incuban las células a 8 X 10^5 células/ml en solución salina amortiguadora de fosfato que contiene albúmina de suero de bovino al 0.1%, solución amortiguadora 20 mM HEPES, glucosa 5mM, suero de bovino fetal al 1%, 4 μM Fluo-3AM y probenecid a 2.5 mM por 60 minutos a 37°C. Las células usadas para tales ensayos de calcio pueden incluir monocitos humanos aislados como se describe por Weiner et al., J. Immunol. Methods, 36, 89-97 (1980) o líneas celulares que expresan el receptor endógeno CCR2 tal como THP-1 y MonoMac-6. Luego se lavan las células tres veces en solución salina amortiguada de fosfato que contiene albúmina de suero de bovino 0.1%, 20mM HEPES, glucosa 5 mM y 2.5 mM de probenecid. Se vuelven a suspender las células en solución salina amortiguadora de fosfato que contiene albúmina de suero de bovino 0.5%, 20 mM HEPES y probenecid 2.5 mM a una concentración final de 2-4 X 10^6 células/ml. Se colocan en placas las células en microplacas de pared negra de 96 pozos (100μl/pozos) y se centrifugan las placas a 200 x g por 5

0043

minutos. Se agregan concentraciones diversas de compuesto a los pozos (50 µl/pozos) y después de 5 minutos se agregan 50µl/pozo de MCP-1 para dar una concentración final de 10nM. Se detecta la movilización de calcio al usar un lector de placas de imagen fluorescente. La monocapa de células se excita con un láser de argón (488 nM) y se mide la fluorescencia asociada con la célula durante 3 minutos, (cada segundo durante los primeros 90 segundos y cada 10 segundos durante los siguientes 90 segundos). Se generan los datos como unidades de fluorescencia arbitraria y el cambio en la fluorescencia para cada pozo se determina como un diferencial máximo-mínimo. La inhibición dependiente del compuesto se calcula con relación a la respuesta de MCP-1 solamente.

Antagonismo de la Quimiotaxis PBMC humana inducida por MCP-1

(Bacon et al., Brit. J. Pharmacol. 1998, 95, 966)

Al menos unos compuestos descritos en los ejemplos tienen actividad en el antagonismo del ensayo de quimiotaxis PBMC humana inducido por MCP-1 aquí descrito.

La cámara de quimiotaxis de 96 pozos MBA96 Neuroprobe, la placa de 96 pozos Polyfiltronics MPC, y los filtros de 8 micras de PFD5 de policarbonato libre con polivinilpirrolidona Neuroprobe se entibian en un incubador de 37°C. Las células Mononucleares de Sangre Periférica Humanas (PBMCs, por sus siglas en inglés) (Boyum et al.,

Scand. J. Clin Lab Invest. Suppl. 1968, 97, 31), aisladas recientemente por medio del método de separación de densidad ficoll, se suspenden en DMEM a 1 X 10^7 c/ml y se calentaron a 37°C. Una solución 60nM de MCP-1 humano también se calienta a 37°C. Se hacen diluciones del compuesto de prueba a 2x la concentración necesaria en DMEM. La suspensión PBMC y la solución 60nM MCP-1 se mezclan 1:1 en tubos de polipropileno con DMEM precalentado con o sin una dilución de los compuestos de prueba. Estas mezclas se calientan en un calentador de tubos de 37°C. Para comenzar con el ensayo, se agrega a la mezcla MCP-1/compuesto en los pozos de la placa de pozo Polyfiltronics MPC 96 que se ha colocado en la parte inferior de la cámara de quimiotaxis Neuroprobe. El volumen aproximado es de 400µl para cada pozo y debe haber un menisco positivo después de dosificar. El filtro de 8 micrones se coloca suavemente en la parte superior de la placa de 96 pozos, se coloca una empaquetadura de hule al fondo de la cámara superior y se ensambla la cámara. Un volumen de 200µl de la mezcla de compuesto/suspensión de células se agrega a los pozos adecuados de la cámara superior. Se cubre la cámara superior con un sellador de placas y se coloca la unidad ensamblada en un incubador de 37°C por 45 minutos. Después de la incubación se retira el sellador de placas y toda la suspensión celular restante se aspira completamente. Se desensambla la cámara y el filtro se retira suavemente.

Mientras se mantiene el filtro en un ángulo de 90 grados, se lavan completamente las células sin migrar usando una corriente suave de solución salina amortiguada de fosfato y la parte superior del filtro se limpia con la punta de un escobillón de hule. Se repite ese lavado dos veces más. Se seca al aire el filtro y luego se sumerge completamente en una tinción Wright Geimsa por 45 segundos. Luego se lava el filtro al sumergir en agua destilada por 7 minutos y luego un lavado adicional de 15 segundos en agua fresca destilada. El filtro se seca al aire nuevamente. Las células migradas al filtro se cuantifican por microscopia visual.

Los receptores de quimiocina de mamífero proporcionan un objetivo para interferir con o promover la función de células inmunes en un mamífero, tal como un humano. Los compuestos que inhiben o promueven la función del receptor de quimiocina son particularmente útiles para la modulación de la función de células inmunes para propósitos terapéuticos. De esta manera, la presente invención se dirige a compuestos que son útiles en la prevención y/o tratamiento de una amplia variedad de trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas, e inmunoreguladoras, incluyendo enfermedades alérgicas y asma, infección por microbios patogénicos (los cuales, por definición, incluyen virus) así como patologías autoinmunes tales como la artritis reumatoide y la ateroesclerosis.

Por ejemplo, un compuesto actual que inhibe una o más funciones de un receptor de quimiocina mamífero (por ejemplo, un receptor humano de quimiocina) se puede administrar para inhibir (esto es, reducir o evitar) la inflamación o enfermedad infecciosa. Como resultado, uno o más procesos inflamatorios, tales como la migración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis, (por ejemplo, de enzimas, histaminas) o liberación del mediador inflamatorio, se inhibe.

Similarmente, un compuesto actual que promueve una o más funciones del receptor mamífero de quimiocinas (por ejemplo, una quimiocina humana) cuando se administra para estimular (inducir o mejorar) una respuesta inmune o inflamatoria, tal como la migración de leucocitos, adhesión, quimiotaxis, exocitosis, (por ejemplo, de enzimas, histaminas) o liberación del mediador inflamatorio, resultan en la estimulación benéfica de los procesos inflamatorios. Por ejemplo, los eosinófilos se pueden reclutar para combatir infecciones de parásitos. Además, el tratamiento de las enfermedades alérgicas y autoinmunes inflamatorias antes mencionadas, también se puede contemplar para un compuesto actual que promueve una o más funciones del receptor mamífero de quimiocinas si se contempla a la administración de compuesto suficiente para provocar la pérdida de la expresión del receptor en células a través de la inducción de la

internalización del receptor de quimiocinas, o el suministro de un compuesto en una forma que resulte en la dirección equivocada de la migración de células.

Además de los primates, tales como los humanos, se puede tratar una diversidad de otros mamíferos de conformidad con el método de la presente invención. Por ejemplo, mamíferos que incluyen pero no se limitan a, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejillos de indias, ratas u otros bovinos, especies ovinas, equinas, caninas, felinas, roedores o murinas, se pueden tratar. Sin embargo, el método también se puede practicar en otras especies tales como especies de aves. El sujeto tratado en los métodos anteriores es un mamífero, macho o hembra, en quien la modulación de la actividad del receptor de quimiocinas se desea. La "modulación" como se usa en la presente, pretende antagonismo, agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

Enlace de CCR5 y ensayos funcionales

Derivación celular y cultivo celular: Un grupo de células HT1080 que expresan establemente el receptor 5 de quimiocina CC endógena (CCR5) se desarrolló usando los métodos resumidos por Harrington, Sherf and Rundlett (ver Patentes de Estados Unidos US 6,361,972 y US 6,410,266). Los clones que se expresaron más altos se aislaron usando citometría de flujo repetitivo, seguido por sub-clonación.

Estas células luego se cultivaron en placas de 6 pozos a células 3 x 10^5/pozo y se transfirieron con un vector de ADN que contiene el Gqi5 de proteína HA-etiquetada G quimérica (Molecular Devices; 5 microgramos del ADN de vector linealizado en 15 microl de Ex-Gen de Fermentes usados para la transfección). Dos días después de la transfección, los pozos se combinaron y se colocaron en P100 placas. Siete días después de colocarse en placas, las colonias se pincharon, se expandieron y se analizaron por Gqi5 contenido por Western blot. Un clon (designado como 3559.1.6) que tiene alta expresión de Gqi5 (de transfección) y de CCR5 (endógeno) se selecciona y se uso para los experimentos descritos a continuación. Las células HT1080 (clon 3559.1.6) se cultivaron con alfa-MEM suplementado con 10% de suero de bovino fetal dializado, 2% de penicilina/estreptomicina/glutamina y 500 migrogramo/ml de higromicina B (concentración final) a 37°C con 5% de CO_2 en una atmósfera humidificada.

Preparación de membranas: Un granulado celular que contiene 1 x 10^8 células HT1080 (clon 3559.1.6) se resuspendió en 5 ml de solución amortiguadora preparativa de membrana enfriada en hielo (50 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$) y se homogenizó a alta velocidad en un homogenizador Politron durante 20 segundos en hielo. El homogeneizado se diluyó con otros 25 ml de solución amortiguadora preparativa

de membrana y se centrifugó durante 12 minutos (48,000 x g a 4°C). El granulado celular se resuspendió en 5 ml de solución amortiguadora preparativa de membrana antes de rehomogenizarse como se describe previamente. El homogeneizado se diluyó con 5 ml de solución amortiguadora preparativa de membrana y se ensayó por la concentración de la proteína CCR5.

Ensayo de enlace: El homogeneizado recientemente preparado de la preparación de la membrana descrita arriba se diluyó en la solución amortiguadora de enlace (50 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.1% de BSA; una tableta de inhibidor de proteasa completa se agregó antes del ensayo) para llevar a cabo una concentración de la proteína final de 10 microgramos/pozo (placas de 96 pozos de sólido blanco de Corning, Inc.). Esta preparación de la membrana se mezcló con perlas WGA-SPA (Amershsam; se pre-remojó en solución amortiguadora de enlace) para dar una concentración de 200 microgramos/pozo. La mezcla membrana/perla SPA (100 microlitros/pozo) luego se agregó a una placa que se pre-punteo con 2 microlitros de DMSO que contienen diversas concentraciones de artículos de prueba (DMSO puro para el control negativo; diversas concentraciones de los ejemplos de esta invención para los artículos de prueba; 500 nM MIP-1 beta como un control positivo). El ensayo de enlace se inició a través de la adición de 50 microlitros de [^{125}I]-MIP-1 beta

-000410

(Perkin Elmer; material se diluyó en solución amortiguadora de enlace tal que la adición de 50 microlitros/pozo dio una concentración final de 0.1 nM [^{125}I]-MIP-1 beta). La placa se selló y se permitió mantener a temperatura ambiente durante 4-6 horas antes de contarse en un Packard TopCount. El porcentaje de enlace para el artículo reprueba se calculó, usando controles negativos y positivos para definir la ventana para cada experimento.

Ensayo Funcional basado en el Lector de placa formadora de imágenes fluorométrica (FLIPR): Las células HT1080 (clón 3559.1.6) se colocaron en 10,000 células/pozo (30 microlitros) en placas de 384 pozos (fondo negro/claro Biocoat PDL, Beckton Dickinson) y se cargaron con 30 microlitros/pozo del teñido fluorescente Fluro-4 AM (preparado por disolver 1 mg de Fluro-4 AM en 440 microlitros de DMSO y se diluyó con 100 microlitros de solución plurónica antes de diluirse además con 10 ml de solución amortiguadora Hanks). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 durante 30 minutos antes de lavarse tres veces y suspenderse en solución amortiguadora de ensayo (20 mM HEPES, 1.2 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 2.5 mM Probenecid, 0.5% de BSA, 1x Hanks). El artículo de prueba se diluyó en serie en DMSO y luego se diluyó 1:10 con solución amortiguadora de ensayo antes de agregarse a las células (10 microlitros/opzo). Usando FLIPR, las placas se leyeron (10-17 segundos) para la inducción de

flujo (esto es, actividad agonista). Las células además se cargaron con solución agonista (30 microlitros/pozo, se prepararon por diluir 30 microne de 100 microMolar MIP-1 beta en 100 ml de solución amortiguadora de ensayo; este protocolo liberó 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 prueba se determinó relativo hasta 0.4% de DMSO/control negativo de solución amortiguadora.

Al menos un compuestos de la descripción es un inhibidor de ambos CCR2 y CCR5 y puede usarse para tratar enfermedades asociadas con ya sea quimiocina. Los compuestos de la presente invención se consideran a antagonistas duales.

Las enfermedades o condiciones de humanos u otras especies que se pueden tratar con promotores de la función del receptor de quimiocinas incluyen, pero no se limitan a: enfermedades y condiciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades de hipersensibilidad de pulmón, neumonitis de hipersensibilidad, celulitis eosinofílica (por ejemplo, síndrome de Well), neumonías eosinofílicas (por ejemplo, síndrome Loeffler, neumonía eosinofílica crónica), fascitis eosinofílica (por ejemplo, síndrome de Shulman), hipersensibilidad de tipo retrasado, enfermedades del pulmón intersticial (ILD) (por ejemplo,

fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociado con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), síndrome de mialgia-eosinofilia debido a la ingestión de triptofano contaminado, alergias a picaduras de insectos; enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, artritis psoriática, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, diabetes de comienzo juvenil; glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet, rechazo de injerto (por ejemplo, en transplantes), incluyen rechazo de aloinjertos o enfermedad de injerto contra hospedero, enfermedades inflamatorias del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerante, espondiloantropatías; escleroderma; psoriasis (incluyendo psoriasis mediada por células T) y dermatosis inflamatoria tal como en dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea, e hipersensibilidad); miositis eosinofílica, fasciitis eosinofílica, cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos. Otras enfermedades o condiciones en las cuales las respuestas inflamatorias indeseables se van a inhibir y pueden tratarse, incluyen,

pero no se limitan a, vasculitis, placas vulnerables, lesión por reperfusión de hiperplasia neoíntima venosa, hiperplasia neoíntima de injerto en diálisis, hiperplasia íntima de desviación artio-venosa, ateroesclerosis, ciertas malignidades hematológicas, toxicidad inducida por citocinas (por ejemplo, choque séptico, coche endotóxico), polimiositis, dermatomiositis. Las enfermedades o condiciones infecciosas del humano o de otras especies que se pueden tratar con inhibidores de la función del receptor de quimiocina, incluyen, pero no se limitan a, VIH.

Las enfermedades o condiciones de humanos u otras especies que se pueden tratar con promotores de la función del receptor de quimiocinas incluyen, pero no se limitan a: inmunodepresión, tal como aquella en individuos con síndrome de inmunodeficiencia tal como el SIDA u otras infecciones virales, individuos que se someten a terapia de radiación, quimioterapia, terapia para enfermedad autoinmune o terapia de fármacos (por ejemplo, terapia de corticosteroides), que provoca la inmunosupresión, inmunosupresión debido a la deficiencia congénita en la función del receptor u otras causas; y enfermedades infecciosas tales como enfermedades de parásitos que incluyen, pero no se limitan a infecciones por helmintos, tal como nemátodos (gusanos redondos) (Trichuriasis, Enterobiasis, Ascariasis, Gusano de gancho, Strongiloidiasis, Triquinosis, filariasis); tremátodos,

(gusanos planos), (Schistosomiasis, Clonorchiasis), céstodos (gusanos truncos), (Echinococcosis, Taeniasis sagiata, Cysticercosis); gusanos viscerales, migrañas por larvas viscerales (por ejemplo, Toxocara), gastroenteritis eosinofílica (por ejemplo, especies Anisaki, Phocanema), migrañas de larva cutánea (Anilostona braziliense, Ancilostoma caninum). Los compuestos de la presente invención son, de esta manera, útiles en la prevención y tratamiento de una amplia variedad de trastornos y enfermedades inflamatorias infecciosas e inumunoreguladoras.

Además, el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes antes mencionadas, también se puede contemplar para los promotores de la función del receptor de quimiocinas, si se contempla la administración de un compuesto suficiente para provocar la pérdida de la expresión del receptor en las células a través de la inducción de la internalización del receptor de quimiocina o la administración de un compuesto en una forma que resulte en una mala dirección de la migración de células.

En otro aspecto, la invención actual se puede usar para evaluar los agonistas o antagonistas específicos supuestos de un receptor acoplado a la proteína G. La presente invención se dirige al uso de estos compuestos en la preparación y ejecución de ensayos de separación por exclusión para compuestos que modulan la actividad de los receptores de

00415

quimiocinas. Adicionalmente, los compuestos de esta invención son útiles en establecer o determinar el sitio de enlace de otros compuestos a los receptores de quimiocina, por ejemplo, por la inhibición competitiva o como una referencia del ensayo para compartir su actividad conocida a un compuesto con una actividad desconocida. Cuando se desarrollan nuevos ensayos o protocolos, los compuestos de conformidad con la presente invención se pueden usar para probar su efectividad. Específicamente, tales compuestos se pueden suministrar en un kit comercial, por ejemplo, para su uso en investigación farmacéutica que involucre las enfermedades antes mencionadas. Los compuestos de la invención actual también son útiles para la evaluación de moduladores específicos supuestos de los receptores de quimiocinas. Además, se pueden utilizar compuestos de esta invención para examinar la especificidad de los receptores acoplados a la proteína G, que no se piensa que sean receptores de quimiocinas, ya sea que sirvan como ejemplos de compuestos que no se enlazan o como variantes estructurales de tales de compuestos activos en estos receptores que puedan ayudar a definir los sitios específicos de interacción.

Los compuestos descritos en la presente son útiles para tratar o prevenir trastornos seleccionados de artritis reumatoide, osteoartritis, choque séptico, ateroesclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, choque

hemodinámico, síndrome de sepsis, lesión por reperfusión postisquémica, 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 de la piel, esclerosis múltiple, daño por radiación, lesión alveolar hiperóxica, VIH, demencia por VIH, diabetes mellitus no dependiente de insulina, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, fibrosis pulmonar idiopática, penfigoide buloso, infecciones de parásitos helmínticos, colitis alérgica, eczema, conjuntivitis, transplante, eosinofilia familiar, celulitis eosinofílica, neumonías eosinofílicas, fasciitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, eosinofilia inducida por fármacos, fibrosis cística, síndrome de Churg-Strauss, linfoma, enfermedad de Hodgkin, carcinoma colónico, síndrome de Felty, sarcoidosis, uveitis, Alzheimer glomerulonefritis, y lupus eritematoso sistémico, carcinoma de células escamosa esofagal, dolor neuropático y obesidad.

En otro aspecto, los compuestos son útiles para tratar o prevenir trastornos inflamatorios seleccionados de artritis reumatoide, osteoartirtis, ateroesclerosis, aneurisma, fiebre, efectos cardiovasculares, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias del intestino, psoriasis, insuficiencia cardiaca congestiva, esclerosis múltiple,

enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias de la piel.

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

En otro aspecto, los ejemplos descritos en la presente pueden ser útiles para el tratamiento de una variedad de cánceres, incluyendo, pero no limitando a los siguientes:

Carcinoma incluyendo a aquel de la vejiga (incluyendo cáncer de vejiga metastática y acelerada), mama, colón (incluyendo cáncer colorectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña y no pequeña y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, matriz, tiroides y piel (incluyendo carcinoma de célula escamosa);

Tumores hematopoyéticos de línea linfoide incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma de célula vellosa, linfoma histiocítico y linfoma de Burketts;

Tumores hematopoyéticos de línea mieloide incluyendo

418

leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplástico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica;

Tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas;

Tumores de origen mesenquimal que incluyen fibrosarcoma, rabdomioscarcoma y osteosarcoma; y

Otros tumores que incluyen melanoma, xenoderma pigmentoso, ceratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

En otra modalidad, se describe en la presente los métodos para tratar cáncer, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata y melanoma. Adicionalmente, los compuestos descritos en la presente pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer de ovario y mieloma múltiple.

La presente invención proporciona métodos para el tratamiento de una variedad de enfermedades proliferativas no cancerosas.

La terapia combinada para prevenir y tratar trastornos y enfermedades inflamatorias, infecciosas e inmunoreguladoras incluyen enfermedades alérgicas y asma, así como patologías autoinmunes tales como artritis reumatoide y ateroesclerosis, y aquellas patologías antes señaladas, se ilustran por la combinación de los compuestos de esta invención y otros

66419

compuestos que se conocen para tales utilidades. Por ejemplo, en el tratamiento o prevención de inflamación, los compuestos actuales se pueden usar en conjunto con un agente analgésico o anti-inflamatorio tal como un agonista opiáceo, un inhibidor de lipoxigenasa, un inhibidor de ciclooxigenasa 2, un inhibidor de interlucina, tal como un inhibidor de interleucina 1, un inhibidor del factor de necrosis de tumor, un antagonista NMDA, un inhibidor del óxido nítrico o un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, un agente inflamatorio no esteroidal, un inhibidor de fosfodiesterasa, o un agente anti-inflamatorio supresor de la citoquina, por ejemplo, con un compuesto tal como acetominofen, aspirina, codeina, fentainil, ibuprofeno, indometacina, cetorolaco, morfina, naproxeno, fenacetina, piroxicam, un analgésico esteroidal, sufentanil, sunlindac, interferón alfa y similares. Similarmente, los compuestos actuales se pueden administrar con un aliviador del dolor; un potenciador tal como la cafeína, un antagonista H2, simeticona, hidróxido de aluminio o magnesio, un descongestionante tal como fenilefrina, fenilpropanolamina, seudofedrina, oximetazolina, efinefrina, nafazolina, xilometazolina, propilhexedrina, o levodesoxi-efedrina, un antitusivo tal como codeina hidrocodona, caramifen, carbetapentano, o dextrametorfano; un diurético; y un antihistamínico sedante o no sedante. Similarmente, los compuestos descritos en la presente se

pueden usar en combinación con otros fármacos que se usan en el tratamiento/prevención/supresión o mejora de las enfermedades o condiciones para las cuales son útiles el compuesto de la presente invención. Se pueden administrar tales otros fármacos por una ruta y en una cantidad comúnmente usadas por lo tanto, contemporáneamente o secuencialmente con un compuesto de la presente invención. Cuando un compuesto de la presente invención se usa contemporáneamente con uno o más de otros fármacos, una composición farmacéutica que contiene tales otros fármacos además del compuesto de la presente invención se puede usar. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas que también contienen uno o más de otros ingredientes activos, además de un compuesto de la presente descripción.

Los ejemplos de otros ingrediente activos que se pueden combinar con un compuesto de la presente invención, administrado separadamente o en las mismas composiciones farmacéuticas, incluyen, pero no se limitan a: (a) antagonistas de integrina tales como aquellos para selectina, ICAMs y VLA-4, (b) esteroides tal como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona e hidrocortisona, (c) inmunodepresores tales como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina y otros inmunodepresores del tipo FK-506: (d) antihistamínicos (antagonistas de la histamina H1)

000421

tales como bromofeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, triprolidina, clemastina, difenhidramina, difenilpiralina, tripelenamina, hidroxizina, metdilazina, prometazina, trimeprazina, azatadina, ciproheptadina, antazolina, feniramina, pirilamina, astemizol, terfenadina, loratadina, cetirizina, fexofenadina, descarboetoxiloratadina, y similares; (e) antiasmáticos no esteroidales tales como agonistas b2 (terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetarina, albuteral, bitolterol, y pirbuteril), teofilina, cromolina sodio, atropina, bromuro de ipratropio, antagonistas de leucotrieno (zafirlucast, montelucast, pranlucast, iralucast, pobilucast, SKB-102, 203), inhibidores de la biosíntesis leucotrieno (zileuton, BAY-1005); (f) agentes anti-inflamatorios no esteroidales (NSAIDs) tal como derivados del ácido propiónico, (alminoprofeno, benxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, cetoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozino, pirprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tioxaprofeno) derivados del ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenac, clidanac, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclózico, fentiazaco, furofenaco, ibufenaco, isoxepaco, oxipinaco, sulindaco, tiopinaco, tolmetino, idometacina, y zomepiraco), derivados de ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico,

ácido mefenámico, ácido niflúmico, y ácido tolfenámico), derivados de ácido bifenilcarboxílico (diflunisal y flufenisal) oxicamos (isoxicam, piroxicam sudoxicam y tenoxican), salicilatos (ácido acetil salicílico, sulfasalazina) y las pirazolonas (apazona, bezpiperilon, feprazona, mafebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona); (g) inhibidores de cicloxigenasa-2 (COX-2); (h) inhibidores de la fosfodiesterasa de tipo IV (PDE-IV); (I) otros antagonistas de los receptores de quimiocinas; (j) agentes reductores del colesterol tales como inhibidores de la HMG-COA reductasa (lovastatina, simvastatina y pravastatina, fluvastataina, atorvastatina, y otras estatinas), secuestrantes (cloestiramina y colestipol), ácido nicotínico, derivados del ácido fenofíbrico (gemfibrozil, clofibrat, fenofibrato y benzafibrato), y probucol; (k) agentes antidiabéticos tales como insulina, sulfonilureas, biguanidas (metformina), inhibidores de a-glucosidasa (acarbosa) 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 efavirenz, nevirapina, indinavir, ganciclovir, lamivudina, famciclovir, y zalcitabina; (o) otros compuestos tales como el ácido 5-aminosalicílico y profármacos del mismo, antimetabolitos tales como azatioprina y 6-mercaptopurina, y agentes

000423

quimioterapéuticos para el cáncer citotóxico. La relación en peso del compuesto de la presente invención al segundo ingrediente activo se puede variar, y dependerá de las dosis efectivas de cada ingrediente.

Generalmente, se usará una dosis efectiva de cada uno. Así, por ejemplo, cuando un compuesto se combina con un NSAID la relación en peso del compuesto de la presente invención al NSAID estará generalmente en un intervalo desde alrededor de 1000:1 hasta alrededor de 1:1000, o alternativamente desde alrededor de 200:1 hasta alrededor de 1:200. Las combinaciones de un compuesto de la presente invención y otros ingredientes activos estarán generalmente dentro del intervalo arriba mencionado, pero en cada caso, se debe usar una dosis efectiva de cada ingrediente activo.

En el tratamiento de cáncer, una combinación de agentes quimioterapéuticos y/o otros tratamientos (por ejemplo, terapia de radiación) es ventajoso a menudo. El segundo agente (o tercero) puede tener el mismo o diferente mecanismo de reacción que el primer agente terapéutico. Esto puede ser especialmente útil para emplear combinaciones de fármaco citotóxicas en donde dos o más fármacos administrados actúan en diferentes maneras o en diferentes fases del ciclo celular y/o en donde los dos o más fármacos tiene sobre expresión de efectos laterales o tóxicos y/o en donde los fármacos se combinan cada uno demostrando eficacia en el tratamiento de

080424

los estados de las enfermedades particulares manifestadas por el paciente.

En consecuencia, los compuestos descritos en la presente (o otras fórmulas descritas en la presente) pueden administrarse en combinación con otros agentes anti-cáncer y citotóxicos y tratamientos útiles en el tratamiento de cáncer u otras enfermedades proliferativas. La invención en la presente además comprende el uso de los compuestos de la presente (u otras fórmulas descritas en la presente), en la preparación de medicamentos para el tratamiento de cáncer, y/o estos comprenden el empaquetamiento de los compuestos de la presente junto con las instrucciones que los compuestos utilicen en combinación con otro agentes anti-cáncer o citotóxico y para el tratamiento de cáncer. La presente invención además comprende las combinaciones de los compuestos de y uno o más agentes adicionales en forma de kit, por ejemplo, en donde estos se empacan juntos o se colocan en paquetes separados para venderse juntos como un kit, o en donde estos se empacan para formularse juntos.

El segundo agente anti-cáncer (o más) pueden seleccionarse de cualquiera uno o más de los siguientes: agentes alquilantes (incluyendo mostaza de nitrógeno, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, derivados de etilenimina, y triazenos); anti-angiogénicos (incluyendo inhibidores de metaloproteinasa de matriz); antimetabolitos

(incluyendo inhibidores de deaminasa de adenosina, 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 transferasa de proteína de farnesilo;

agentes hormonales y antihormonales y esteroides (incluyendo análogos sintéticos, glucocorticoides, estrógenos/anti-estrógenos [por ejemplo, SERMs], andrógenos/anti-andrógenos, progestinas, agonistas del receptor de progesterona, y agonistas y antagonistas [LHRH] de liberación de la hormona luteinizada); factor de crecimiento de tipo insulina (IGF)/moduladores del sistema (IGFR) del receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (incluyendo inhibidores IGFR1); inhibidores de señal de integrina; inhibidores de cinasa (incluyendo inhibidores de multi-cinasa y/o inhibidores de Src cinasa o Src/abl, inhibidores de [CDK] cinasa dependiente de ciclina, panHer, anticuerpo Her-1 y Her-2, inhibidores VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF, inhibidores EGFR, inhibidores [MAP] de la proteína activada con mitogeno, inhibidores MEK, inhibidores de aurora cinasa, inhibidores PDGF, y otros inhibidores de tirosina cinasa o inhibidores de serina/treonina cinasa;

agentes disruptores de microtúbulo, tales como ecteinascidinas o sus análogos y derivados; agentes estabilizadores del microtúbulo tales como taxanos y las epotilonas que se presentan naturalmente y sus análogos sintéticos y semi-sintéticos;

agentes de enlace de microtúbulo, desestabilizadores (incluyendo alcaloides vinca); e

inhibidores de topoisomersa, inhibidores de transferasa de proteína de prenilo; complejos de coordinación de platino; inhibidores de transducción de señal, y otros agentes se usaron como agentes anti-cáncer y citotóxicos tales como modificadores de respuesta biológica, factores de crecimiento y moduladores inmunes.

Adicionalmente, los compuestos de la presente invención pueden formarse o co-administrarse con otros agentes terapéuticos que se seleccionan por su utilidad particular para atender los efectos colaterales asociados con las condiciones anteriormentes mencionadas. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden formularse con agentes para prevenir náusea, hipersensibilidad e irritación gástrica, tales como antieméticos y antihistamínicos H_1 y H_2.

Los otros agentes terapéuticos de arriba, cuando se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, pueden usarse, por ejemplo, en aquellas cantidades indicadas en el Physicians' Desk Reference (PDR) o como se

determina de otra manera por alguien de habilidad ordinaria en el arte.

Se administran los compuestos a un mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un compuesto de la presente invención que, cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional mamífero, es efectivo para evitar o mejorar la condición de enfermedad tromboembólica o el avance de la enfermedad.

DOSIS Y FORMULACION

Los compuestos de esta descripción se pueden administrar en forma de dosis orales tales como tabletas, cápsulas (cada una de las cuales incluye formulaciones de liberación programada o liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elíxires, pinturas, suspensiones jarabes y emulsiones. También se pueden administrar en forma intravenosa (bolo o infusión), intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular, todas formas de dosis unitarias bien conocidas para aquellos expertos ordinarios en las técnicas farmacéuticas. Se pueden administrar solas pero generalmente se administrarán con un portador farmacéutico seleccionado sobre la base de la ruta elegida de administración y la práctica farmacéutica estándar.

El régimen de dosis para los compuestos de la presente invención, variará, por supuesto, dependiendo de factores

conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente en particular y su modo y ruta de administración; la especie, edad, sexo, salud, condición médica y peso del receptor; la naturaleza y grado de los síntomas; el tipo de tratamiento concurrente; 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 efectiva del fármaco requerido para evitar, contrarrestar, o detener el avance del trastorno.

A manera de guía general, la dosis diaria oral de cada ingrediente activo, cuando se usa para los efectos indicados, estará en un intervalo de entre alrededor de 0.001 hasta 1000 mg/kg de peso corporal, o entre alrededor de 0.01 hasta 100 mg/kg de peso corporal por día, o alternativamente, entre alrededor de 1.0 hasta 20 mg/kg/día. De forma intravenosa, la dosis estará desde alrededor de 1 alrededor de 10 mg/kg/minuto durante una infusión a velocidad constante. Los compuestos de esta invención se pueden administrar en una dosis diaria sencilla, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres, o cuatro veces al día. En una modalidad, la dosis oral diaria del ingrediente activo es entre 3 y 600 mg ya sea administrada una vez al día o en dosis dividas administradas dos veces al día. Alternativamente, el ingrediente activo puede administrarse en dosis de 10-20 mg administrado dos veces

diarias o 40 hasta 100 mg administrado una vez diaria. Alternativamente, el ingrediente activo puede administrarse en una dosis de 12.5 mg dos veces al día o 75 mg una vez al día. Alternativamente, el ingrediente activo puede administrarse en dosis de 3, 10, 30, 100, 300 y 600 mg administrados ya sea una vez o dos veces al día.

Los compuestos de esta invención se pueden administrar en forma intranasal mediante el uso tópico de los vehículos intranasales adecuados o por medio de vías transdermales usando parches transdermales para la piel. Cuando se administran en forma de un sistema de administración trasndermal, la administración de dosis, por supuesto, será continua más que intermitente a través del régimen de dosis.

Los compuestos se administran típicamente en mezcla con diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticos adecuados (referidos colectivamente en la presente como portadores farmacéuticos) seleccionados adecuadamente con respecto a la forma pretendida de administración, esto es, tabletas orales, cápsulas, elíxires, jarabes y similares, y consistente con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para administración oral en la forma de una tableta o cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un portador inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metil celulosa, estearato de magnesio,

fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares; para administración oral en forma líquida, los componentes de fármaco oral se pueden combinar con cualquier portador inerte, oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua, y similares. Además, cuando sea deseado o necesario, se pueden también incorporar en la mezcla aglutinantes adecuados, lubricantes, agentes de desintegración, y agentes colorantes. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lacotosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilen glicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosis incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, y similares. Los desintegradores incluyen, sin limitación, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, goma de xantano y similares.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamerales grandes, y vesículas multilamerales. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, tal como colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas.

00431

Los compuestos de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles como portadores de fármacos objetivos. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspartamidafenol, o polietilenoxido-polilisina sustituidos con residuos de palmitoilo. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles en alcanzar la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros del ácido poliláctico y poliglicólico, poliepsilon, caprolactona, ácido polihidroxi butírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacilatos, y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Las formas de dosis (composiciones farmacéuticas) adecuadas para administración pueden contener desde alrededor de 1 miligramo a alrededor de 100 miligramos de ingrediente activo por unidad de dosis. En estas composiciones farmacéuticas, el ingrediente activo estará ordinariamente presente en una cantidad de alrededor de 0.5-95% de peso con base en el peso total de la composición.

Las cápsulas de gelatina pueden contener el ingrediente activo y portadores pulverizados, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido

esteárico y similares. Se pueden usar diluyentes similares para hacer tabletas comprimidas. Ambas tabletas y cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación sostenida para suministrar la liberación continua del medicamento por periodos de horas. Las tabletas comprimidas pueden ser recubiertas con azúcar o recubiertas con película para ocultar cualquier sabor desagradable y proteger la tableta de la atmósfera, o recubiertas de forma entérica para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal.

Las formas de dosis líquidas para administración oral pueden contener coloración y saborización para incrementar la aceptación del paciente.

En general, el agua, un aceite adecuado, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa), y soluciones relacionadas de azúcar y glicoles tales como propilen glicol o polietilen glicoles, son portadores adecuados para soluciones parenterales. Las soluciones para administración parenteral pueden contener una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes de estabilización adecuados, y si es necesario, sustancias amortiguadoras. Los agentes antioxidantes tal como el bisulfito de sodio, sulfito de sodio o ácido ascórbico, ya sean solos o combinados, son agentes estabilizadores adecuados. También se usan el ácido cítrico y sus sales EDTA de sodio. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservadores, tales como

cloruro benzalconio, metil o propil paraben, y clorobutanol.

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

Las formas de dosis farmacéutica representativas útiles para la administración de los compuestos de esta invención, se pueden ilustrar como sigue:

Cápsulas

Un gran número de cápsulas unitarias se pueden preparar al llenar cápsulas de gelatina dura de dos piezas estándar cada una con 100 miligramos de ingrediente activo pulverizado, 150 miligramos de lactosa, 50 miligramos de celulosa, y 6 miligramos de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina suave.

Se puede preparar una mezcla de ingrediente activo en un aceite digerible tal como aceite de soya, aceite de semilla de algodón, o aceite de olivo, e inyectarse por medio de una bomba de desplazamiento positivo dentro de la gelatina para formas cápsulas de gelatina suave que contienen 100 miligramos de ingrediente activo. Las cápsulas se deben lavar y secar.

Tabletas

Las tabletas se pueden preparar por procedimientos convencionales de manera que la dosis unitaria es de 100 miligramos del ingrediente activo, 0.2 miligramos de dióxido

000454

de silicio coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 miligramos de celulosa microcristalina, 11 miligramos de almidón y 98.8 miligramos de lactosa. Los recubrimientos adecuados se pueden aplicar para incrementar el sabor o retrazar la absorción.

Inyectables

Una composición parenteral adecuada para administración por inyección se puede preparar al agitar 1.5% en peso de ingrediente activo en 10% de volumen de propilen glicol y agua. La solución debe hacerse isotónica con cloruro de sodio y esterilizarse.

Suspensión

Se puede preparar una suspensión acuosa para administración oral de manera que cada 5mL contienen 100 mg de ingrediente activo finamente dividido, 200 mg de carboximetil celulosa de sodio, 5 mg de benzoato de sodio, 1.0 mg de solución de sorbitol, U.S.P., y 0.025 mL de vanillina.

Donde se combinan los compuestos de esta invención con otros agentes anticoagulantes, por ejemplo, una dosis diaria puede ser alrededor de 0.1 hasta 100 miligramos del compuesto de Fórmula I y alrededor de 1 hasta 7.5 miligramos del segundo anticoagulante por kilogramo del peso corporal del paciente. Para una forma de dosis de tableta, los compuestos de esta invención pueden estar generalmente presentes en una

cantidad de alrededor de 5 hasta 10 miligramos por dosis unitaria, y el segundo anticoagulante en una cantidad del alrededor de 1 hasta 5 miligramos por dosis unitaria.

Donde se administran dos o más del segundo agente terapéutico anterior con el compuesto de los ejemplos, generalmente la cantidad de cada componente en una dosis diaria típica y forma de dosis típica se puede reducir con relación a la dosis usual del agente cuando se administra solo, en vista del efecto aditivo o sinérgico de los agentes terapéuticos cuando se administran por combinación.

Particularmente cuando se suministra como una dosis unitaria sencilla, existe un potencial para una interacción química entre los ingredientes activos combinados. Por esta razón, cuando el compuesto de los ejemplos y un segundo agente terapéutico se combinan en una dosis unitaria sencilla, se formulan de manera tal que aunque se combinen los ingredientes activos en una dosis unitaria sencilla, se minimiza el contacto físico entre los ingredientes activos (esto es, se reduce). Por ejemplo, un ingrediente activo puede estar recubierto de forma entérica. Al recubrir de forma entérica uno de los ingredientes activos, es posible no solamente minimizar el contacto entre los ingredientes activos combinados, sino también, es posible controlar la liberación de uno de estos componentes en el tracto gastrointestinal, de manera tal que uno de estos componentes

no se liberen el estómago, sino más bien se liberen en los intestinos. Uno de los ingredientes activos también se puede recubrir con un material que efectúa una liberación sostenida a través del tracto gastrointestinal, y también sirve para minimizar el contacto físico entre los ingredientes activos combinados. Además, el componente de liberación sostenida se puede adicionalmente recubrir de forma entérica, de manera tal que la liberación de este componente sucede solamente en el intestino. Todavía otro enfoque involucraría la formulación de un producto de combinación en el cual un componente se recubre con un polímero de liberación entérica y/o sostenida, y el otro componente también se recubre con un polímero tal como un grado de baja viscosidad de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) u otros materiales adecuados como se conocen en el arte, con objeto de separar además los componentes activos. El recubrimiento de polímero sirve para formar una barrera adicional a la interacción con el otro componente.

Estas, así como otras formas de minimizar el contacto entre los componentes de los productos de combinación de la presente invención, ya sea administrado en una forma de dosis sencilla o administrado en forma separada pero al mismo tiempo por la misma manera, serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica una vez equipado con la presente descripción.

30437

Adicionalmente, ciertos compuestos descritos en la presente pueden ser útiles como metabolitos de otros compuestos. Por lo tanto, los compuestos pueden ser útiles ya sea como un compuesto substancialmente puro, el cual también luego puede incorporarse en una composición farmacéutica, o puede ser útil como metabolito la cual se genera después de la administración del profármaco de tal compuesto. En una modalidad, un compuesto puede ser útil como un metabolito por ser útil para tratar trastornos como se describen en la presente.

"Substancialmente puro" como se usa en la presente se pretende para incluir un compuesto que tiene una pureza mayor que alrededor de 90 porciento en peso, incluyendo alrededor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 por ciento.

Como un ejemplo, un compuesto descrito en la presente puede ser substancialmente puro que tiene una pureza mayor que alrededor de 90 porciento (en peso), donde el resto es menor que alrededor de 10 porciento de material que comprende otro metabolito del compuesto, un profármaco del compuesto, y/o reacción y/o purezas procesadas que resulta de su preparación.

Obviamente, son posibles diversas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto se entenderá que dentro del alcance de la reivindicaciones anexas la invención se

puede practicar de otra forma a la que se describe específicamente en la presente.

ENSAYOS Y EFICACIA IN VIVO

La N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida (también referida como "Ejemplo 1") se evaluó en los siguientes ensayos in vivo como se describe abajo.

Sección 1. Ejemplo 1 que bloquea el reclutamiento celular mononuclear a la piel después de la provocación con MCP-1 intradérmico (ID) en mono cinomólgo.

La inyección intradermal de MCP-1 resulta en la infiltración de células mononucleares al sitio de inyección. Este modelo se desarrolla inicialmente para evaluar el efecto inhibidor de antagonistas CCR2 en la infiltración de células mononucleares al tejido de la piel inyectadas con MCP-1 humano. El infiltrado celular puede medirse semicuantitativamente por clasificación histológica.

Métodos

Cada mono se dosificó con el Ejemplo 1 o su control de vehículo (HCl 0.5 N) una vez al día durante tres días. El Ejemplo 1 se administró oralmente a dosis de 0, 5, 10, ó 20 mg/kg a grupos de 4 monos conomólogos (2 por sexo por grupo). Inmediatamente después de dosificar el Día 3, todos los animales reciben al menos 2 inyecciones transdermales de 10

00439

µg (50 µL/inyección) de MCP-1 humano (R & D Systems) y 2 inyecciones transdermales de su control DPBS (50 µl/inyección) en sitios separados en el tórax dorsal. Las biópsias dermales de todos los sitios se obtuvieron a aproximadamente 18 horas después de la provocación con MCP-1 (o DPBS). Las biopsias se procesaron para evaluación histológica semi-cuantitativa. Las secciones representativas de muestras de piel se examinaron por microscópio de luz, las lesiones de microscopio e infiltración celular se notan, y sus incidencias se tabulan.

Además del análisis de biópsia, la sangre se colectó y evaluó para cuentas de sangre completa y diferenciales celulares. También se evaluaron las muestras de plasma para concentraciones del compuesto, y muestras de suero para niveles mediadores inflamatorios sistémicos.

Resultados

El reclutamiento de células mononucleares a la piel de los animales de control tratados con el vehículo en respuesta a la provocación por MCP-1 fue significativo (calificación histológica media de 2.0 con un intervalo de1-3, Tabla 10). El Ejemplo 1 a 5, 10, y 20 mg/kg inhibe esta infiltración celular mononuclear dermal por 75%, 95% y 95%, respectivamente (Tabla 10 y Figura 20). El compuesto también bloquea la infiltración de otros tipos de células tales como eosinófilos y neutrófilos (Tabla 12). Las concentraciones de

plasma del Ejemplo 1 a 18 horas y su relación a los niveles de inhibición y valores IC90 de quimiotaxis Cyno se resumen en la Tabla 12. Con base en el valor IC50 de 7.1 ± 2.7 nM para el Ejemplo 1 en ensato de quimiotaxis cyno, la dosis de 5, 10 y 20 mg/kg resulta en concentraciones de plasma libres de 0.8, 2.1, y 4.3 veces el IC90 de quimiotaxis a 18 horas después de la dosificación (Tabla 12).

TABLA 12

Resumen de efectos del Ejemplo 1 en la infiltración de células mononucleares y otros tipos de células en respuesta a la provocación con MCP-1 en monos cinomolgus [d,e]

Dosis mg/kg	Concentración de plasma libre(nM)	Veces de quimiotaxis IC90	Registro celular mononuclear (intervalo) (% de inhibición)	Registro PMN[c] (intervalo)	Registro Eos[c] (intervalo)	Registro celular total (Inter.-valo)
0	0	0	2.0 (1 - 3) (0%)	0.3 (0 - 1)	1.5 (0.5 - 3)	4.0 (2 -6[c])
5	99	0.8	0.5 (0 - 1) (75%)	0.1 (0 - 0.5)	1.4 (1 - 2)	2.0 (1 - 3)
10	248	2.1	0.1 (0 - 0.5) (95%)	0.1 (0 - 0.5)	0.8 (0.5 - 1)	1.0 (0.5 - 2)
20	512	4.3	0.1 (0 - 0.5) (95%)	0 (0 - 0)	0.8 (0.5 - 1)	0.9 (0.5 - 1)

[d] Un sistema de escalamiento arbitrario desde 0 hasta 4 se utilizó con cada número representando una designación particular de infiltrado inflamatorio como sigue: 0, número no notable de células inflamatorias; 0.5, rastro; 1, mínimo; 2, medio; 3, moderado; 4, infiltración marcada.

[e] Valores medios son un promedio de 8 biopsias de sitio MCP-1, que representa 2 biopsias separadas de 4 monos por grupo. Los intervalos representan la extensión del promedio de registros histológicos promedio para 2 biopsias por animal.

[a] PMN se establece para célula polimorgonuclear (neutrófilo).

[b] Eos es una abreviatura para eosinófilos.

[c] El registro total es una suma matemática de los valores medios para cada tipo de célula APRA demostrar la respuesta a la dosis.

La evaluación de cambios en los mediadores inflamatorios de suero muestra un incremento (aproximadamente 3-4 veces) en el nivel MCP-1 en grupos tratados con el Ejemplo 1 con relación al control de vehículo. Además, el análisis de conteo sanguíneo completo (CBC) muestra un incremento (~2 veces) en neutrófilos en grupos tratados con el Ejemplo 1, con relación al control de vehículo, a 18 horas el día 4 después de tres días de dosificación.

Para refinar la respuesta a la dosis (concentración) del

Ejemplo 1 en un sistema cuantificable más fácilmente, se usaron ratones hCCR2 KI para evaluar el efecto de la infiltración de monocito/macrófago del Ejemplo 1 en el modelo de peritonitis inducida por tioglicolato (TG) con la metodología basada en citometría de flujo.

Sección 2. Infiltración del monocito/macrófago inhibida por el Ejemplo 1 en modelo de peritonitis TG de 48 horas en ratón hCCR2 KI

El modelo de peritonitis inducido por TG se ha usado como un modelo de reclutamiento de monocitos macrófagos al sitio de inflamación. Tanto en estudios caseros como publicados, se ha demostrado que el reclutamiento de monocito/macrófago en este modelo depende de CCR2. Ver Boring L. et al., Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. J Clin Invest., 100(10):2552-61. (1997); y Kuziel, W.A. et al., Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(22):12053-8 (1997).

Métodos

Para el estudio de peritonitis TG de 48 horas, el Ejemplo 1 se dosificó dos veces al día con una primera dosis dada una hora antes de la inyección TG. Se obtienen cuentas celulares peritoneales totales en células aisladas por un contador celular. La sangre también se colecta en heparina

del seno retro-orbital la final de cada estudio para citometría de flujo y en EDTA para determinación de concentración de fármaco.

Para análisis citométrico de flujo, se lavaron las células exudadas peritoneales ($1x10^6$) una vez con solución amortiguadora FACS (PBS/0.5% BSA) y se vuelve a suspender en solución amortiguadora FACS. Las células se incubaron con un anticuerpo de bloqueo Fc (BD Pharmingen) en hielo durante 15 min seguido por la adición de los siguientes anticuerpo (BD Pharmingen): conjugado PE anti-F4/80, conjugado FITC anti-Ly6C, y conjugado Alexa 647 anti-hCCR2. Después de 45 min en hielo, las células se fijaron por BD Cytofix durante 15 min en hielo, se lavan dos veces con solución amortiguadora FACS, y se vuelven a suspender en 200 µl de solución amortiguadora FACS. Los eventos celulares (40,000) se adquirieron de cada muestra y los datos se analizaron usando el software FloJo (TreeStar). Se coloca una puerta FSC/SSC para incluir todos los monocitos (SSC inferior, FSC más alto) mientras se excluye los granulocitos de los análisis. Esta población en puerta se analiza entonces para expresión Ly6C (FITC), F4/80 (PE). Los números de monocitos/macrófago peritoneal se determinan al multiplicar las cuentas celulares peritoneales totales obtenidas por el contador celular y el porcentaje de monocitos/macrófagos identificados por células $F4/80^+$ de citometría de flujo. La importancia estadística de

diferencias entre medios se analiza usando la prueba t de dos colas emparejada con significancia establecida a valores p debajo de 0.05.

Resultados

El Ejemplo 1 se evaluó en el modelo de peritonitis TG de ratón hCCR2 KI para determinar su EC50 para inhibir la infiltración de monocito/macrófago. Los ratones se les administró tioglicolato, y se dosificaron oralmente con el Ejemplo 1 a 1, 25, ó 100 mg/kg BID. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento TG, se obtiene un lavado peritoneal para análisis de infiltrado celular por citometría de flujo.

Para distinguir entre los monocitos/macrófagos reclutados contra los macrófagos y granulocitos residentes, se usó el teñido de marcadores de superficie de monocito/macrófago tanto F4/80 como Ly6C para definir los monocitos/macrófagos reclutados. Una inhibición dependiente de la dosis se observó (Figura 21). Las dosis de 1, 25, y 100 mg/kg dan una inhibición del 24%, 74% y 78%, respectivamente. En tres estudios separados con dosis múltiples, el EC50 promedio para inhibición de infiltración monocito/macrófago por este análisis se estimó que es 3.9 Nm.

Para evaluar el nivel in vivo de ocupación del receptor por el Ejemplo 1 en el modelo de peritonitis de tioglicolato de 48 horas usando el ratón hCCR2 KI, los niveles de plasma de tanto el Ejemplo 1 como el MCP-1 del ratón se midieron. La

- 000445

advertencia para esta estimación es que sólo el CCR2 y su ligando MCP-1 principal, se tomaron en consideración. La ocupación del receptor del ligando en presencia de un inhibidor competitivo se define por la ecuación Gaddum:

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

Ya que el Ejemplo 1 es un inhibidor competitivo de MCP-1 enlazado a CCR2, las cantidades de tanto el complejo del MCP-1/receptor CCR2 de ratón como el complejo Ejemplo 1/receptor CCR2 pueden determinarse usando los niveles de suero de tanto el MCP-1 de ratón como el Ejemplo 1 no enlazado a la proteína en el plasma. El K_d para el MCP-1 de ratón enlazado al hCCR2 es 0.91 +/- 0.08 nM (n=8), que se determina en experimentos de enlace de ligando de competencia fría usando MCP-1 ^{125}I-humano. El K_i promedio para el Ejemplo 1 enlazado al hCCR2 es 1.3 nM. La fracción de complejos MCP-1/receptor CCR2 de ratón se determina usando la forma de la ecuación descrita arriba. Para determinar la fracción de complejos Ejemplo 1/CCR2 la ecuación se vuelve a definir como:

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

Finalmente, la cantidad de CCR2 libre se determina de:

$[CCR2]_{total} = [CCR2]_{libre} + [$MCP-1 de ratón/CCR2$] + ($Ejemplo 1/CCR2$]$

Como se muestra en la Tabla 13, el porcentaje de

080446

inhibición de la infiltración monocito/macrófago en el peritoneo a 48 h refleja el porcentaje del complejo Ejemplo 1/receptor CCR2.

TABLA 13

Determinación de ocupación del receptor in vivo del Ejemplo 1 en sangre de ratones hCCR2 KI el modelo de peritonitis TG de 48 horas

Dosis (mg/kg)	Concentración de MCP-1 de Ratón en plasma (nM)	Concentración del Ejemplo 1 libre en plasma (nM) (veces de enlace IC90 CCR2)	% de MCP-1 de ratón enlazado CCR2	% del CCR2 enlazado al Ejemplo 1	% de CCR2 libre	% de inhibición de infiltración monocito/macrófago[a]
100	0.015	53 (1.8)	0.04	97.6	2.4	78
25	0.017	14 (0.5)	0.16	91.2	8.6	74
1	0.005	1.4 (0.05)	0.26	51.4	48.3	24
0 (vehículo)	0	0	0	0	100	0

Sección 3. Estudios de eficacia crónica

Encefalomielitis autoinmune experimental (EAE)

Métodos

Para evaluar el efecto del Ejemplo 1 en modelos de

000447

enfermedad crónica, se usaron el modelo EAE de esclerosis múltiple en ratones hCCR2 KI. Para estudiar el efecto del Ejemplo 1 en el modelo EAE, se usaron 10 ratones por grupo. El día 0, los ratones hCCR2 KI se inmunizaron subcutáneamente con un total de 200 µl de 300 µg de glicoproteína oligodendrítica de mielina (MOG) 35-55 (Genemed Synthesis) mezclada 1:1 con 300 µg de tuberculosis micobacteriana (H37Ra) (Becton-Dickinson) en adyuvante Freund incompleto (IFA) (Sigma-Aldrich). El día 0 (dos horas después de la inmunización) y el día 2, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 100 µl de toxina pertusis 400 ng. El registro clínico inicial el día 10, continua tres veces por semana durante el estudio, y se basó en una escla de 0-5: 0, sin señales de enfermedad; 0.5, debilidad de la cola parcial; 1, cola blanda o paso contoneado con tonicidad de cola; 1.5 paso contoneado con debilidad de cola parcial; 2, paso contoneado con cola blanda (ataxia); 2.5 (ataxia con parálisis de miembro parcial; 3, parálisis completa de un miembro; 3.5, parálisis completa de un miembro con parálisis aprcial de un segundo miembro; 4, parálisis completa de dos miembros; 4.5, moribundo; 5, muerte. La dosis oral del Ejemplo 1 a 25 mg/kg y 55 mg/kg (BID) se inició el día 1.

Resultados

El Ejemplo 1 a ambas dosis reduce el área bajo la curva (AUC) del registro clínico por 49% ($p < 0.05$) (Figura 22).

000448

El IC50 es 3.7 nM para el Ejemplo 1 en ^{125}I-ratón MCP-1 enlazado a células que expresan hCCR2, hPBMCs (imitadores hCCR2 KI establecidos). Con base en este valor IC50, la dosis de 25 y 55 mg/kg resulta en una concentración de canal de plasma libre de 1 y 3 veces el enlace IC90. La evaluación histológica de la médula espinal el día 22 no demuestra una diferencia importante en el infiltrado celular inflamatorio total entre los ratones tratados con el Ejemplo 1 contra vehículo. Se observó un infiltrado neutrófilo marcado en ratones tratados con el compuesto.

Reivindicaciones

1. Compuesto, caracterizado porque es N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-2, caracterizada porque comprende la forma N-2.

4. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-3, caracterizada por los parámetros de celdas unitarias substancialmente iguales a los siguientes:

dimensiones de celda:

a = 18.7240(3)

b= 8.01701(2)

c = 19.6568(5)

α = 90

β = 114.935(2))

γ = 90

V($Å^3$) = 2675.7 (1)

- 000459

Reivindicaciones

1. Compuesto, caracterizado porque es N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque es una forma cristalina de N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-2, caracterizada porque comprende la forma N-2.

4. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-3, caracterizada por los parámetros de células unitarios substancialmente iguales a los siguientes:

dimensiones de celda:

a = 18.7240(3)

b= 8.01701(2)

c = 19.6568(5)

α = 90

β = 114.935(2))

γ = 90

V($Å^3$) = 2675.7 (1)

Grupo de espacio $P2_12_12_1$

Moléculas/celda unitaria 2

en donde el cristal está a una temperatura de alrededor de +22°C (T.A.).

5. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-4, caracterizada porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende tres o más de los valores 2θ (CuKα λ=1.5418Å) seleccionados de 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 y 19.2 a una temperatura de alrededor de 22°C.

6. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-5, caracterizada además porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende cuatro o más de los valores 2θ (CuKα λ=1.5418Å) seleccionados del grupo que consiste de 5.5, 9.1, 12.1, 14.0 y 19.2, a una temperatura de alrededor de 22°C.

7. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque las coordenadas atómicas fraccionales son substancialmente como se enlistan en la Tabla 3.

8. Forma cristalina de conformidad con las reivindicaciones 1-7, caracterizada porque tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo substancialmente de conformidad con la Figura 2.

9. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el compuesto de conformidad con las

reivindicaciones 1-8, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10. Método para tratar una enfermedad en un mamífero, caracterizado porque comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1-9 en donde la enfermedad se selecciona de diabetes, obesidad, síndrome metabólico, apoplejía, dolor neuropático, cardiomiopatía isquémica, psoriasis, hipertensión, esqueroderma, osteoartritis, aneurisma, fiebre, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Crohn, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, demencia asociada con VIH, psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática, arterioesclerosis por transplante, trauma cerebral físicamente o químicamente inducido, enfermedad inflamatoria del intestino, alveolitis, colitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis de suero nefrotóxico, nefritis glomerular, asma, esclerosis múltiple, arterioesclerosis, vasculitis, placas vulnerables, artritis reumatoide, restenosis, hiperplasia neoíntima venosa, hiperplasia neoíntima de injerto de diálisis, hiperplasia íntima de derivación arteriovenosa, transplante de órganos, nefropatía de aloinjerto crónico y cáncer.

11. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la enfermedad se selecciona de diabetes,

obesidad, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, ateroesclerosis, restenosis, y transplante de órganos.

12. Método de conformidad con las reivindicaciones 10-11, caracterizado porque la enfermedad se selecciona de esclerosis múltiple, ateroesclerosis, enfermedad de Crohn, y diabetes.

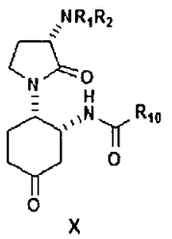
13. Método de conformidad con las reivindicaciones 10-12, caracterizado porque la enfermedad es diabetes.

14. Método de conformidad con las reivindicaciones 10-12, caracterizado porque la enfermedad es ateroesclerosis.

15. Método de conformidad con las reivindicaciones 10-12, caracterizado porque la enfermedad es enfermedad de Crohn.

16. Método de conformidad con las reivindicaciones 10-11, caracterizado porque la enfermedad es esclerosis múltiple.

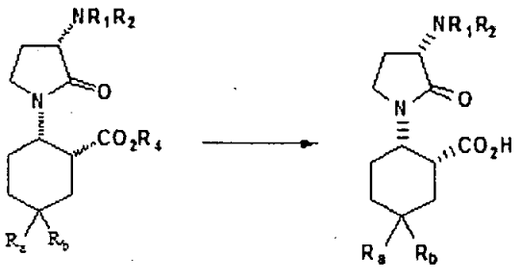
17. Proceso para la preparación de un compuesto teniendo la fórmula (X)



X

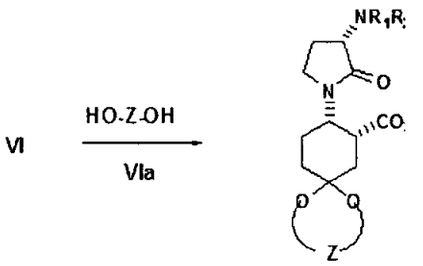
caracterizado porque comprende:

hidrolizar la porción éster del compuesto de la fórmula V con un agente de hidrolización para formar el ácido del compuesto VI a temperaturas desde alrededor de -5 hasta alrededor de 5°C.

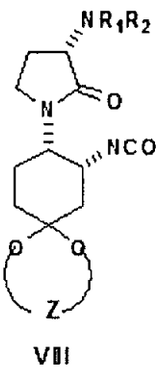


V VI

reaccionando un compuesto de la fórmula VIa, HO-Z-OH, con un compuesto de la fórmula IV (opcionalmente in situ) en la presencia de un catalizador ácido para dar un compuesto de la fórmula VII



transformando la porción del ácido carboxilíco de el cetal de la fórmula VII a un isocianato intermediario de la fórmula VIII



VIII

contactando el isocianato de la fórmula VIII con un

compuesto de la fórmula $R_{10}COW$ (por ejemplo, ácido acético) en la presencia de un anhídrido ácido correspondiente, $(R_{10}CO)_2O$) para formar la amida de la fórmula IX teniendo una porción cetal:

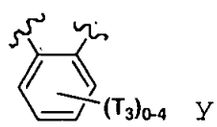
Hidrolizar la porción cetal de la amida de la formula IX para formar un compuesto de la formula X en donde

R_1, y R_2 son independientemente hidrógeno o un grupo protector amina;

R_4 y R_{10} son independientemente alquilo C_{1-6} o bencilo substituido opcionalmente;

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

W es OH o Oalquilo C_{1-6}.

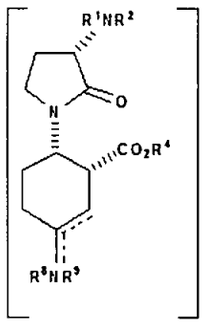
Z es $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$, o  y

T_1, T_2 y T_3 cada que se presentan se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, halógeno, hidroxi, ciano, nitro, CF_3, Oalquilo C_{1-4}, OCF_3, y C(=O)alquilo C_{1-4}

18. Proceso de conformidad con la reivindicación 17,

caracterizado porque la animación reductiva comprende las etapas de:

a) agregar un ácido Lewis a una solución del compuesto X y la amina que tiene la fórmula HNR_8R_9 en un solvente aprótico para formar una imina-enamina de la fórmula Xa:



Xa ; y

b) tratar la imina-enamina de la fórmula Xa con un agente reductor para proporcionar el compuesto de la fórmula X que tiene una porción pirolindonil amina.

19. Proceso de conformidad con las reivindicaciones 17-18 caracterizado porque

el compuesto de fórmula VII es ácido (7R, 8S)-8-(3S)-3-}(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaspiro[4,5]decano-7-carboxílico, una sal del mismo;

el compuesto de fórmula VIIa es ((3S)-1-((7R,8S)-7-(azidocarbonil)-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

el compuesto de fórmula VIII es ((3S)-1-((7R,8S)-7-isocianato-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

el compuesto de fórmula IX es ((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

el compuesto de fórmula X es ((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo; y

el compuesto de fórmula XI es ((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-butilamino)ciclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo.

20. Compuesto, caracterizado porque es seleccionado de

Ácido (7R,8S)-8-((3S)-3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-oxo-1-pirrolidinil)-1,4-dioxaspiro[4.5]decano-7-carboxílico, o una sal del mismo;

((3S)-1-((7R,8S)-7-(azidocarbonil)-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

((3S)-1-((7R,8S)-7-isocianato-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

((3S)-1-((7R,8S)-7-acetamido-1,4-dioxaespiro[4.5]dec-8-il)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo;

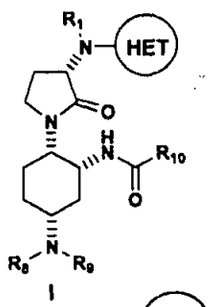
((3S)-1-((1S,2R)-2-acetamido-4-oxociclohexil)-2-oxo-3-pirrolidinil)carbamato de bencilo, o una sal del mismo; y

((3S)-1-((1S,2R,4R)-2-acetamido-4-(tert-

386459

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona un antagonistas novedoso o agonista parcial/antagonista del receptor de la actividad de MCP-1; N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable, de los mismos que tiene una combinación inesperada de características farmacológicas deseables. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas contienen los mismos y los métodos de uso de los mismos como agente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicos, cáncer y/o cardiovascular también es un objetivo de esta invención. La presente descripción también proporciona un proceso para preparar los compuestos de la fórmula (I), incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida:



I

en donde R^1, R^8, R^9, R^{10} y HET son como se describen en la presente. Los compuestos que son intermediarios útiles de los procesos también se proporcionan en la presente.

FIG. 1

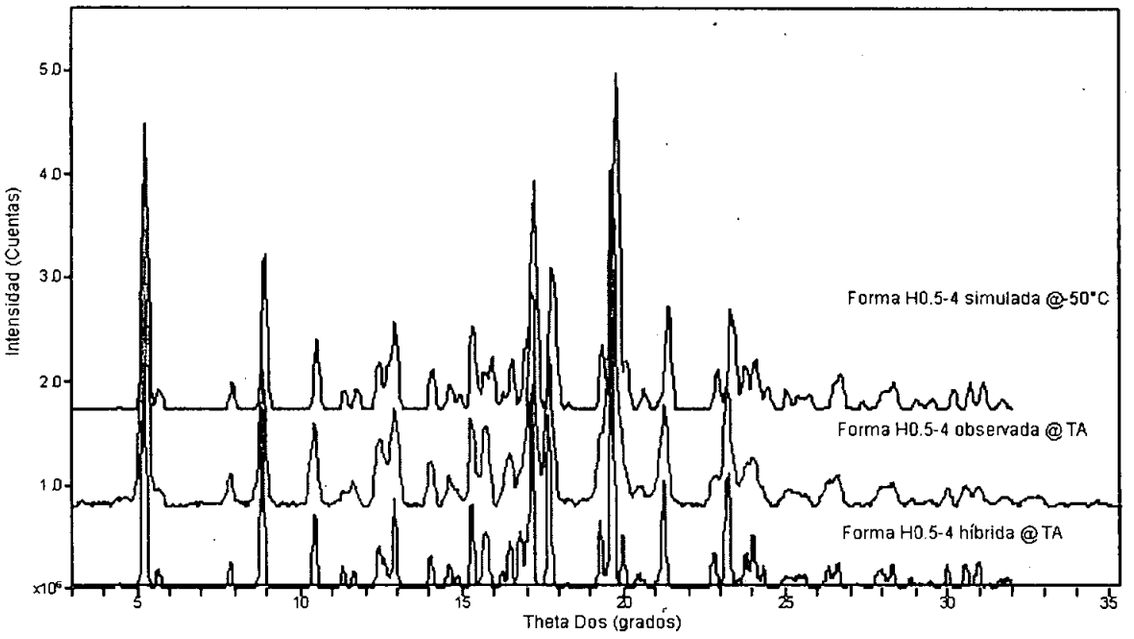

Intensidad (Cuentas)
x10⁶
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
5
10
15
20
25
30
35
Theta Dos (grados)
Forma H0.5-4 simulada @-50°C
Forma H0.5-4 observada @ TA
Forma H0.5-4 híbrida @ TA

FIG. 2

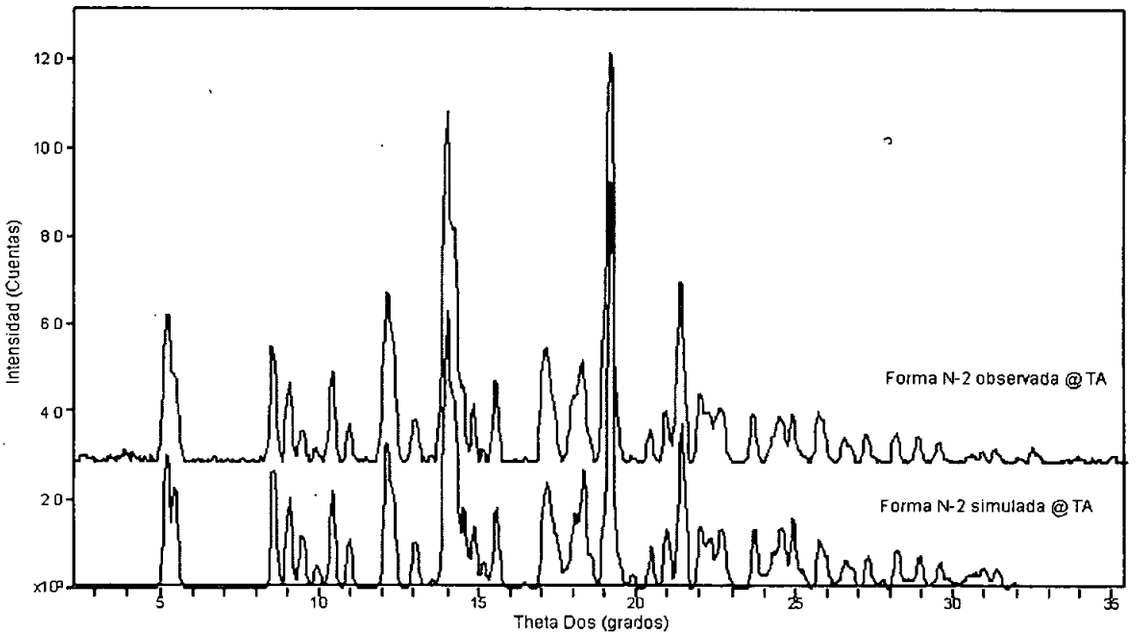

Intensidad (Cuentas)
120
100
80
60
40
20
x10³
5
10
15
20
25
30
35
Theta Dos (grados)
Forma N-2 observada @ TA
Forma N-2 simulada @ TA

FIG. 3

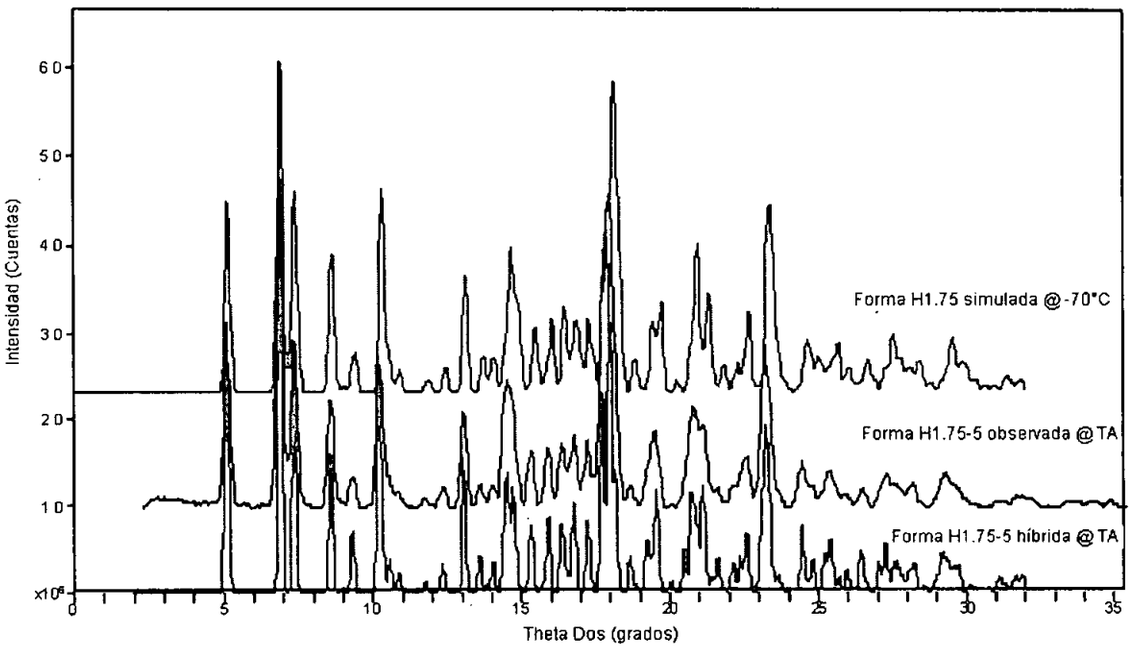

Intensidad (Cuentas)
60
50
40
30
20
10
x10
0
5
10
15
20
25
30
35
Theta Dos (grados)
Forma H1.75 simulada @ -70°C
Forma H1.75-5 observada @ TA
Forma H1.75-5 híbrida @ TA

FIG. 4

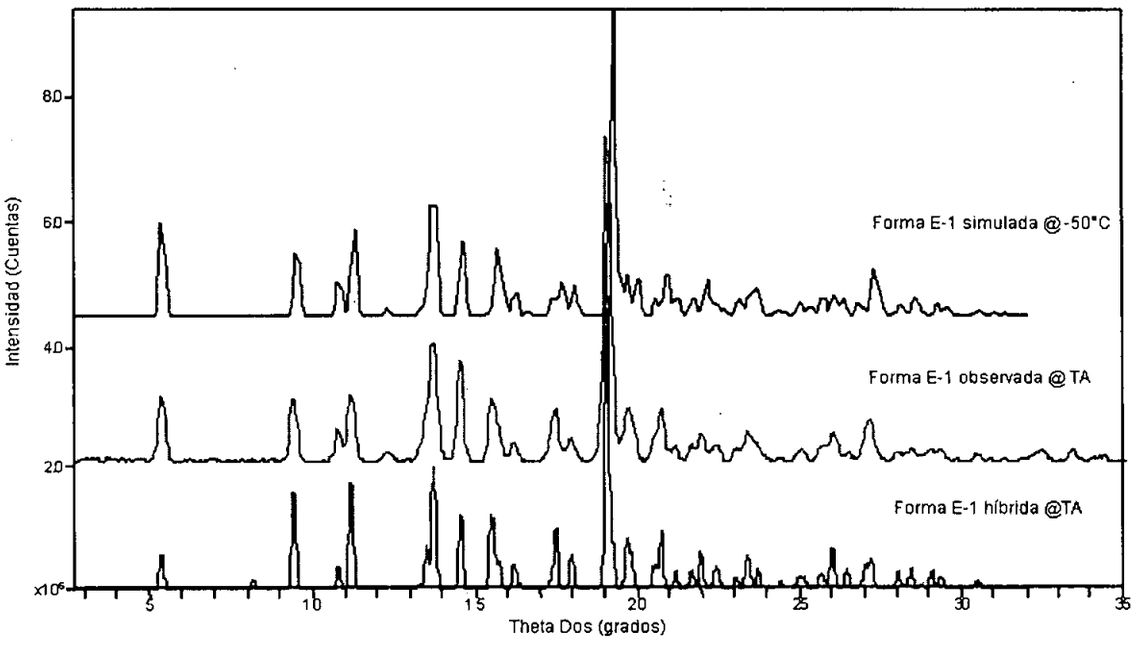

Intensidad (Cuentas)
80
60
40
20
x10⁶
5
10
15
20
25
30
35
Theta Dos (grados)
Forma E-1 simulada @-50°C
Forma E-1 observada @TA
Forma E-1 híbrida @TA

FIG. 5

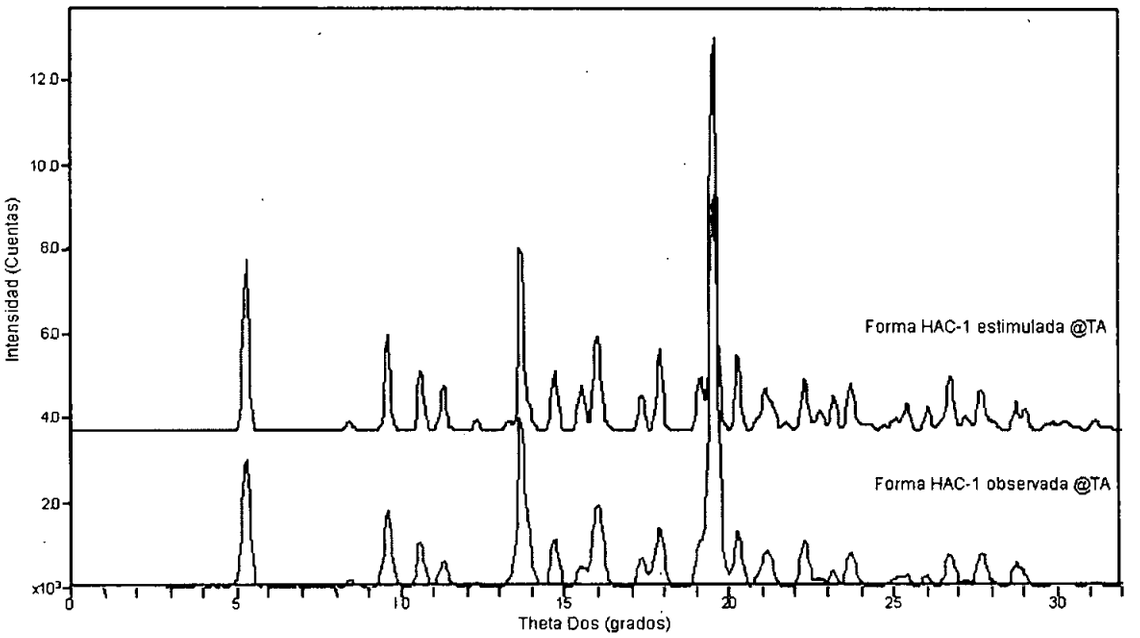

12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
x10³
Intensidad (Cuentas)
0
5
10
15
20
25
30
Theta Dos (grados)
Forma HAC-1 estimulada @TA
Forma HAC-1 observada @TA

FIG. 6

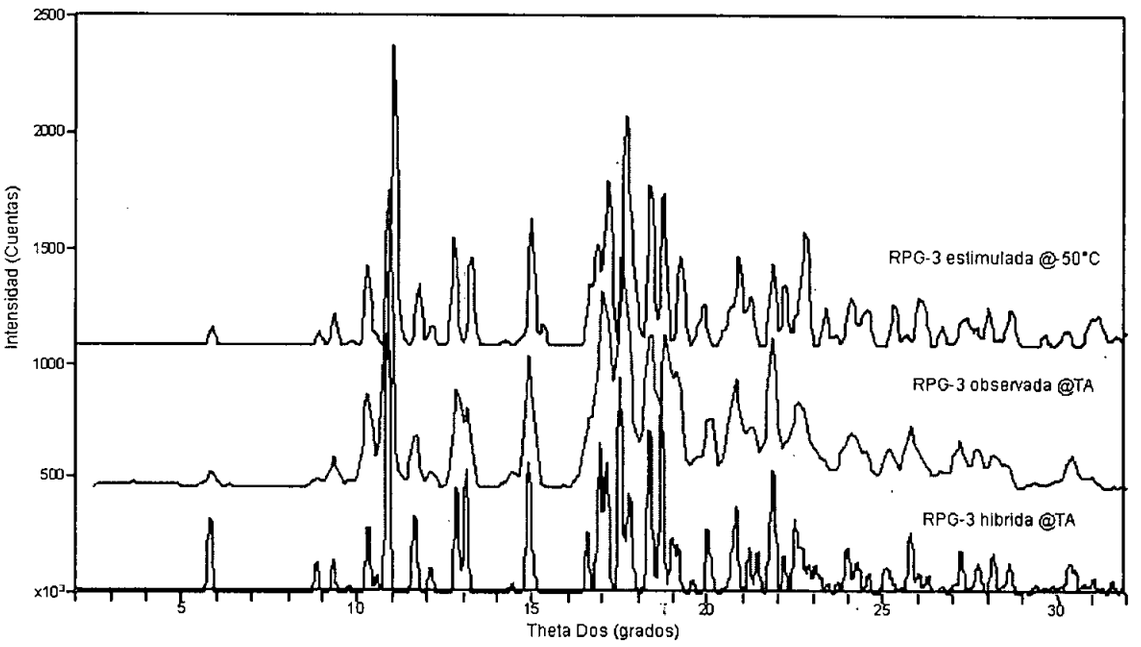
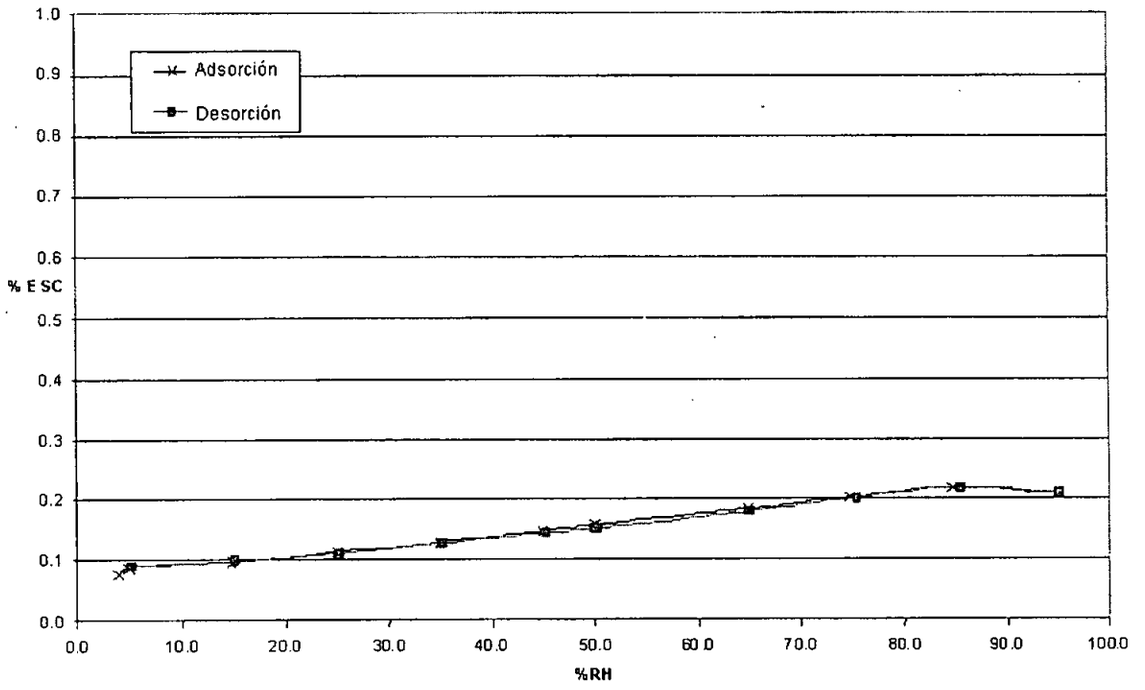

2500
2000
1500
1000
500
x10³
Intensidad (Cuentas)
RPG-3 estimulada @-50°C
RPG-3 observada @TA
RPG-3 hibrida @TA
5
10
15
20
25
30
Theta Dos (grados)

FIG. 11


Adsorción
Desorción
% E SC
%RH
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0
70.0
80.0
90.0
100.0

600472

FIG. 13

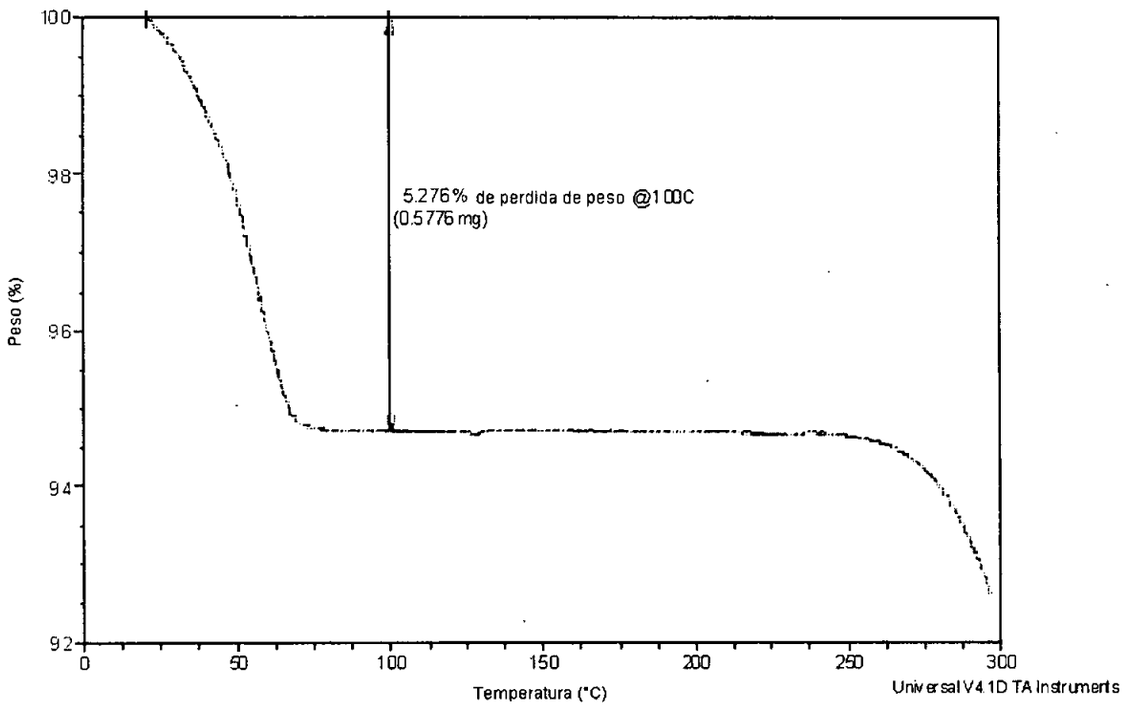
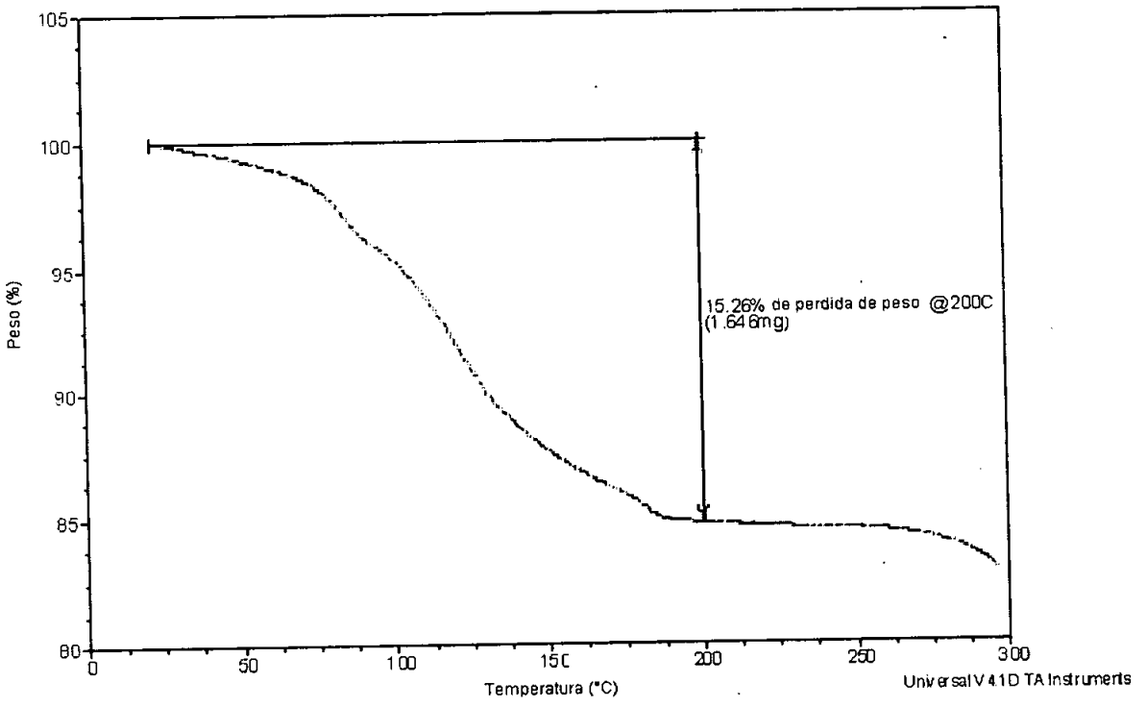
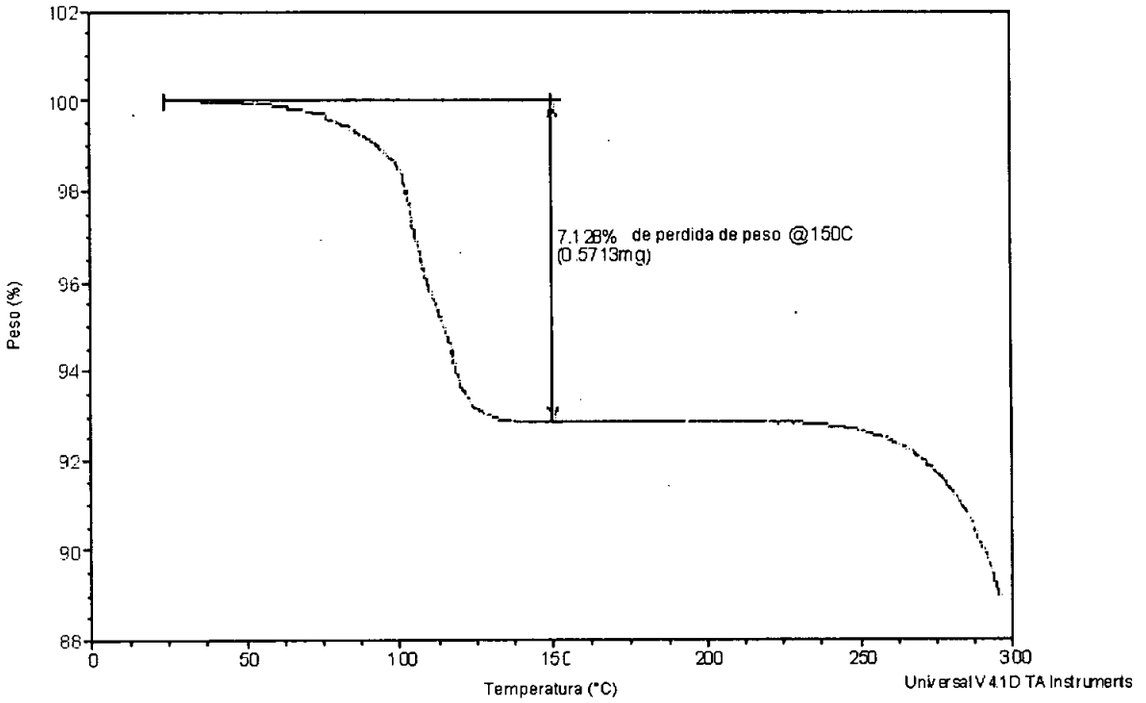


FIG. 15


105
100
95
90
85
80
Peso (%)
0
50
100
150
200
250
300
Temperatura (°C)
15.26% de perdida de peso @200C
(1.646mg)
Universal V 4.1D TA Instruments

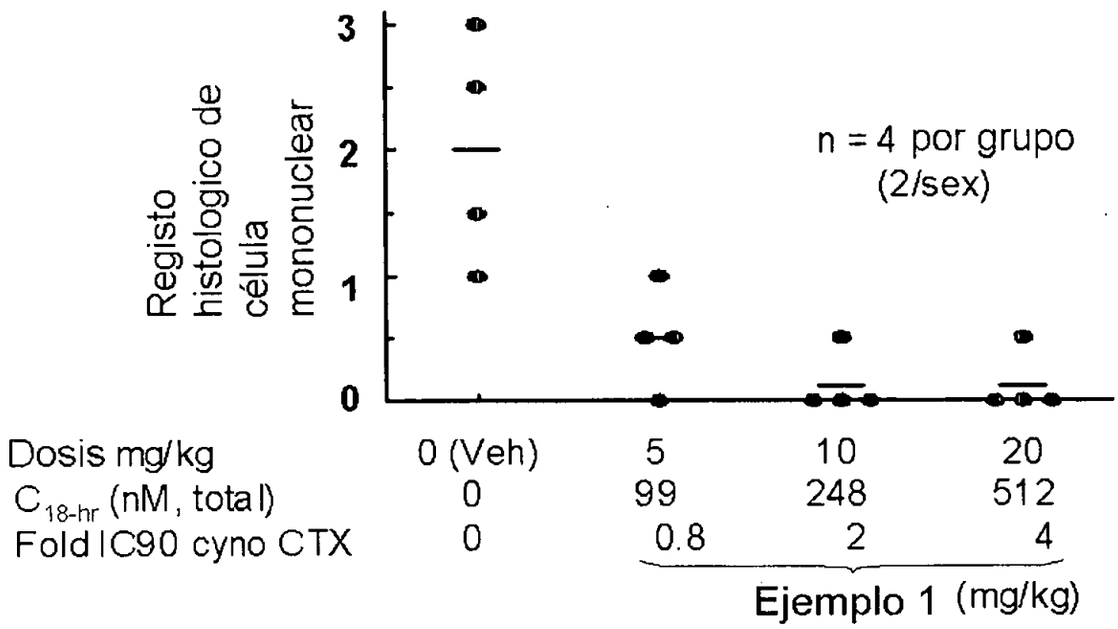
000476

FIG. 17



000479

FIG. 20



000480

FIG. 21

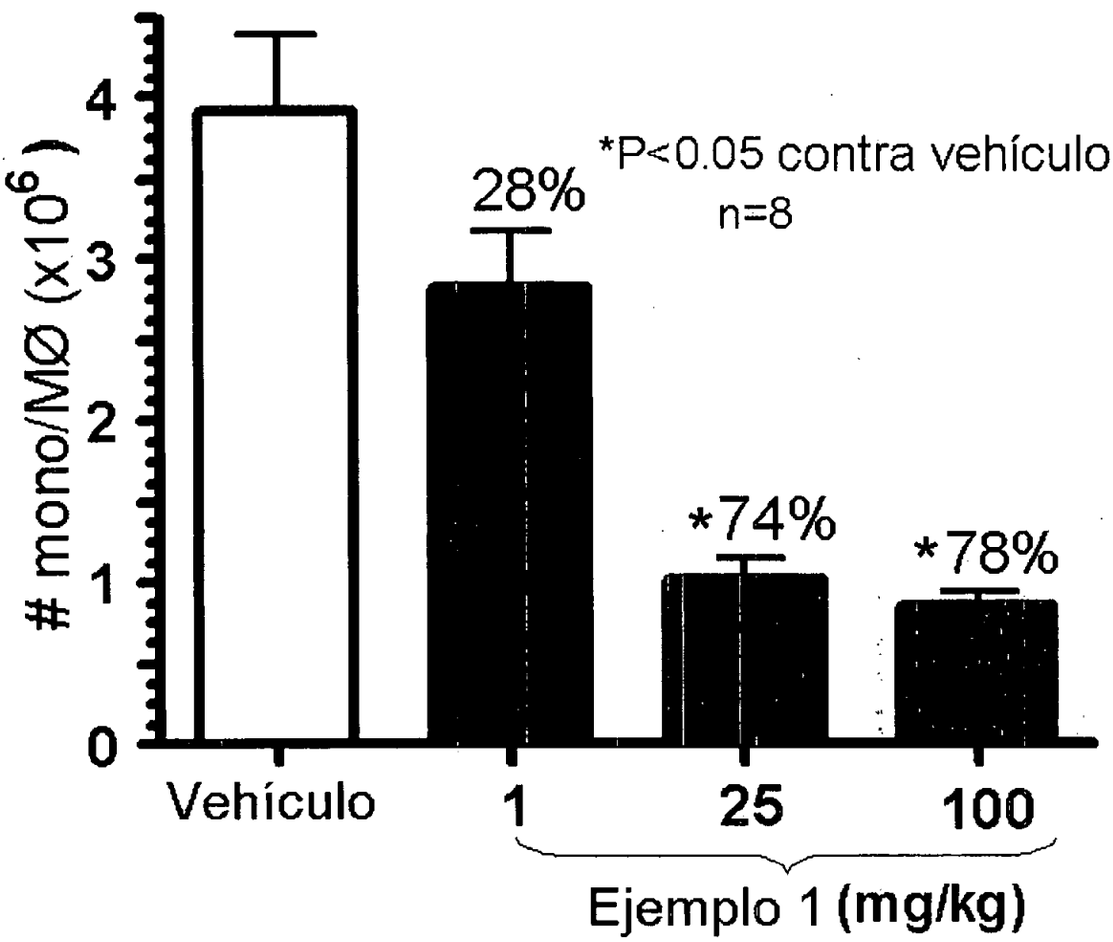
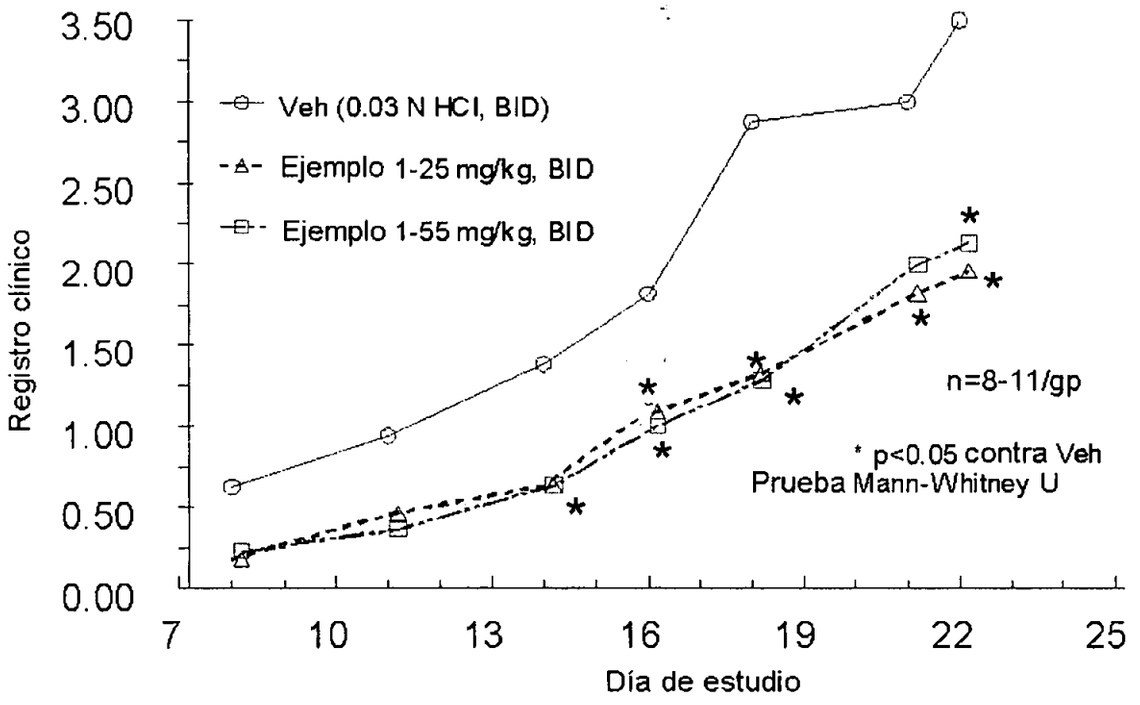
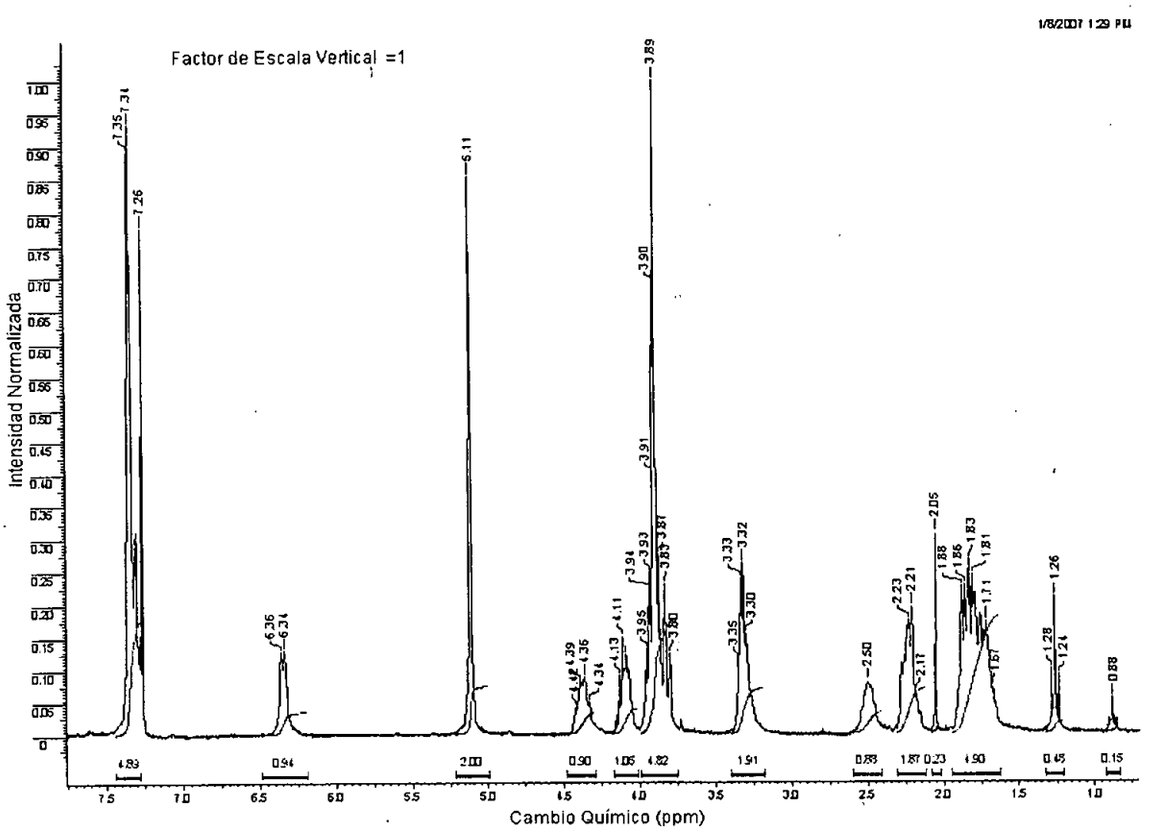


FIG. 22


3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
Registro clínico
Veh (0.03 N HCl, BID)
Ejemplo 1-25 mg/kg, BID
Ejemplo 1-55 mg/kg, BID
n=8-11/gp
* p<0.05 contra Veh
Prueba Mann-Whitney U
7
10
13
16
19
22
25
Día de estudio

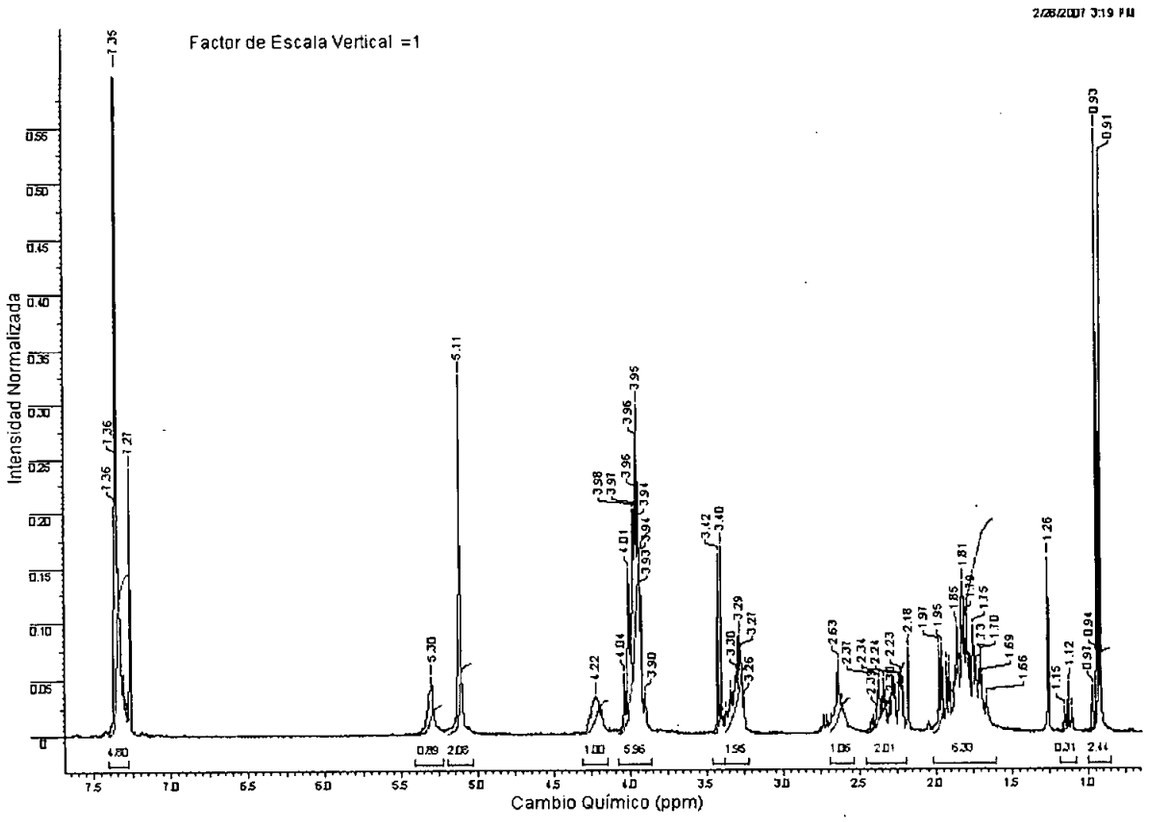
000482

FIG. 23



000433

FIG. 24



000484

FIG. 25

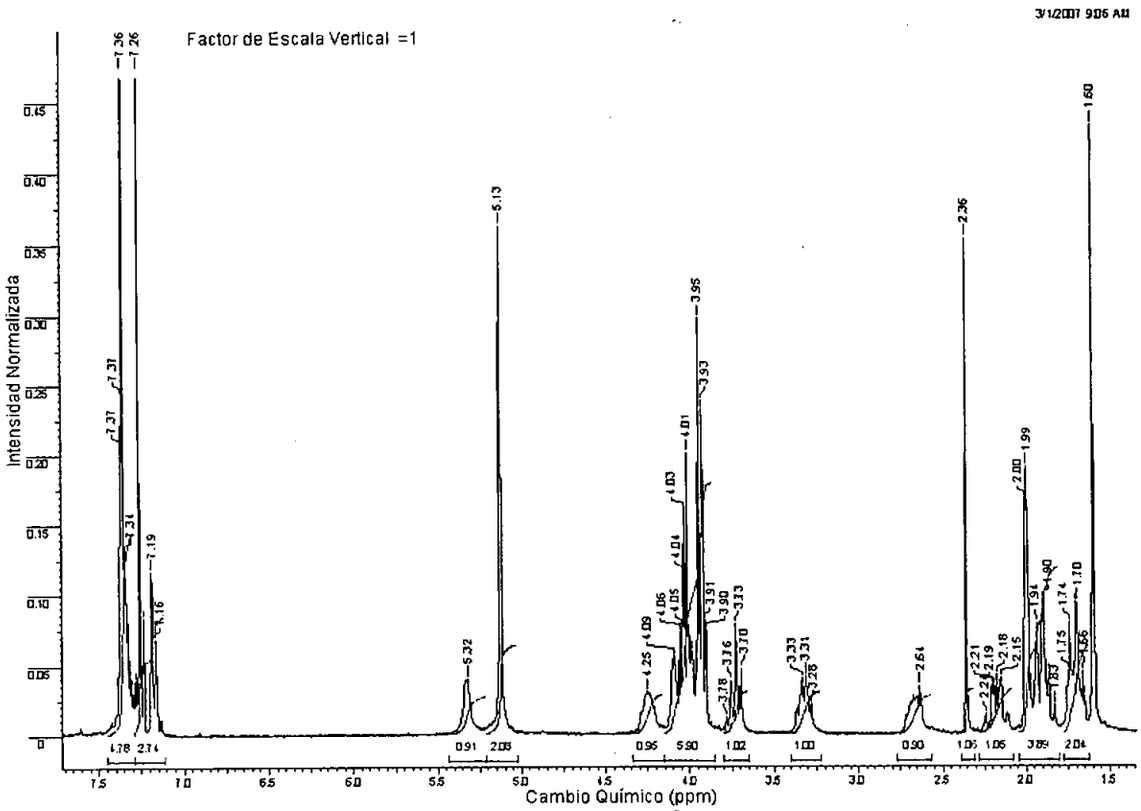


FIG. 26

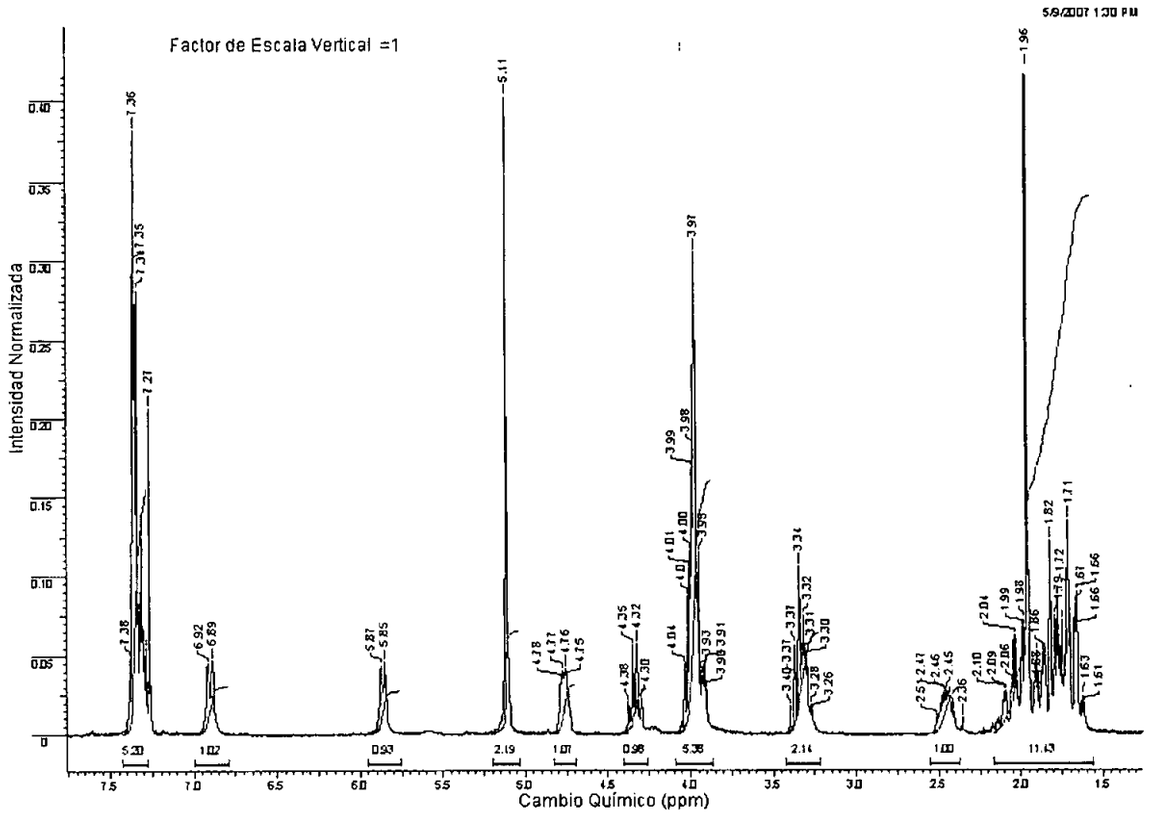
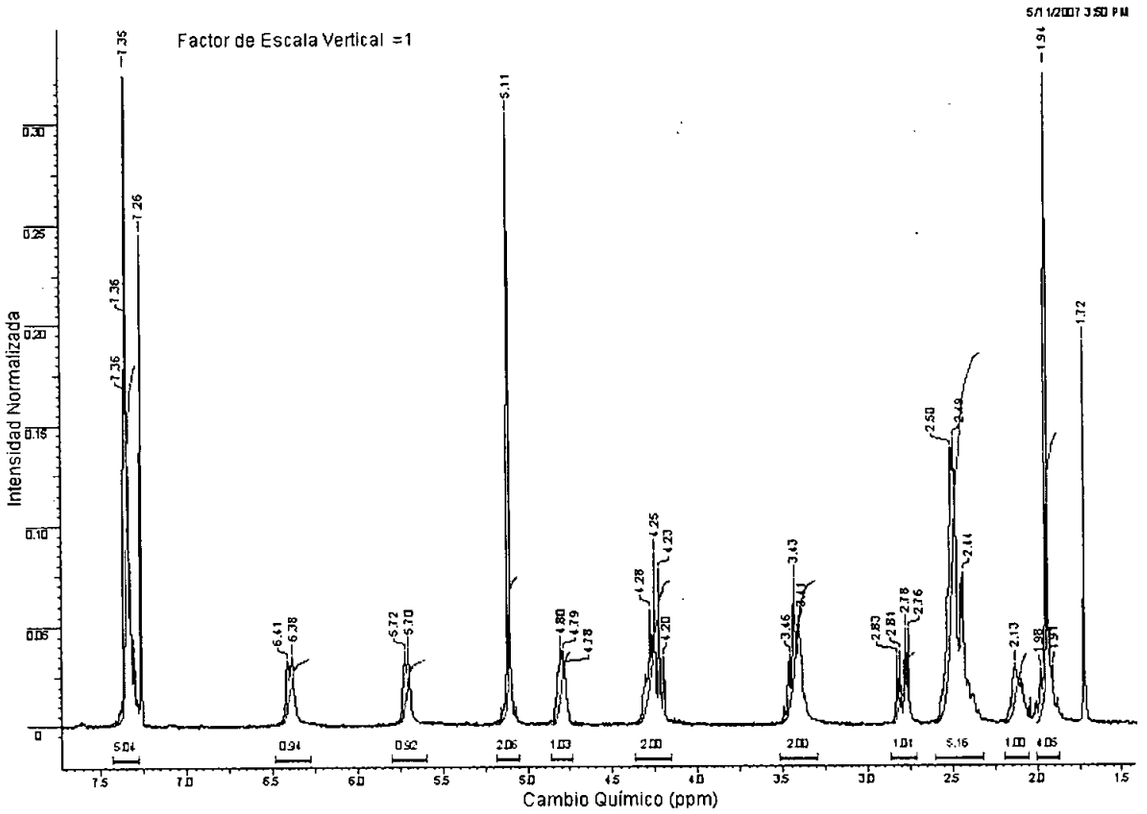

Factor de Escala Vertical =1
Intensidad Normalizada
Cambio Químico (ppm)

FIG. 27


Factor de Escala Vertical =1
Intensidad Normalizada
Cambio Químico (ppm)

IX°

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ___ PCT X MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : C07D 403/12; A61K 31/4025; C07D 207/273; C07D 317/72

(71)Solicitante(s) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

(72) Inventor(es) CARTER, Percy; DUNCIA, John, V.; Y OTROS

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
	60/834,235	28.07.2006	US
	60/896,026	21.03.2007	US
	11/782,742	25.07.2007	US

(85) Fecha inicio fase nacional: 28/02/2009

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2007
No. de solicitud : : PCT/US2007/074377

(87) Publicación internacional
Fecha: 31.01.2008
N° publicación: WO/2008/014360

(54) Titulo: MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS Y PROCESOS

48-1

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ___ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : C07D 403/12; A61K 31/4025; C07D 207/273; C07D 317/72

(71)Solicitante(s) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

(72) Inventor(es) CARTER, Percy; DUNCIA, John, V.; Y OTROS

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

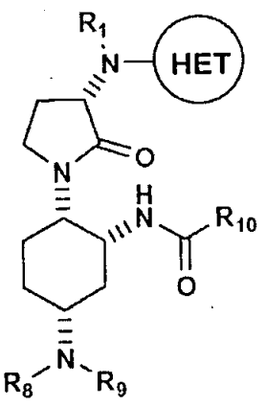
(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
60/834,235	28.07.2006	US
60/896,026	21.03.2007	US
11/782,742	25.07.2007	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28/02/2009

(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2007
No. de solicitud : PCT/US2007/074377

(87) Publicación internacional:
Fecha: 31.01.2008
No. Publicación : WO/2008/014360



(I)

(54) Titulo: MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINA, FORMAS CRISTALINAS Y PROCESOS

(57) Resumen: La presente invención proporciona un antagonistas novedoso o agonista parcial/antagonista del receptor de la actividad de MCP-1; N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable, de los mismos que tiene una combinación inesperada de características farmacológicas deseables. Las formas cristalinas de la presente invención también se proporcionan. Las composiciones farmacéuticas contienen los mismos y los métodos de uso de los mismos como agente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, autoinmunes, metabólicos, cáncer y/o cardiovascular también es un objetivo de esta invención. La presente descripción también proporciona un proceso para preparar los compuestos de la fórmula (I), incluyendo N-((1R,2S,5R)-5-(tert-butilamino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluorometil)quinazolin-4-ilamino)pirrolidin-1-il)ciclohexil)acetamida: en donde R1, R8, R9, R10 y son como se describen en la presente. Los compuestos que son intermediarios útiles de los procesos también se proporcionan en la presente.

490

2009/002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 5,902
FECHA : ENERO 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 497

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	21549006	23/01/2009	54,828,500.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL : $	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

491

2009/001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-019203- -00000-0000

Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 497

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 2,003
F : ENERO 9 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120647380	09/01/2009	16,094,000.00

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

C	RENTISTICO		CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998	VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#O ANTR	20,000.00
				TOTAL : $	20,000.00

S(VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

492

2008/023

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 100,468
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 497

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120646805	24/12/2008	46,377,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99	OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	10,000.00
			TOTAL : $	10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

493

20081023

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 497

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 100,486
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120646805	24/12/2008	46,377,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	10,000.00
		TOTAL : $	10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

494

2008/023

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 497

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 100,487
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120646805	24/12/2008	46,377,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	10,000.00
		TOTAL : $	10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

2008/023

495

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 497

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 100,488
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120646805	24/12/2008	46,377,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	10,000.00
		TOTAL : $	10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

2008/023 496

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 497

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 100,479
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120646805	24/12/2008	46,377,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	10,000.00
		TOTAL : $	10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

2008/023

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 100,331
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-019203- -00000-0000
Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 497

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120646805	24/12/2008	46,377,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99	OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
			TOTAL : $	5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-019203- -00000-0000

Fecha: 2009-02-25 16:58:26 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 497

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- Descripción de la invención [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [✓]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Claudia M Nieva Cortés.
Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia