(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 367 369**

(51) Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)	***C07D 295/18*** (2006.01)
C07D 217/12 (2006.01)	***C07D 333/62*** (2006.01)
A61K 31/4045 (2006.01)	***A61K 31/4353*** (2006.01)
A61K 31/4965 (2006.01)	***A61P 35/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06726982 .9**

(96) Fecha de presentación : **04.05.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1879895**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

(54) Título: **Inhibidores de enzimas.**

(30) Prioridad: **05.05.2005 GB 0509223**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **02.11.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **02.11.2011**

(73) Titular/es: **CHROMA THERAPEUTICS LIMITED**
93 Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB

(72) Inventor/es: **Davidson, Alan Hornsby;**
Patel, Sanjay Ratilal;
Mazzei, Francesca Ann;
Davies, Stephen John;
Drummond, Alan Hastings;
Moffat, David Festus C.;
Baker, Kenneth William John y
Donald, Alistair David Graham

(74) Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 369 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de enzimas.

Esta invención se refiere a compuestos que inhiben a miembros de la familia de enzimas histona desacetilasa y a su uso en el tratamiento de enfermedades de células proliferativas, incluyendo cánceres, enfermedades asociadas a la poliglutamina, por ejemplo, la enfermedad de Huntingdon, enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, por ejemplo, la artritis reumatoide y el rechazo del trasplante de órganos, la diabetes, trastornos hematológicos, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, y secuelas inflamatorias producidas por infecciones.

Antecedentes de la invención

En las células eucarióticas, el ADN se empaqueta con las histonas formando la cromatina. Aproximadamente son envueltos 150 pares de bases de ADN dos veces alrededor de un octámero de histonas (dos por cada una de las histonas 2A, 2B, 3 y 4) formando un nucleosoma, la unidad básica de la cromatina. La estructura ordenada de la cromatina tiene que ser modificada a fin de permitir la transcripción de los genes asociados. La regulación transcripcional es clave para la diferenciación, proliferación y apoptosis, y está, por lo tanto, fuertemente controlada. El control de los cambios de la estructura de la cromatina (y por lo tanto de la transcripción) está mediado por modificaciones covalentes a histonas, más específicamente de las colas del extremo N-terminal. Las modificaciones covalentes (por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación) de las cadenas laterales de los aminoácidos son mediadas enzimáticamente (una revisión de las modificaciones covalentes de histonas y su papel en la regulación transcripcional puede ser encontrado en Berger SL 2001 *Oncogene* **20**, 3007-3013; Véase Grunstein, M 1997 *Nature* **389**, 349-352; Wolffe AP 1996, *Science* **272**, 371-372; y Wade PA *et al.*, 1997 *Trends Biochem Sci* **22**, 128-132 para revisiones de acetilación y transcripción de histonas).

La acetilación de histonas tiene que ver con áreas de cromatina que son transcripcionalmente activas, mientras que los nucleosomas con niveles de acetilación bajos son, típicamente, transcripcionalmente silenciosos. El estado de acetilación de las histonas es controlado por dos clases de enzimas de actividades contrarias; las histona acetiltransferasas (HAT) y las histona desacetilasas (HDAC). En las células transformadas se cree que la expresión inadecuada de las HDAC causa la silenciación de genes supresores de tumores (para una revisión de los papeles potenciales de las HDAC en la tumorogénesis véase Gray SG y Teh BT 2001 *Curr Mol Med* **1**, 401-429). Se han descrito en la bibliografía inhibidores de las enzimas HDAC y parece que inducen la reactivación transcripcional de ciertos genes que causan la inhibición de la proliferación de células del cáncer, la inducción de la apoptosis y la inhibición del crecimiento de tumores en animales (Para una revisión véase Kelly, WK *et al.*, 2002 *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 1695-1713). Dichas conclusiones sugieren que los inhibidores de HDAC tienen un potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como el cáncer (Kramer, Ohio *et al.*, 2001 *Trends Endocrinol* **12**, 294-300, Vigushin DM y Coombes RC 2002 *Anticancer Drugs* **13**, 1-13).

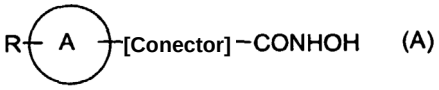
Además, otros han propuesto que la acetilación de histonas o la actividad de HDAC aberrante está implicada en las siguientes enfermedades y desórdenes: enfermedad asociada a la poliglutamina, por ejemplo, enfermedad de Huntingdon (Hughes RE 2002 *Curr Biol* **12**, R141R143; McCampbell A *et al* 2001 *Proc Soc Natl Acad Sci* **98**, 15179-15184; Hockly E *et al* 2003 *Proc Soc Natl Acad Sci* **100**, 2041-2046), otras enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (Hempen B y Brion JP 1996, *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 964-972), enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes de órganos (Skov S *et al* 2003 *Blood* **101**, 14 30-1438; Mishra N *et al* 2003 *J Clin Invest* **111**, 539-552), diabetes (Mosley AL y Ozcan S 2003 *J Biol Chem* **278**, 19660 -19666) y complicaciones diabéticas, infecciones (incluyendo infecciones protozoarias (Darkin-Rattray, SJ *et al*., 1996 *Proc Soc Natl Acad Sci* **93**, 13143-13147)) y desórdenes hematológicos incluyendo la talasemia (Witt O *et al* 2003 *Blood* **101**, 2001-2007). Las observaciones contenidas en estos manuscritos sugieren que la inhibición de HDAC debe tener ventajas terapéuticas en estas enfermedades y otras relacionadas.

Se han sugerido muchos tipos de compuestos del inhibidor de HDAC, y varios compuestos están siendo evaluados actualmente clínicamente, para el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, las siguientes publicaciones de patentes describen a dichos compuestos:

US 5.369.108 y WO	WO 03/076395	WO 04/110989
01/18171	WO 03/076400	WO 04/092115
US 4,254,220	WO 03/076401	WO 04/0224991
WO 01/70675	WO 03/076421	WO 05/014588
WO 01/38322	WO 03/076430	WO 05/018578
WO 02/30879	WO 03/076422	WO 05/019174
WO 02/26703	WO 03/082288	WO 05/004861

WO 02/069947	WO 03/087057	WO 05/007091
WO 02/26696	WO 03/092686	WO 05/030704
WO 03/082288	WO 03/066579	WO 05/013958
WO 02/22577	WO 03/011851	WO 05/028447
WO 03/075929	WO 04/013130	WO 05/026907

Muchos de los inhibidores de HDAC conocidos en la técnica tienen una plantilla estructural, que puede ser representada como en la fórmula (A):



(A)

en donde el anillo A es un sistema de anillos carbocíclico o heterocíclico con sustituyentes opcionales R, y el [Conector] es un radical conector de varios tipos. El grupo hidroxamato funciona como un grupo de unión metálico, que interacciona con el ión metálico en el sitio activo de la enzima HDAC, que está en la base de una bolsa en la estructura de la enzima plegada. El anillo o el sistema de anillos está tumbado dentro de entrada a la bolsa, o dentro, que contiene el ión metálico, extendiéndose el radical -[Conector]- más profundamente dentro de dicha bolsa que conecta uniendo a A al metal que se une al grupo del ácido hidroxámico. En la técnica, y de vez en cuando en este documento, el anillo o sistema de anillos A es a veces informalmente denominado el "grupo principal" del inhibidor.

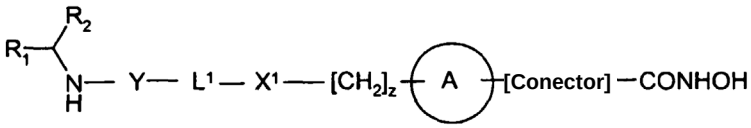
El uso de profármacos para potenciar la administración a órganos y tejidos dianas, o superar las pobres propiedades farmacocinéticas del fármaco parenteral, es un enfoque de química medicinal conocido. La administración de profármacos de éster, por ejemplo, que son hidrolizados por carboxilesterasas de suero *in vivo* en los ácidos parenterales activos, puede causar niveles de suero más altos del ácido parenteral que la administración del propio ácido.

Breve descripción de la invención

Esta invención está basada en el descubrimiento de que la introducción de un éster de un aminoácido alfa que se agrupa en la plantilla molecular del inhibidor de HDAC (A) anterior facilita la penetración del agente a través de la membrana celular, y así permite que la actividad de la carboxilesterasa intracelular hidrolice al éster que suelta al ácido parenteral. Cuando está cargado, el ácido no es fácilmente transportado dentro la célula, éste se acumula por lo tanto aumentando la concentración intracelular del inhibidor de HDAC activo. Esto lleva a aumentos de la potencia y la duración de la acción. La invención por lo tanto pone a disposición una clase de compuestos cuyas estructuras son caracterizadas por tener un resto éster de un aminoácido alfa que es un sustrato para la carboxilesterasa intracelular (también denominada en este documento un "motivo de esterasa") covalentemente unido a una plantilla molecular de un inhibidor de HDAC, y a los correspondientes ácidos parenterales esterificados, teniendo dichos compuestos utilidad farmacéutica en el tratamiento de enfermedades, tales como cánceres que se benefician de la inhibición intracelular de HDAC.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal, N-óxido, hidrato o solvato del mismo:



(I)

en donde ciclohexilmetilo, ciclohexilo, piridin-3-ilmetilo, sec-butilo, terc-butilo, 1-benciltio-1-metiletilo, 1-etiltio1-metiletilo y 1-mercapto-1-metiletilo, fenilo, bencilo, feniletilo, terc-butoximetilo o iso-butilo.

Aunque la anterior definición potencialmente incluya a moléculas de peso molecular alto, es preferible, de acuerdo con los principios generales de la práctica de la química medicinal, que los compuestos a los cuales esta invención está referida deben tener pesos moleculares de no más de 600.

En otro amplio aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente, o un N-óxido, sal, hidrato o solvato del mismo en la preparación de una composición para el tratamiento de una enfermedad de proliferación celular, por ejemplo, la proliferación de células cancerígenas, enfermedades asociadas a la poliglutamina, por ejemplo, la enfermedad de Huntingdon, enfermedades

neurodegenerativas, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, por ejemplo, la artritis reumatoide, y el rechazo de trasplantes de órganos, la diabetes, los trastornos hematológicos, infecciones (incluyendo, pero sin limitarse a infecciones protozoarias y fungosas), enfermedades inflamatorias y enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis.

El término "éster" o "grupo carboxilo esterificado" significa un grupo $R_9O(C=O)$- en el que R_9 es el grupo que caracteriza al éster, nocionalmente sacado del alcohol R_9OH.

Como se usa en este documento, la expresión "alquilo (C_a-C_b)", en donde a y b son números enteros, se refiere a un radical alquilo de cadena lineal o ramificada de de a a b átomos de carbono. Así cuando a es 1 y b es 6, por ejemplo, la expresión incluye metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo y n-hexilo.

Como se usa en este documento la expresión "radical alquileno (C_a-C_b) divalente", en donde a y b son números enteros, se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada que tiene de a a b átomos de carbono y dos valencias libres.

Como se usa en este documento la expresión "alquenilo (C_a-C_b)", en donde a y b son números enteros, se refiere a un resto alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene de a a b átomos de carbono con al menos un doble enlace de estereoquímica E o Z, cuando sea aplicable. La expresión incluye, por ejemplo, vinilo, alilo, 1- y 2-butenilo y 2-metil-2-propenilo.

Como se usa en este documento la expresión "radical alquenileno (C_a-C_b) divalente" significa una cadena hidrocarbonada con de a a b átomos de carbono, al menos un doble enlace, y dos valencias libres.

Como se usa en este documento la expresión "alquinilo C_a-C_b", en donde a y b son números enteros, se refiere a grupos hidrocarburo de una cadena lineal o una cadena ramificada con de dos a seis átomos de carbono y además con un enlace triple. Esta expresión incluiría por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, 1- y 2-butinilo, 2-metil-2-propinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo y 5-hexinilo.

Como se usa en este documento la expresión "radical alquinileno (C_a-C_b) divalente", en donde a y b son números enteros, se refiere a una cadena hidrocarbonada divalente con de 2 a 6 átomos de carbono, y al menos un enlace triple.

Como se usa en este documento el término "carbocíclico" se refiere a un radical mono- bi- o tricíclico con hasta 16 átomos de anillo, todo de los cuales son carbono, e incluye arilo y cicloalquilo.

Como se usa en este documento el término "cicloalquilo" se refiere a un radical carbocíclico saturado monocíclico con 3-8 átomos de carbono e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

Como se usa en este documento el término no calificado "arilo" se refiere a un radical aromático carbocíclico mono-bi- o tri-cíclico, e incluye a radicales que tienen dos anillos aromáticos carbocíclicos monocíclicos que se unen directamente por un enlace covalente. Ilustrativo de dichos radicales son fenilo, bifenilo y naftilo.

Como se usa en este documento el término no calificado "heteroarilo" se refiere a un radical aromático mono- bi- o tri-cíclico que contiene uno o varios heteroátomos seleccionados de S, N y O, e incluye a radicales que tienen dos de dichos anillos monocíclicos, o uno de dicho anillo monocíclico y un anillo de arilo monocíclico, que se unen directamente por un enlace covalente. Ilustrativo de dichos radicales son tienilo, benzotienilo, furilo, benzofurilo, pirrolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isotiazolilo, bencisotiazolilo, pirazolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, bencisoxazolilo, isotiazolilo, triazolilo, benzotriazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, indolilo e indazolilo.

Como se usa en este documento el término no calificado "heterociclilo" o "heterocíclico" incluye "heteroarilo" como se define anteriormente, y en su sentido no aromático está relacionado con un radical no aromático mono-, bi- o tri-cíclico que contiene uno o varios heteroátomos seleccionados de S, N y O, y a grupos que consisten en un radical no aromático monocíclico que contiene uno o varios de dichos heteroátomos que se une covalentemente a otro tal radical o a un radical carbocíclico monocíclico. Ilustrativo de dichos radicales son los grupos pirrolilo, furanilo, tienilo, piperidinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirrolidinilo, pirimidinilo, morfolinilo, piperazinilo, indolilo, morfolinilo, benzofuranilo, piranilo, isoxazolilo, bencimidazolilo, metilendioxifenilo, etilendioxifenilo, maleimido y succinimido.

A menos que se especifique de otro modo en el contexto en el cual esto aparece, el término "sustituido" aplicado a cualquier resto en este documento significa sustituido con hasta cuatro sustituyentes compatibles, cada uno de los cuales puede ser independientemente, por ejemplo, alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6), hidroxi, hidroxi alquilo (C_1-C_6), mercapto, mercapto alquilo (C_1-C_6), alquilo (C_1-C_6)-tio, fenilo, halo (incluyendo fluoro, bromo y cloro), trifluorometilo, trifluorometoxi, nitro, nitrilo (-CN), oxo, -COOH, $-COOR^A$, $-COR^A$, $-SO_2R^A$, $-CONH_2$, $-SO_2NH_2$, $-CONHR^A$, $-SO_2NHR^A$, $-CONR^AR^B$, $-SO_2NR^AR^B$, $-NH_2$, $-NHR^A$, $-NR^AR^B$, $-OCONH_2$, $-OCONHR^A$, $-OCONR^AR^B$, $-NHCOR^A$, $-NHCOOR^A$, $-NRBCOOR^A$, $-NHSO_2OR^A$, $-NR^BSO_2OH$, $-NR^BSO_2OR^A$, $-NHCONH_2$, $-NR^ACONH_2$, $-NHCONHR^B$, $-NR^ACONHR^B$, -

$NHCONR^AR^B$, o $-NR^ACONR^AR^B$ en donde R^A y R^B son independientemente alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_6), fenilo o heteroarilo monocíclico con 5 o 6 átomos de anillo. Un "sustituyente opcional" puede ser uno de los grupos de sustituyente anteriores.

Como se usa en este documento el término "sal" incluye adición sales de base, de adición de ácido y cuaternarias. Los compuestos de la invención que son ácidos pueden formar sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, con bases, como hidróxidos de metal alcalino, p.ej hidróxidos de potasio y sodio; hidróxidos de metal alcalinotérreos, p.ej hidróxidos de calcio, bario y magnesio; con bases orgánicas p.ej. N-metil-D-glucamina, colina tris (hidroximetil) amino-metano, L-arginina, L-lisina, N-etil-piperidina, dibencilamina y otros por el estilo. Aquellos compuestos (I) que son básicos pueden formar sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos, p.ej con ácidos halídricos, tales como ácidos clorhídrico o bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido nítrico y otros por el estilo, y con ácidos orgánicos p.ej con ácidos acético, tartárico, succínico, fumárico, maleico, málico, salicílico, cítrico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico, benzoico, bencenosulfónico, glutámico, láctico y mandélico y otros por el estilo.

Los compuestos de la invención que contienen uno o varios centros quirales reales o potenciales, debido a la presencia de átomos de carbono asimétricos, pueden existir como varios diastereoisómeros con estereoquímica R o S en cada centro quiral. La invención incluye todos dichos diastereoisómeros y sus mezclas.

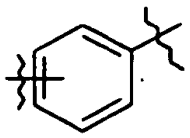
Como se indica anteriormente, los ésteres de la invención son principalmente profármacos de los ácidos carboxílicos correspondientes en los cuales son convertidos por carboxilesterasas intracelulares. Sin embargo, mientras que permanezcan no hidrolizados, los ésteres pueden tener actividad inhibitoria con HDAC por sí mismos. Los compuestos de la invención incluyen no sólo el éster, sino también los productos de hidrólisis de los ácidos carboxílicos correspondientes.

El grupo hidroxamato -C(=O)NHOH

[En los compuestos de la invención, el grupo hidroxamato funciona como un grupo de unión metálico, que interactúa con el ión metálico en el sitio activo de la enzima HDAC, que está en la base de una bolsa en la estructura de enzima plegada.

El anillo o sistema de anillos A

En los compuestos de la invención, cuando se unen al sitio activo de la enzima HDAC, el anillo o el sistema de anillos yace dentro o está en la misma entrada de la bolsa que contiene el ión metálico, extendiéndose el radical -[Conector] más profundamente en dicha bolsa que conecta a A al grupo del ácido hidroxámico que se une al metal. En la técnica, el anillo o el sistema de anillos A es a veces denominado informalmente el "grupo principal" del inhibidor. El sistema de anillos A es el siguiente; opcionalmente sustituido



El radical -[Conector]-

El -[Conector]- representa un radical conector divalente que une un átomo de anillo en A con el grupo del ácido hidroxámico CONHOH, la longitud del radical conector, desde el átomo terminal unido al átomo del anillo de A al átomo terminal unido al grupo del ácido hidroxámico, siendo equivalente a la de una cadena hidrocarbonada saturada no ramificada de 3-10 átomos de carbono. Una cadena hidrocarbonada saturada no ramificada de 3 átomos de carbono tiene una longitud de aproximadamente 2,5 angstroms, y cada uno de 10 átomos de carbono tiene una longitud de aproximadamente 11,3 angstroms. La longitud de cualquier radical -[Conector]- dado puede ser determinada a partir de los datos de los radios de los átomos y las longitudes de enlace de la bibliografía, o puede ser determinada usando un software del modelado de la estructura química, tal como el DS ViewerPro (Accelrys, Inc). La longitud definida del radical -[Conector]- refleja el hecho que el grupo principal A puede yacer en la entrada o dentro de la bolsa metálica que contiene el ión en el sitio activo de la enzima, y está, por lo tanto, suelto respecto a la profundidad de dicha bolsa. En muchos casos, la longitud del conector será equivalente a la de una cadena hidrocarbonada saturada no ramificada de 4 a 9 átomos de carbono, por ejemplo de 5, 6 o 7 átomos de carbono.

El -[conector]- representa a un radical divalente con la fórmula - $(CH_2)_x$-Z-L^2- en donde x es 0 o 1;

Z es un enlace, $-NR_3$-, $-NR_3C(=O)$-, $-C(=O)NR_3$-, $-NR_4C(=O)-NR_3$-, $-C(=S)-NR_3$, $-C(=N)-NR_3$, $-NR_3S(=O)_2$-, o $-S(=O)_2NR_3$- en donde R_3 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6;-C (=O); o $-S(=O)_2$-; y

L^2 representa un radical alquileno C_4-C_7, alquenileno C_4-C_6 o alquinileno C_4-C_6, opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, que puede contener opcionalmente o terminarse en un enlace éter (-O-), tioeter (-S-) o amino (-NR^A-) en donde RA es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido.

En una subclase de este tipo del conector, en cualquier combinación compatible, x es 0; Z es -NH-, -C(=O)-, NHC(=O)- o -C(=O)NH- y L^2 es -$(CH_2)_5$-, -$(CH_2)_6$-, o -$(CH_2)_7$-.

El grupo éster R_1

El grupo éster R_1 debe ser alguno que en el compuesto de la invención se hidrolice por una o varias de las enzimas de carboxilesterasa intracelulares hCE-1, hCE-2 y hCE-3 a un grupo ácido carboxílico. Las enzimas de carboxilesterasa intracelulares capaces de hidrolizar el grupo de éster de un compuesto de la invención en el ácido correspondiente incluyen los tres isotipos enzimáticos humanos conocidos hCE-1, hCE-2 y hCE-3. Aunque se considere que éstas son las enzimas principales, también pueden tener un papel en la hidrólisis del éster otras enzimas, tales como la bifenilhidrolasa (BPH). En general, si la carboxilesterasa hidroliza el éster del aminoácido libre al ácido parenteral también hidrolizará el motivo del éster cuando esté covalentemente conjugado al inhibidor de HDAC, sujeto a la dependencia del N-carbonilo de hCE-2 y hCE-3 estudiada anteriormente. Por lo tanto, el ensayo de células rotas descrito en este documento proporciona una primera criba directa, rápida y simple de los ésteres que tienen el perfil de hidrólisis requerido. Los motivos del éster seleccionados de esta manera pueden ser analizados de nuevo entonces en el mismo ensayo de carboxilesterasa cuando estén conjugados al modulador vía la química de conjugación elegida, para confirmar que todavía es un sustrato de carboxilesterasa en dicha línea de fondo.

Dependiendo del requerimiento de que sean hidrolizables por las enzimas de carboxilesterasa intracelulares, los ejemplos de grupos éster particulares R_1 incluyen a aquellos de fórmula -(C=O)OR_9 en donde R_9 es (i) R_7R_8CH- en donde R_7 es alquil (C_1-C_3)-$(Z^1)_a$-alquilo (C_1-C_3)- opcionalmente sustituido o alquenil (C_2-C_3)-$(Z^1)_a$-alquilo (C_1-C_3)- en donde a es 0 o 1 y Z^1 es -O-, -S- o -NH-, y R_8 e hidrógeno o alquilo (C_1-C_3)- o R_7 y R_8, tomados juntos con el carbono al cual se unen forman un anillo cicloalquilo C_3-C_7 opcionalmente sustituido o un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 átomos de anillo; o (ii) fenilo opcionalmente substituido o heterocíclico monocíclico con 5 o 6 átomos de anillo. Dentro de estas clases, R_9 puede ser, por ejemplo, metilo, etilo, n- o iso-propilo, sec-butilo, ciclohexilo, alilo, fenilo, bencilo, 2-, 3 - o 4-piridilmetilo, N-metilpiperidin-4-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo o metoxietilo. En este caso se prefiere cuando R_9 es ciclopentilo.

Se sabe que los macrófagos desempeñan un papel fundamental en los trastornos inflamatorios por la liberación de citoquinas, en particular, TNFα e IL-1 (van Roon *et al*. *Artritis and Rheumatism*, 2003, 1229-1238). En la artritis reumatoide son los responsables principales del mantenimiento de la inflamación de las articulaciones y de la destrucción de las articulaciones. Los macrófagos también están implicados en el crecimiento y desarrollo de tumores (Naldini y Carraro *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 3-8). Por lo tanto, los agentes que reconozcan selectivamente la proliferación de macrófagos podrían ser de valor en el tratamiento del cáncer y de enfermedades autoinmunes. Se espera que el reconocimiento de tipos de células específicos conlleve a una reducción de los efectos secundarios. Los inventores han descubierto un método para reconocer inhibidores de HDAC frente a macrófagos que está basado en la observación de que el camino en el cual el motivo de esterasa se une al inhibidor de HDAC determina si es hidrolizado, y por lo tanto si se acumula en los diferentes tipos de células. Específicamente, se ha encontrado que los macrófagos contienen la carboxilesterasa humana hCE-1 mientras que otros tipos de células no la contienen. En la fórmula general (I), cuando el nitrógeno del motivo de esterasa R_1R_2 CHNH- no está directamente unido a un carbonilo (-C(=O)-), es decir cuando Y no es un radical -C(=O), -C(=O)O- o -C(=O)NR_3-, el éster sólo será hidrolizado por hCE-1 y por lo tanto los inhibidores de HDAC sólo se acumularán en los macrófagos. En este documento, a menos que sea especificado "monocito" o "monocitos", el término macrófago o macrófagos será usado para nombrar a los macrófagos (incluyendo macrófagos asociado a tumores) y/o monocitos.

La cadena lateral del aminoácido R_2

R_2 es bencilo, fenilo, ciclohexilmetilo, ciclohexilo, piridin-3-ilmetilo, terc-butoximetilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, 1-benciltio-1-metiletilo, 1-metiltio-1-metiletilo, 1-mercapto-1-metiletilo, y feniletilo. Los grupos R_2 normalmente preferidos incluyen fenilo, bencilo, e iso-butilo.

Para los compuestos de la invención que deben ser administrados sistémicamente, se prefieren ésteres con una velocidad lenta de división de carboxilesterasa, ya que son menos susceptibles al metabolismo presistémico. Su capacidad de alcanzar su tejido diana intacto es por lo tanto mayor, y el éster puede ser convertido dentro de las células del tejido diana en el producto ácido. Sin embargo, para la administración local, cuando el éster o bien se aplica directamente al tejido diana o bien se dirigido hacia éste, por ejemplo, por inhalación, a menudo será deseable que el éster tenga una velocidad rápida de división de esterasa, para reducir al mínimo la exposición sistémica y los consiguientes efectos secundarios no deseados. En los compuestos de esta invención, si el carbono adyacente al carbono alfa del éster del éster de aminoácido alfa está monosustituido, es decir R_2 es CH_2R^z (siendo R^z el monosustituyente) entonces los ésteres tienden a dividirse más rápidamente que si dicho carbono está di- o tri-sustituido, como en el caso en el que R_2 es, por ejemplo, fenilo o ciclohexilo.

El radical -Y-L^1-X^1-$[CH_2]_z$

Este radical (o enlace) proviene de la estrategia química particular elegida para unir el motivo del éster de aminoácido $R_1CH(R_2)NH$- al grupo principal A del inhibidor. Claramente la estrategia química para dicho enganche puede variar extensamente, y así son posibles muchas combinaciones de las variables Y, L^1, X^1 y z. Sin embargo, como se menciona anteriormente, cuando el inhibidor se une a la enzima HDAC en su sitio activo, el grupo principal A está localizado en lo alto de la bolsa, o dentro de ésta, que contiene el ion metálico de la enzima, entonces uniendo el motivo del éster de aminoácido al grupo principal, éste generalmente se extiende en una dirección lejos de dicha bolsa, y por eso reduce al mínimo o evita la interferencia con el modo de unión de la plantilla del inhibidor A-[Conector]-CONHOH. Por lo tanto, la combinación precisa de la variable que dispone la química conectadora entre el motivo del éster del aminoácido y el grupo principal A a menudo será irrelevante para el modo de unión primario del compuesto en conjunto. Por otra parte, dicha química de conexión en algunos casos puede captar otras interacciones de unión con la enzima en lo alto de la bolsa que contiene el ión metálico, o adyacente a ésta, realzando así la unión.

También hay que decir que las ventajas del motivo del éster del aminoácido descrito anteriormente (entrada fácil en la célula, hidrólisis de carboxilesterasa dentro de la célula, y acumulación dentro de la célula del producto de hidrólisis de ácido carboxílico activo) se consiguen mejor cuando la conexión entre el motivo del éster del aminoácido y el grupo principal no es un sustrato para la actividad de peptidasa dentro de la célula, lo que podría causar la división del aminoácido de la molécula. Por supuesto, la estabilidad frente a la peptidasas intracelulares es fácilmente probada incubando el compuesto con contenidos de células rotos, y analizando para cualquier de dichas divisiones.

Con las observaciones generales anteriores en mente, tomando las variables que constituyen al radical -Y-L^1-X^1-$[CH_2]_z$ por su parte:

z puede ser 0 o 1, de modo que sea opcional un radical metileno unido al grupo principal A;

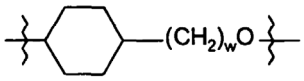
los ejemplos preferidos específicos de Y cuando no se requiere selectividad al macrófago incluyen -(C=O)-, -(C=O)NH-, y -(C=O)O-; cuando se requiere selectividad al macrófago cualquiera de las otras opciones para Y, incluyendo el caso en el que Y es un enlace, son apropiadas.

En el radical L^1, los ejemplos de los radicales Alk^1 y Alk^2, cuando están presentes, incluyen $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, -CH=CH-, $-CH=CHCH_2-$, $-CH_2CH=CH-$, $CH_2CH=CHCH_2-C=C-$, $-C=CCH_2-$, $CH_2C=C-$ y $CH_2C=CCH_2$. Otros ejemplos de Alk^1 y Alk^2 incluyen $-CH_2W-$, $-CH_2CH_2W-$, $-CH_2CH_2WCH_2-$, $-CH_2CH_2WCH(CH_3)-CH_2WCH_2CH_2-$, $-CH_2WCH_2CH_2WCH_2-$ y $--WCH_2CH-$ donde W es -O-, -S-, -NH-, $-N(CH_3)-$ o $-CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)CH_2-$. Otros ejemplos de Alk^1 y Alk^2 incluyen radicales ciclopropilo divalentes, ciclopentilo y ciclohexilo.

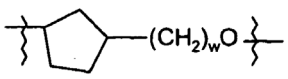
En L1, cuando n es 0, el radical es una cadena hidrocarbonada (opcionalmente sustituida y quizás con una conexión éter, tioeter o amino). En este caso es preferido que no haya ningún sustituyente opcional en L^1. Cuando tanto m como p son 0, L^1 es un radical carbocíclico o heterocíclico divalente mono- o bicíclico con 5 - 13 átomos de anillo (opcionalmente sustituidos). Cuando n es 1 y al menos uno de m y p es 1, L^1 es un radical divalente incluyendo una o varias cadenas hidrocarbonadas y un radical carbocíclico o heterocíclico mono o bicíclico con 5 - 13 átomos de anillo (opcionalmente sustituidos). Cuando está presente, Q puede ser, por ejemplo, un radical fenilo divalente, naftilo, ciclopropilo, ciclopentilo, o ciclohexilo, o un radical heterocíclico mono- o bi-cíclico con de 5 a 13 miembros de anillo, tal como el radical piperidinilo, piperazinilo, indolilo, piridilo, tienilo o pirrolilo, pero en este caso se prefiere 1,4-fenileno.

Específicamente, en algunas realizaciones de la invención, L^1, m y p pueden ser 0 siendo n 1. En otras realizaciones, n y p pueden ser 0 siendo m 1. En otras realizaciones, m, n y p pueden ser todos 0. En otras realizaciones más, m puede ser 0, n puede ser 1 siendo Q un radical heterocíclico monocíclico, y p puede ser 0 o 1. Alk^1 y Alk^2, cuando están presentes, pueden ser seleccionados de $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ y $-CH_2CH_2CH_2-$ y Q puede ser 1,4-fenileno.

Los ejemplos específicos del radical -Y-L^1-X^1-$[CH_2]$- incluyen -C(=O)- y -C(=O)NH- así como $-(CH_2)-_v$, $-(CH_2)_vO-$, $-C(=O)-(CH_2)_v-$, $-C(=O)-(CH_2)_vO-$, $-C(=O)-NH-(CH_2)_w-$, $-C(=O)-NH-(CH_2)_wO-$

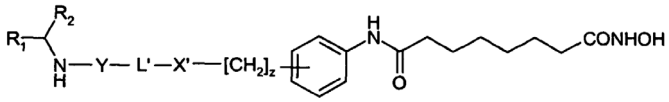


y

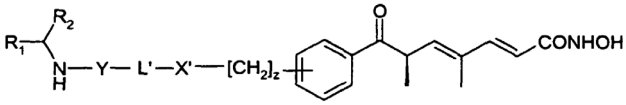


en donde v es 1, 2, 3 o 4 y w es 1, 2 o 3, tal como $-CH_2-$, $-CH_2O-$, $-C(=O)-CH_2-$, $-C(=O)-CH_2O-$, $-C(=O)-NH-CH_2-$ y $-C(=O)-NH-CH_2O$.

Los ejemplos de subconjuntos particulares de compuestos de la invención incluyen a aquellos de la fórmula (ID) y (IF);



(ID)



(IF)

en donde z, R_1, R_2, R_3, L^1 y X^1 y Y son como se define con relación a la fórmula (I), y como se menciona anteriormente, incluyendo sus preferencias.

Los ejemplos de compuestos específicos de la invención incluyen lo siguiente:

éster de ciclopentilo del ácido (S)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético,

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-fenil-butírico

éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético,

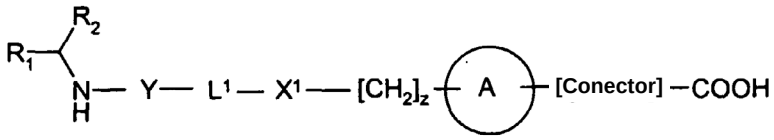
éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-metil-pentanoico

éster de ciclopentilo del ácido (S)-{2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenil]-etilamino}-fenil-acético

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-propilamino}-3-fenil-propionico

Los compuestos de la invención se pueden preparar, por ejemplo, por los métodos descritos más abajo y en los Ejemplos de este documento.

Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de los ácidos carboxílico correspondientes (II)



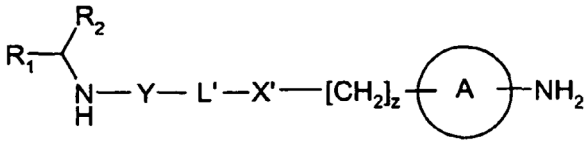
(II)

por reacción de su derivado activado, tal como cloruro de ácido, con hidroxilamina o una versión protegida de hidroxilamina.

O bien, se puede desproteger un precursor N- o O-protegido o N,O-diprotegido del compuesto deseado (I). En una versión útil de este método la O-protección es proporcionada mediante un soporte de resina, a partir del cual el ácido hidroxámico deseado (I) puede dividirse, por ejemplo, por hidrólisis ácida.

Los derivados protegidos de carboxilo de los compuestos (II), o los derivados soportados por la resina O-unidos de los compuestos (II) de la invención se pueden sintetizar por etapas por los métodos de la bibliografía, seleccionadas según la estructura particular del compuesto deseado. En dicha conexión, las publicaciones de patente expuestas anteriormente proporcionan información sobre la síntesis de inhibidores de HDAC que son estructuralmente similares a los de la presente invención.

En un enfoque, conveniente para los compuestos (I) en los que Z es un radical sulfonamido $-NHSO_2-$, una amina (III)

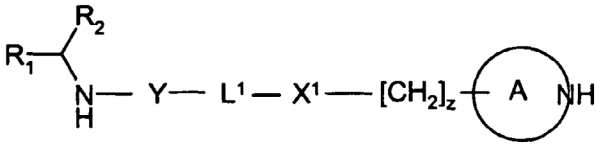


(III)

puede hacerse reaccionar con un derivado activado, por ejemplo el cloruro de ácido, de un ácido sulfónico $HOSO_2$-L^2-Z^2 en donde Z^2 es un grupo carboxilo protegido, tal como el éster divisible, o un grupo del ácido hidroxámico soportado por la resina O-unido.

En otro enfoque, conveniente para los compuestos (I) en donde Z es el radical amida -NHC(=O)-, una amina (III) puede hacerse reaccionar con un ácido carboxílico HOC(=O)-L-Z^2, Z^2 como se define en el párrafo precedente, en presencia de un agente de acoplamiento de carbodiimida.

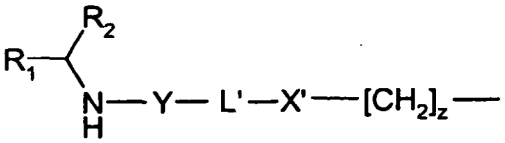
El caso de los compuestos (I) donde el anillo o el sistema de anillos A están unidos al - resto del -Conector-CONHOH vía un nitrógeno de anillo, y Z es -(C=O)- o-SO_2-, N-heterociclo (IV) apropiado



(IV)

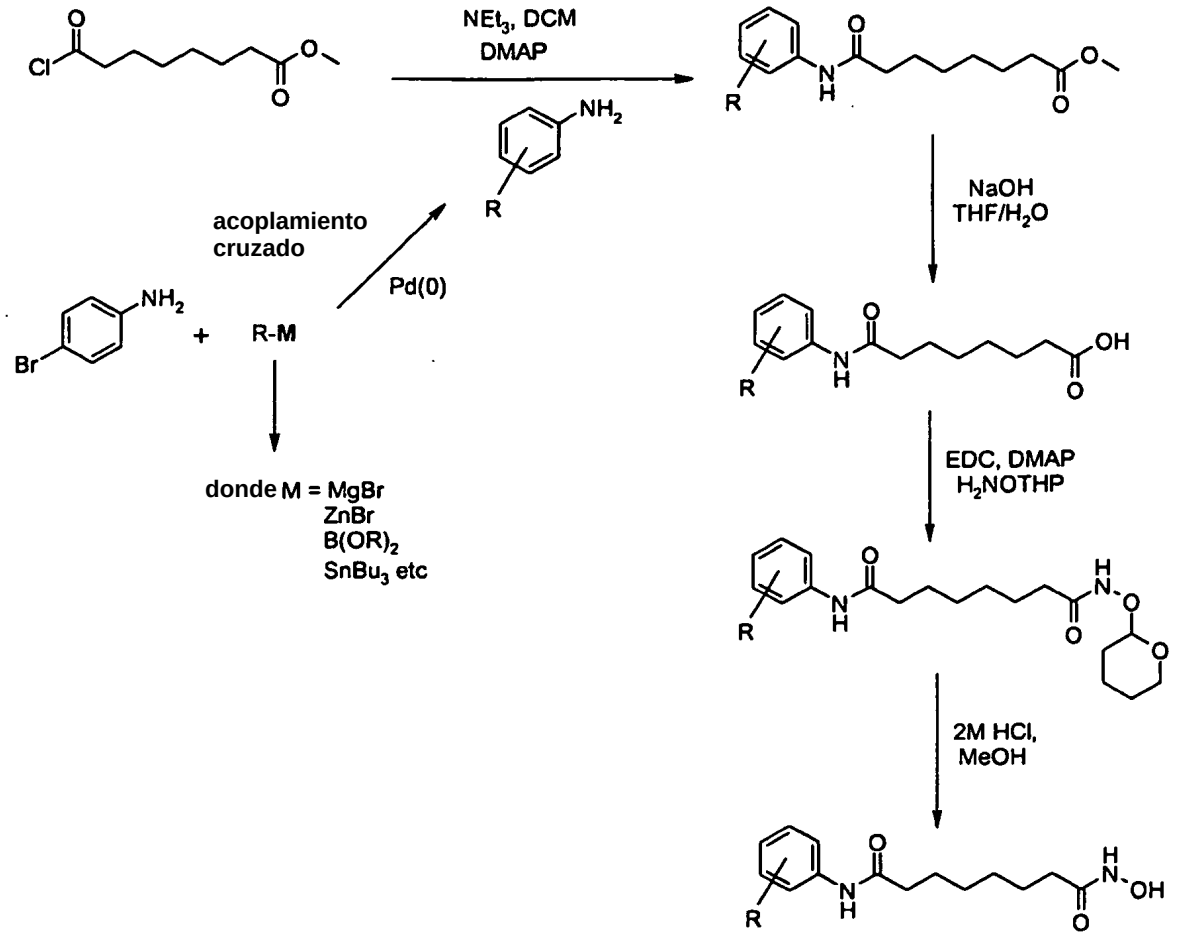
puede hacerse reaccionar con el ácido carboxílico o sulfónico correspondiente (es decir HOOC-L^2-Z^2 o $HOSO_2$-L^2-Z^2 en donde Z^2 es como se define anteriormente), como su derivado activado, tal como cloruro, o en presencia de un agente de acoplamiento de carbodiimida.

Para una mejor ilustración del uso de los métodos de la bibliografía para la síntesis de compuestos dentro del ámbito de la fórmula (I) anterior, se presentan los esquemas de reacción siguientes 1-6. En estos esquemas el grupo R representa al radical



presente en los compuestos de la invención, o representa un grupo funcional sobre el cual aquel radical puede aumentarse usando los métodos de la bibliografía.

También en los esquemas, el símbolo representa un soporte de la resina en fase sólida.



Esquema 5

Como se menciona anteriormente, los compuestos de los cuales se ocupa la invención son inhibidores de HDAC, y pueden ser, por lo tanto, de uso en el tratamiento de enfermedades de células proliferativas, tales como el cáncer, en seres humanos y otros mamíferos.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso del cuerpo, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración, la velocidad de excreción, la combinación del fármaco y la seriedad de la enfermedad particular que conlleva el tratamiento. Los niveles de dosis óptimos y la frecuencia de la medicación serán determinados mediante el análisis clínico.

Los compuestos a los cuales se refiere la invención se pueden preparar para su administración por cualquier ruta consecuente con sus propiedades farmacocinéticas. Las composiciones oralmente administrables pueden ser comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas, líquidos o preparaciones de gel, tales como soluciones parenterales estériles o suspensiones orales o tópicas. Los comprimidos y las cápsulas para la administración oral pueden estar en la forma de una presentación de dosis unitaria, y pueden contener excipientes convencionales, tales como espesantes, por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes de compresión, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo, almidón de patata o agentes humectantes aceptables, como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden ser revestidos según métodos conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma, por ejemplo, de suspensiones acuosas o aceitosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, por ejemplo, sorbitol, jarabe, metil-celulosa, jarabe de glucosa, grasas comestibles hidrogenadas de gelatina; agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; vehículos no acuosos (que puede incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres aceitosos, tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico y, de ser deseado, aromatizantes convencionales o agentes colorantes.

Para su aplicación tópica a la piel, el fármaco puede prepararse como una crema, loción o ungüento. Las formulaciones en crema o ungüento que se pueden usar para el fármaco son formulaciones convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, tales como las descritas en los libros de texto estándares de farmacia, como en la Farmacopea Británica.

Para su aplicación tópica por inhalación, el fármaco se puede formular para su administración como aerosol, por ejemplo, mediante una presión impulsada por atomizadores o atomizadores ultrasónicos, o preferiblemente por aerosoles medidos impulsados por el propelente o la administración sin propelente de polvos micronizados, por ejemplo, cápsulas de inhalación u otros sistemas de administración de "polvo seco". Pueden estar presentes en dichas formulaciones inhaladas excipientes, tales como, por ejemplo, propelentes (p.ej. Frigen en caso de aerosoles medidos), sustancias tensioactivas, emulsores, estabilizadores, conservantes, aromatizantes y cargas (p.ej, lactosa en el caso de inhaladores en polvo). Para fines de inhalación, hay un gran número de aparatos disponibles con los que pueden ser generados y administrados aerosoles con un tamaño de partículas óptimo, usando alguna técnica de inhalación que sea apropiada para el paciente. Además del uso de adaptadores (espaciadores, extensores) y recipientes en forma de pera (p.ej. Nebulator®, Volumatic®), y dispositivos automáticos que emiten aerosoles (Autohaler®), para aerosoles medidos, en particular en el caso de inhaladores en polvo, están disponibles varias soluciones técnicas (p.ej. Diskhaler®, Rotadisk®, Turbohaler® o, por ejemplo, los inhaladores que se describen en la solicitud de patente europea EP 0 505321).

Para su aplicación tópica al ojo, el fármaco puede prepararse como una disolución o suspensión en un vehículo acuoso estéril adecuado o no acuoso. También se pueden incluir aditivos, por ejemplo, tampones, tales como metabisulfito de sodio o edeato de disodio; conservantes incluyendo agentes bactericidas y fungicidas, tales como acetato o nitrato de fenil-mercúrico, cloruro de benzalkonio o clorhexidina y agentes espesantes, tal como la hipromelosa.

El ingrediente activo también puede ser administrado parenteralmente en un medio estéril. Según el vehículo y la concentración usada, el fármaco puede ser suspendido o disuelto en un vehículo. Ventajosamente, pueden disolverse en el vehículo adyuvantes, tales como un anestésicos locales, conservante y agentes tampón.

Las siguientes síntesis ilustran la preparación de compuestos de éster específicos de la invención y sus ácidos carboxílicos correspondientes y sus propiedades inhibitorias HDAC: En las síntesis:

Se usaron reactivos comercialmente disponibles y los disolventes (grado HPLC) sin otra purificación. La irradiación por microondas fue realizada usando un reactor microondas enfocado CEM Discover. Los disolventes fueron quitados usando una GeneVac Series I sin calentamiento o una Genevac Series II con VacRamp a 30°C o un evaporador rotatorio Buchi.

La purificación de los compuestos por cromatografía de columna de detestello fue realizada usando gel de sílice, tamaño de partículas 40-63 μm (230-400 malla) obtenido de Silicycle. La purificación de compuestos por HPLC preparatoria fue realizada con un sistema Gilson usando columnas C18 ThermoHypersil-Keystone-Hiperprep HS de fase inversa (12 μm, 100 X 21,2 mm), gradiente 20-100 % B (A = agua / TFA al 0,1 %, B = acetonitrilo/TFA al 0,1 %) más de 9,5 minutos, flujo = 30 ml/min, disolvente de inyección 2:1 DMSO: acetonitrilo (1,6 ml), detección por UV a 215 nm.

Los espectros ^{1}H RMN fueron registrados en un espectrómetro AV de 400 MHz de Bruker en disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) están en partes por millón. El análisis por cromatografía de capa fina (TLC) fue realizado con placas Kieselgel 60 F_{254} (Merck) y se visualizó utilizando luz UV.

La HPLCMS analítica fue realizada en Agilent HP1100, sistemas Waters 600 o Waters 1525 LC usando columnas C18 Hypersil BDS de fase inversa (5 μm, 2,1 X 50 mm), gradiente 0-95 % B (A = agua / TFA al 0,1 %, B = acetonitrilo/TFA al 0,1 %) durante 2,10 minutos, flujo = 1,0 ml/min. Los espectros UV fueron registrados a 215 nm utilizando un Detector Gilson de la Serie Diodo de G1315A, detector UV G1214A de longitud de onda única, detector UV 2487 de Waters de longitud de onda dual, detector UV 2488 de Waters de longitud de onda dual, o detector UV 2996 de Waters de serie diodo. Los espectros de masa fueron obtenidos del intervalo m/z de 150 a 850 a una velocidad de muestreo de 2 exploraciones por segundo o 1 exploración por 1,2 segundos usando LCT Micromass con interfaz de Z-spray o LCT micromass con interfaz multiplexor o Z-spray. Los datos fueron integrados y publicados utilizando el software de OpenLynx y OpenLynx Browser.

Se han usado las siguientes abreviaturas:

MeOH = metanol

EtOH = etanol

EtOAc = acetato de etilo

Boc = terc-butoxicarbonilo

Cbz = carbobenciloxi

DCM = diclorometano

DCE = dicloroetano

DMF = dimetilformamida

DMSO = dimetil-sulfóxido

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

Na_2CO_3 = carbonato de sodio

HCl = ácido clorhídrico

DIPEA = diisopropiletilamina

NaH = hidruro de sodio

NaOH = hidróxido de sodio

$NaHCO_3$ = hidrógeno carbonato de sodio

Pd/C = paladio sobre carbono

TBME = metil-terc-butil-éter

DMAP = 4-Dimetilaminopiridina

N_2 = nitrógeno

PyBop = hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidin-fosfonio

Na_2SO_4 = sulfato de sodio

Et_3N = trietilamina

NH_3 = amoníaco

TMSCl = trimetilclorosilano

NH_4Cl = cloruro de amonio

$LiAlH_4$ = hidruro de litio y aluminio

pyBrOP = hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidin-fosfonio

$MgSO_4$ = sulfato de magnesio

MnO_2 = dióxido de manganeso

^nBuLi = n-butilitio

CO_2 = dióxido de carbono

EDCI = hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida

Et_2O = dietil-éter

LiOH = hidróxido de litio

HOBt = 1-hidroxibenzotriazol

DIAD = azodicarboxilato de diisopropilo

HATU = hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiluronio

ELS = Dispersión de luz evaporativa

TLC = Cromatografía de capa fina

ml = mililitro

g = gramo (s)

mg = miligramo (s)

mol = moles

mmol = milimol (es)

eq = moles equivalente

LCMS = Cromatografía líquida de alta resolución / Espectrometría de masas

NMR = Resonancia Magnética Nuclear

t.a. = Temperatura ambiente

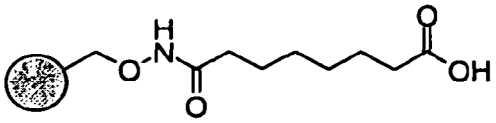
Procedimiento de lavado estándar para la química de resinas

La resina fue lavada con la secuencia siguiente: DMF, MeOH, DMF, MeOH, DCM, MeOH, DCM, MeOH x 2, TBME x 2.

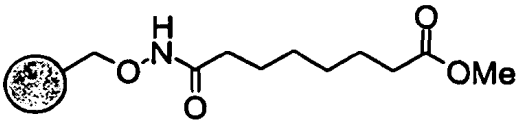
División de análisis de la resina

Una pequeña cantidad de la resina de hidroxilamina 2-clorotritilo funcionalizada (aprox. 0,3 ml de mezcla de reacción, aprox. 10 mg de resina) se trató con TFA/DCM al 2% (0,5 ml) durante 10 min a temperatura ambiente. La resina se filtró y el filtrado se concentró insuflando con una corriente de gas N_2. Se obtuvo la LCMS del residuo. (Nota: Para el ensayo de resina Wang de hidroxilamina funcionalizada la división se llevó a cabo usando TFA / DCM al 50%).

Preparación de la resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada de ácido subérico

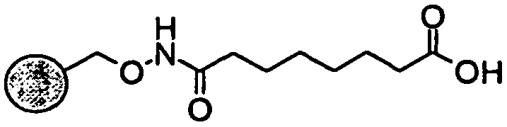


Etapa 1 - Inmovilización en la resina de 2-clorotritil-O-NH_2



A una matraz de fondo redondo cargado con la resina de 2-clorotritil-O-NH_2 (6 g, cargando a 1,14 mmol/g, 6,84 mmol) y DCM (60 ml) se añadió diisopropiletilamina (5,30, 41,0 mmol, 6 eq). Se añadió lentamente a la mezcla de reacción con agitación orbital 8-cloro-8-oxooctanoato de metilo (4,2 g, 20,5 mmol, 3 eq) y la mezcla de reacción se agitó durante 48 horas. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío. La pureza LCMS se determinó mediante detección ELS, 100%, m/z 204 $[M^+ + H]^+$.

Etapa 2- saponificación

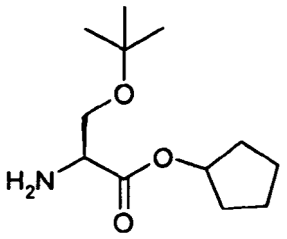


A una matraz de fondo redondo cargado con la resina de la etapa 1 (4 g, cargando a 1,14 mmol/g, 4,56 mmol) se añadió THF (16 ml) y MeOH (16 ml). A la reacción se añadió una disolución de NaOH (0,91 g, 22,8 mmol, 5 eq) en agua (16 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío. La pureza LCMS se determinó mediante detección ELS, 100% m/z 190 $[M^{+}+H]^{+}$.

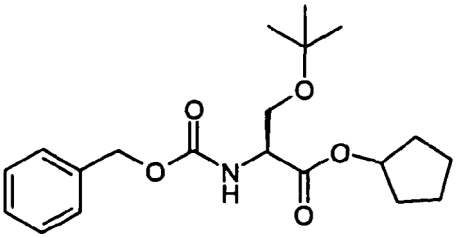
Preparación de ésteres se ciclopentilo

Los ésteres se prepararon de acuerdo con uno de los siguientes métodos.

Método A- Síntesis del éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-amino-3-terc-butoxi-propionico

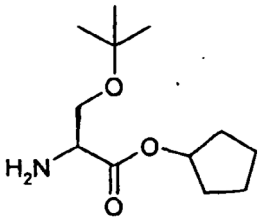


Etapa 1: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-terc-butoxi-propionico



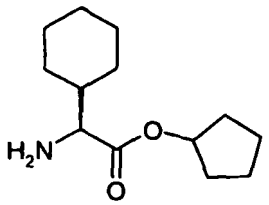
Se disolvió en DMF (40 ml) el ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-terc-butoxi-propionico (4g, 0,014 mol). Se añadieron ciclopentanol (2,54 ml, 0,027 mol) y dimetilaminopiridina (0,165 g, 0,014 mol). La disolución se enfrió a 0°C usando un baño de hielo y se añadió a esto hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (2,73 g, 0,014 mol, 1,05 eq.). La mezcla se agitó a 0°C durante 10 minutos y luego se dejó calentar a t.a. y se agitó durante 18 horas más. A la mezcla de reacción se añadió agua (20-30 ml) seguido de EtOAc (40 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (15 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (4 x 20 ml), se secaron ($MgSO_4$) y el disolvente se eliminó in vacuo para dar un residuo. La purificación por cromatografía de columna (1:1 EtOAc/heptano) proporcionó el producto como un aceite incoloro (3,82g, 78% rendimiento). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 1,15 (9H, s, CH_3 x 3), 1,50-1,90 (8H, m, CH_2 x 4), 3,57 (1H, dd, J = 7,4, 1,2Hz, CH), 3,85 (1H, dd, J = 7,4, 1,2Hz, CH), 4,45 (1H, m, CH), 5,15 (2H, s, CH_2), 5,25 (1H, m, CH), 5,65 (1H, d, CH, J = 7,6Hz), 7,30-7,50 (5H, m, ArH x 5).

Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-amino-3-terc-butoxipropionico

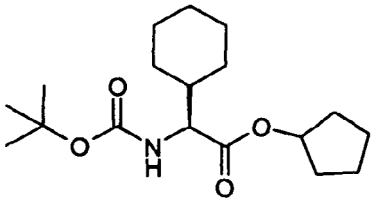


Se disolvió el éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-terc-butoxi-propionico (3,82 g, 0,011 mol) en EtOH (50 ml). Se añadió con cuidado a la disolución 20% en peso hidróxido de paladio (húmedo). El sistema se evacuó y se puso bajo una atmósfera de hidrógeno durante 4 horas. El sistema se evacuó y los residuos de paladio se filtraron a través de Celite. El Celite se lavó a fondo con EtOH (3 x 5 ml). El disolvente del filtrado se eliminó *in vacuo* para dar el producto como un aceite incoloro (2,41 g, 100% rendimiento). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 1,15 (9H, s, CH_3 x 3), 1,50-1,90 (10H, m, CH_2 x 4, NH_2), 3,50-3,70 (3H, m, CH_2, CH), 5,22 (1H, s, CH).

Método B- Síntesis del éster de ciclopentilo del ácido (S)-amino-ciclohexil-acético

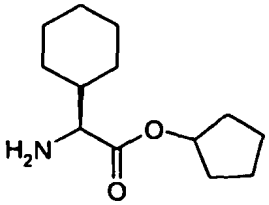


Etapa 1: éster de ciclopentilo del ácido (S)-terc-butoxicarbonilamino-ciclohexil-acético



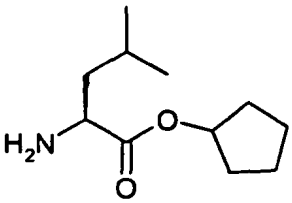
Esto se preparó de la misma manera que el éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-terc-butoxi-propionico (Método A, Etapa 1) pero a partir del ácido (S)-terc-butoxicarbonilamino-ciclohexil-acético. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 1,00-1,40 (10H, m, CH x 10), 1,45 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 1,60-2,00 (8H, m, 4 x CH_2), 4,15 (1H, m, CH), 5,05 (1H, d, NH, J = 7,6Hz), 5,25 (1H, m, CH).

Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-amino-ciclohexil-acético

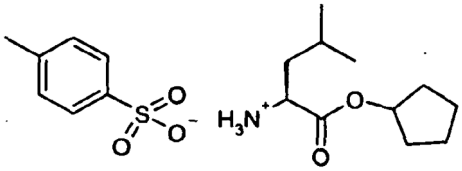


Se disolvió el éster de ciclopentilo del ácido (S)-terc-butoxicarbonilamino-ciclohexil-acético (1,17g, 3,60 mmol) en una mezcla de TFA / DCM (1:1, 10 ml) a 0°C. La disolución se agitó durante 90 minutos, el disolvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se destiló a azeótropo con una mezcla DCM / heptano (2x) para dar una goma. La goma se redisolvió en DCM (10 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (3 x 10 ml), se secó ($MgSO_4$) y se filtró. El disolvente del filtrado se eliminó *in vacuo* para dar el producto como un aceite (0,780 g, 78% rendimiento). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 1,00-1,40 (10H, m, CH x 10), 1,50-2,00 (8H, m, CH x 8), 3,25 (1H, d, CH, J = 7,2Hz), 5,20 (1H, m, CH).

Método C-Síntesis del éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico

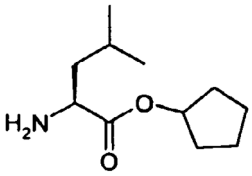


Etapa 1: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico del ácido tolueno-4-sulfónico



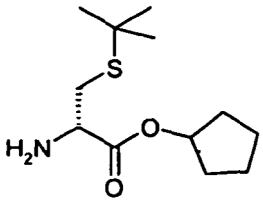
A una suspensión de (S)-leucina (15g, 0,11 mol) en ciclohexano (400 ml) se añadió ciclopentanol (103,78 ml, 1,14 mmol) y ácido p-toluenosulfónico (23,93 g, 0,13 mol). La suspensión se calentó a reflujo para causar la solvatación. Después del reflujo durante 16 horas la disolución se enfrió para dar una suspensión blanca. Se añadió heptano (500 ml) a la mezcla y la suspensión se filtró para dar el producto como un sólido blanco (35 g, 85% rendimiento). ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ: 1,01 (6H, t, CH_3 x 2, J = 5,8Hz), 1,54-2,03 (11H, m, 11 x CH), 2,39 (3H, s, CH_3), 3,96 (1H, t, CH, J = 6,5Hz), 5,26-5,36 (1H, m, CH), 7,25 (2H, d, ArH x 2, J = 7,9Hz), 7,72 (2H, d, ArH x 2, J = 8.3Hz).

Etapa 2: Síntesis del éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico

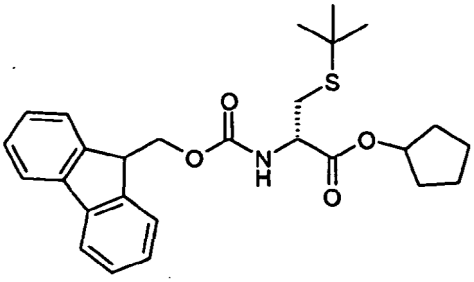


Una disolución del éster de ciclopentilo del ácido del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico tolueno-4-sulfónico (2,57 g, 0,013 mol) en DCM (5 ml) se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2 x 3 ml). Las capas acuosas combinadas se extrajeron de nuevo con DCM (3 x 4 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$), y el disolvente se eliminó *in vacuo* para dar un aceite incoloro (1,10 g, 80% rendimiento). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 0,90 (6H, t, CH_3 x 2, J = 6,4Hz), 1,23-1,94 (11H, m, 5 x CH_2, CH), 3,38 (1H, dd, CH, J = 8,4, 5,9Hz), 5,11-5,22 (1H, m, CH).

Método D-Síntesis del éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-amino-3-terc-butilsulfanil-propionico

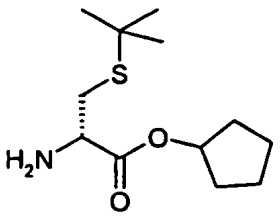


Etapa 1: éster de ciclopentilo del ácido (S)-3-terc-butilsulfanil-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-propionico



Este se preparó de la misma manera que el éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-terc-butoxi-propionico (Método A, Etapa 1) pero a partir del ácido (S)-3-terc-butilsulfanil-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-propionico. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 1,30 (9H, s, $(CH_3)_3$), 1,55-1,95 (8H, m, CH_2 x 4), 3,05 (2H, d, CH_2, J = 4,8Hz), 4,20-4,30 (1H, m, CH), 4,40 (2H, d, CH_2, J = 7,5Hz), 4,65 (1H, m, CH), 5,25 (1H, m, CH), 5,70 (1H, d, NH, J = 7,8Hz), 7,30-7,50 (4H, m, ArH x 4), 7,65 (2H, d, J = 7,5Hz, ArH x 2), 7,80 (2H, d, J = 7,5Hz, ArH x 2).

Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-amino-3-terc-butilsulfanil-propionico



Se disolvió el éster de ciclopentilo del ácido (S)-3-terc-butilsulfanil-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-propionico (1,63g, 3,50 mmol) en CH_3CN (25 ml) a 0°C. Se añadió piperidina (21 ml) a la disolución. Después de agitar durante 30 minutos, el disolvente se eliminó *in vacuo* para dar un residuo. La purificación por cromatografía de columna (eluente EtOAc) proporcionó el producto como un aceite incoloro (628 mg, 73% rendimiento). ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 1,30 (9H, s, $(CH_3)_3$), 1,55-1,95 (8H, m, CH_2 x 4), 2,75 (1H, dd, CH, J = 7,2, 12,3Hz), 2,95 (1H, dd, CH, J = 4,8, 12,3Hz), 5,25 (1H, m, CH).

Los siguientes aminoácidos N-Cbz protegidos fueron convertidos en los ésteres de ciclopentilo de acuerdo con el Método A (anterior)

éster de 4-terc-butilo del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-succínico

ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-succinámico

ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-4-carbamoil-butírico

ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-(4-terc-butoxi-fenil)-propiónico

ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-hidroxi-butírico

ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3,3-dimetil-butírico

ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-(1H-indol-2-il)-propiónico

ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-6-terc-butoxicarbonilamino-hexanoic

Los siguientes aminoácidos N-Boc protegidos fueron convertidos en los ésteres de ciclopentilo de acuerdo con el Método B (anterior)

ácido terc-butoxicarbonilamino-acético

ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-pentanoico

éster de 1-terc-butilo ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico

ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butírico

ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butírico

Los siguientes aminoácidos libres fueron convertidos en los ésteres de ciclopentilo de acuerdo con el Método C (anterior)

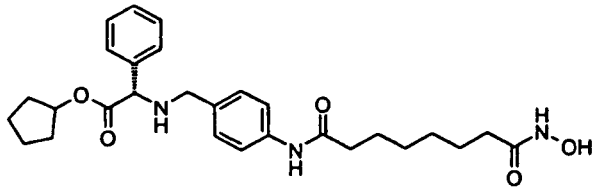
ácido (S)-amino-fenil-acético

ácido (S)-amino-3-fenil-propionico

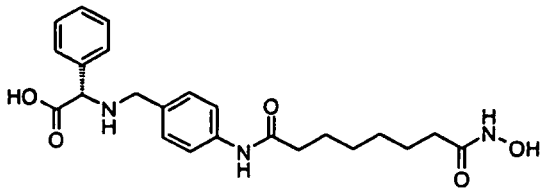
ácido (S)-amino-propiónico

ácido (S)-amino-4-metil-pentanoico

Síntesis del Compuesto (20) y Compuesto (21)

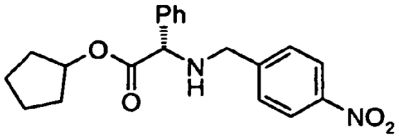


20



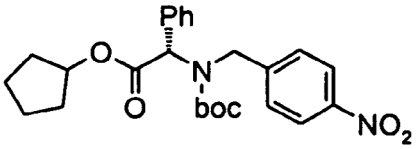
21

Etapa 1: éster de ciclopentilo del ácido (S)-(4-nitro-bencilamino)-fenil-acético



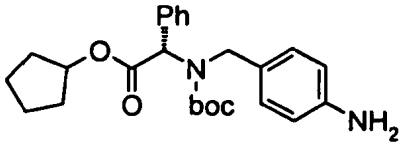
Una mezcla de bromuro de 4-nitrobencilo (15 g, 69,4 mmol), sal de tosilo del éster de ciclopentilo de L-fenilglicina (27,1g, 60,4 mmol) y carbonato de potasio (19,6g, 138,8 mmol) en DMF (250 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 18h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (300 ml) y se lavó con agua (3 x 200 ml). La capa de EtOAc se aisló, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró hasta secarse proporcionando un aceite de color naranja. Se aisló un peso crudo de 21 g. La pureza LCMS 81%, m/z 355 $[M^+ + H]^+$. Este producto fue usado sin purificarlo más.

Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[terc-butoxicarbonil-(4-nitro-bencil)-amino]-fenil-acético



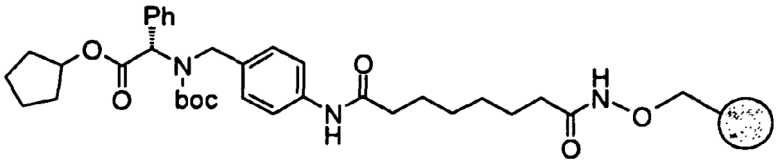
A una disolución del producto de la Etapa 1 (15 g, 42,37 mmol) en THF (150 ml) se añadió K_2CO_3 (6,9g, 50,8 mmol), seguido de di-t-butildicarbonato (22,2g, 101,7 mmol). Se añadió agua (150 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 36h. La mezcla de reacción se evaporó hasta secarse. El residuo se redisolvió en EtOAc (300 ml), se lavó consecutivamente con HCl 0,1 M (150 ml), $NaHCO_3$ sat. ac. y agua (150 ml). La capa de EtOAc se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró hasta secarse proporcionando un aceite amarillo. Después de la purificación por cromatografía de columna (10% EtOAc/ hexano) el producto se obtuvo como un aceite amarillo claro (12 g, 62% rendimiento).La pureza LCMS 95%, m/z 455 $[M^+ + H]^+$, 496 $[M^+ + H + 41]^+$.

Etapa 3: ácido ciclopentilo del éster de (S)-[(4-amino-bencil)-terc-butoxicarbonil-amino]-fenil-acético



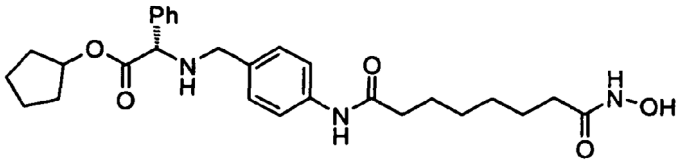
Una mezcla del producto de la Etapa 2 (12g, 26,4 mmol) y 10% Pd/C (2,0g) en EtOAc (350 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente durante 18h. El catalizador Pd/C se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un sólido blanco (10,1 g, 90% rendimiento). La pureza LCMS 100%, m/z 425 $[M^+ + H]^+$, 466 $[M^+ + H + 41]^+$.

Etapa 4: Acoplamiento de la etapa 3 anilina



Se hinchó resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (1,0 g, cargando 0,94 mmol) en DCM anhidro (100 ml). Se añadió 1-cloro-N,N-2-trimetilpropenilamina (reactivo Ghosez)[1] (0,373 ml, 2,82 mmol, 3 eq) a 0 °C bajo una atmósfera de N_2. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó suavemente durante 1-2h. Se añadió la anilina de la Etapa 3 (1,2 g, 2,82 mmol, 3 eq) a porciones durante 20 min. Se añadió Et_3N (0,53 ml, 3,76 mmol, 4 eq). La mezcla se agitó durante 1 h. La LCMS después de un ensayo de división muestra una conversión del 70%, m/z 596 $[M^+ + H]^+$. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

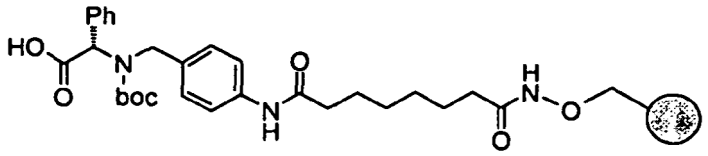
Etapa 5: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (20)



20

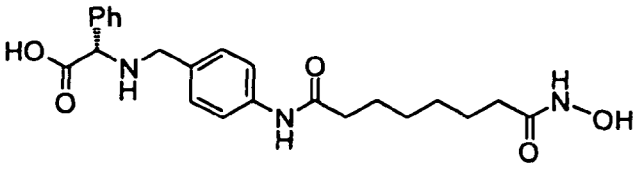
La resina de la Etapa 4 (1,5 g, cargando 0,94 mmol) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a t.a. para dar un residuo. Este residuo se dejó sedimentando en TFA/DCM al 20% durante 40 min. Después de evaporarse hasta secarse, también bajo presión reducida y a t.a., el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (20) como una sal de TFA, pureza LCMS 95%, m/z 496 $[M^+ + H]^+$, ^1H RMN (400 MHz, DMSO), δ: 1,30-1,50 (6 H, m, 3 x CH_2), 1,50-1,70 (8H, m, 4 x CH_2), 1,80 (2 H, m, CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,45 (2 H, t, CH_2), 4,1 (2 H, dd, CH_2NH), 5,25 (1 H, m, CHOCO), 5,35 (1 H, m, OCOCHPh), 7,45 (2 H, d, Ar), 7,60 (5 H, m, Ar), 7,80 (2 H, d, Ar), 10,00-10,10 (2 H, s ancho), 10,50 (1 H, s).

Etapa 6: Saponificación del éster de ciclopentilo



La resina de la Etapa 4 (2,5g, cargando, 0,94 mmol, 2,35 mmol) se suspendió en MeOH (8,7 ml) y THF (8,7 ml). Se añadió una disolución ac. de NaOH 2,7 N (8,8 ml, 10 eq, 23,5 mmol). La mezcla se agitó durante 36h. La LCMS de la división de ensayo confirmó que la reacción había acabado, m/z 528 $[M^+ + H]^+$. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

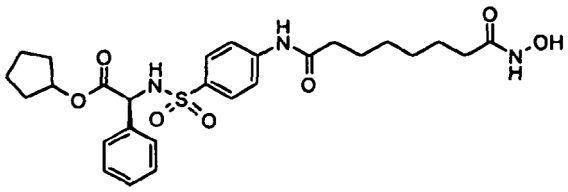
Etapa 7: ácido (S)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (21)



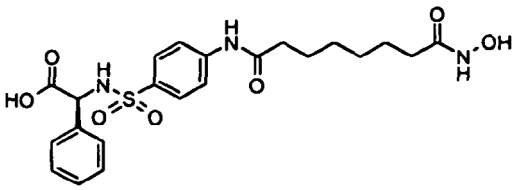
21

La resina de la Etapa 6 (2,5 g, cargando 0,94 mmol, 2,35 mmol) se dividió y se desprotegió en boc usando el procedimiento expuesto para la Etapa 5. El producto crudo (0,40g) se purificó por HPLC preparativa dando el compuesto (21) como una sal de TFA. Pureza LCMS 100%, m/z 428 [M++H], ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD), δ: 1,30 (4 H, 2 x CH_2), 1,55 (4 H, 2 x CH_2), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,30 (2 H, t, CH_2), 3,90 (1 H, s, $NHCH_2$), 4,05 (2 H, dd, $NHCH_2$), 4,95 (1 H, s, CHPh), 7,35 (2 H, d, Ar), 7,40 (5 H, m, Ar), 7,55 (2 H, d, Ar).

Síntesis del Compuesto (22) y Compuesto (23)

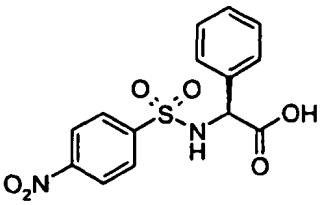


22



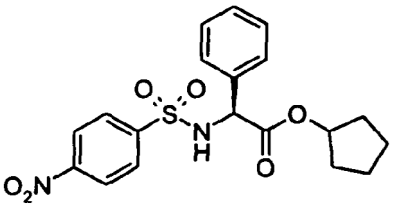
23

Etapa 1: ácido (S)-(4-nitro-bencenosulfonilamino)-fenil-acético



A una disolución de L-fenilglicina (0,227 g, 1,5 mmol) en agua (5 ml) y dioxano (5 ml) se añadió trietilamina (0,42 ml, 3,0 mmol) seguido de una adición lenta de cloruro de 4-nitrobenceno-sulfonilo (0,5g, 2,3 mmol) en dioxano (5 ml) a 0°C. Después de agitar durante 45 minutos, la mezcla de reacción se evaporó hasta secarse, se disolvió de nuevo en EtOAc y se lavó con una disolución de $NaHCO_3$ saturada (2 x 20 ml) y agua (10 ml). La capa de EtOAc se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó hasta secarse. La pureza LCMS 75%, (ion molecular no observado) rendimiento 0,58 g (76%). Este material se usó sin purificarse más.

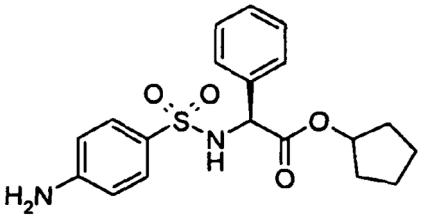
Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-(4-nitro-bencenosulfonilamino)-fenil-acético



A una disolución del ácido de la Etapa 1 (4,32 g, 12,8 mmol) en ciclopentanol (60 ml) a 0°C se añadió lentamente cloruro de tionilo (9,3 ml, 128 mmol). La mezcla de reacción se agitó y se calentó bajo reflujo a 70°C durante 2 horas. El exceso de cloruro de tionilo se eliminó por evaporación *in vacuo*, la mezcla de reacción se extrajo con

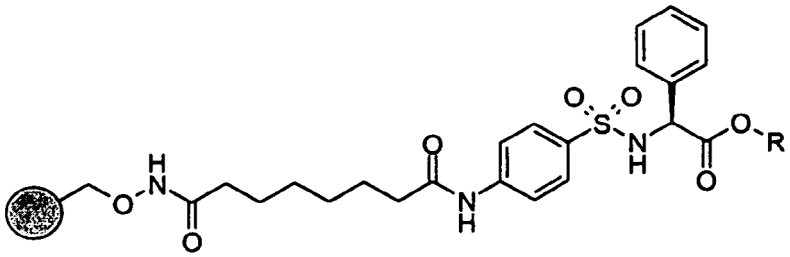
EtOAc y se lavó con una disolución de $NaHCO_3$ saturada y se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó hasta secarse. La purificación en cromatografía de columna por destello con DCM dio el producto requerido (3,6 g, 70% rendimiento). Pureza LCMS de 100%, (ion molecular no observado).

Etapa 3: éster de ciclopentilo del ácido (S)-(4-amino-bencenosulfonilamino)-fenil-acético



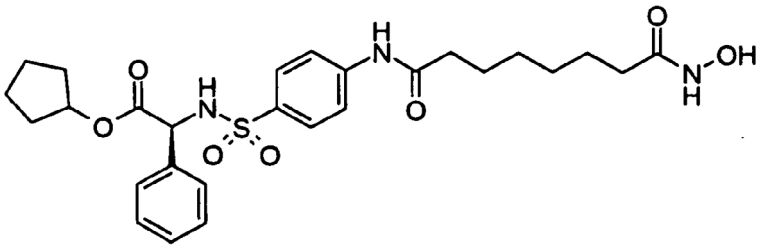
Una mezcla de éster de ciclopentilo del ácido (S)-(4-nitro-bencenosulfonilamino)-fenil-acético (5,29g, 13,1 mmol) y Pd/C al 10% (5,0 g) en EtOAc (350 ml) se hidrogenó bajo presión de balón a temperatura ambiente durante 24h. El catalizador Pd/C se separó por filtración a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto requerido (4,54 g, 92% rendimiento). Pureza LCMS 100%, m/z 375 $[M^+ + H]^+$.

Etapa 4: Acoplamiento de anilina



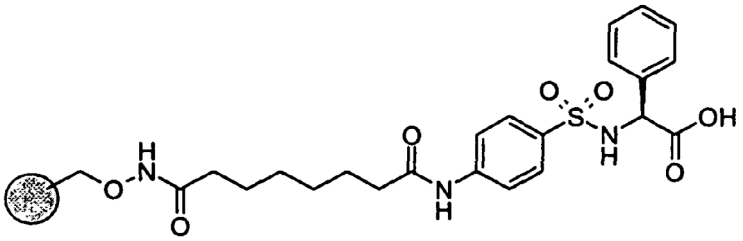
La resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (0,39 g, cargando 1,14 mmol/g) se hinchó en DCM anhidro (25 ml) y, a 0°C bajo una atmósfera de N_2, se añadió gota a gota 1-cloro-N,N, 2-trimetilpropenilamina (0,175 ml, 1,33 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas. Una disolución de la anilina de la Etapa 3 (0,5 g, 1,33 mmol) en DCM (25 ml) se añadió seguido de trietilamina (0,25 ml, 1,76 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante más 10 minutos. La LCMS después de un ensayo de división mostró una conversión de 61%, m/z 546 $[M^+ + H]^+$. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío y se usó en la siguiente etapa.

Etapa 5: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencenosulfonilamino]-fenil-acético (22)



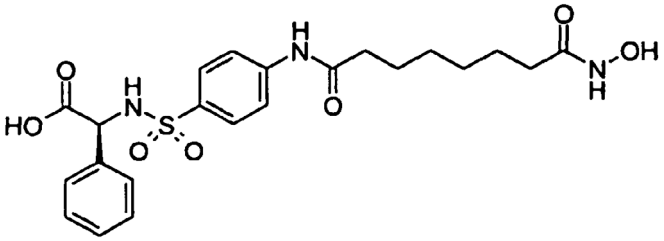
La resina de la Etapa 4 (1,12g, cargando 1,14mmol/g) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (22). Pureza LCMS 93%, m/z 546 $[M^+ + H]^+$, ^1H RMN (400 MHz, DMSO), δ:1,20-1,68 (16 H, m, 8 x CH_2), 1,93 (2 H, t, CH_2), 2,33 (2H, t, CH_2), 4,80 (1 H, m, CHOCO), 4,81 (1 H, d, OCOCHPh), 7,27 (5 H, m, Ar), 7,65 (2 H, d, Ar), 7,71 (2 H, d, Ar), 8,67 (1 H, s ancho), 8,75 (1 H, d), 10,24 (1 H, s), 10,34 (1 H, s).

Etapa 6: Saponificación del éster de ciclopentilo



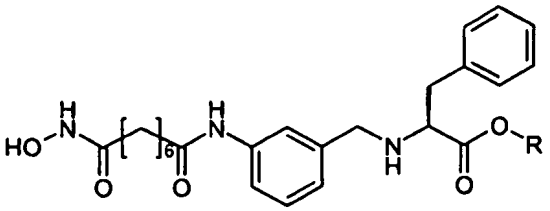
La resina de la Etapa 4 (1,2 g, cargando 1,14 mmol/g) se suspendió en THF (8 ml) y metanol (8 ml) y se añadió hidróxido de sodio 2,7M (5,1 ml, 13,68 mmol). La mezcla se agitó durante 48h. La LCMS de la división de ensayo confirmó que la reacción había acabado, m/z 478 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 7: ácido (S)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencenosulfonilamino]-fenil-acético (23)

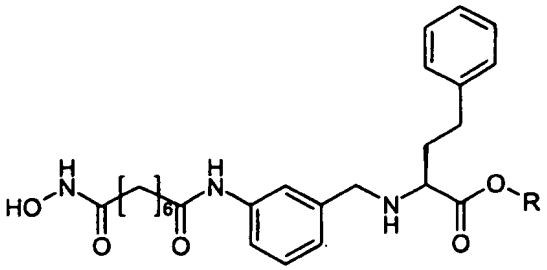


La resina de la Etapa 6 (1,2g, cargando 1,14 mmol/g) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (23). Pureza LCMS 91%, m/z 478 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,44 (4 H, m, 2 x CH_2),1,62-1,74 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,12 (2 H, t, CH_2), 2,34 (1 H, m, OCOCHPh), 2,41 (2 H, t, CH_2), 7,25 (5 H, m, Ar), 7,69 (2 H, d, Ar), 7,72 (2 H, d, Ar).

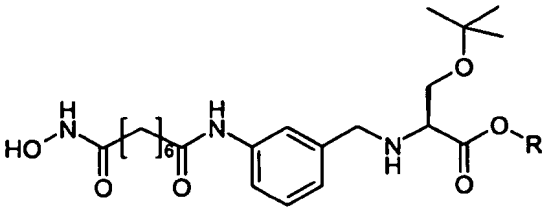
Síntesis de los Compuestos en la Figura 2 como se ilustra por el Compuesto (26) y Compuesto (27)



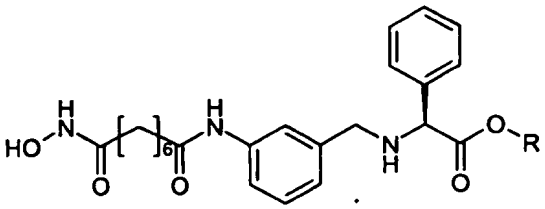
R = etilo **26**
R = H **27**
R = ciclopentilo **28**



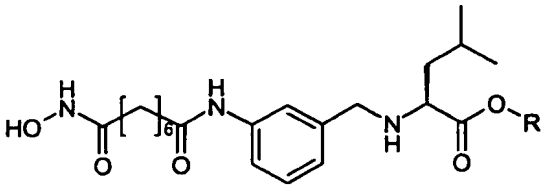
R = etilo **29**
R = H **30**
R = ciclopentilo **31**



R = etilo **32**
R = H **33**
R = ciclopentilo **34**



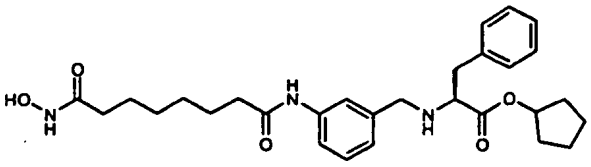
R = ^{1}Butilo **35**
R = H **36**
R = ciclopentilo **37**



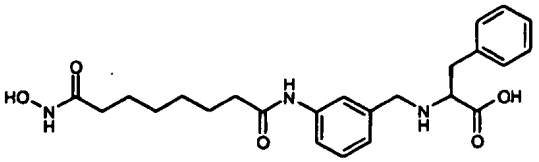
R = H **38**
R = ciclopentilo **39**

Figura 2

Síntesis del Compuesto (26) y Compuesto (27)

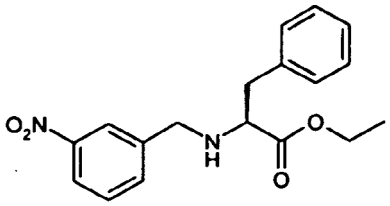


26



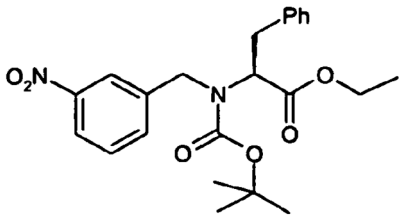
27

Etapa 1: (S)-2-(3-Nitro-bencilamino)-3-fenil-propionico éster de etilo del ácido



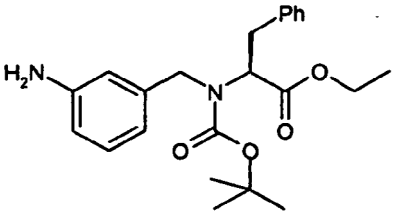
Se disolvió bromuro de 3-nitrobencilo (10,0 g, 46 mmol) en DMF (180 ml) y se añadió carbonato de potasio (12,7 g, 92 mmol), seguido del hidrocloruro del éster de etilo de L-fenilalanina (10,6 g, 46 mmol). La reacción se agitó durante 17 h a temperatura ambiente antes de evaporar hasta secarse. El residuo se disolvió de nuevo en EtOAc (150 ml) y se lavó con agua (3 X 80 ml), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró hasta secarse. Después de la purificación por cromatografía de columna por destello (EtOAc 30%/ hexano) se obtuvo el producto (3,7 g, 24% rendimiento). Pureza LCMS 86%, m/z 329 $[M^+ + H]^+$.

Etapa 2: éster de etilo del ácido (S)-2-[terc-butoxicarbonil-(3-nitro-bencil)-amino]-3-fenil-propionico



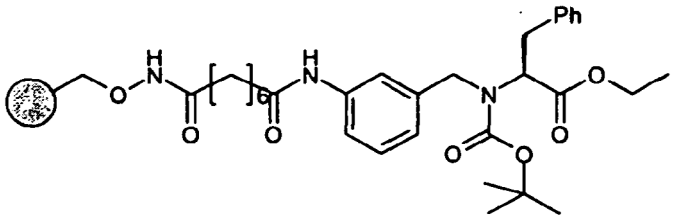
La amina de la Etapa 1 (13,4 g, 40,9 mmol) se disolvió en THF (250 ml) antes de la adición de carbonato de potasio (8,46 g, 61,4 mmol) y agua (150 ml). Se añadió dicarbonato de di-tbutilo (35,6, 163 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 18 h. Se añadió DCM a la mezcla resultante, se lavó consecutivamente con HCl 0,1 M (150 ml), $NaHCO_3$ sat. ac. y agua (150 ml). La capa de DCM se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró hasta secarse. Después de la purificación por cromatografía de columna por destello (EtOAc 5% / hexano) el producto se aisló (9,4 g, 54% rendimiento). Pureza LCMS 95%, m/z 428 $[M^+ + H]^+$.

Etapa 3: éster de etilo del ácido (S)-2-[(3-amino-bencil)-terc-butoxicarbonil-amino]-3-fenil-propionico



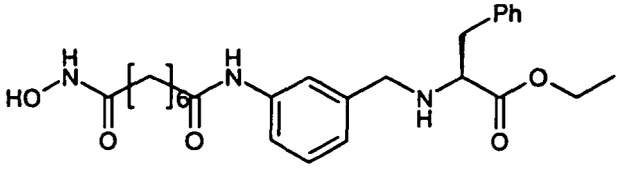
El carbamato de la Etapa 2 (4,92 g, 11,5 mmol) se disolvió en EtOAc (150 ml) antes de la adición del catalizador de Pd/C (10% húmedo) (0,8 g) y se hidrogenó bajo presión de balón a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y se evaporó hasta secarse para dar un sólido rojo (4,0 g, 89% rendimiento). Pureza LCMS 100%, m/z 399 $[M^+ + H]^+$.

Etapa 4: Acoplamiento a la resina



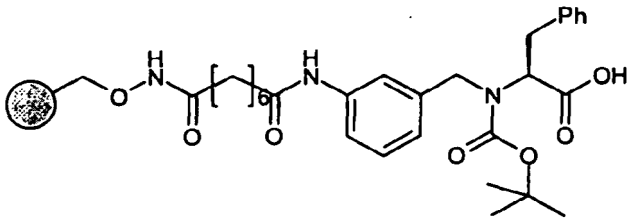
La resina de 2-clorotritilo de hidroxilamina derivatizada con ácido subérico (1,0 g, cargando 0,83 mmol/g) se hinchó en DMF (15 ml) y se añadió PyBOP (1,36 g, 2,61 mmol), seguido de DIPEA (1,5 ml, 8,7 mmol). La anilina de la Etapa 3 (1,04 g, 2,61 mmol) se disolvió en DCM (15 ml) y se añadió a la mezcla de reacción. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La LCMS después de un ensayo de división indicó una conversión del 86%, m/z 570 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 5: éster de etilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil)-heptanoilamino)-bencilamino]-3-fenil-propiónico (26)



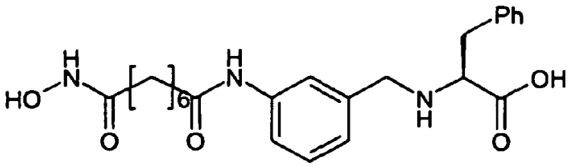
La resina de la Etapa 4 (1,3 g, cargando 0,83 mmol) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y se filtró después de 20 min. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo aceitoso. El residuo se dejó sedimentando en TFA/DCM al 20% durante 40 min. Después de evaporarse hasta secarse, también bajo presión reducida a temperatura ambiente, el producto crudo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (26). Pureza LCMS 100%, m/z 470 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,08 (3 H, t, CH_3), 1,35-1,45 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,60-1,80 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,40 (2 H, t, CH_2), 3,13 (1 H, dd, PhCHH), 3,40 (1 H, dd, PhCHH), 4,11 (2 H, q, CH_2CH_3), 4,14-4,22 (3 H, m), 7,20-7,48 (8 H, m, Ar), 7,92 (1 H, s, Ar).

Etapa 6: Saponificación



La resina de la Etapa 4 (1,4 g, cargando 0,83 mmol) se suspendió en THF (8,6 ml) y metanol (8,6 ml) y se añadió una solución de hidróxido de sodio 1,4M (8,6 ml, 5,98 mmol). La mezcla se agitó durante 24 horas antes de que la división de análisis revelara una conversión del 83% en el ácido requerido, m/z 541 $[M^{+}+H]$. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 7: ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-3-fenil-propionico (27)



La resina de la Etapa 6 (1,44 g, cargando 0,83 mmol) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y se filtró después de 20 min. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo aceitoso. El residuo se dejó sedimentando en TFA/DCM al 20% durante 40 min. Después de evaporarse hasta secarse, bajo presión reducida a temperatura ambiente, el producto crudo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (27).

Pureza LCMS 100%, m/z 442 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD). δ: 1,35-1,48 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,60-1,78 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,40 (2 H, t, CH_2), 3,20 (1 H, dd, PhCHH), 3,28 (1 H, dd, PhCHH), 3,90 (1 H, t, OCOCH), 4,14 (2 H, m), 7,15 (1 H, d, Ar), 7,26 (6 H, m, Ar), 7,51 (1 H, d, Ar), 7,73 (1 H s, Ar).

Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto (26) y compuesto (27)

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-3-fenil-propionico (28).

Pureza LCMS 100%, m/z 510 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,00-1,61 (16 H, m, 8 x CH_2), 1,90 (2 H, t, CH_2), 2,20 (2 H, d, CH_2), 2,90 (1 H, dd, PhCHH), 3,20 (1 H, dd, PhCHH), 4,00-4,11 (3 H, m), 4,91 (1 H, m), 7,00-7,25 (8 H, m, Ar), 7,75 (1 H, s, Ar).

éster de etilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-fenil-butírico (29)

Pureza LCMS 100%, m/z 484 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400MHz, MeOD), δ: 1,23-1,29 (7 H, m, CH_3, 2 x CH_2), 1,53 (2 H, t, CH_2), 1,62 (2 H, t, CH_2), 1,99 (2 H, t, CH_2), 2,11-2,16 (2 H, m, CH_2), 2,28 (2 H, t, CH_2), 2,53-2,61 (1 H, m, CH), 2,65-2,76 (1 H, m, CH), 3,80-3,90, (1 H, m, CHCO2Et), 4,05 (2H, s, CH_2), 4,21 (2 H, q, CH_2), 7,05-7,15 (4 H, m, Ar), 7,15-7,22 (2 H, m, Ar), 7,25-7,39 (2 H, m, Ar), 7,75 (1 H, s, Ar).

ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-fenil-butírico (30)

Pureza LCMS 100%, m/z 456 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400MHz, MeOD), δ: 1,27-1,32 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,53 (2 H, t, CH_2), 1,62 (2 H, t, CH_2), 1,99 (2 H, t, CH_2), 2,11-2,16 (2 H, m, CH_2), 2,29 (2 H, t, CH_2), 2,57-2,64 (1 H, m, CH), 2,69-2,77 (1 H, m, CH), 3,84-3,87 (1 H, m, CHCO2H), 4,12 (2 H, q, CH_2), 7,09-7,11 (4 H, m, Ar), 7,16-7,20 (2 H, m, Ar), 7,27-7,35 (2 H, m, Ar), 7,78 (1 H, s, Ar).

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-fenil-butírico (31)

Pureza LCMS 100%, m/z 524 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,20-1,35 (4 H, m), 1,45-1,62 (10 H, m), 1,85 (2 H, m), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,10 (2 H, m), 2,28 (2 H, t, CH_2), 2,55 (1 H, m), 2,68 (1 H, m), 3,88 (1 H, t, OCOCHNH), 4,11 (2 H, s, CH_2Ph), 5,24 (1 H, m) 7,02-7,12 (4 H, m, Ar), 7,18 (2 H, m, Ar), 7,30 (2 H, m, Ar), 7,80 (1 H, s, Ar).

éster de etilo del ácido (S)-3-terc-butoxi-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-propionico (32)

Pureza LCMS 90%, m/z 466 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,25 (9 H, s, $C(CH_3)_3$), 1,35 (3 H, t, CH_2CH_3), 1,35-1,45 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,62-1,76 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,12 (2 H, t, CH_2), 2,40 (2 H, t, CH_2), 3,89 (1 H, m), 3,98 (1 H, m), 4,20-4,40 (5 H, m), 7,25 (1 H, d, Ar), 7,39-7,50 (2 H, m, Ar), 7,90 (1 H, s, Ar).

ácido (S)-3-terc-Butoxi-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-propionico (33)

Pureza LCMS 86%, m/z 438 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,20 (9 H, s, $C(CH_3)_3$), 1,38 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,57-1,75 (4 H, m ,2 x CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,39 (2 H, t, CH_2), 3,78-3,85 (3 H, m), 4,26 (2 H, s, CH_2Ph), 7,21 (1 H, d, Ar), 7,39 (1 H, t, Ar), 7,50 (1 H, d, Ar), 7,80 (1 H, s, Ar).

éster de ciclopentilo del ácido (S)-3-terc-Butoxi-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-propionico (34)

Pureza LCMS 94%, m/z 506 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,25 (9 H, s, $C(CH_3)_3$), 1,33-1,50 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,60-2,00 (12 H, m), 2,13 (2 H, t, CH_2), 2,42 (2 H, t, CH_2), 3,83-4,00 (2 H, m), 4,18 (1 H, m), 4,28 (2 H, s, CH_2Ph), 5,35 (1 H, m), 7,25 (1 H, m, Ar), 7,45 (2 H, m, Ar), 7,90 (1 H, s, Ar).

éster de terc-butilo del ácido (S)-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (35)

Pureza LCMS 97%, m/z 484 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,30 (13 H, m, 2 x CH_2, $C(CH_3)_3$),1,45-1,65 (4 H, m, CH_2 x 2), 1,93-2,05 (2 H, m, CH_2), 2,20-2,40 (2 H, m, CH_2), 3,99 (2 H, q, CH_2), 4,65-4,95 (1 H, m, CH, señal enmascarada) 7,05 (1 H, d, Ar), 7,25-7,33 (2 H, m, Ar), 7,35-7,50 (5 H, m, Ar), 7,75 (1 H, s, Ar).

éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (36)

Pureza LCMS 100%, m/z 496 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400MHz, MeOD), δ:1,30-1,70 (16 H, m, 8 x CH_2), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,30 (2 H, t, CH_2), 4,05 (2 H, dd, CH_2NH), 5,00 (1 H, m, OCOCHPh), 5,15 (1 H, m, CHOCO), 7,05 (1 H, m, Ar), 7,30 (2 H, m, Ar), 7,40 (5 H, m, Ar), 7,75 (1H, m, Ar).

ácido (S)-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (37)

Pureza LCMS 100%, m/z 428 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400MHz, MeOD), δ: 1,20-1,35 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,50-1,65 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,00 (2 H, m, CH_2), 2,30 (2 H, m, CH_2), 4,00 (2 H, dd, CH_2NH), 4,90 (1 H, m, OCOCHPh), 7,05 (1 H, m, Ar), 7,25-7,50 (7 H, m, Ar), 7,70 (1 H, m, Ar).

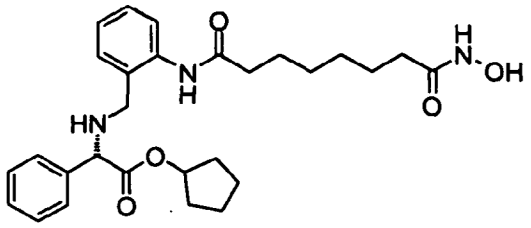
ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-metil-pentanoico (38)

Pureza LCMS 91%, m/z 408 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 0,78 (3 H, d, J = 6,6 Hz, CH_3), 0,84 Hz (3 H, d, J = 6,6 Hz, CH_3), 1,26-1,40 (6 H, m, alquilo), 1,49-1,70 (5 H, m, CH + 2 x CH_2), 1,95 (2 H, t, J = 7,32, CH_2), 2,25 (2 H, t, J = 7,36, CH_2), 3,00 (1 H, t, J = 6,88 Hz, NHCHCO), 3,42 (1 H, d, J = 12,7 Hz, CH), 3,68 (1 H, d, J = 12,5 Hz, CH), 7,00 (1 H, d, J = 7,6 Hz, Ar), 7,15 (1 H, t, J = 7,8 Hz, Ar), 7,30 (1 H, s. Ar), 7,47 (1 H, d ancho, Ar).

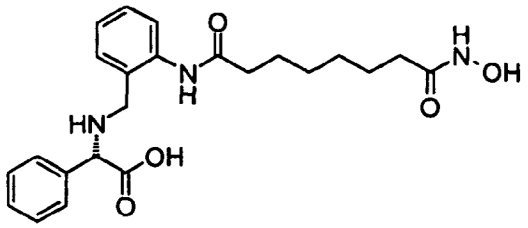
(éster de ciclopentilo del ácido S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-metil-pentanoico (39)

Pureza LCMS 100%, m/z 476 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 0,85 -0,95 (6 H, 2 x d, 2 x CH_3), 1,30 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,50 -1,70 (13 H, m, alquilo), 1,75 (2 H, m, CH_2), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,30 (2 H, t, CH_2), 3,90 (1 H, NHCHCO), 4,10 (2 H, q, CH_2), 5,25, (1 H, m, CH), 7,10 (1 H, d, Ar), 7,30 (2 H, m), 7,80 (1 H, s, Ar)

Síntesis del Compuesto (40) y Compuesto (41)

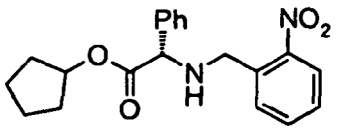


40



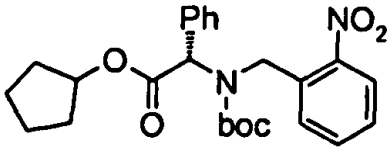
41

Etapa 1: éster de ciclopentilo del ácido (S)-(2-Nitro-bencilamino)-fenil-acético



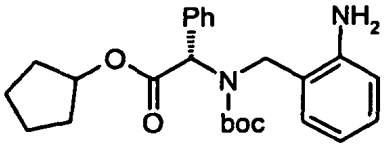
Una mezcla de bromuro de 2-nitrobencilo (15 g, 69,4 mmol), sal de tosilo del éster de ciclopentilo de L-fenilglicina (27,2 g, 69,4 mmol) y carbonato de potasio (19,2 g, 138,8 mmol) en DMF (300 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (300 ml) y se lavó con agua (3 x 200 ml). La capa de EtOAc se aisló, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró hasta secarse proporcionando un aceite de color naranja. Un peso crudo de 24 g se aisló. Pureza LCMS 81%, m/z 355 $[M^+ + H]^+$. Este producto fue usado sin purificarlo más

Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[terc-butoxicarbonil-(2-nitro-bencil)-amino]-fenil-acético



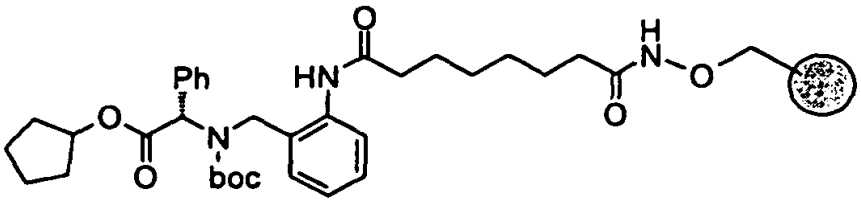
A una disolución del éster de ciclopentilo del ácido (S)-(2-nitro-bencilamino)-fenil-acético (24,4 g, 69,1 mmol) en THF (150 ml) se añadió K_2CO_3 (7,6 g, 69,1 mmol), seguido de dicarbonato de di-terc-butilo (30,1 g, 138,1 mmol). Se añadió agua (150 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 días con más dicarbonato de di-terc-butilo (45,1 g, 206,6 mmol). La mezcla de reacción se evaporó hasta secarse. El residuo se re-disolvió en EtOAc (300 ml), se lavó con HCl 0,1 M (150 ml), $NaHCO_3$ sat. ac. y agua (150 ml). La capa de EtOAc se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró hasta secarse proporcionando un aceite amarillo. Después de la purificación por cromatografía de columna (EtOAc 20% / hexano) el producto se obtuvo como un aceite amarillo claro (15 g, 48% rendimiento).

Etapa 3: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[(2-amino-bencil)-terc-butoxicarbonil-amino]-fenil-acético



Una mezcla del carbamato de la Etapa 2 (4,44 g, 9,78 mmol) y Pd/C al 10% (0,7g) en EtOAc (130 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente durante 18 h bajo presión de balón. El catalizador Pd/C se separó por filtración a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un sólido blanco (4,25g). Pureza LCMS 100%, m/z 425 $[M^{+}+H]^{+}$.

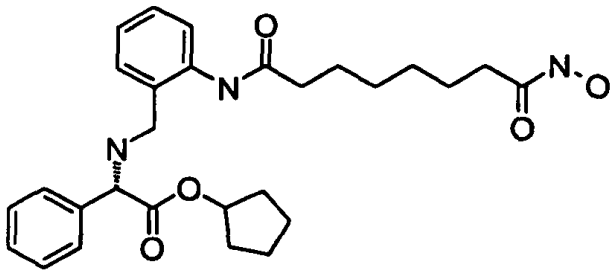
Etapa 4: Acoplamiento de la anilina de la Etapa 3



La resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (1,6 g, cargando 0,83 mmol) se hinchó en DCM anhidro (100 ml). Se añadió 1-cloro-N,N-2-trimetilpropenilamina (reactive Ghosez)[1] (0,56 ml, 3,3 mmol, 3 eq) a 0 °C bajo una atmósfera de N_2. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó suavemente durante 1-2 h. La anilina de la Etapa 3 (1,4 g, 3,3 mmol, 3 eq) se añadió a porciones durante 20min. Se añadió Et_3N (0,76 ml, 4,4 mmol, 4eq). La mezcla se agitó durante 1 h. La LCMS después de un ensayo de división muestra una conversión del 97%, m/z 596 [M++H]+. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

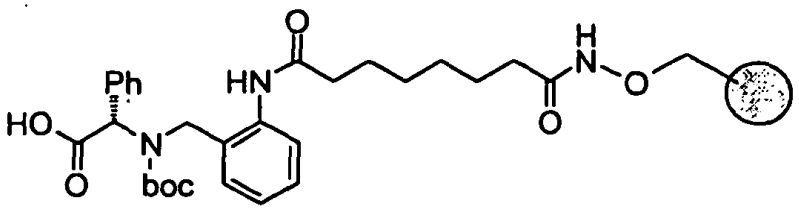
[1]. Ghosez *et al*, *J. C. S. Chem. Comm*., 1979, 1180.

Etapa 5: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[2-(7 -hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (40)



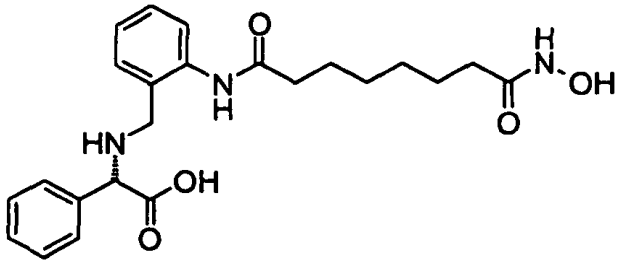
La resina de la Etapa 4 (1,34 g, cargando 0,83 mmol) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo. Este residuo se dejó sedimentando en TFA/DCM al 20% durante 40 min. Después de evaporarse hasta secarse, también bajo presión reducida a temperatura ambiente, el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto 40 como una sal de TFA. Pureza LCMS 100%, m/z 496 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400MHz, MeOD), δ: 1,40-2,00 (16 H, m, 8 x CH_2), 2,15 (2 H, m, CH_2), 2,45 (2 H, m, CH_2), 3,95 (1 H, d, CH_2NH), 4,20 (1 H, d, CH_2NH), 5,20 (1 H, m, OCOCHPh), 5,35 (1 H, m, CHOCO), 7,25 (1 H, m, Ar), 7,40 (1 H, m, Ar), 7,50-7,60 (7 H, m, Ar).

Etapa 6: Saponificación



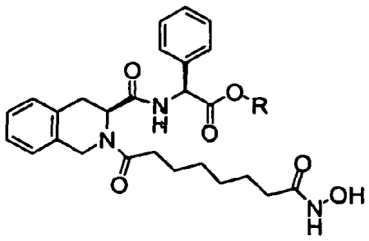
La resina de la Etapa 4 (2,0 g, cargando, 0,83 mmol, 2,35 mmol) se suspendió en MeOH (6,1) y THF (6,1 ml). Se añadió NaOH 2,7 N (ac., 6,1 ml). La mezcla se agitó durante 5 días. La LCMS de la división de ensayo confirmó que la reacción había acabado, m/z 528 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 7: compuesto ácido (S)-[2-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (41)

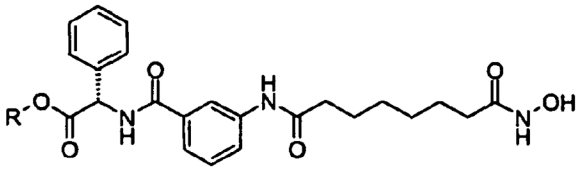


La resina de la Etapa 6 (2,0 g, cargando 0,83 mmol) se dividió y se desprotegió en boc usando el procedimiento representado para la Etapa 5. El producto crudo se purificó por HPLC preparativa proporcionando el compuesto (41) como una sal de TFA. Pureza LCMS 98%, m/z 428 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400MHz, MeOD), δ: 1,25-1,35 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,50-1,65 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,00 (2 H, m, CH_2), 2,30 (2 H, m, CH_2), 3,80 (1 H, d, CH_2NH), 4,10 (1 H, d, CH_2NH), 5,00 (1 H, m, OCOCHPh), 7,10 (1 H, m, Ar), 7,30 (1 H, m, Ar), 7,40-7,50 (7 H, m, Ar). CH_2CH), 4,80 (2 H, m, CH_2NH, señal enmascarada), 6,00 (1 H, m, OCOCHPh), 6,90 (1 H, m, Ar), 7,00 (1 H, m, Ar), 7,20 (1 H, m, Ar), 7,30-7,50 (6 H, m, Ar).

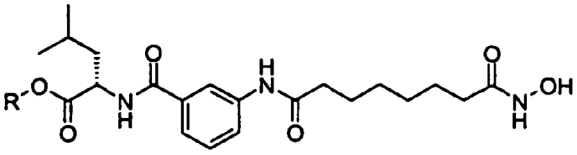
Síntesis del Compuestos en la Figura 3 como se ilustra por el compuesto modelo (44) y compuesto modelo (45)



R = ciclopentilo 44
R = H 45



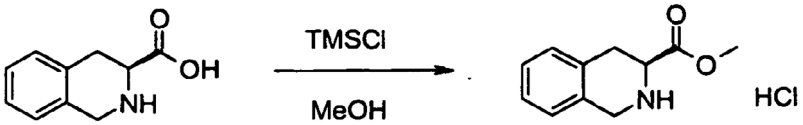
R = ciclopentilo 60
R = H 61



R = ciclopentilo 62
R = H 63

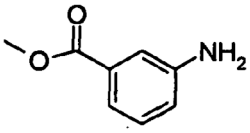
Preparación de los bloques de construcción H-L

Bloque de construcción H



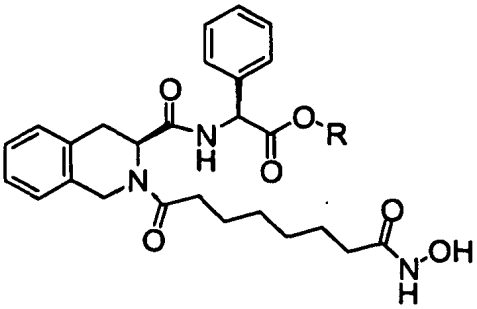
Se sometieron a reflujo juntos el ácido (S)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (10 g, 56 mmol), TMSCl (39 ml, 310 mmol) y metanol (500 ml) (a 70°C) durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó hasta secarse y el análisis LCMS indicó una conversión del 100% en el éster de metilo del ácido (S)-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-3-carboxílico, m/z 192 [M++H]+.

Bloque de construcción K

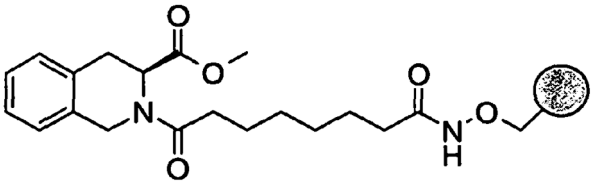


El metil-3-aminobenzoato se obtuvo de fuentes comerciales.

Síntesis de los Compuestos representados en la Figura 3 ilustrados por el compuesto modelo (44, R = ciclopentilo) y el compuesto (45, R = H)

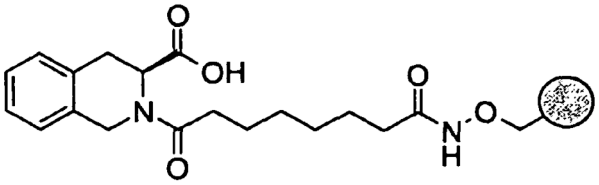


Etapa 1: Carga de la amina sobre la resina



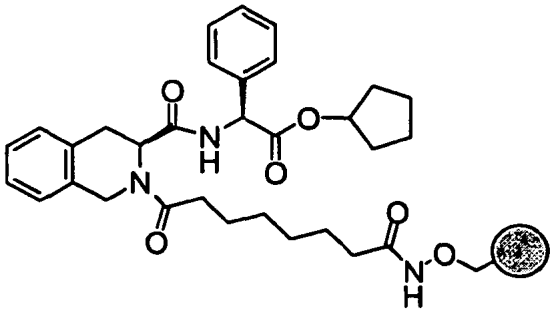
La resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (6,6 g, cargando, 0,83 mmol) se hinchó en DCM anhidro (65 ml). Se añadieron PyBOP (8,6 g, 16,43 mmol), bloque de construcción A de la amina (3,7 g, 16,43 mmol) y DIPEA (9,5 ml, 58,4 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La LCMS del material dividido de ensayo indicó el final de la reacción. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 2: Saponificación del éster de metilo



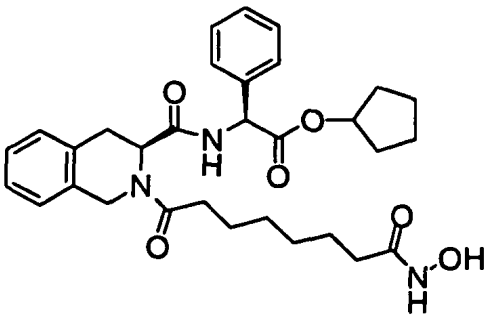
El éster de la Etapa 1 unido a la resina (6,95 g, cargando 0,83 mmol/g) se suspendió en THF (25 ml) y metanol (25 ml). Se añadió hidróxido de sodio, solución acuosa 1,4 M (25 ml). La mezcla se agitó durante 48 horas y se añadió más hidróxido de sodio (25 ml) después de 24 horas. La LCMS del material de división de ensayo indicó una conversión de 65% al ácido m/z 349 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 3: Acoplamiento con éster de ciclopentilo de L-fenilglicina



El ácido carboxílico de la Etapa 2 unido a la resina (2,2 g, cargando 0,83mmol/g) se hinchó en DCM anhidro (25 ml). Se añadieron PyBOP (2,85 g, 5,48 mmol), sal de tosilo del éster de ciclopentilo de L-fenilglicina (2,14 g, 5,48 mmol) y DIPEA (3,17 ml, 18,3 mmol). La mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La LCMS después de la división de análisis reveló una conversión de 52%, m/z 550 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío

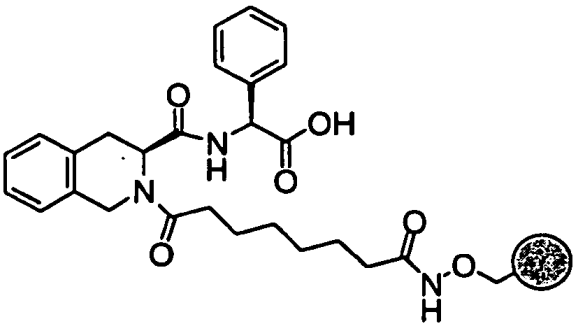
Etapa 4: éster de ciclopentilo del ácido (S)-{[(S)-2-(7-hidroxicarbamoil-heptanoil)-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinoline-3-carbonil]-amino}-fenil-acético (44)



44

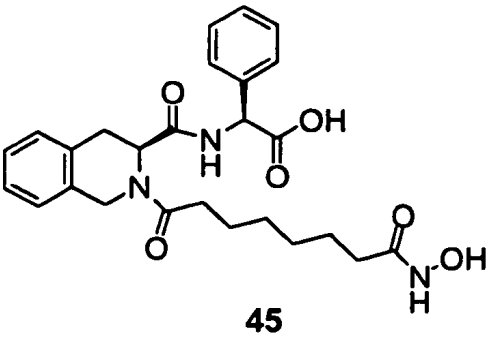
La resina de la Etapa 3 (2,2 g, cargando 0,83 mmol) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (44) como una sal de TFA. Pureza LCMS 95%, m/z 550 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,12-1,75 (16 H, m, 8 x CH_2), 1,92-2,02 (2 H, m, CH_2), 2,09-2,30 (1 H, m), 2,48 (1 H, m), 3,10 (2 H, m, CH_2), 4,58-4,66 (2 H, m, CH_2), 4,82 (1 H, m), 5,04 (1 H, m), 5,20 (1 H, s, OCOCHPh), 6,95-7,20 (9 H, m, Ar).

Etapa 5- Saponificación del éster de ciclopentilo



La resina de la Etapa 3 (1,3 g, 1,13 mmol) se suspendió en THF (4,6 ml) y metanol (4,6 ml). Se añadió hidróxido de sodio como una solución acuosa 1,4M (4,6 ml). La mezcla se agitó durante 24 horas. La LCMS del material de la división de ensayo confirmó la conversión al ácido requerido. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 6: ácido (S)-{[(S)-2-(7-hidroxicarbamoil-heptanoil)-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-3-carbonil]-amino}-fenil-acético (45)



45

La resina de la Etapa 5 (1,3 g, cargando 0,83 mmol) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (45).

Pureza LCMS 96%, m/z 482 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,12-1,38 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,45-1,61 (4 H, m, CH_2), 1,98 (2 H, m, CH_2), 2,10-2,58 (2 H, m, CH_2), 3,04-3,20 (2 H, m, CH_2), 4,48-4,65 (2 H, m), 4,85 (1 H, m), 5,20 (1 H, m), 6,92-7,25 (9 H, m, Ar).

Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito para los compuestos (44) y compuesto (45)

éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benzoilamino]-fenil-acético (60)

Bloque de construcción K usado

Pureza LCMS 100%, m/z 510 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,28 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,40-1,80 (12 H, m, 6 x CH_2), 1,98 (2 H, t, CH_2), 2,27 (2 H, t, CH_2), 5,12 (1 H, m), 5,50 (1 H, s, OCOCHPh), 7,21-7,32 (4 H, m, Ar), 7,36 (2 H, m, Ar), 7,45 (1 H, d, Ar), 7,61 (1 H, d, Ar), 7,90 (1 H, s, Ar).

ácido (S)-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benzoilamino]-fenil-acético (61)

Bloque de construcción K usado

Pureza LCMS 100%, m/z 442$[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,21-1,34 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,48-1,63 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,98 (2 H, t, CH_2), 2,26 (2 H, t, CH_2), 5,55 (1 H, s, OCOCHPh), 7,20-7,32 (4 H, m, Ar), 7,40 (2 H, d, Ar), 7,48 (1 H, d, Ar), 7,64 (1 H, d, Ar), 7,89 (1 H, s, Ar).

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benzoilamino]-4-metil-pentanoico (62)

Bloque de construcción K usado

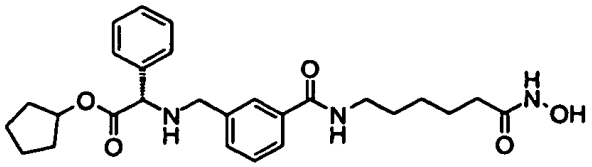
Pureza LCMS 93%, m/z 490 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 0,84 (3 H, d, $CH(CH_3)$), 0,88 (3 H, d, CH (CH_3)), 1,20-1,40 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,40-1,85 (15 H, m, 6 x CH_2,$CH(CH_3)2$, $CH_2CH(CH_3)2$), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,25 (2 H, t, CH_2), 4,45 (1 H, m, $OCOCHCH_2$), 5,10 (1 H, m, CHOCO), 7,25 (1 H, m Ar), 7,40 (1 H, d, Ar), 7,60 (1 H, d, Ar), 7,90 (1 H, s, Ar).

ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benzoilamino]-4-metil-pentanoico (63)

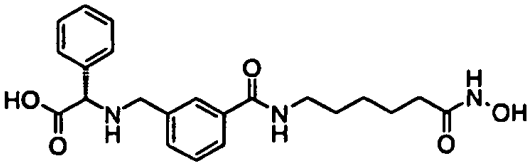
Bloque de construcción K usado

Pureza LCMS 97%, m/z 422 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,03 (3 H, d, $CH(CH_3)$), 1,06 (3 H, d, CH (CH_3)), 1,40-1,55 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,65-1,95 (7 H, m, 2 x CH_2,$CH(CH_3)2$, $CH_2CH(CH_3)2$), 2,15 (2 H, t, CH_2), 2,45 (2 H, t, CH_2), 4,70 (1 H, m, $OCOCHCH_2$), 7,45 (1 H, m, Ar), 7,60 (1 H, d, Ar), 7,80 (1 H, d, Ar), 8,05 (1 H, s, Ar).

Síntesis del Compuesto (69) y Compuesto (70)

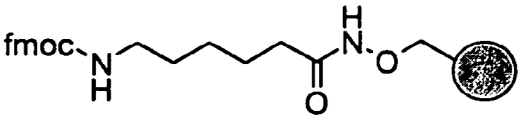


69



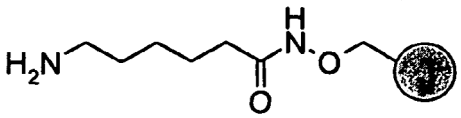
70

Etapa 1: Carga del ácido Fmoc amino caproico sobre la resina



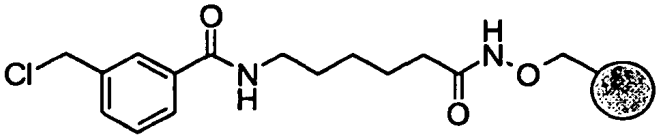
A una mezcla de la resina hidroxilamina 2-clorotritilo (2,5 g, cargando 0,94mmol/g) en DCM anhidro (10 ml) se añadió una disolución de 1,3-diisopropilcarbodiimida (1,1 ml, 7,05 mmol) y ácido 6-(Fmoc-amino) caproico (2,5 g, 7,05 mmol) en DCM anhidro (10 ml). Se añadió DMF (5 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La división de análisis mostró una conversión del 96% en el producto requerido. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 2: desprotección de Fmoc



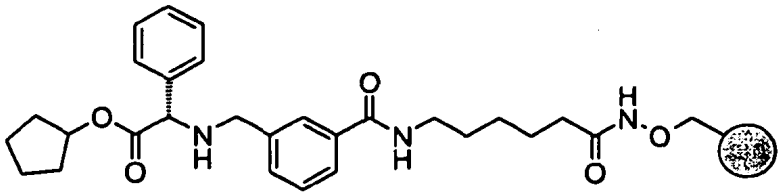
La resina de la amina protegida con Fmoc de la Etapa 1 (2,0 g, cargando 0,94mmol/g) se disolvió en una disolución de piperidina al 20% en DMF (25 ml, exceso) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una división de análisis indicó la completa conversión por LCMS, 100% (detección ELS). La resina se filtró, se lavó usando el procedimiento de lavado estándar y se secó al vacío.

Etapa 3: Reacción de acoplamiento



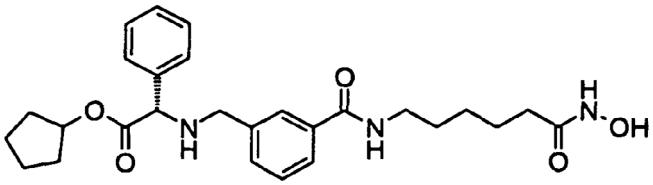
A la amina de la Etapa 2 unida a la resina (2,0 g, cargando 0,94mmol/g) en DCM anhidro (10 ml) y DMF (10 ml) se añadió DIC (0,71 ml, 5,64 mmol) y ácido 3-(clorometil) benzoico (0,96g, 5,64 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora antes de que la división de análisis revelara una conversión del 49% por LCMS, m/z 219 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 4: Desplazamiento de cloruro con el éster de ciclopentilo de L-fenilglicina



Al cloruro de la Etapa 3 unido a la resina (0,5 g, 0,47 mmol) en DMF anhidro (5 ml) se añadió sal de tosilo del éster de ciclopentilo de L-fenilglicina (0,57g, 1,41 mmol), DIPEA (0,24 ml, 1,41 mmol) y una cantidad catalítica de yoduro de sodio. La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 1 hora. La LCMS después de la división de análisis reveló una conversión del 45%, m/z 482 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío.

Etapa 5: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(5-hidroxicarbamoil-pentilcarbamoil)-bencilamino]-fenil-acético (69)

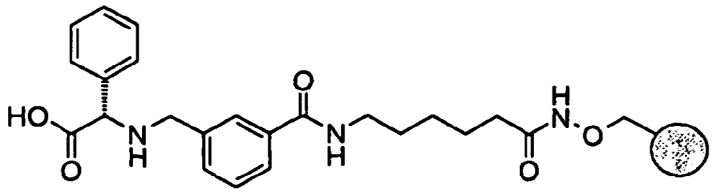


69

La resina de la Etapa 4 (1,0 g, cargando 0,94 mmol/g) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (69).

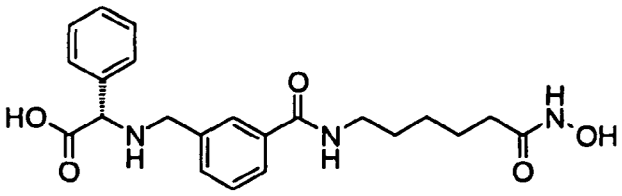
Pureza LCMS 89%, m/z 482 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,24-1,82 (14 H, m, 7 x CH_2), 2,03 (2 H, t, CH_2), 3,30 (2 H, t, CH_2), 4,08 (1 H, d, CHHPh), 2,20 (1 H, d, CHHPh), 5,09 (1 H, s, OCOCHPh), 5,18 (1 H, m, CHOCO), 7,39-7,54 (7 H, m, Ar), 7,77 (2 H, m, Ar).

Etapa 6: Saponificación del éster de ciclopentilo



La resina de la Etapa 4 (1,35 g, cargando 0,94 mmol/g) se suspendió en THF (4,7 ml) y metanol (4,7 ml). Se añadió hidróxido de sodio 1,4M (9,4 ml, 12,66 mmol). La mezcla se agitó durante 48h. La LCMS de la división de ensayo mostró una conversión del 49% en el ácido, m/z 414 $[M^{+}+H]^{+}$. La resina se filtró y se lavó con agua x 2, MeOH x 2, seguido por el procedimiento de lavado estándar. La resina se secó al vacío

Etapa 7: ácido (S)-[3-(5-hidroxicarbamoil-pentilcarbamoil)-bencilamino]-fenil-acético (70)

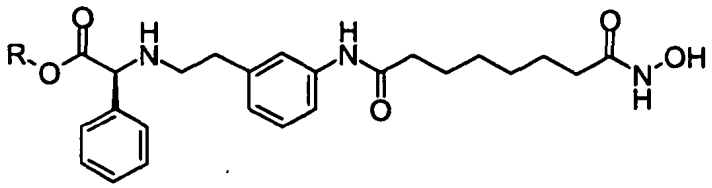


70

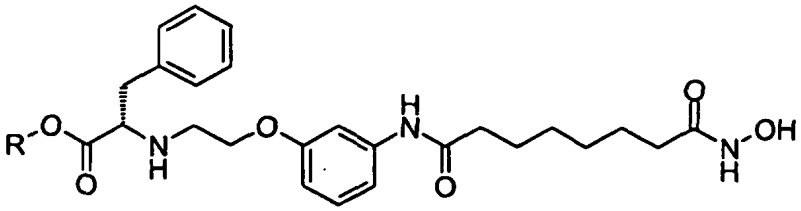
La resina de la Etapa 6 (1,35 g, cargando 0,94 mmol/g) se agitó lentamente en TFA/DCM al 2% (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se recogió y se evaporó bajo presión reducida a temperatura ambiente. La resina se trató de nuevo con TFA/DCM al 2% (10 ml) y después de 20 min se filtró. Los filtrados combinados se evaporaron hasta secarse bajo presión reducida a temperatura ambiente para dar un residuo. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (70).

Pureza LCMS 100%, m/z 414 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,30 (2 H, m, CH_2), 1,57 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,20 (2 H, t, CH_2), 3,30 (2 H, t, CH_2), 4,05 (1 H, d, CHHPh), 4,18 (1 H, d, CHHPh), 4,90 (1 H, s, OCOCHPh), 7,35-7,52 (7 H, m, Ar), 7,78 (2 H, m, Ar).

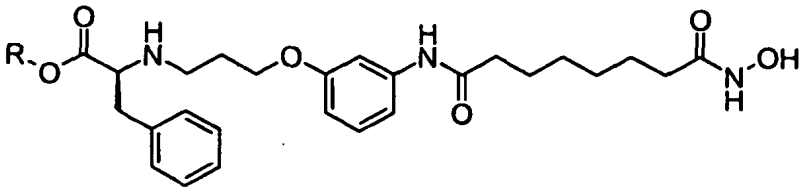
Síntesis de los Compuestos en la Figura 4 ilustrados por el Compuesto (71) y Compuesto (72)



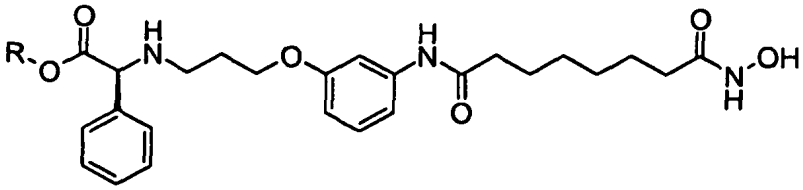
R = ciclopentilo **71**
R = H **72**



R = ciclopentilo **73**
R = H **74**



R = ciclopentilo **75**
R = H **76**

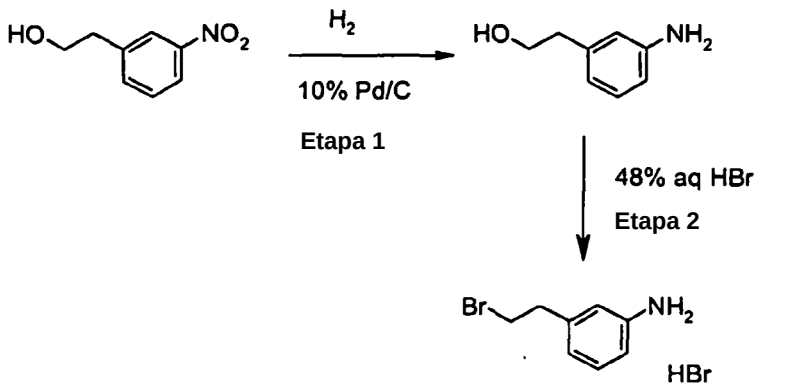


R = ciclopentilo **77**
R = H **78**

Figura 4

Preparación del bloque de construcción M, N, O

Bloque de construcción M



Bloque de construcción M

Etapa 1: 2-(3-amino-fenil)-etanol

Una mezcla de alcohol de nitro-fenetilo (8,0 g, 0,047 mol) y Pd/C al 10% (0,6 g) en etanol (100 ml) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno (presión de balón) durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y el catalizador de Pd/C se retiró. El filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un sólido marrón claro 6,1g (95% rendimiento).

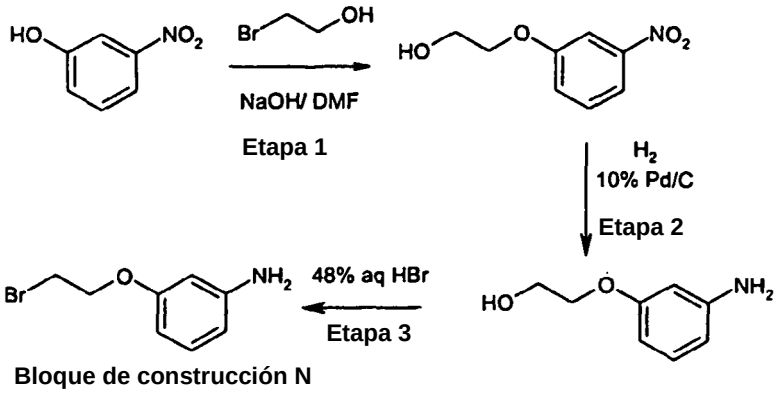
Pureza LCMS 98%, m/z 138 $[M+H]^+$.

Etapa 2: 3-(2-bromo-etil)-fenilamina

Una disolución de 2-(3-amino-fenil)-etanol (2,0 g) en HBr ac. al 48% (20 ml) se calentó a 90°C durante 18 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y el precipitado formado se recogió por filtración. El sólido se secó *in vacuo* proporcionando el Bloque de construcción M, 1,8 g (61% rendimiento).

Pureza LCMS 90%, m/z 200/202 $[M+H]^+$.

Bloque de construcción N



Bloque de construcción N

Etapa 1: 2-(3-Nitro-fenoxi)-etanol

A una disolución de 3-nitrofenol (10 g, 71,9 mmol) en DMF (40 ml) se añadieron perlas de NaOH (3,16 g, 79,1 mmol) y 2-bromoetanol (5,6 ml, 79,1 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 18 h. La LCMS indicó una conversión del 65% en el producto requerido. La mezcla de reacción se diluyó con agua (10 ml) y se neutralizó lentamente con HCl 2M. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (50 ml) y se lavó con agua (50 ml). La capa de EtOAc se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó hasta secarse. La purificación en cromatografía de columna por destello eluyendo con EtOAc 30% / heptano dio el producto requerido (8,2 g, 62% rendimiento).

Pureza LCMS 100%, m/z 184 $[M+H]^+$.

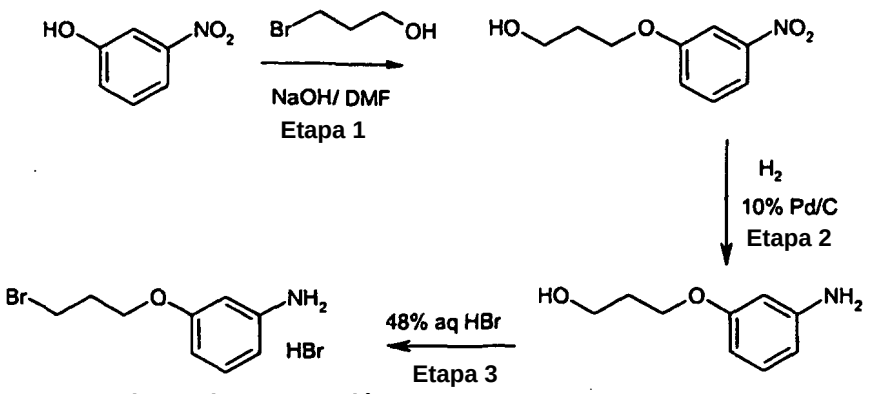
Etapa 2: 2-(3-amino-fenoxi)-etanol

Se llevó a cabo la reducción usando el procedimiento descrito para el Bloque de construcción M.

Etapa 3: 3-(2-bromo-etoxi)-fenilamina

Se llevó a cabo la bromación usando el procedimiento descrito para el Bloque de construcción M.

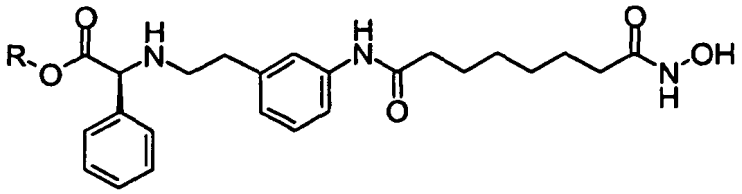
Bloque de construcción O



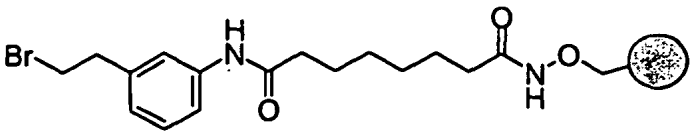
Bloque de construcción O

El Bloque de construcción O se preparó como se describe para el Bloque de construcción G usando el 3-bromo-1-propanol en lugar del 2-bromoetanol.

Síntesis de los Compuestos en la Figura 4 ilustrados para el Compuesto (71, R = ciclopentilo) y Compuesto (72, R = H)

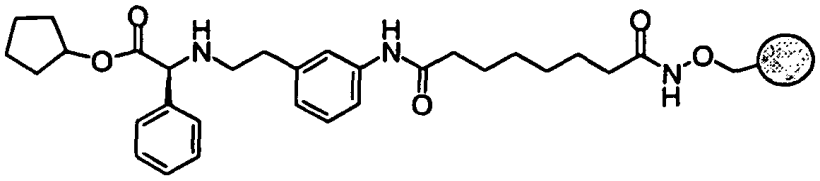


Etapa 1: Acoplamiento del derivado de anilina a la resina del ácido carboxílico funcionalizada



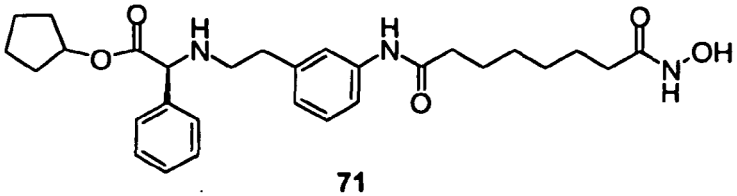
A una suspensión de la resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (1,0 g, 0,94 mmol, cargando 0,94 mmol) en DCM/DMF (10 ml/10 ml) se añadió DIPEA (1,75 ml) seguido del bloque de construcción M, 0,8 g, 2,82 mmol. Se añadió PyBrOP (0,53 g, 3,76 mmol) y la suspensión se agitó durante 18 h. La resina se lavó usando el procedimiento de lavado estándar y se secó a fondo.

Etapa 2: Desplazamiento del bromuro con el éster de ciclopentilo de L-fenilglicina



A una suspensión de la resina de la etapa 1 (0,4 g, 0,38 mmol) en DMF (4 ml) en un vial, se añadió sal de tosilo del éster de ciclopentilo de L-fenilglicina (0,44 g, 1,12 mmol) y DIPEA (0,67 ml, 3,76 mmol) seguido de NaI (50 mg). La reacción se dejó sedimentando a 65°C durante 8 h. La resina se lavó a fondo usando el procedimiento de lavado estándar.

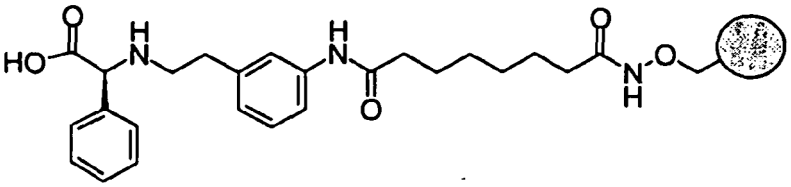
Etapa 3: éster de ciclopentilo del ácido (S)-{2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenil]-etilamino}-fenilacetico (71)



71

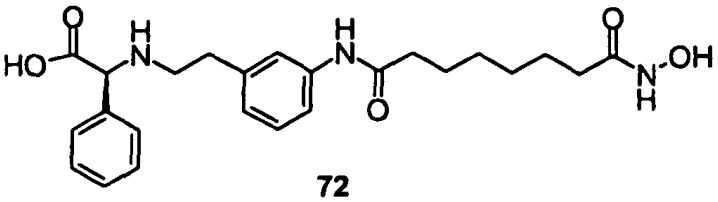
La resina de la Etapa 2 se dividió con TFA 2% / DCM (10 ml x 3). El filtrado se concentró hasta secarse y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (71) como una sal de TFA. Rendimiento 21mg (11% global), Pureza LCMS 99%, m/z 510 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,35-1,95 (16 H, m 8 x CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,38 (2 H, t, CH_2), 2,91-3,29 (4 H, m), 5,18 (1 H, s, OCOCHPh), 5,32 (1 H, m, CHOCO), 6,98 (1 H, m, Ar), 7,30 (2 H, m, Ar), 7,47-7,56 (5 H, m, Ar), 7,62 (1 H, s, Ar).

Etapa 4: Saponificación



La resina de la Etapa 2 (1,2 g, 1,12 mmol) se suspendió en THF/ MeOH (12m/12 ml). Se añadió una solución de NaOH 2,7M y la mezcla se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción la resina se lavó a fondo (procedimiento de lavado estándar).

Etapa 5: ácido (S)-{2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenil]-etilamino}-fenilacetico (72)



72

La resina de la Etapa 4 (0,8 g, 0,76 mmol) se dividió con TFA 2% / DCM (10 ml x 3). EL filtrado se concentró hasta secarse y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar el compuesto (72) como una sal de TFA, rendimiento 40 mg (10% global).

Pureza LCMS de 100%, m/z 442 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz MeOD), δ: 1,20-1,35 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,45-1,70 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,95 (2 H, t, CH_2), 2,25 (2 H, t, CH_2), 2,80-3,20 (4 H, m CH_2NH, CH_2Ph), 5,00 (1 H, s, CHCOOH), 6,85 (1 H, m, Ar), 7,15 (2 H, m, Ar), 7,40 (5 H, s, Ar), 7,50 (1 H, s, Ar).

Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito para los compuestos (71) y el compuesto (72)

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-{2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-etilamino}-3-fenil-propionico (73)

Bloque de construcción N usado

Pureza LCMS 94%, m/z 540 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,26-1,82 (16 H, m, 8 x CH_2), 2,11 (2 H, t, CH_2), 2,39 (2 H, t, CH_2), 3,15 (1 H, dd, CHHPh), 3,44 (1 H, dd, CHHPh), 3,56 (2 H, m, CH_2), 4,30 (2 H, t, CH_2), 4,40 (1 H, m), 5,13 (1 H, m, CHOCO), 6,76 (1 H, d, Ar), 7,00 (1 H, d, Ar), 7,24-7,41 (6 H, m, Ar), 7,57 (1 H, s, Ar).

ácido (S)-2-{2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-etilamino}-3-fenil-propionico (74)

Bloque de construcción N usado

Pureza LCMS 100%, m/z 472 [M*+H]+. ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,35-1,46 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,61-1,77 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,11 (2 H, t, CH_2), 2,40 (2 H, t, CH_2), 3,28-3,40 (2 H, m, CH_2, señal enmascarada), 3,53 (2 H, t, CH_2), 4,29 (2 H, t, CH_2), 4,38 (1 H, t, $OCOCHCH_2$), 6,75 (1 H, d, Ar), 7,00 (1 H, d, Ar), 7,25 (1 H, t, Ar), 7,30-7,41 (5 H, m, Ar), 7,53 (1 H, s, Ar).

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-propilamino}-3-fenil-propionico (75)

Bloque de construcción O usado

Pureza LCMS 100%, m/z 554 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,29-1,87 (16 H, m, 8 x CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,21 (2 H, m, CH_2), 2,37 (2 H, t, CH_2), 3,12 (1 H, dd, CHHPh), 3,25-3,43 (3 H, m, CHHPh, CH_2), 4,11 (2 H, t, CH_2), 4,33 (1 H, m, $OCOCHCH_2$), 5,18 (1 H, m, CHOCO), 6,78 (1 H, d, Ar), 7,00 (1 H, d, Ar), 7,22 (1 H, t, Ar), 7,24-7,39 (5 H, m, Ar), 7,44 (1 H, s, Ar).

ácido (S)-2-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-propilamino}-3-fenil-propionico (76)

Bloque de construcción O usado

Pureza LCMS 100%, m/z 486 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,34-1,47 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,60-1,75 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,19 (2 H, m, CH_2), 2,38 (2 H, t, CH_2), 3,25-3,40 (4 H, m, 2 x CH_2, señal enmascarada), 4,09 (2 H, t, CH_2), 4,35 (1 H, $OCOCHCH_2$), 6,75 (1 H, d, Ar), 6,98 (1 H, d, Ar), 7,20 (1 H, t, Ar), 7,28-7,39 (5 H, m, Ar), 7,41 (1 H, s, Ar).

éster de ciclopentilo del ácido (S)-{3-[3-(7-hidroxicarbamoilheptanoilamino)-fenoxi]-propilamino}-fenil-acético

(77) Bloque de construcción O usado

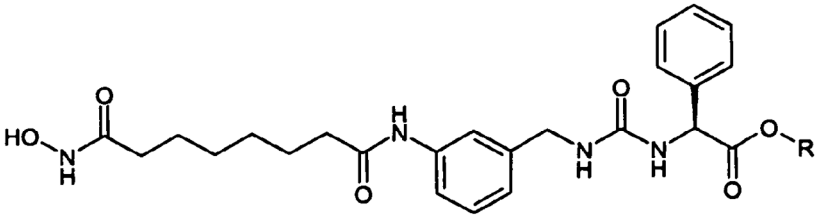
Pureza LCMS de 100%, m/z 540 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,20-1,50 (8 H, m, 4 x CH_2), 1,50-1,80 (8 H, m, 4 x CH_2), 1,80-1,90 (2 H, m, $NHCH_2CH_2$), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,25 (2 H, t, CH_2), 2,55-2,70 (2 H, m, $NHCH_2$), 3,90 (2 H, t, CH_2CH_2O), 4,25 (1H, s, OCOCHPh), 5,05 (1 H, m, CHOCO), 6,55 (1 H, m, Ar), 6,95 (1 H, m, Ar), 7,00-7,10 (1 H, m, Ar), 6,15-6,35 (6 H, m, Ar)

éster de ciclopentilo del ácido (S)-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-propilamino}-fenil-acético (78)

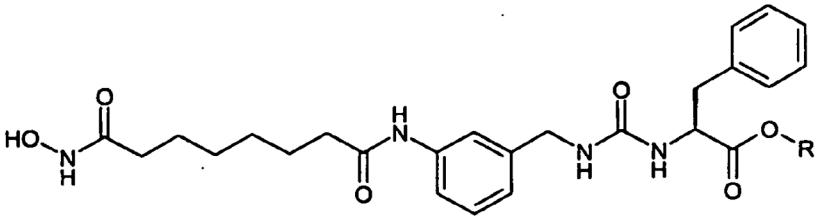
Bloque de construcción O usado

Pureza LCMS de 100%, m/z 472 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO), δ:1,20-1,40 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,45-1,65 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,90 (2 H, m, $NHCH_2CH_2$), 2,00-2,20 (2 H, m, CH_2), 2,20-2,35 (2 H, m, CH_2), 2,80-3,10 (2 H, m, $NHCH_2$ señal enmascarada), 3,90-4,00 (2 H, m, CH_2CH_2O), 4,60-4,85 (1 H, s ancho, OCOCHPh), 6,55 (1 H, d, Ar), 7,05 (1 H, d, Ar), 7,15 (1 H, m, Ar), 7,30-7,60 (6 H, m, Ar), 8,50-8,85 (1 H, s ancho), 9,85 (1 H, s), 10,35 (1 H, s).

Síntesis de los Compuestos en la Figura 5 ilustrados por el Compuesto 79 y Compuesto 80



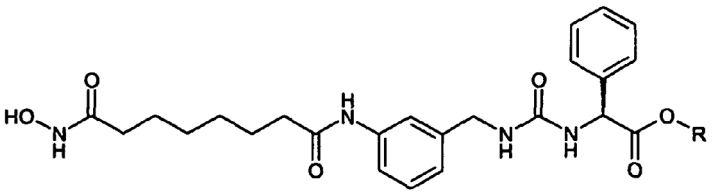
R = ciclopentilo 79
R = H 80



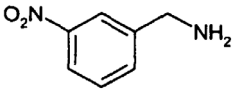
R = ciclopentilo I 81
R = H 82

Figura 5

Síntesis del Compuesto 79 (R = ciclopentilo) y Compuesto 80 (R = H)



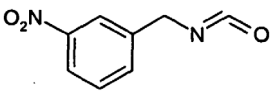
Etapa 1: 3-Nitro-bencilamina



Se disolvió bromuro de 3-nitrobencilo (10 g, 46,3 mmol) en etanol (200 ml) y se agitó a temperatura ambiente Una disolución de NH_3 (ac) conc. (200 ml) en etanol (300 ml) se añadió gota a gota a la reacción en 30 minutos. La reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente antes de evaporarse hasta secarse. Se añadió agua (350 ml) al residuo y la disolución se lavó con EtOAc (2x 200 ml). La capa acuosa se basificó con NaOH 1 M y se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml). Los extractos orgánicos de la capa básica se combinaron, se secaron (Na_2SO_4) y se evaporaron hasta secarse. El producto se obtuvo como un aceite naranja (4,6 g, 65% rendimiento).

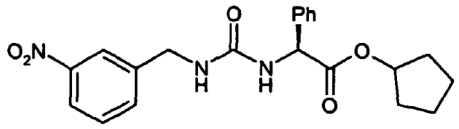
Pureza LCMS 100%, m/z 153 [M++H]+.

Etapa 2: 1-Isocianatometil-3-nitro-benceno



Se disolvió 3-nitro-bencilamina (2,3 g, 15,1 mmol) en dioxano anhidro (50 ml) bajo una atmósfera de N_2. Se añadió difosgeno (2,2 ml, 18,2 mmol), un precipitado formado que se disolvió con calentamiento a 75°C. La reacción se agitó a 75°C durante 3 h, se enfrió y se evaporó hasta secarse dando 3,4 g del material crudo que se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

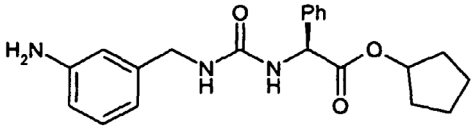
Etapa 3: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(3-nitro-bencil)-ureido]-fenil-acético



Se disolvió la sal de tosilo del éster de ciclopentilo de L-fenilglicina (7,47g, 19,1 mmol) en DMF (70 ml). Se añadió trietilamina (5,8 ml, 42,0 mmol) y la mezcla se enfrió a 0°C. Una disolución de 1-isocianatometil-3-nitro-benceno (3,4 g, 19,1 mmol en 30ml de DMF) se añadió lentamente a la mezcla de reacción bajo una atmósfera de N_2. Se continuó la agitación durante 18 h dejando que la reacción se calentara a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con agua (3 x 100m) y salmuera (100 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se evaporaron hasta secarse. La urea cruda se purificó por cromatografía de columna (MeOH 1% /DCM) para proporcionar un aceite amarillo palo (4,6 g, 65% rendimiento).

Pureza LCMS 85%, m/z 398 $[M^+ + H]^+$.

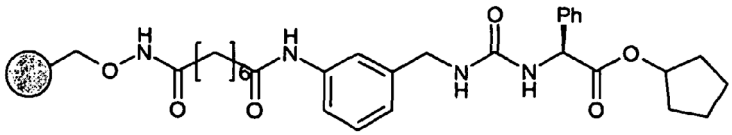
Etapa 4: éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(3-amino-bencil)-ureido]-fenil-acético



Se disolvió el éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(3-nitro-bencil)-ureido]-fenil-acético (3,6 g, 9,0 mmol) en etanol (50 ml) se añadió el catalizador Pd/C (10% húmedo) (100 mg) y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de H_2 (presión de balón) durante 18h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohada de celite y se evaporó hasta secarse para dar un aceite púrpura (2,34 g, 71% rendimiento).

Pureza LCMS 90%, m/z 368 $[M^+ + H]^+$.

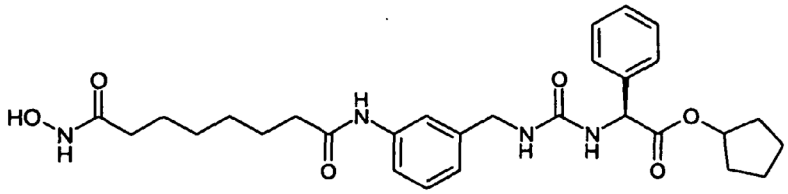
Etapa 5: Acoplamiento a la resina



La resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (1,5 g, cargando 0,94 mmol/g) se hinchó en DMF (15 ml) y se añadió PyBOP (2,2 g, 4,23 mmol), seguido de DIPEA (2,4 ml, 14,1 mmol).

La anilina de la Etapa 4 (1,3 g, 3,53 mmol) se disolvió en DCM (15 ml) y se añadió a la mezcla de reacción. La reacción se agitó durante 42 h a temp. ambiente antes del lavado de la resina estándar y del secado.

Etapa 6: éster de ciclopentilo del ácido (S)-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencil]-ureido}-fenilacetico (79)

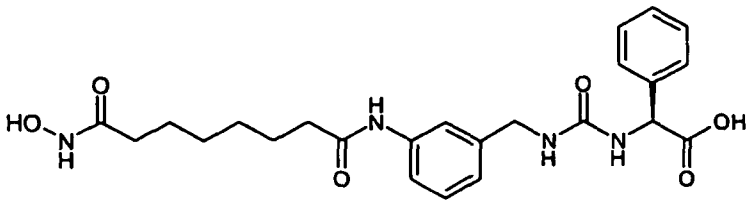


79

El éster de ciclopentilo de la Etapa 5 unido a la resina (1,75 g) se agitó con TFA 2%/ DCM (15 ml) durante 10 min antes de filtrar la resina y evaporar el disolvente bajo presión reducida a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió (x 3) y el producto crudo combinado se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (79).

Pureza LCMS 100%, m/z 539 [M++H]+, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,34-1,90 (16 H, m, 8 x CH_2), 2,11 (2 H, t, CH_2), 2,38 (2 H, t, CH_2), 4,30 (2 H, s, CH_2), 5,18 (1 H, m, CHOCO), 5,30 (1 H, s, OCOCHPh), 7,05 (1 H, d, Ar), 7,26 (1 H, t, Ar), 7,34-7,40 (5 H, m, Ar), 7,47 (2 H, m, Ar).

Etapa 7: ácido (S)-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencil]-ureido}-fenilacetico (80)



80

El Compuesto (79) (75 mg) se disolvió en THF (1 ml) y se añadió NaOH 2M (ac. 1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El THF se eliminó bajo una corriente de N_2 y la capa acuosa (~1 ml) se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (80).

Pureza LCMS 99%, m/z 471 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,20-1,35 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,45-1,65 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,25 (2 H, t, CH_2), 4,20 (2 H, s CH_2NH), 5,25 (1 H, s CHPh), 6,90 (1 H, d, Ar), 7,10 (1 H, t, Ar), 7,15-7,40 (7 H, m, Ar).

Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito para los compuestos (79) y el compuesto (80)

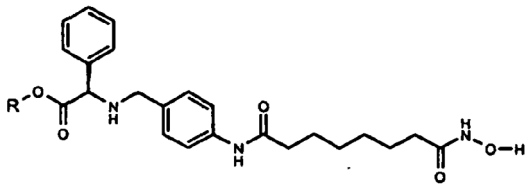
éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencil]-ureido}-3-fenil-propionico (81)

Pureza LCMS 95%, m/z 553 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,20-1,40 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,40-1,80 (12 H, m, 6 x CH_2), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,25 (2 H, t, CH_2), 2,90 (2 H, m, $CHCH_2Ph$), 4,15 (2 H, s CH_2NH), 4,40 (1 H, m, $OCOCHCH_2$), 5,00 (1 H, m, CHOCO), 6,85 (1 H, d, Ar), 7,00-7,25 (6 H, m, Ar), 7,35 (2 H, s ancho, Ar).

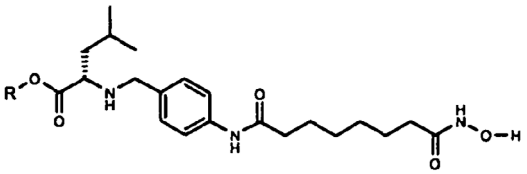
ácido (S)-2-{3-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencil]-ureido}-3-fenil-propionico (82)

Pureza LCMS 94%, m/z 485 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ: 1,30-1,50 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,60-1,80 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,35 (2 H, t, CH_2), 2,95-3,25 (2 H, m, $CHCH_2Ph$), 4,25 (2 H, s, CH_2NH), 4,60 (1 H , m $OCOCHCH_2$), 7,00 (1 H, d, Ar), 7,15-7,35 (6 H, m, Ar), 7,45 (2 H, m, Ar)

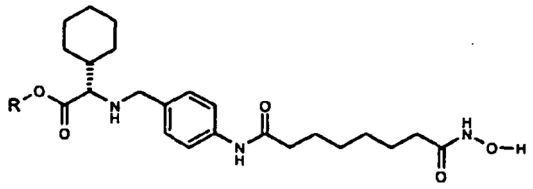
Síntesis de los Compuestos representados en la Figura 6 ilustrados por el Compuesto (83) y Compuesto (84)



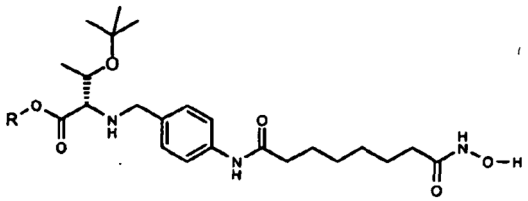
R = ciclopentilo **83**
R = H **84**



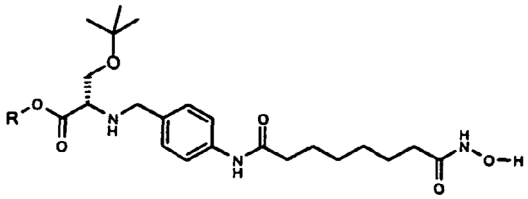
R = ciclopentilo **85**



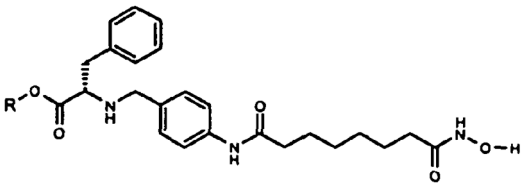
R = ciclopentilo **86**
R = H **87**



R = ciclopentilo **88**



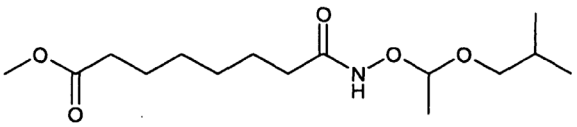
R = ciclopentilo **89**
R = H **90**



R = ciclopentilo **91**

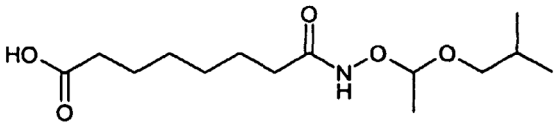
Figura 6

Etapa 1: éster de metilo del ácido 7-(1-Isobutoxi-etoxicarbamoil)-heptanoico



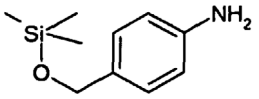
Se disolvió suberato de monometilo (25,0 g, 13,3 mmol, 1,0 eq) en THF (300 mL) y DCM (300 mL). Se añadió EDC.HCl (25,46 g, 13,3 mmol, 1,0 eq) a la solución agitada, seguido de HOBt (17,95 g, 13,3 mmol, 1,0 eq) y trietilamina (48,5 mL, 34,5 mmol, 2,6 eq). Se añadió O-(1-isobutoxi-etil)-hidroxilamina (21,9 mL, 15,9 mmol, 1,2 eq) a la solución viscosa y la reacción se dejó agitar toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró al vacío, se añadió DCM (350 mL) y se lavó con agua (250 mL) y salmuera (200 mL). La capa orgánica se aisló, se secó ($MgSO_4$), filtró y concentró *in vacuo*. El producto se obtuvo como un sólido blanco (36,6 g, 91% rendimiento). Pureza LCMS 88%, m/z 302 (M++H)+. Esto se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

Etapa 2: ácido 7-(1-isobutoxi-etoxicarbamoil)-heptanoico



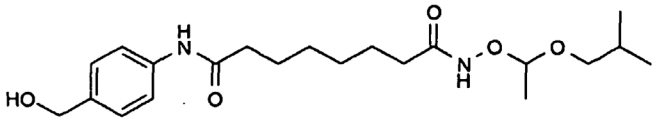
Se agitó el éster de metilo del ácido 7-(1-isobutoxi-etoxicarbamoil)-heptanoico (36,6 g, 12,1 mmol, 1,0 eq) en THF (200 mL) y agua (200 mL) en presencia de hidróxido de litio (8,68 g, 36,2 mmol, 3,0 eq) durante 3 h a 50°C. El THF se evaporó al vacío y se añadieron a la mezcla agua (100 mL) y acetato de etilo (200 mL). La mezcla se acidificó con cuidado a pH 3 por la adición de HCl 1 N. La fase orgánica se aisló y la capa acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (150 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron *in vacuo*. El producto se obtuvo como un sólido blanco (29,0 g, 83% rendimiento), m/z 288 $[M^+ + H]^+$ y se usó en la Etapa 4 sin más purificación.

Etapa 3: 4-Trimetilsilaniloximetil-fenilamina



A una solución agitada de alcohol 4-amino bencílico (16,0 g, 13,0 mmol, 1,0 eq) en THF (400 mL), se añadió trietilamina (18,9 mL, 13,6 mmol, 1,05 eq) seguido de trimetilclorosilano (17,2 mL, 13,6 mmol, 1,05 eq). La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno toda la noche a temperatura ambiente. El THF se evaporó al vacío y la mezcla se dividió con acetato de etilo (300 mL) y agua (300 mL). La fase orgánica se aisló y la capa acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (2 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 150 mL), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y concentraron *in vacuo*. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (24,0 g, 95% rendimiento) y se usó en la Etapa 4 sin más purificación.

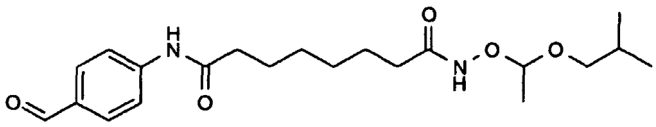
Etapa 4: (1-isobutoxiethoxi)-amida de la (4-hidroximetil-fenil)-amida del ácido octanodioico



Se agitaron juntos el ácido 7-(1-isobutoxi-etoxicarbamoil)-heptanoico (5,0 g, 1,72 mmol, 1,0 eq) y 4-trimetilsilaniloximetilfenilamina (3,38 g, 1,72 mmol, 1,0 eq) en DMF (140 mL). A la mezcla se añadió PyBroP (10,5 g, 2,25 mmol, 1,3 eq) y DiPEA (3,9 mL, 2,25 mmol, 1,3 eq). La reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno toda la noche a temperatura ambiente. Se añadieron acetato de etilo (200 mL) y agua (200 mL). La fase acuosa se aisló y se extrajo de nuevo con acetato de etilo (2 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 50 mL) y salmuera (50 mL), luego se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron *in vacuo*. El producto crudo se disolvió en el mínimo de acetato de etilo y se purificó pasándolo a través de una almohadilla de sílice. El producto se lavó a través de la sílice usando acetato de etilo y se recogió en matraces cónicos de 100 mL hasta que paró la elución por análisis LCMS. La purificación dio un aceite amarillo (3,59 g, 53% rendimiento).

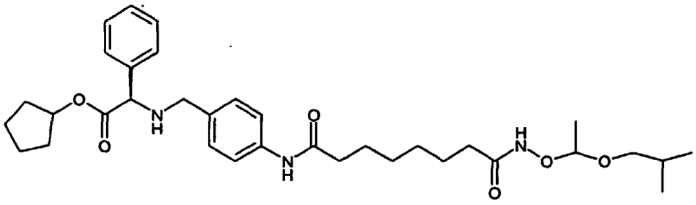
Pureza LCMS 61%, m/z 417 $[M^+ + Na]^+$

Etapa 5: (1-isobutoxi-ethoxi)-amida de la (4-formil-fenil)-amida del ácido octanodioico



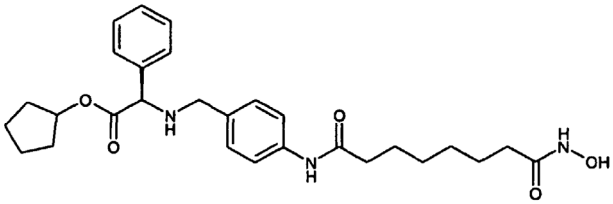
La (1-isobutoxietoxi)-amida de la (4-hidroximetil-fenil)-amida del ácido octanodioico (100 mg, 0,025 mmol, 1,0 eq) se disolvió en DCM (5 mL). A la mezcla de reacción, se añadió MnO_2 (286 mg, 0,33 mmol, 13,0 eq) y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite y se lavó a través de DCM, seguido de la evaporación del disolvente para dar un aceite amarillo (78,6 mg, 79% rendimiento) Pureza LCMS 53%, m/z 415 $[M^+ + Na]^+$. El producto se usó en las siguientes etapas sin más purificación.

Etapa 6: éster de ciclopentilo del ácido (R)-{4-7-(1-isobutoxi-etoxicarbamoil)-heptanoilamino]-bencilamino}-fenil-acético



Se agitaron la (1-isobutoxi-etoxi)-amida de la (4-formil-fenil)-amida del ácido octanodioico (276 mg, 0,70 mmol, 1,0 eq) y el éster de ciclopentilo de Dfenilglicina (170 mg, 0,77 mmol, 1,1 eq) en DCE (15 mL) durante 10 min. Se añadió ácido acético (65 mL) y se agitó durante 2 min. Se introdujo triacetoxiborohidruro de sodio (448 mg, 0,21 mmol, 3,0 eq) y la mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió hidrogenocarbonato de sodio para inactivar la reacción. Después se añadió DCM y la fase orgánica se aisló. La capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM, las capas orgánicas combinadas, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y concentraron *in vacuo* para dar el producto crudo (100 mg, 24%) Pureza LCMS 94,0%, m/z 496 $[M^+ + H]^+$ que se tomó sin más purificación.

Etapa 7: éster de ciclopentilo del ácido (R)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (83)

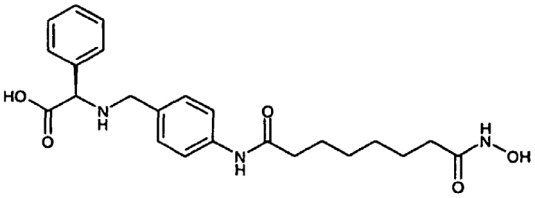


83

Se disolvió el éster de ciclopentilo del ácido (R)-{4-[7-(1-isobutoxi-etoxicarbamoil)-heptanoilamino]-bencilamino}-fenil-acético (50 mg, 0,08 mmol, 1 eq) en DCM (0,5 mL) y se agitó con HCl 4M en dioxano (0,2 mL) durante 30 min. La sal resultante se concentró, se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (83).

Pureza LCMS 94%, m/z 496 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ: 1,41-1,95 (16H, m, 8 x CH_2), 2,15-2,17 (2H, m, CH_2), 2,40 (2H, t, J = 7,2 Hz, CH_2), 4,16 (2H, q, J = 13,5 Hz, CH_2), 5,12 (1H, s, CH), 5,27-5,30 (1H, m, CH), 7,40 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H), 7,50-7,56 (5H, m, Ar-H), 7,67 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H).

Etapa 8: ácido (R)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenil-acético (84)



84

A una disolución de CHR-003644 (50 mg, 0,008 mmol, 1,0 eq) en THF (2 mL) y agua (2 mL), se añadió LiOH (8,0 mg, 0,033 mmol, 4,0 eq). La reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno a 40°C toda la noche. El THF se evaporó bajo el vacío y el disolvente de reacción acuoso restante se lavó con acetato de etilo. La disolución se acidificó a pH 3 y el producto se concentró *in vacuo*. Las sales resultantes se disolvieron en metanol y el producto se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (84).

Pureza LCMS 97%, m/z 428 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ: 1,39-1,41 (4H, m, 2 x CH_2), 1,62-1,74 (4H, m, 2 x CH_2), 2,13-2,15 (2H, m, CH_2), 2,40 (2H, t, J = 7,5 Hz, CH_2), 4,14 (2H, q, J = 12,9 Hz, CH_2), 5,06 (1H, s, CH), 7,39 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H), 7,54 (5H, s, Ar-H), 7,67 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H)

El siguiente compuesto se preparó de una manera similar al Compuesto (83) y Compuesto (84) usando los intermedios apropiados.

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-4-metil-pentanoico (85)

Pureza LCMS 97%, m/z 476 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ:0,98-1,03 (6H, m, 2 x CH_3), 1,41-1,42 (4H, m, 2 x CH_2), 1,71-1,96 (14H, m, 7 x CH_2), 2,10-2,15 (2H, m, CH_2), 2,40 (2H, t, J = 7,2 Hz, CH_2), 3,96-4,01 (1H, m, CH), 4,15-4,26 (2H, m, CH_2), 4,81 (1H, s, CH), 5,31-5,34 (1H, m, CH), 7,44 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H), 7,70 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H)

ácido (S)-ciclohexil-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-acético (87)

Pureza LCMS 95%, m/z 434 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ:1,23-1,96 (18H, m, 9 x CH_2), 2,10-2,15 (2H, m, CH_2), 2,39 (2H, m, CH_2), 3,71 (1H, m, CH), 4,12 (2H, q, J = 7,2 Hz, CH_2), 4,80 (1H, s, CH), 7,43 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H), 7,68 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H)

éster de ciclopentilo del ácido (S)-3-terc-butoxi-2-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-butírico (88)

Pureza LCMS 83%, m/z 520 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ:1,19 (9H, s, 3 x CH_3), 1,29 (3H, d, J = 7,8 Hz, CH_3), 1,37-1,41 (4H, m, CH_2), 1,64-1,89 (12H, m, CH_2), 2,09-2,15 (2H, m, CH_2), 2,40 (2H, t, J = 7,2 Hz, CH_2), 3,36-3,37 (1H, m, CH), 3,70-3,71 (1H, m, CH), 4,24-4,27 (2H, m, CH_2), 5,17-5,19 (1H, m, CH), 7,42 (2H, d, J = 6,9 Hz, Ar-H), 7,68 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H)

éster de ciclopentilo del ácido (S)-3-terc-butoxi-2-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-propionico (89)

Pureza LCMS 95%, m/z 506 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ:1,23 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 1,36-2,09 (16H, m, 8 x CH_2), 1,66 (2H, t, J=7,7Hz, CH_2), 1,75 (2H, t, J=7,4Hz, CH_2), 2,11 (2H, t, J=7,4Hz, CH_2), 2,40 (2H, t, J=7,3Hz, CH_2), 3,92 (2H, m, CH_2), 4,16 (1H, m, CH), 4,26 (2H, s, CH_2), 5,32 (1H, m, CH), 7,45 (2H, d, J=8,5Hz, ArH), 7,67 (2H, dd, J=3,2, 8,3Hz, ArH).

ácido (S)-3-terc-butoxi-2-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-propionico (90)

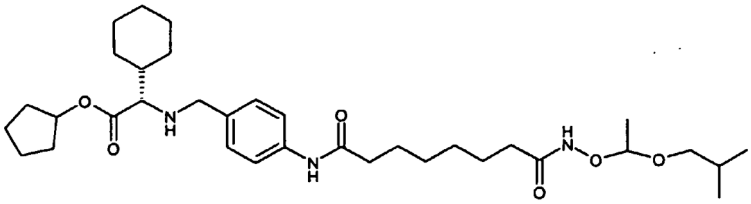
Pureza LCMS 95%, m/z 438 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ: 1,25 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 1,39-1,42 (4H, m, 2 x CH_2), 1,62-1,69 (4H, m, 2 x CH_2), 2,08-2,17 (2H, m, CH_2), 2,40 (2H, t, J = 7,5 Hz, CH_2), 3,85-3,96 (2H, m, CH_2), 4,01-4,04 (1H, m, CH), 4,26 (2H, s, CH_2), 7,46 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H), 7,68 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H)

éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-3-fenil-propionico (91)

Pureza LCMS 95%, m/z 510 $[M^+ + H]^+$, ^{1}H RMN (300 MHz, MeOD), δ:1,17-2,43 (22H, m, 11 x CH_2), 4,19-4,30 (2H, m, CH_2), 5,08 (1H, s, CH), 5,20- 5,26 (1H, m, CH), 7,24 -7,71 (9H, m, Ar-H)

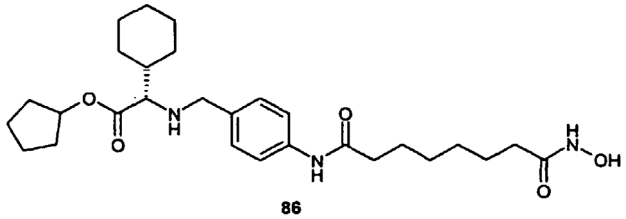
El Compuesto (86) se preparó vía una metodología alternativa. Las condiciones modificadas se detallan más abajo.

Etapa 6b: éster de ciclopentilo del ácido (S)-ciclohexil-{4-[7-(1-isobutoxi-etoxicarbamoil)-heptanoilamino]-bencilamino}-acético



Se agitaron (1-isobutoxi-etoxi)-amida de la (4-formil-fenil)-amida del ácido octanodioico (220 mg, 0,056 mmol, 1,0 eq) y L-ciclohexil- glicina éster de ciclopentilo (138,9 mg, 0,062 mmol, 1,1 eq) en metanol (8 mL) toda la noche a temperatura ambiente. Se introdujo borohidruro de sodio (31,8 mg, 0,084 mmol, 1,5 eq) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min. La mezcla de reacción se transfirió a un baño de hielo y se añadieron 2 gotas de hidróxido de sodio (2M). Se añadió dietil-éter y la fase orgánica se aisló. La capa acuosa se extrajo de nuevo con dietil-éter, las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera. La fase orgánica se secó después ($MgSO_4$), se filtró y se concentró *in vacuo* para dar el material crudo que se pasó a la siguiente etapa sin más purificación.

Etapa 7b: éster de ciclopentilo del ácido (S)-ciclohexil-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-acético (86)

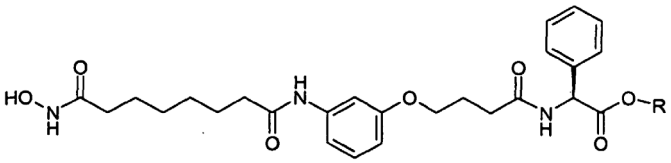


86

El material de la etapa 6b (50 mg, 0,083 mmol, 1 eq) se disolvió en DCM/metanol (2 mL : 2 mL) y se agitó con TFA (1,0 mL) durante 2 h. La sal resultante se concentró, se disolvió en metanol y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (86).

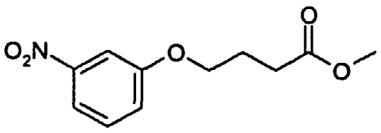
Pureza LCMS 100%, m/z 502 $[M^+ + H]^+$, ^1H RMN (300 MHz, MeOD), δ: 1,28-1,98 (26H, m, 13 x CH_2), 2,10-2,15 (2H, m, CH_2), 2,40 (2H, t, J = 7,8 Hz, CH_2), 3,81 (1H, d, J = 3,9 Hz, CH), 4,21 (2H, m, CH_2), 5,01 (1H, s, CH), 5,23-5,25 (1H, m, CH), 7,43 (2H, d, J = 8,4 Hz, Ar-H), 7,68 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H)

Síntesis de 92 y 93



R = ciclopentilo 92
R = H 93

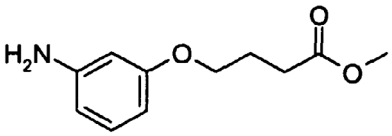
Etapa 1: éster de metilo del ácido 4-(3-nitro-fenoxi)-butírico



A una disolución de 3-nitrofenol (8,35 g, 60 mmol), en DMF (50 ml) se añadió K_2CO_3 (16,56 g, 120 mmol) y 1,4-bromobutirato de metilo (11,95 g, 66 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La fase orgánica se separó y se lavó con agua (2 x 200 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se concentró *in vacuo*. El éter requerido se aisló después de la cromatografía (acetato de etilo : heptano, 1 : 9) como un sólido amarillo palo (12,2 g, 85% rendimiento).

Pureza LCMS 100%, m/z 240 $[M^+ + H]^+$.

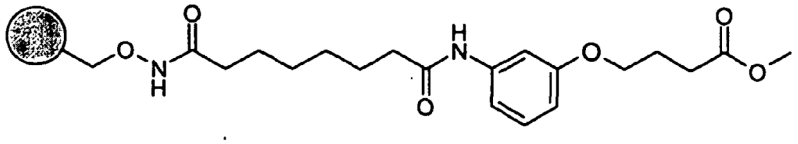
Etapa 2: éster de metilo del ácido 4-(3-amino-fenoxi)-butírico



El nitro éster de la Etapa 1 (250 mg, 1 mmol) se disolvió en etanol (3 ml). Se añadió Pd/carbono (40 mg) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno (presión de balón) durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite. La almohadilla de celite se lavó con etanol y las fracciones orgánicas combinadas se concentraron *in vacuo* para dar el producto requerido como un aceite naranja (210 mg, 100% rendimiento).

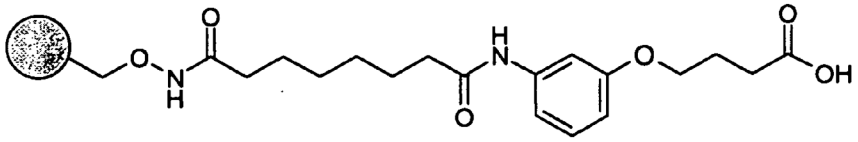
Pureza LCMS 89%, m/z 210 $[M^+ + H]^+$. La anilina se usó en la siguiente Etapa sin más purificación.

Etapa 3: Acoplamiento a la resina



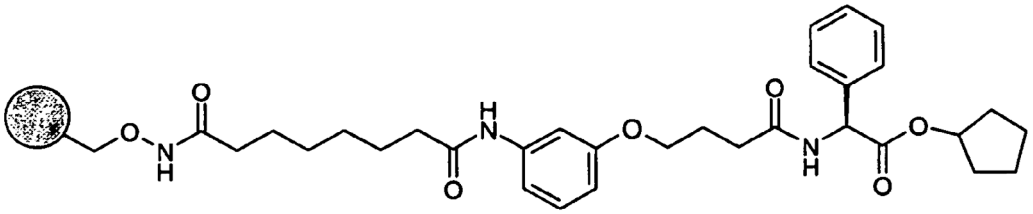
La resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (8 g, 7,52 mmol, cargando, 0,94 mmol/g) se hinchó en DCM/DMF (80 ml/80 ml). Se añadieron PyBOP (11,8 g, 22,6 mmol) y diisopropiletilamina (13,1 ml, 75,2 mmol) al matraz seguido del éster de metilo del ácido 4-(3-amino-fenoxi)-butírico (4,73g, 22,6 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 72 h antes del lavado estándar y del secado.

Etapa 4: hidrólisis del éster



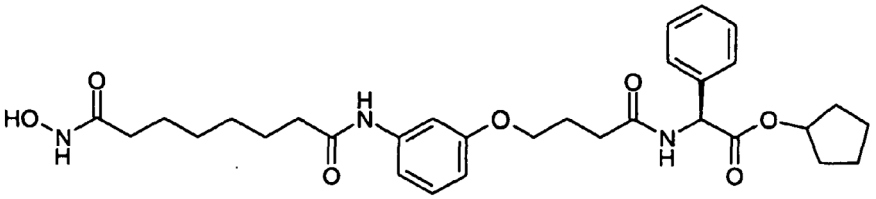
La resina de la Etapa 3 (9,5 g) se suspendió en THF/MeOH (34 ml/34 ml). Se añadió NaOH (1,4 M, ac., 34 ml) y la reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La resina se lavó usando el procedimiento de lavado estándar antes del secado al aire.

Etapa 5: acoplamiento del éster de amino ácido



La resina de la Etapa 4 (2,1g), se suspendió en DCM/DMF (20ml/20 ml). Se añadieron secuencialmente PyBOP (3,1 g, 5,92 mmol), el éster de ciclopentilo de N-fenilglicina (2,4 g, 5,92 mmol) y diisopropiletilamina (3,4 ml, 19,7 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. La resina se sometió a un lavado estándar y se secó.

Etapa 6: éster de ciclopentilo del ácido (S)-{4-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-butirilamino}-fenil-acético (92)

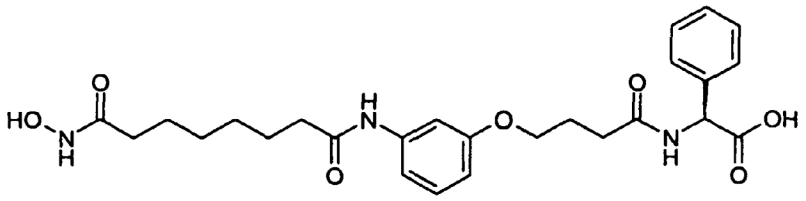


92

El éster de ciclopentilo unido a la resina de la Etapa 5 (1,1 g) se agitó con TFA 2%/DCM (10 ml) durante 10 minutos antes de filtrar la resina y evaporar el disolvente bajo presión reducida a temperatura ambiente. El proceso se repitió (x3) y el producto crudo combinado se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (92) (114 mg).

Pureza LCMS 99%, m/z 568 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,40 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,45 -1,90 (13 H, m, alquilo), 2,10 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,40 (2 H, t, CH_2), 2,50 (2 H, m, CH_2), 4,00 (2 H, m, CH_2), 5,15 (1 H, m,), 5,40 (1 H, s, NHCHCO), 6,65 (1 H, m, Ar) 7,15 (1 H, m, Ar), 7,20 (1 H, t, Ar), 7,30 (1 H, s, Ar), 7,40 (5 H, s, Ar).

Etapa 7: ácido (S)-{4-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenoxi]-butirilamino}-fenil-acético (93)

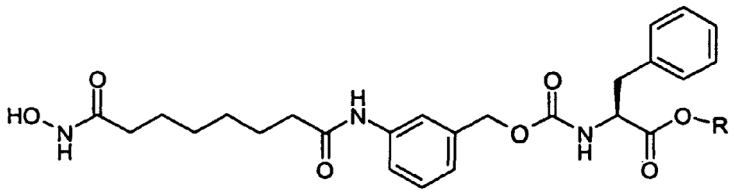


93

La resina del éster de ciclopentilo de la Etapa 6 (500mg) se suspendió en THF (15 ml). A la suspensión se añadió NaOH (1,4M ac., 1,6 ml) y la reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El filtrado se eliminó y la resina se lavó y secó antes de la división. La división se realizó por agitación con TFA 2%/DCM (5 ml) durante 10 minutos antes de filtrar la resina y evaporar el disolvente bajo presión reducida a temperatura ambiente. El proceso se repitió (x3) y el producto crudo combinado se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (93) (62 mg).

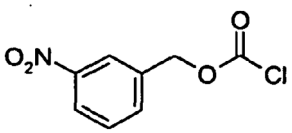
Pureza LCMS 99%, m/z 500 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,40 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,60 -1,80 (4 H, m, alquilo), 2,10 (4 H, m, 2 x CH_2), 2,40 (2 H, t, CH_2), 2,50 (2 H, t, CH_2), 4,00 (2 H, m, CH_2), 5,45 (1 H, s, NHCHCO), 6,65 (1 H, d, Ar) 7,10 (1 H, m, Ar), 7,20 (1 H, t, Ar), 7,25 (1 H, s, Ar), 7,30-7,45 (5 H, m, Ar).

Síntesis de 94 y 95



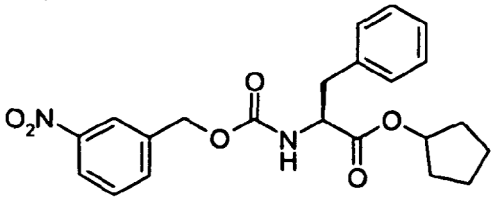
R = ciclopentilo 94
R = H 95

Etapa 1: Formación del 3-nitro-bencil-cloroformiato



A una disolución de alcohol 3-nitro bencílico (10 g, 65 mmol), en dioxano (anhidro, 100 ml) se añadió cloroformiato de triclorometilo (9,47 ml, 78 mmol). La reacción se calentó a 75°C bajo nitrógeno durante 16 h. El disolvente se evaporó y el residuo se suspendió de nuevo en dioxano y se evaporó. El procedimiento se repitió (x 3). El cloroformiato crudo se usó en la siguiente Etapa sin más purificación.

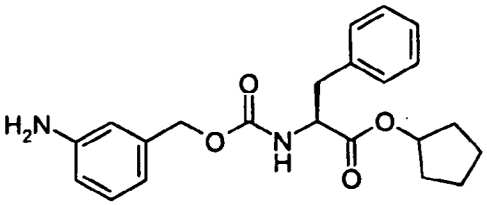
Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-(3-nitro-benciloxicarbonilamino)-3-fenil-propionico



La sal del éster de L-Phe-ciclopentilo.TsOH (9,42 g, 23 mmol) se suspendió en DCM (40 ml). Se añadió trietilamina (6,5 ml, 47 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 min.

El cloroformiato de la Etapa 1 (5g, 23 mol) disuelto en DCM (10 ml) añadido a la mezcla de reacción se añadió gota a gota con enfriamiento (baño de hielo). La reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó y el residuo disuelto en EtOAc (100 ml) se lavó con agua (50ml x 3) y se secó (Na_2SO_4) antes de su concentración *in vacuo*. El material crudo se purificó por cromatografía (EtOAc : heptano, 1 : 9) para dar el carbamato requerido (6,4 g, 67% rendimiento). m/z 413 $[M^+ + H]^+$

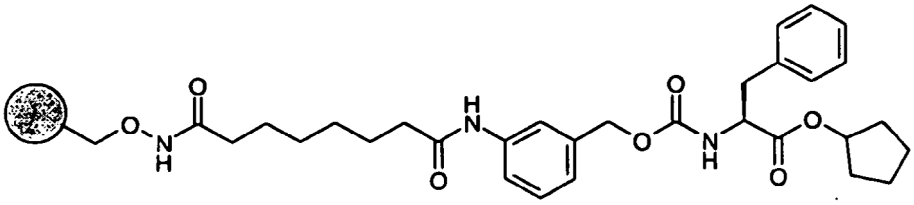
Etapa 3: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-(3-amino-benciloxicarbonilamino)-3-fenil-propionico



El nitro carbamato de la Etapa 2 (6,4 g, 15,5 mmol) se disolvió en etanol (64 ml). Se añadió dihidrato de cloruro de estaño (17,5 g, 77 mmol) y la reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en EtOAc (60 ml). Una disolución saturada de tartrato de sodio y potasio (60 ml) se añadió seguido de una disolución de hidrogenocarbonato de sodio saturado (120 ml). La solución bifásica se agitó durante 15 min. La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (60 ml x1). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron y el disolvente se evaporó para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía (EtOAc : heptano 1 : 3 . 1 : 1). El producto requerido se aisló (3,5 g, 59% rendimiento).

Pureza LCMS 100%, m/z 383 $[M^+ + H]^+$.

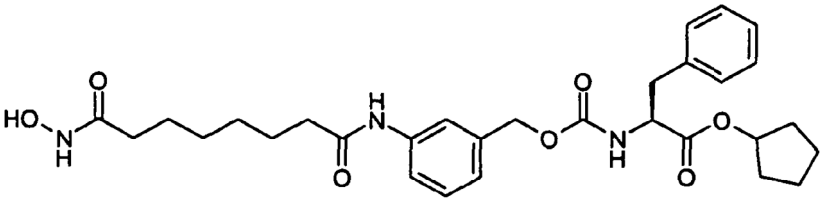
Etapa 4: Acoplamiento a la resina



La resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (2,0 g, 1,88 mmol, cargando, 0,94 mmol/g) se hinchó en DMF (20 ml). Se añadieron PyBOP (2,93 g, 5,64 mmol) y diisopropil-etilamina (3,25 ml, 18,8 mmol).

El carbamato de anilino de la Etapa 3 (1,8 g, 4,7 mmol) disuelto en DCM (20 ml) se añadió y la reacción se agitó durante 4 d antes de que se quitara el filtrado y del lavado estándar de la resina que se secó al aire.

Etapa 5: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benciloxicarbonilamino]-3 -fenil-propionico (94)

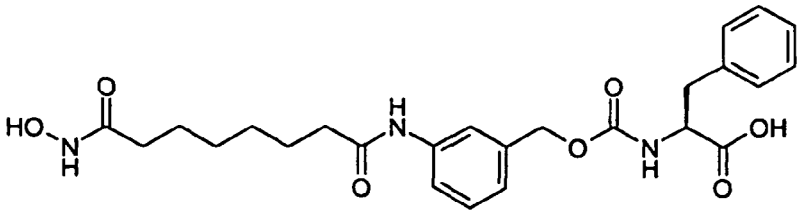


94

El éster de ciclopentilo unido a la resina de la Etapa 4 (2g) se agitó con TFA 2%/DCM (15 ml) durante 10 minutos antes de filtrar la resina y evaporar el disolvente bajo presión reducida a temperatura ambiente. El proceso se repitió (x3) y el producto crudo combinado se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (94).

Pureza LCMS 95%, m/z 554 $[M^+ + H]^+$, ^1H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,30 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,40 -1,90 (13 H, m, alquilo), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,30 (2 H, t, CH_2), 2,90 (2 H, ddd, CH_2), 3,80 (1 H, m), 4,25 (1 H, dd, NHCHCO), 4,90 (2 H, s, CH_2), 5,05 (1 H, m), 5,35 (1 H, m), 6,95 (1 H, d, Ar) 7,05-7,25 (6 H, m, Ar), 7,35 -7,75 (2 H, m, Ar).

Etapa 6: ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benciloxicarbonilamino]3 -fenil-propionico (95)

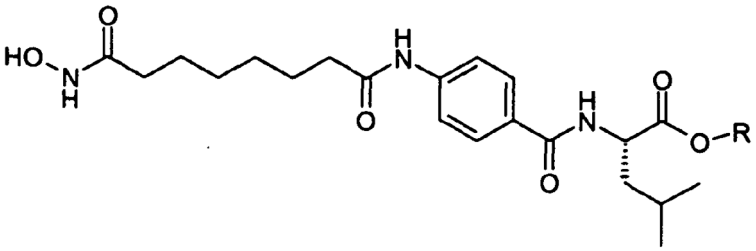


95

El Compuesto (94) (100 mg, 0,18 mmol) se disolvió en THF (1 ml) y se añadió NaOH 2M (1 ml). El recipiente de reacción se agitó durante 4 h antes de eliminar el THF vía una corriente de nitrógeno. El residuo acuoso se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (95) (62 mg).

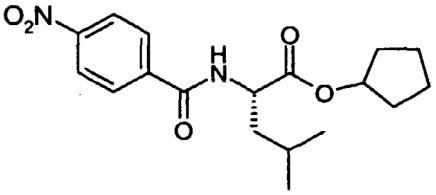
Pureza LCMS 95%, m/z 486 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:1,35 (4 H, m, 2 x CH_2), 1,55 -1,75 (4 H, m, alquilo), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,35 (2 H, t, CH_2), 2,95 (2 H, dd, CH), 3,20 (1 H, dd, CH), 4,45 (1 H, dd, NHCHCO), 5,00 (2 H, s, CH_2), 7,05 (1 H, d, Ar), 7,20-7,35 (6 H, m, Ar), 7,55 (2 H, m, Ar).

Síntesis del Compuesto (98) y Compuesto (99)



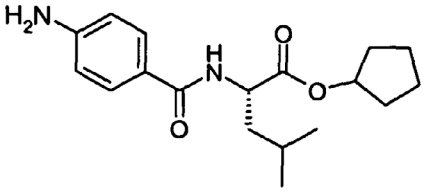
R = ciclopentilo 98
R = H 99

Etapa 1: éster de ciclopentilo del ácido (S)-4-metil-2-(4-nitro-benzoilamino)-pentanoico



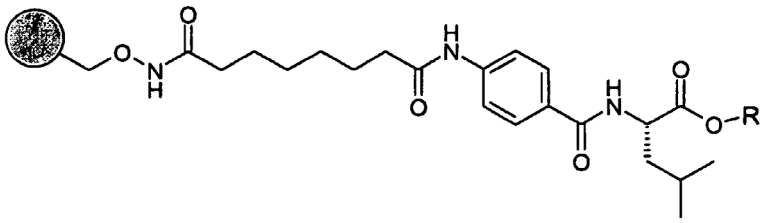
La sal de éster de L-leucina ciclopentilo. TsOH (7,98 g, 21,51 mmol) se disolvió en THF (40 ml) y se añadió trietilamina (6 ml, 21,5 mmol). Se añadió a porciones con enfriamiento, baño de hielo, cloruro de 4-nitrobenzoilo (4 g, 21,5 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h antes de la evaporación hasta secarse. El residuo se disolvió en DCM (100 ml) y se lavó con hidrogenocarbonato de sodio saturado (3 x 100 ml), HCl 1 M (3 x 100 ml) y salmuera, se secó (Na_2SO_4), y el disolvente se eliminó *in vacuo*, para dar el producto requerido 5,25 g (70% rendimiento) que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. Pureza LCMS 100%, m/z 349 $[M^{+}+H]^{+}$

Etapa 2: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-(4-amino-benzoilamino)-4-metil-pentanoico



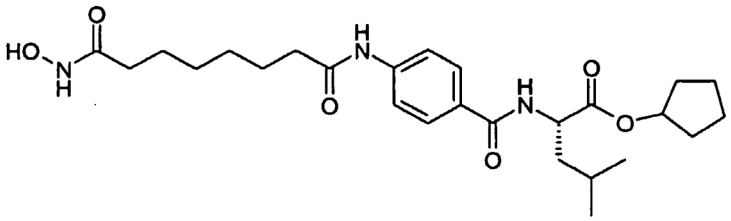
La nitro amida de la Etapa 1 (5,25 g, 15,1 mmol) se disolvió en etanol (100 ml). se añadió Pd/carbono (200 mg) y la reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente con hidrógeno (presión de balón). La mezcla de reacción se filtró a través de celite y se evaporó para dar la amida de la amina requerida 3,9 g (81% rendimiento) que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. Pureza LCMS 100%, m/z 319 $[M^{+}+H]^{+}$

Etapa 3: Acoplamiento a la resina



La resina de hidroxilamina de Wang derivatizada con ácido subérico (1,6 g, cargando 1,8 mmol/g) se hinchó en DCM (anhidro, 20 ml). Se añadió gota a gota 1-cloro-N,N-2-trimetilpropenilamina (1,15 ml, 8,64 mmol) antes de su agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió el éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-(4-amino-benzoilamino)-4-metil-pentanoico (2,75 g, 8,64 mmol) seguido de trietilamina (2,4 ml, 17,63 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La resina se lavó (estándar) y se secó al aire.

Etapa 4: éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benzoilamino]-4-metil-pentanoico (98)

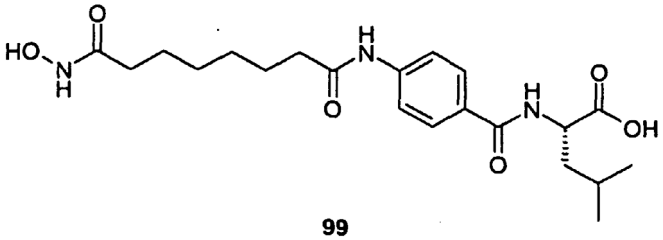


98

El éster de ciclopentilo unido a la resina de la Etapa 3 se agitó con TFA 2%/DCM (10 ml) durante 10 minutos antes de filtrar la resina y evaporar el disolvente bajo presión reducida a temperatura ambiente. El proceso se repitió (x 3) y el producto crudo combinado se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (98) (36 mg).

Pureza LCMS 91%, m/z 490 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:0,80 -0,95 (6 H, 2 x CH_3), 1,25 (4 H, m, alquilo), 1,40 -1,85 (15 H, m, alquilo), 2,00 (2 H, t, CH_2), 2,30 (2 H, t, CH_2), 4,45 (1 H, m, CH), 5,05 (1 H, m, CH), 7,60 (2 H, d, Ar), 7,75 (2 H, d, Ar).

Etapa 5: ácido (S)-2-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-benzoilamino]-4-metil-pentanoico (99)



99

El Compuesto (98) (21 mg, 0,043 mmol) se disolvió en THF (1 ml) y se añadió NaOH 2M (1 ml). El recipiente de reacción se agitó durante 16 h antes de eliminar el THF insuflando una corriente de gas N_2 en la superficie de la disolución. El residuo acuoso se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto (99) (5,2 mg).

Pureza LCMS 92%, m/z 422 $[M^{+}+H]^{+}$, ^{1}H RMN (400 MHz, MeOD), δ:0,95 -1,05 (6 H, m, 2 x CH_3), 1,30 -1,50 (4 H, m, alquilo), 1,55 -1,85 (7 H, m, alquilo), 2,10 (2 H, t, CH_2), 2,40 (2 H, t, CH_2), 4,65 (1 H, m, CH), 7,65 (2 H, d, Ar), 7,80 (2 H, d, Ar).

Medida de las actividades biológicas

Actividad de histona desacetilasa

Se midió la capacidad que tenían los compuestos para inhibir las actividades de histonadesacetilasa usando el ensayo de actividad fluorescente de HDAC comercialmente disponible de Biomol. En resumen, se incuba el sustrato *Fluor de Lys*™, una lisina con una acetilación épsilon-amino, con la fuente de la actividad de histona desacetilasa (extracto nuclear de HeLa) en presencia o ausencia del inhibidor. La desacetilación del sustrato sensibiliza al revelador del sustrato *Fluor de Lys*™, que genera un fluoróforo. Así, la incubación del sustrato con una fuente de actividad de HDAC causa un aumento de la señal que es disminuida en presencia de un inhibidor de HDAC.

Los datos son expresados como un porcentaje del control, medido en ausencia del inhibidor, siendo restada de todas las muestras con señal de fondo, como sigue:

$$\% \text{ actividad} = ((S^i - B) / (S° - B)) \times 100$$

donde S' es la señal en presencia de sustrato, enzima y inhibidor, S° es la señal en presencia de sustrato, enzima y el vehículo en el cual el inhibidor es disuelto, y B es la señal de fondo medida en ausencia de la enzima.

Los valores de IC_{50} fueron determinados por un análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados de ocho puntos de datos a la ecuación para la respuesta de dosis sigmoidea con pendiente variable (actividad en % frente al log de la concentración del compuesto), usando el software Prism de Graphpad.

La actividad de la histona desacetilasa del extracto nuclear crudo derivado de células HeLa se usó para la selección. La preparación, comprada en 4C (Seneffe, Bélgica), se preparó con células HeLa cultivadas durante la fase de crecimiento exponencial. El extracto nuclear se preparó según Dignam JD1983 *Nucl. Acid. Res*. **11**, 1475-1489, fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C. La composición del tampón final fue Hepes 20 mM, KCl 100 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,2 mM y glicerol al 20 % (v/v). Los resultados de IC_{50} fueron asignados a uno de los 3 intervalos siguientes:

Intervalo A: IC_{50} <100nM,

Intervalo B: IC_{50} de 101nM a 1000nM;

Intervalo C: IC_{50}> 1001nM.

NT = No analizado

Los resultados de analizar los compuestos de los ejemplos en este ensayo se dan en la segunda columna de la Tabla 2 más abajo.

Ensayos de inhibición en células

Se cultivaron las líneas de células de cáncer correspondientes (Hela, U937 y HUT) creciendo en fase log y se sembraron a 1000 células/pocillo (200 μl volumen final) en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Después de 24 h de crecimiento celular las células fueron tratadas con los compuestos (concentración final 20 μM). Las placas fueron incubadas de nuevo entonces durante 72 h más antes de que se llevara a cabo el ensayo de viabilidad de células de sulforhodamina B (SRB) según Skehan 1990 *J Natl Canc Inst* **82**, 1107-1112.

Los datos se expresaron como una inhibición en porcentaje del control, medido en ausencia del inhibidor, como sigue:

$$\% \text{ inhibición} = 100-((S^i/S°)\times 100)$$

donde S^i es la señal en presencia de inhibidor y S° es la señal en presencia de DMSO.

Los valores de IC_{50} fueron determinados por el análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados de ocho puntos de datos a la ecuación para la respuesta de dosis sigmoidea con pendiente variable (actividad en % frente a la concentración de del log del compuesto), usando el software Prism de Graphpad. Los resultados de IC_{50} fueron asignados a uno de 3 intervalos como sigue:

Intervalo A: IC_{50} <330nM,

Intervalo B: IC_{50} de 330nM a 3300nM;

Intervalo C: IC_{50}> 3301 nM.

NT = No probado

Los resultados de analizar los compuestos de los ejemplos en este ensayo se dan en las columnas tercera - quinta de la Tabla 2 más abajo.

Tabla 2

Ejemplo Nº.	Actividad de HDAC	Hela	U937	HUT
20	B	B	A	B
21	B	C	C	C
22	B	B	B	B
23	B	C	C	C
26	A	B	B	B
27	B	C	NT	NT
28	B	B	B	B
29	B	B	B	B
30	B	C	NT	NT
31	B	B	A	B
32	A	B	NT	B
33	B	C	NT	NT
34	B	B	A	B
35	B	B	B	B
36	A	B	A	B
37	B	C	C	C
38	B	NT	NT	NT
39	B	NT	A	B
40	C	C	C	C
41	C	C	C	C
60	B	B	B	B
61	B	C	NT	NT
62	B	C	C	B
63	B	NT	NT	NT
69	B	B	NT	B
70	B	C	NT	NT
71	A	B	A	B
72	A	NT	NT	NT
73	A	B	A	B
74	B	NT	NT	NT
75	A	B	A	A

76	A	NT	NT	NT
77	A	B	A	A
78	A	NT	NT	NT
79	A	NT	C	C
80	B	NT	NT	NT
81	A	C	C	B
82	B	NT	NT	NT
83	B	B	B	B
84	B	NT	NT	NT
85	B	C	A	B
86	B	C	A	B
87	A	NT	NT	NT
88	B	B	A	B
89	B	C	A	B
90	B	NT	NT	NT
91	B	C	B	B
92	A	B	B	B
93	A	NT	NT	NT
94	B	NT	B	B
95	B	NT	NT	NT
98	B	B	B	B
99	C	NT	NT	NT

Ensayo de carboxiesterasa de células rotas

Preparación del extracto celular

Se lavaron células de tumor U937 o Hct116 (~ 10^9) en 4 volúmenes de PBS de Dulbeccos (~ 1 litro) y se granularon a 160g durante 10 min a 4ºC. Esto se repitió dos veces y el pelete de células final fue suspendido de nuevo después en 35 ml del tampón de homogeneización frío (Trizma 10 mM, NaCl 130 mM, $CaCl_2$ 0,5mM, pH 7,0) a 25°C. Los homogenados se prepararon por cavitación con nitrógeno (700psi durante 50 minutos a 4°C). El homogenado fue guardado en hielo y suplementado con un cóctel de inhibidores diseñados para dar concentraciones finales de

Leupeptina 1 μM

Aprotinina 0,1 μM

E64 8 μm

Pepstatina 1,5 μm

Bestatina 162 μm

Quimostatina 33 μm

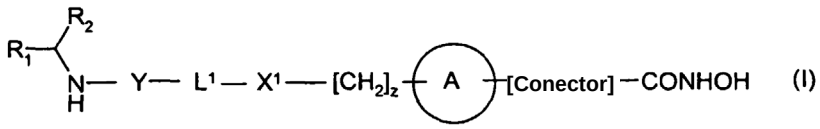
Después de la aclaración del homogenado de células por centrifugación a 360 revoluciones por minuto durante 10 minutos, el sobrenadante resultante se usó como una fuente de actividad de esterasa y se pudo almacenar a -80°C hasta que se requirió.

Medida de división del éster

La hidrólisis del éster al ácido carboxílico correspondiente se puede medir usando este extracto celular. Para realizarlo este extracto celular (~30 μg / volumen de ensayo total de 0,5 ml) fue incubado a 37°C en Tris-HCl 25 mM, NaCl 125 μM, tampón, pH 7,5 a 25°C. En el tiempo cero, el éster relevante (sustrato), a una concentración final de 2,5 μM fue añadido entonces y las muestras fueron incubadas a 37°C durante el tiempo adecuado (por lo general cero o 80 minutos). Las reacciones fueron paradas por la adición de 3x volúmenes de acetonitrilo. Para las muestras de tiempo cero, el acetonitrilo fue añadido antes del compuesto de éster. Después de la centrifugación a 12000g durante 5 minutos, las muestras fueron analizadas respecto al éster parenteral y su ácido carboxílico correspondiente a temperatura ambiente por LCMS (Sciex API 3000, bomba binaria HP1100, CTC PAL). Las condiciones cromatográficas usadas estaban basadas en una columna AceCN (75*2,1 mm) y una fase móvil de acetonitrilo al 5-95 % en agua/ácido fórmico al 0,1 %.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) o una sal, N-óxido, hidrato o solvato del mismo:



en donde

R_1 es un grupo éster de que es hidrolizable por una o varias de las enzimas carboxilesterasa intracelulares hCE1, hCE-2 y hCE-3 en un grupo ácido carboxílico;

R_2 es ciclohexilmetilo, ciclohexilo, piridin-3-ilmetilo, sec-butilo, terc-butilo, 1-benciltio-1-metiletilo, 1-etiltio-1-metiletilo y 1-mercapto-1-metiletilo, fenilo, bencilo, feniletilo, terc-butoximetilo o iso-butilo.

Y es un enlace, -C(=O)-, -S(=O)$_2$-, -C(=O)O-, -C(=O)NR$_3$-, -C(=S)-NR$_3$, -C(=NH)NR$_3$ o -S(=O)$_2$NR$_3$- en donde R_3 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido;

L^1 es un radical divalente de fórmula -(Alk^1)$_m$(Q)$_n$(Alk^2)$_p$- en donde

m, **n** y **p** son independientemente 0 o 1,

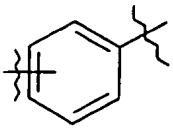
Q es (i) un radical carbocíclico o heterocíclico monocíclico o bicíclico divalente opcionalmente sustituido con 5-13 miembros de anillo, o (ii), en el caso en el que tanto m como p sean 0, un radical divalente de fórmula-X^2-Q^1- o -Q^1-X^2 en el que X^2 es -O-, S- o NR^A- en donde R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido, y Q^1 es un radical carbocíclico o heterocíclico monocíclico o bicíclico divalente opcionalmente sustituido con 5-13 miembros de anillo,

Alk^1 y **Alk^2** representan independientemente radicales cicloalquilo C_3-C_7 divalentes opcionalmente sustituidos, u opcionalmente sustituido de cadena lineal o ramificada, radicales alquileno C_1-C_6, alquenileno C_2-C_6, o alquinileno C_2-C_6 que pueden contener opcionalmente o estar terminados en un enlace éter (-O-), tioeter (-S-) o amino (-NR^A-) en donde R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido;

X^1 representa un enlace; -C(=O); o -S(=O)$_2$-; -NR$_4$C(=O)-, -C(=O)NR$_4$-, -NR$_4$C(=O)NR$_5$-, -NR$_4$S(=O)$_2$-, O-S(=O)$_2$NR$_4$- en donde R_4 y R_5 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido;

z es 0 o 1;

A es el siguiente sistema de anillo, opcionalmente sustituido:



-[Conector]- representa un radical divalente de fórmula - (CH$_2$)$_x$Z-L^2- en donde

x es 0 o 1;

Z es un enlace,-NR$_3$C(=O)-, -C (=O)NR$_3$-, -NR$_4$C(=O)NR$_3$-, -C(=S)-NR$_3$, -C (=NH)-NR$_3$-NR$_3$S (=O)$_2$-, o -S(=O)$_2$NR$_3$- en donde R_3 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6; -C(=O); o -S(=O)$_2$-; y L^2 representa un radical alquileno C_4-C_7, alquenileno C_4-C_6 o alquinileno C_4-C_6 opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, que puede contener opcionalmente o terminar en una unión éter (-O-), tioeter (-S-) o amino (NR^A-) en donde R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido; y en donde la expresión "opcionalmente sustituido" significa opcionalmente sustituido con hasta cuatro sustituyentes compatibles, cada uno de los cuales es independientemente seleccionado de alquilo C_1-C_6, alcoxi (C_1-C_6), hidroxi, hidroxi alquilo (C_1-C_6), mercapto, mercapto alquilo (C_1-C_6), alquil (C_1-C_6)-tio, fenilo, halo (incluyendo fluoro, bromo y cloro), trifluorometilo, trifluorometoxi, nitro, nitrilo (-CN), oxo, -COOH, -COOR^A, -COR^A,-SO$_2$R^A, -CONH$_2$, -SO2NH$_2$, -CONHR^A, -SO$_2$NHR^A, -CONR^{A}R^B, -SO$_2$NR^{A}R^B, -NH$_2$, -NHR^A, -NR^{A}R^B, -OCONH$_2$, -OCONHR^A, -OCONR^{A}R^B, -NHCOR^A, -NHCOOR^A, -NR^{B}COOR^A, -NHSO$_2$OR^A, -NR^{B}SO$_2$OH, -NRBSO$_2$OR^A, -NHCONH$_2$, -NR$_4$CONH$_2$, -NHCONHR^B, -NR^{A}CONHR^B, -NHCONR^{A}R^B, o -NR^{A}CONR^{A}R^B en donde R^A y R^B son independientemente alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_6), fenilo o heteroarilo monocíclico con 5 o 6 átomos de anillo.

2. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 en donde x es 0.

3. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que Z es -C(=O)-, -NHC(=O)- o-C (=O)NH-.

4. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 2 o la reivindicación 3 en el que L^2 es $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, o $-(CH_2)_7-$.

5. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que z es 0.

6. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que Y es $-S(=O)_2-$, $-C(=S)-NR^3$, $-C(=NH)-NR^3$ o $-S(=O)_2NR^3-$ en el que R^3 es hidrógeno o alquilo (C_1-C_6).

7. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que Y es un enlace.

8. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que, el radical L^1, Alk^1 y Alk^2, cuando están presentes, se seleccionan de $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$,- $CH_2CH_2CH_2-$, y radicales divalente ciclopropilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

9. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que, en el radical L^1, Q es un radical fenilo divalente o un heteroarilo mono- o bi-cíclico teniendo el radical de 5 a13 miembros de anillo.

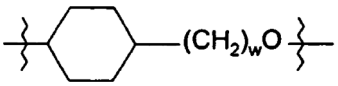
10. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 8 en el que Q es 1,4-fenileno.

11. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que, en el radical L^1 m y p son 0.

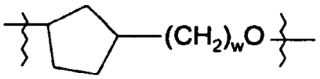
12. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que, en el radical L^1, n y p son 0 y m es 1.

13. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que, en el radical L^1, m, n y p son todos 0.

14. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el radical $-Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$ se selecciona de -C(=O)-, -C(=O)NH-, $-(CH_2)_v-$. $-(CH_2)_vO-$, -C(=O)-$(CH_2)_v$, -C(=O)-$(CH_2)_vO-$, -C(=O)-NH-$(CH_2)_w$, -C(=O)-NH-$(CH_2)_wO-$



y



en el que v es 1, 2, 3 o 4 y w es 1, 2 o 3.

15. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que el radical $-Y-L^1-X^1-[CH_2]-$ es $-CH_2-$, $-CH_2O-$, -C(=O)-CH_2-, C(=O)-CH_2O-, -C(=O)-NH-CH_2-, o -C(=O)-NH-CH_2O-.

16. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que R_1 es un grupo éster de fórmula $-(C=O)OR_9$ en el que R_9 es

(i) R_7R_8CH- en el que R_7 es alquil (C_1-C_3)-$(Z^1)_a$-alquil (C_1-C_3)- o alquenil alquil (C_2-C_3)-$(Z^1)_a$-alquil (C_1-C_3)- opcionalmente sustituido en el que a es 0 o 1 y Z' es -O-, -S-, o -NH-, y R_8 es hidrógeno o alquil (C_1-C_3)-o R_7 y R_8, tomados juntos con el carbono al cual se unen, forma un anillo cicloalquilo C_3-C_7 opcionalmente sustituido o un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 átomos de anillos; o

(ii) fenilo opcionalmente sustituido o heterocíclico monocíclico con 5 o 6 átomos de anillo,

17. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 16 en el que R_9 es metilo, el etilo, n- o iso-propilo, n- o sec-butilo, ciclohexilo, alilo, fenilo, bencilo, 2-, 3- o 4-piridilmetilo, N-metilpiperidin-4-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo o metoxietilo.

18. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 17 en el que R_9 es ciclopentilo.

19. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 en el que la fórmula (I) define al éster de ciclopentilo del ácido (S)-3-terc-butoxi-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino) - bencilamino]-propionico;

20. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 en el que la fórmula (I) define al éster de ciclopentilo del ácido (S)-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino] - fenil-acético;

21. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 en el que la fórmula (I) define al éster de ciclopentilo del ácido (S)-[4-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino] - fenil-acético;

22. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 en el que la fórmula (I) define al éster de ciclopentilo del ácido (S)-2-[3-(7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino] - 4-metil-pentanoico.

23. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

24. El uso de un compuesto de fórmula (I) como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 en la preparación de una composición para el tratamiento de una enfermedad de proliferación celular, enfermedad relacionada con la poliglutamina, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad autoinmune, enfermedades inflamatorias, rechazo de trasplante de órgano, diabetes, trastornos hematológicos o infecciones.

25. El uso como se reivindica en la reivindicación 24 en el que Y es un enlace, $-S(=O)_2$ o $-S(=O)_2NR_3-$ en el que R_3 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido.

26. El uso como se reivindica en la reivindicación 24 para el tratamiento de una enfermedad de proliferación celular, enfermedad de Huntingdon o enfermedad de Alzheimer.

27. El uso como se reivindica en la reivindicación 24 del tratamiento de la artritis reumatoide.

28. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 23 que está adaptada a la administración tópica y en la que, en el compuesto que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, R_2 está unido al átomo de carbono al cual se une por un metileno radical $-CH_2-$.