

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 257**

51 Int. Cl.:  
**C07D 333/24** (2006.01)  
**C07H 3/02** (2006.01)  
**C07C 323/65** (2006.01)  
**A61K 31/381** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**C07C 323/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06807506 .8**  
96 Fecha de presentación: **24.10.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1940818**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS QUE CONTIENEN UN GRUPO DISULFANILO COMO INHIBIDORES MIXTOS DE LA NEPRILISINA Y DE LA AMINOPEPTIDASA N.**

30 Prioridad:  
**25.10.2005 FR 0510862**  
**05.05.2006 FR 0604030**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.11.2011**

73 Titular/es:  
**PHARMALEADS**  
**11, RUE WATT**  
**75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:  
**ROQUES, Bernard y**  
**FOURNIE-ZALUSKI, Marie-Claude**

74 Agente: **Curell Aguila, Marcelino**

ES 2 369 257 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

Derivados de aminoácidos que contienen un grupo disulfanilo como inhibidores mixtos de la neprilisina y de la aminopeptidasa N.

La presente invención se refiere a nuevos inhibidores mixtos de la neprilisina y de la aminopeptidasa N.

Se sabe que los péptidos opiáceos naturales o encefalinas -(Tyr-Gly-Gly-Phe-Met o Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)- son esencialmente degradados por dos metalopeptidasas de zinc, la neprilisina (EC 3.4.24.11) que escinde la unión Gly3-Phe4 (Nature 276 (1978) 523) y la aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) que corta la unión Tyr1-Gly2 de estos péptidos (Eur. J. Pharmacol. 117 (1985) 233; revisión en Pharmacological review., 1993, 45, 87-146). Se conocen unos inhibidores mixtos de estas dos enzimas que, protegiendo completamente las encefalinas endógenas de su degradación enzimática, revelan las actividades farmacológicas, en particular analgésicas y antidepresivas, de las encefalinas. Los inhibidores mixtos, descritos en la técnica anterior, de estas dos actividades enzimáticas, son unos compuestos con función hidroxamato (FR 2 518 088 y FR 2 605 004), unos compuestos aminofosfínicos (FR 2 755 135 y FR 2 777 780) y unos derivados de aminoácidos (FR 2 651 229). Los compuestos descritos en estas solicitudes de patente presentan una excelente actividad *in vitro* e *in vivo* después de la administración por vía intracerebroventricular; esto se ha demostrado particularmente en el caso de los hidroxamatos (Eur. J. Pharmacol., 102, (1984), 525-528; Eur. J. Pharmacol., 165, (1989), 199-207; Eur. J. Pharmacol., 192, (1991), 253-262), para los cuales una actividad significativa ha podido ser demostrada asimismo después de una administración intravenosa (iv) en un modelo de rata artrítica (Brain Research, 497, (1989), 94-101). En el caso de los derivados fosfínicos y de los derivados de aminoácidos, una buena actividad *in vivo* ha sido demostrada después de la administración por vía iv, cuando las moléculas estudiadas han sido solubilizadas en una mezcla de aceite, de etanol y de agua (J. Med. Chem., 43, (2000), 1398-1408; J. Med. Chem., 44, (2001), 3523-3530; J. Pharm. Exp. Ther., 261, (1992), 181-190). Sin embargo, incluso si uno de los compuestos que pertenece a la serie de los derivados de aminoácidos ha resultado relativamente soluble en agua (Pain, 73, (1997), 383-391), ninguna de las moléculas descritas anteriormente posee una solubilidad en fase acuosa y una biodisponibilidad suficientes para ser administrada por vía oral y presentar unas respuestas analgésicas interesantes a unas dosis suficientemente bajas en el animal para ser extrapoladas al ser humano. Asimismo, ninguna de las moléculas citadas anteriormente permite una administración intravenosa puesto que exigen en los ensayos en animales una solubilización en unas mezclas incompatibles con la administración por esta vía en el ser humano.

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar nuevos compuestos hidrosolubles capaces de inhibir conjuntamente las dos actividades enzimáticas responsables de la degradación de las encefalinas y de manifestar sus propiedades farmacológicas después de la puesta en disolución en un soluto acuoso y de una inyección intravenosa, subcutánea, percutánea, intratecal, intraarticular y por vía oral o nasal.

Generalmente, se admite que la barrera hematoencefálica es más fácilmente franqueable por unas moléculas hidrófobas y no polares. Sin embargo, de manera inesperada, las moléculas hidrófilas que han sido sintetizadas presentan unas respuestas potentes en unos ensayos centrales que indican la existencia de una buena capacidad para alcanzar las estructuras cerebrales, sean cuales sean las vías de administración (con la excepción de la vía local). Otro objetivo de la invención es proporcionar unos nuevos compuestos que presentan unas propiedades de las sustancias morfínicas, en particular la analgesia, los efectos beneficiosos sobre el comportamiento (disminución de la componente emocional del dolor y respuestas antidepresivas) y unos efectos periféricos (antidiarreico, antitusivo, antiinflamatorio) sin tener los inconvenientes principales (tolerancia, dependencias física y psíquica, depresión respiratoria, estreñimiento, náuseas). Además, los dolores inflamatorios y neurogénicos, cuya componente periférica es importante, se reducen, incluso se eliminan, mediante los compuestos de la invención administrados por vía oral y por lo tanto sin que éstos tengan la obligación de alcanzar el sistema nervioso central. Este resultado, muy interesante pero inesperado, ha sido demostrado formalmente mediante la utilización de un antagonista incapaz de entrar en el cerebro. Esto reduce totalmente todos los efectos debidos a la estimulación de los receptores opiáceos cerebrales por los compuestos de la invención, sin alterar los efectos analgésicos de los compuestos sobre estos dolores, en particular neurogénico.

La invención tiene más particularmente por objeto unos compuestos que responden a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

R<sub>1</sub> representa:

- una cadena hidrocarbonada, saturada o insaturada, lineal o ramificada, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, eventualmente sustituida por:

\* un radical OR, SR o S(O)R, en cada uno de estos radicales, R representa un hidrógeno, una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de 1 a 4 átomos de carbono, un radical fenilo o bencilo,

- \* un radical fenilo o bencilo,
- 5 - un radical fenilo o bencilo eventualmente sustituido por:
  - \* 1 a 5 halógenos, en particular el flúor,
  - \* un radical OR, SR o S(O)R, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente,
- 10 - un radical metileno sustituido por un heterociclo de 5 ó 6 átomos, aromático o saturado, que posee como heteroátomo un átomo de nitrógeno o de azufre, eventualmente oxidado en forma de N-óxido o de S-óxido;

R<sub>2</sub> representa:

- 15 - un radical fenilo o bencilo, eventualmente sustituido por:
  - \* 1 a 5 átomos de halógenos, en particular el flúor,
  - 20 \* un radical OR o SR, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente,
  - \* un grupo amino eventualmente mono- o di-sustituido por un grupo alifático, cíclico o lineal, de 1 a 6 átomos de carbono,
  - 25 \* un ciclo aromático de 5 ó 6 átomos,
- un heterociclo aromático de 5 ó 6 átomos, siendo el heteroátomo un oxígeno, un nitrógeno o un azufre,
- 30 - un grupo metileno sustituido por un heterociclo de 5 ó 6 átomos, aromático o saturado, siendo el heteroátomo un oxígeno, un nitrógeno o un azufre, pudiendo los átomos de nitrógeno y de azufre estar oxidados en forma de N-óxido o de S-óxido.

R<sub>5</sub> representa:

- 35 a) un radical CH(R<sub>3</sub>)-COOR<sub>4</sub> en el que

R<sub>3</sub> representa:

- 40 - un hidrógeno,
- un grupo OH u OR, teniendo R el mismo significado que anteriormente
- una cadena hidrocarbonada saturada (alquilo), lineal o ramificada, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, eventualmente sustituida por un radical OR o SR, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente,
- 45 - un radical fenilo o bencilo, eventualmente sustituido por:
  - 50 \* 1 a 5 halógenos, en particular el flúor,
  - \* un radical OR o SR, teniendo R la misma definición que anteriormente.

y OR<sub>4</sub> representa

- 55 - un radical glicolato OCH<sub>2</sub>COOR' o lactato OCH(CH<sub>3</sub>)COOR', representando R' en cada uno de estos radicales
  - \* una cadena hidrocarbonada saturada (alquilo) de 1 a 6 átomos de carbono, lineal o ramificada, eventualmente sustituida por un grupo alcoxi de C1 a C3, preferentemente un grupo alquilo de C1-C4 eventualmente sustituido por un grupo metoxi
  - 60 \* un grupo cicloalquilo de C5 a C8, preferentemente un grupo cicloalquilo de C5-C6,
  - \* un grupo fenilo, bencilo, heteroarilo, alquilheteroarilo
- 65 - un grupo OCH(R'')O(CO)OR' u OCH(R'')O(CO)R', teniendo R' en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente y representando R''

- \* un átomo de hidrógeno,
- 5 \* una cadena alquilo de C1-C6 lineal o ramificada eventualmente sustituida por un grupo alcoxi de C1 a C3, preferentemente un grupo alquilo de C1-C4 eventualmente sustituido por un grupo metoxi,
- \* un grupo cicloalquilo de C5 a C8, preferentemente un grupo cicloalquilo de C5-C6,
- 10 \* un grupo fenilo, bencilo, heteroarilo, alquilheteroarilo,
- un radical triglicérido  $\text{OCH}(\text{CH}_2\text{OCOR}')_2$  u  $\text{OCH}_2\text{-CH}(\text{OCOR}')\text{-CH}_2\text{OCOR}'$ , teniendo R' en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente
- 15 - un radical glicósido tal como D-glucosa,  $\beta$ -D-glucopiranososa,  $\alpha$ - o  $\beta$ -galactopiranososa,
- un radical sulfonato  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{SO}_2)\text{CH}_3$ ,
- un radical  $\text{OCH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ ;
- 20 así como las sales de adición de dichos compuestos (I) con unos ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables.

La invención tiene asimismo por objeto las sales de adición de los compuestos de fórmula (I), obtenidas con unos ácidos orgánicos o minerales farmacológicamente aceptables, tales como los fosfatos, el clorhidrato, el acetato, el metanosulfonato, el borato, el lactato, el fumarato, el succinato, el hemisuccinato, el citrato, el tartrato, el hemitartrato, el maleato, el ascorbato, el hemifumarato, el hexanoato, el heptanoato, el hipurato, el hidrocínamato, el fenilglicoxilato y el nicotinato.

En el marco de la presente invención, la expresión "cadena hidrocarbonada" designa unos alcanos, unos alcenos o unos alcinos. En particular, la expresión "cadena hidrocarbonada saturada" designa unos radicales alquilo que comprenden de 1 a 6 átomos de carbono (C1-C6) o de 1 a 4 átomos de carbono (C1-C4), lineales o ramificados. Como ejemplo de radicales alquilo que comprenden de 1 a 4 átomos de carbono, se pueden citar los radicales metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, 1-metil-etilo, 1-metil-propilo, 2-metil-propilo. Como ejemplo de radiales alquilo que comprenden de 1 a 6 átomos de carbono se pueden citar además los radicales pentilo, hexilo, 1-metil-butilo, 1-metil-pentilo, 2-metil-butilo, 2-metil-pentilo, 3-metil-butilo, 3-metil-pentilo, 4-metil-pentilo o 1-etil-propilo, 1-etil-butilo, 2-etil-butilo. La expresión "cadena hidrocarbonada insaturada" designa unos radicales alcenilo (por lo menos un doble enlace), por ejemplo vinilo, alilo o análogo, o alcinilo (por lo menos un triple enlace) que comprenden de 2 a 6 átomos de carbono, o de 2 a 4 átomos de carbono, lineales o ramificados.

El término "halógeno" utilizado en la presente memoria designa un cloro, un bromo, un yodo y un flúor. Como ejemplo de núcleos heterocíclicos de 5 ó 6 átomos, aromáticos o saturados, que poseen como heteroátomo un átomo de nitrógeno o de azufre, se pueden citar, pero sin limitación, los radicales siguientes: tineilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperidilo, piperazinilo, tiadiazolilo, estando los átomos de nitrógeno y de azufre eventualmente oxidados en forma de N-óxido o de S-óxido. Como ejemplo de núcleos heterocíclicos de 5 ó 6 átomos, aromáticos o saturados, que poseen como heteroátomo un átomo de oxígeno, se pueden citar, pero sin limitación, los radicales siguientes: furilo, piranilo, isoxazolilo, morfolinilo, furazanilo, oxazolilo, oxazolidinilo, oxazolinilo.

El radical  $R_1$  representa ventajosamente un radical alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, eventualmente sustituido por un radical OR, SR o S(O)R, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente.  $R_1$  representa todavía más ventajosamente un radical alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono sustituido por un radical SR, teniendo R el mismo significado que anteriormente, en particular R representa una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada de 1 a 4 átomos de carbono.

El radical  $R_2$  representa ventajosamente:

- un radical bencilo o fenilo,
- 60 - un radical metileno sustituido por un heterociclo de 5 ó 6 átomos, aromático o saturado, que posee como heteroátomo un átomo de nitrógeno o de azufre, eventualmente oxidado en forma de N-óxido o de S-óxido.

En particular, el radical  $R_2$  representa un radical bencilo o un radical metileno sustituido por un heterociclo de 5 ó 6 átomos, aromático o saturado, que posee como heteroátomo un átomo de nitrógeno o de azufre, eventualmente oxidado en forma de N-óxido o de S-óxido, todavía más ventajosamente un radical bencilo o un radical metileno sustituido por un radical tiofenilo (tienilo),

El radical R<sub>5</sub> es un radical que permite aumentar el carácter hidrófilo del conjunto de la molécula que, de otra manera, es una molécula más bien hidrófoba.

5 Según una primera variante de la invención, el radical R<sub>5</sub> representa un radical CH(R<sub>3</sub>)-COOR<sub>4</sub>.

En esta primera variante, el radical R<sub>3</sub> representa ventajosamente un átomo de hidrógeno o un radical alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, todavía más ventajosamente 1 a 4 átomos de carbono, eventualmente sustituido por un radical OR o SR, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente. El radical R<sub>3</sub> representa todavía más ventajosamente un átomo de hidrógeno o un radical alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, todavía más ventajosamente 1 a 4 átomos de carbono, sustituido por un radical OH o SH.

El radical OR<sub>4</sub> representa ventajosamente:

- 15 - un radical glicolato OCH<sub>2</sub>COOR', teniendo R' el mismo significado que anteriormente (en particular R' representa un grupo alquilo de C1-C4 eventualmente sustituido por un grupo metoxi o un grupo cicloalquilo de C5-C6),
- un radical OCH(R'')O(CO)OR' u OCH(R'')O(CO)R', teniendo R' y R'' el mismo significado que anteriormente (en particular R' y/o R'' representa un grupo alquilo de C1-C4 eventualmente sustituido por un grupo metoxi o un grupo cicloalquilo de C5-C6 o R'' representa un átomo de hidrógeno),
- 20 - un radical triglicérido OCH(CH<sub>2</sub>OCOR')<sub>2</sub> u OCH<sub>2</sub>-CH(OCOR')-CH<sub>2</sub>OCOR', teniendo R' en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente,
- 25 - un radical glucósido tal como D-glucosa,
- un radical sulfonato OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(SO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>,
- 30 - un radical OCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>

En particular, el radical OR<sub>4</sub> representa un grupo OCH(R'')O(CO)OR' u OCH(R'')O(CO)R', representando el radical R' una cadena alquilo de C1-C4 (en particular el radical etilo) y representando el radical R'' un radical metilo, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ciclohexilo o fenilo.

35 La invención se refiere más particularmente a los compuestos siguientes:

1-(2-(1-(2,3-diacetoxipropoxycarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina,

1-(2-(1-(2-metanosulfoniletoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

40 1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxietoxicarbonil))-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metil-sulfanilpropil-amina,

1-(2-(1-etoxicarbonilmetiloxicarboniletilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

45 1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxietoxicarbonil)-2-hidroxi-propilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

1-(2-(1-(2-acetoxi-1-acetoximetiletoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

50 1-(2-(1-(2-hidroxi-1-hidroximetiletoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

1-(2-(1-(3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidropiran-2-ilmetoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

55 1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxi-etoxicarbonil)-2-hidroxi-propilcarbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

60 1-(2-(1-(2-acetoxi-1-acetoximetil-etoxicarbonil)-2-hidroxi-propilcarbamoil)-3-fenilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

1-(2-((1-etoxicarboniloxi-etoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina.

65 3-(2-amino-4-metilsulfanil-butildisulfanil)-2-bencil-N-(5-etil-(1,3,4)-tiadiazol-2-il)-propionamida

1-(2-((1-etoxicarboniloxi-2-metil-propoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina

1-(2-((ciclohexil-etoxicarboniloxi-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina

1-(2-((etoxicarboniloxi-fenil-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina

3-metilsulfanil-1-(3-fenil-2-((1-propioniloxi-etoxicarbonilmetil)-carbamoil)-propildisulfanilmetil)-propil-amina

1-(2-((2-metil-1-propioniloxi-propoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metil-sulfanil-propil-amina

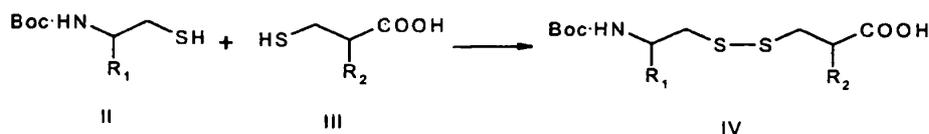
1-(2-((ciclohexil-propioniloxi-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metil-sulfanil-propil-amina

3-metilsulfanil-1-(3-fenil-2-((fenil-propioniloxi-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-propildisulfanilmetil)-propil-amina

Los compuestos de fórmula (I) tienen potencialmente de 2 a 9 centros de asimetría. Los radicales R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se introducirán de manera que se obtengan unos encadenamientos ópticamente puros que corresponden a una estereoquímica reconocida por las actividades enzimáticas. Los radicales R<sub>4</sub> podrán eventualmente contener un centro de asimetría no resuelto.

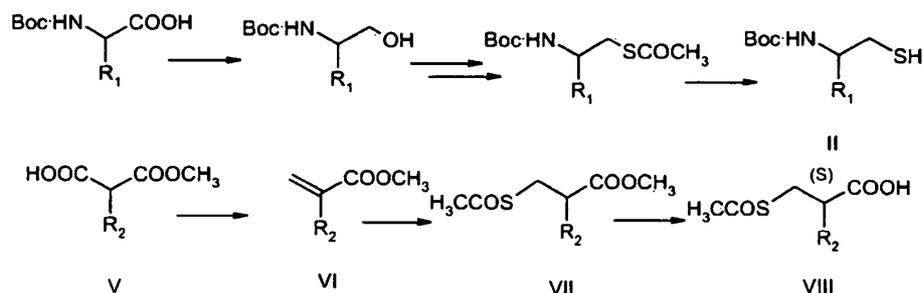
Se obtienen los compuestos de fórmula (I)

1º mediante condensación de un beta-aminotiol protegido sobre la función amina por un grupo t-butiloxicarbonilo (Boc) (II) con un ácido mercaptoalcanoico (III) por medio del cloruro de metoxicarbonilsulfonilo en disolución en THF (tetrahidrofurano), que conduce a IV.



El bloque beta-aminotiol II se prepara a partir del Boc aminoácido comercial correspondiente, de configuración absoluta S con retención de configuración según un procedimiento bien conocido por el experto en la materia (J. Med. Chem., 35, (1992) 1259).

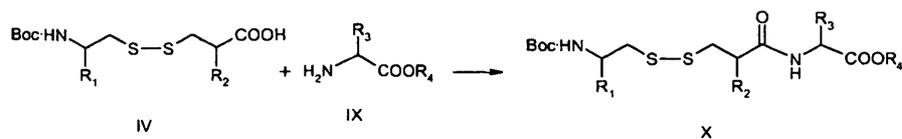
El ácido mercaptoalcanoico III se obtiene a partir del monoéster metílico del malonato correspondiente V, que, según un procedimiento bien conocido por el experto en la materia (Ber., 57, (1924), 1116) se transforma en acrilato VI.



La adición de ácido tioacético al acrilato VI conduce al derivado VII racémico (Biochemistry, 16, (1977), 5484). Una resolución mediante la alfa-quimiotripsina permite aislar el acetiltioácido VIII ópticamente puro (Bioorg. Med. Chem. Let., 3, (1993), 2681). La hidrólisis alcalina del tioéster conduce al compuesto III

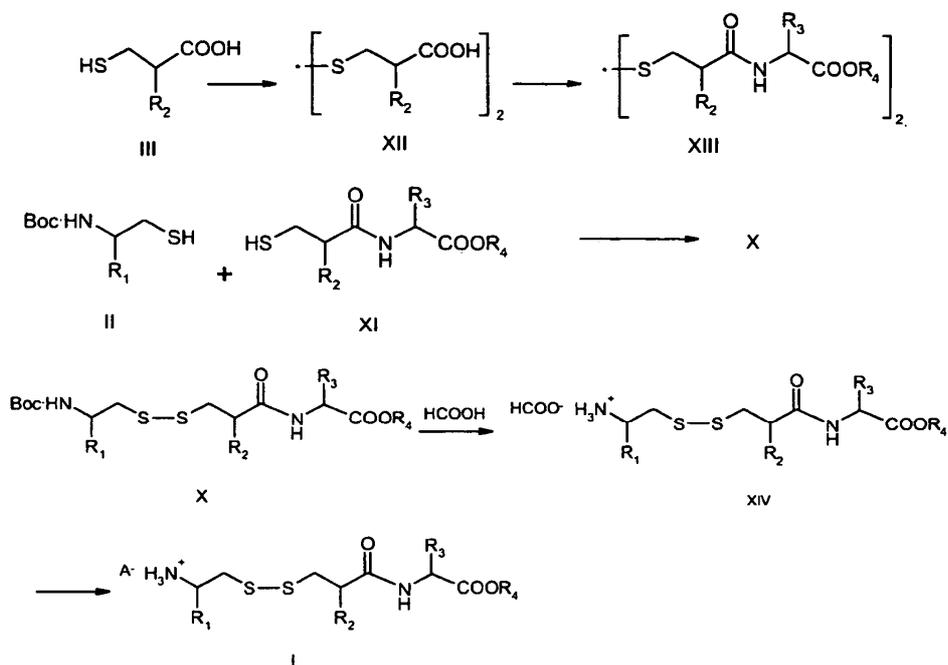
2º Los compuestos de fórmula (I), en los que el radical R<sub>5</sub> representa un radical CH(R<sub>3</sub>)-COOR<sub>4</sub>, pueden ser obtenidos mediante las vías de síntesis siguientes.

2.1º El disulfuro disimétrico IV se acopla, en las condiciones clásicas de acoplamiento peptídico, con el aminoéster IX, que conduce al inhibidor protegido X.



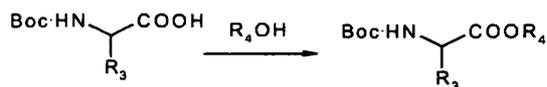
Según un método alternativo, los compuestos X pueden ser obtenidos mediante condensación, por medio del cloruro de metoxicarbonilsulfenilo, de un Boc-β-aminoal II con un mercaptoacilaminoéster de fórmula XI.

El mercaptoacilaminoéster XI se prepara a partir del compuesto III. Éste se oxida mediante una disolución etanólica de yodo en disulfuro XII. El compuesto XII se acopla en las condiciones clásicas de acoplamiento peptídico con el aminoéster IX, que conduce a XIII. El tratamiento de XIII por un agente reductor tal como la mezcla Zn + HCl 3N, libera el compuesto XI.



El corte del grupo N-terminal Boc de X se realiza mediante la acción del ácido fórmico, que libera XIV. El cambio de contra-ión de XIV se obtiene de manera cuantitativa mediante tratamiento por un equivalente de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, extracción en medio orgánico (EtOAc) del compuesto que posee una función amina libre, y después adición de un equivalente del ácido orgánico o mineral seleccionado para conducir a I.

2.2º El aminoéster IX se obtiene mediante condensación de un Boc aminoácido XII con el alcohol R<sub>4</sub>OH, y después desprotección mediante el ácido trifluoroacético (TFA) y neutralización mediante sosa. Si el alcohol R<sub>4</sub>OH es un alcohol primario, el acoplamiento con XII se efectúa en las condiciones clásicas (hidrocloruro de 1-[3-dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCI), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o éster activado). Si el alcohol R<sub>4</sub>OH es un alcohol secundario, la condensación se lleva a cabo por medio de una reacción de Mitsunobu (Synthesis (1981) 1-28), utilizando la mezcla azodicarboxilato de dietilo/trifenilfosfina (DEAD/PPhe<sub>3</sub>).



Los alcoholes R<sub>4</sub>OH son, en la mayor parte de los casos, unos compuestos comerciales. Cuando R<sub>4</sub>OH es un alcohol que conduce a un éster "cascada", éste se sintetiza a partir de los métodos descritos en la bibliografía.

La invención tiene asimismo por objeto las composiciones farmacéuticas que contienen a título de principio activo por lo menos uno de los compuestos de fórmula general (I) o una de sus sales o hidratos de estas sales en combinación con uno o varios soportes inertes u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos compuestos presentan las propiedades de las sustancias morfínicas, en particular la analgesia, incluidos en sus componentes periféricos (inflamatorios, neurogénicos), los efectos beneficiosos sobre el comportamiento, en particular en caso de depresión y/o de ansiedad, sin tener los inconvenientes principales (tolerancia, dependencia, depresión respiratoria, estreñimiento). Así, frente a unos agonistas opioides exógenos que interactúan con los receptores delta, los

inhibidores mixtos según la invención tienen unos efectos antidepresivos sin provocar ningún riesgo de activación de crisis epileptiformes o de convulsiones y actúan rápidamente (Baamonde A. *et al.* 1992, Jutkiewicz E. M. *et al.*, 2005). Estos compuestos son capaces de pasar la barrera hemato-encefálica. La principal aplicación de los compuestos según la invención está por lo tanto dentro del campo de la analgesia, de los antidepresivos y de los ansiolíticos.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden ser, a título de ejemplo, unas composiciones que se pueden administrar por vía oral, nasal (administración mediante aerosol), sublingual (administración mediante difusión perlingual), rectal, parenteral, intravenosa y percutánea. A título de ejemplo de composiciones que se pueden administrar por vía oral, se pueden citar los comprimidos, las cápsulas, los gránulos, las microesferas, los polvos y las disoluciones o suspensiones orales. El radical R<sub>5</sub> confiere una hidrofiliía suficiente a los componentes según la invención, que son así solubles en agua y los disolventes hidrófilos en presencia o no de diversos surfactantes. En particular, son solubles en los disolventes de tipo alcohol/polisorbato/agua, en particular etanol/Tween®/agua y manitol/agua o con la ayuda de ciclodextrinas apropiadas para la administración en el ser humano, que se utilizan frecuentemente para la administración por vía intravenosa. Las composiciones según la invención pueden por lo tanto ser administradas por vía intravenosa. Éstas pueden asimismo ser administradas por vía oral o nasal, en particular a través de un aerosol o mediante difusión perlingual o en el seno de una preparación galénica apropiada (microemulsiones). Asimismo, estas composiciones pueden ser utilizadas para unas administraciones transdérmicas. Estas composiciones pueden ser utilizadas en particular como analgésico principal, como antálgico potente en los dolores inflamatorios y neurogénicos, y como antidepresivo.

Es muy interesante constatar que las composiciones según la invención pueden ser administradas o bien en forma de aerosoles (microemulsiones) por vía oral o nasal, o bien por vía intravenosa. Estas vías de administración permiten así una administración de la composición según la invención por una vía no digestiva. Esto es particularmente interesante cuando la composición comprende unos compuestos complementarios, que pueden presentar unos efectos no deseados sobre el sistema digestivo (en particular el intestino), tales como unos derivados de cannabinoides. Esto permite asimismo aumentar la biodisponibilidad cerebral de los compuestos o asociaciones.

Otro objeto de la invención es la utilización a título de medicamento de los compuestos tales como los definidos anteriormente u obtenidos mediante un procedimiento tal como el definido anteriormente.

Se ha constatado además, de manera sorprendente, que la asociación de los nuevos compuestos según la presente invención con unos derivados cannabinoides conduce a unos efectos analgésicos aún más importantes (superiores a la suma de cada uno de los efectos que pueden ser observados para cada compuesto, es decir para los compuestos según la invención o para los derivados cannabinoides).

Hasta el año 1954, el cannabis ha sido considerado como una planta medicinal que presenta unas propiedades múltiples: analgésicas, antiespasmódicas, anti-convulsivas, antiinflamatorias, anti-vomitivas, bronco-dilatadoras, vaso-dilatadoras, relajantes y somníferas. Recientemente, se han demostrado unas propiedades anti-proliferativas y anti-neurodegenerativas.

Se han descrito algunos efectos nefastos del cannabis, relacionados lo más frecuentemente con una sobredosis: crisis de ansiedad para personas deprimidas y alucinaciones cuando el producto se ingiere mediante bebida (tisana) o comida (pasteles). Los efectos del cannabis se explican por su acción sobre los receptores cannabinoides. Estos receptores están presentes en numerosas estructuras cerebrales y se ha identificado una molécula endógena que se les une naturalmente, la anandamida.

Dos tipos de receptores han sido caracterizados, los receptores CB1 que se encuentran al mismo tiempo en el sistema nervioso central y en la periferia, y los receptores CB2 que son esencialmente periféricos. Los receptores CB1 parecen estar implicados en la modulación de la liberación neuronal de los neurotransmisores excitadores o inhibidores en el cerebro. El papel de los receptores CB2 es menos claro, pero parece ser que intervienen en la modulación del sistema inmunitario.

Las moléculas endógenas que se unen a los receptores CB1 y CB2, denominadas "endocannabinoides" tales como la anandamida, interactúan con los receptores cannabinoides en el cerebro y en la periferia induciendo diversos efectos farmacológicos.

El compuesto psicotrópico más abundante presente en el cannabis (*cannabis sativa*) es el  $\Delta^9$  tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$  THC).

El  $\Delta^9$  THC induce numerosas respuestas farmacológicas, tales como la analgesia, una hipotermia, una actividad locomotora reducida y una pérdida de la vigilancia y de la atención debida a unas interacciones con los receptores CB1 presentes en el cerebro. Algunas de estas propiedades tienen unas aplicaciones terapéuticas interesantes para el tratamiento del dolor y del glaucoma, asimismo para atenuar las náuseas y para estimular el apetito de pacientes tratados con unos compuestos antitumorales y antivíricos que presentan severos efectos secundarios. El  $\Delta^9$  THC, y más generalmente los agonistas del receptor CB1, son asimismo capaces de reducir los efectos dolorosos

asociados a las crisis de esclerosis en placa reduciendo al mismo tiempo la evolución de la enfermedad. Esto ha conducido sin embargo al desarrollo del SATIVEX que es una preparación que procede directamente de la planta (*cannabis sativa*) y que contiene una mezcla a partes iguales de  $\Delta^9$  THC y de cannabidiol (otra sustancia presente en la planta). Esta preparación sirve actualmente para la explotación clínica. Sin embargo, las dosis administradas por vía orobucal son elevadas y se han observado efectos secundarios (Current Opinion in Investigational Drugs 2004, 5, 748).

Otra particularidad del sistema endocannabinoide endógeno (anandamida) se refiere al modo de síntesis y de secreción de este neurotransmisor particular. Formado por vía enzimática a partir de los fosfolípidos de las membranas de los orgánulos, la anandamida está segregada por un transportador a partir de una neurona post-sináptica para interactuar con los receptores CB1 situado en una terminación presináptica (neurotransmisión retrógrada) (Piomelli *et al*, TIS, 2000, 21, 218-224).

Sin embargo, varios efectos del comportamiento, tales como una pérdida de la vigilancia y de la atención, una sedación, una ataxia, trastornos de la visión, una taquicardia, unas hipotermias y unas perturbaciones del comportamiento tales como alucinaciones, ansiedad, ataque de pánico y trastornos de la memoria, producidos por una exposición crónica a los cannabinoides naturales o sintéticos, limitan su utilización clínica (revisión en E.A. Carlini, the good and the bad effects of (-)-transdelta-9-etrahydrocannabinol  $\Delta^9$  THC on humans, Toxicol, 2004, 44, 461-467). Además, en el ser humano, los efectos analgésicos del  $\Delta^9$  THC se obtienen a dosis elevadas, próximas a las dosis que proporcionan los efectos indeseables citados anteriormente (Campbell F.A. *et al.*, Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A quantitative systemic review, Br. Med. J., 2001, 323, 12-16).

Se ha constatado, de manera sorprendente, que la co-administración (simultánea o espaciada en el tiempo) de bajas dosis de derivados de cannabinoides (en particular el  $\Delta^9$  THC) permite potenciar el efecto analgésico y el efecto antidepresivo de los derivados según la invención (fórmula (I)) sin inducir, de manera significativa, los efectos nefastos de dichos cannabinoides, que por vía iv aparecen a partir de 4-5 mg/kg (sedación). En el sentido de la presente invención, se entiende mediante la expresión "contenidos muy bajos de cannabinoides" unos contenidos encannabinoides inferiores a los que inducen dichos efectos secundarios indeseables.

En el sentido de la presente invención, se entiende mediante el término "cannabinoides" el  $\Delta^9$  THC, unos agonistas del receptor CB1 sintéticos o unos inhibidores de la degradación de la anandamida. Los cannabinoides introducidos en las composiciones según la invención son preferentemente el  $\Delta^9$  THC.

La invención tiene asimismo por objeto una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de fórmula (I) tal como el definido anteriormente, por lo menos un derivado de cannabinoides, en particular el  $\Delta^9$  THC, o un protector de su metabolismo (revisión Piomelli *et al.*, TIPS, 2000), y un excipiente farmacéuticamente apropiado, en particular un excipiente apropiado para una administración por vía oral, nasal, intravenosa o transcutánea.

La invención se refiere asimismo a la utilización de una combinación de por lo menos un compuesto de fórmula (I) tal como el definido anteriormente y de por lo menos un derivado de cannabinoides, en particular el  $\Delta^9$  THC, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la depresión y del dolor.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende

- i) por lo menos un compuesto de fórmula (I) tal como el definido anteriormente
- ii) por lo menos un derivado de cannabinoides

como productos de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo.

En el marco de la presente invención, el término dolor designa los diferentes tipos de dolor, tales como el dolor agudo, el dolor inflamatorio y el dolor neurogénico, incluyendo el dolor asociado a la esclerosis en placa. Los compuestos según la invención, eventualmente en asociación con un derivado de cannabinoides, son asimismo apropiados para el tratamiento del glaucoma.

La invención tiene asimismo por objeto la asociación de los nuevos compuestos según la invención con la morfina o uno de sus derivados. En efecto, la morfina es asimismo capaz de potenciar el efecto analgésico inducido por los compuestos según la invención. La invención tiene por lo tanto por objeto una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de fórmula (I) tal como el definido anteriormente, morfina o uno de sus derivados y un excipiente farmacéuticamente apropiado, en particular un excipiente apropiado para una administración por vía oral, nasal, intravenosa o transcutánea. La composición puede comprender además por lo menos un derivado de cannabinoides, en particular el  $\Delta^9$  THC, o un protector de su metabolismo.

Esta composición se puede utilizar como medicamento, en particular en el tratamiento de la depresión y del dolor.

Los diferentes compuestos pueden ser utilizados como productos de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo.

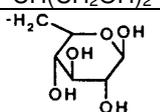
5 Es la buena solubilidad acuosa de los compuestos de la invención según la fórmula I lo que facilita mucho la constitución de la preparación (microemulsiones, disolución en presencia de surfactantes, etc.) apropiada para la utilización en terapéutica por vías intravenosa, nasal, pulmonar (aerosol) o transcutánea.

10 La dosis eficaz de un compuesto de la invención varía en función de numerosos parámetros tales como, por ejemplo, la vía de administración seleccionada, el peso, la edad, el sexo, el estado de avance de la patología a tratar y la sensibilidad del individuo a tratar. En consecuencia, la posología óptima se deberá determinar en función de los parámetros juzgados pertinentes por el especialista en la materia.

15 La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos siguientes. La lista de los compuestos preparados según el ejemplo 12 se proporciona en la tabla 1. Para todos los compuestos descritos en estos ejemplos

- \* R<sub>1</sub> representa el radical -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>.
- \* CH<sub>2</sub>-(C:CH.S.CH:CH) representa el radical tioen-3-ilmetilo.
- \* C:CH.CH:CH-CH:CH representa el radical fenilo.
- 20 \* C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> representa el radical ciclohexilo

Tabla 1: radicales de los ejemplos 12a a 12r

Ejemplo	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
12a	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -C(OCOCH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>3</sub> )
12b	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
12c	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )-O-CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12d	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12e	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH(OH)CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )-O-CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12f	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
12g	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>
12h	-CH <sub>2</sub> -(C:CH.S.CH:CH)	-CH <sub>3</sub>	
12i	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-CH(OH)CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )-O-CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12j	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-CH(OH)CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
12k	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(CH <sub>3</sub> )-O-CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12l	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(CH(CH <sub>3</sub> )) <sub>2</sub> )-O-CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12m	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> )-O-CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12n	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(C:CH.CH:CH-CH:CH)-O-CO-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12o	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(CH <sub>3</sub> )-O-CO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12p	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )-O-CO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12q	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> )-O-CO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
12r	-C:CH.CH:CH-CH:CH	-H	-CH(C:CH.CH:CH-CH:CH)-O-CO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

25 Leyendas de las figuras

Figura 1: Curva dosis/respuesta de la analgesia inducida por la morfina o el compuesto 15 inyectado por vía i.v. en el ratón (ensayo de la placa caliente a 52°C); en las abscisas dosis en mg/kg y en las ordenadas % de analgesia.

30 La línea negra (línea superior) corresponde a los resultados obtenidos para la morfina, la línea gris (línea inferior) corresponde a los resultados obtenidos para el compuesto 15.

Figura 2: A/Respuesta antinociceptiva inducida por el compuesto 15 inyectado *per os* 20 min. antes del ensayo de la placa caliente (52°C, latencia del salto, segundo) en el ratón OF 1 macho (n = 10); en las abscisas dosis de compuesto 15 en mg/kg y en las ordenadas % de analgesia. B/Cinética del efecto del compuesto 15 después de la administración *per os* (n = 10-17); en las abscisas tiempo (minutos) y en las ordenadas % de analgesia.

Figura 3: Respuesta antinociceptiva inducida por la asociación del compuesto 15 y del Δ<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol. Placa caliente (52±1°C), latencia del salto, ratones OF1 machos. Cuff-off: 240 s. \*\*\* p < 0,001 frente a control, ###, p < 0,001 frente a compuesto 15 y Δ<sup>9</sup> THC. ANOVA + Newman-Keuls.

En las abscisas dosis de compuesto 15 (0,4 mg/kg), de THC (0,375 mg/kg) y compuesto 15/THC (0,4 y 0,38 mg/kg) y en las ordenadas % de analgesia.

**Ejemplo 1: Síntesis del Boc-metioninatiol (compuesto 1)**

Este compuesto se prepara siguiendo el protocolo descrito en J. Med. Chem., 35, 1992, 2473. Sólido blanco: pf: 37°C; Rf (ciclohexano (CHex), acetato de etilo (AcOEt) = 1,1) 0,73;  $\alpha_D^{20^\circ\text{C}}$ : -21-, 1<sup>o</sup> (c=1,0 THCl<sub>3</sub>).

**Ejemplo 2: Síntesis del ácido (2S)-2-mercaptometil-3-fenilpropanoico (compuesto 2)**

Etapa 1: El éster metílico del ácido 2-acetiltimetil-3-fenilpropanoico, obtenido mediante la acción del ácido tioacético sobre el éster metílico del acrilato correspondiente, preparado según (Ber., 57, 1924, 1116), se trata mediante la  $\alpha$ -quimotripsina según el protocolo general descrito en (Bioor. Med. Chem. Let., 3, 1993, 2681).

Rendimiento: 71,4%; exceso enantiomérico (ee): 88%,  $\alpha_D^{20^\circ\text{C}}$ : -42,7<sup>o</sup>.

Etapa 2: Ácido (2S)-mercaptometil-3-fenilpropanoico.

El compuesto de la etapa 1 se disuelve en metanol (MeOH) desgasificado a 0°C. Se añaden, bajo atmósfera inerte, 3 equivalentes (eq.) de sosa (NaOH) 1N. La mezcla se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente (T.A.). La mezcla se acidifica mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl) 6N (25 ml) y el MeOH se evapora bajo presión reducida. La fase acuosa se extrae mediante 2x125 ml de AcOEt. La fase orgánica se lava mediante una disolución de cloruro de sodio saturada (NaCl sat.) y después se seca sobre sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evapora hasta sequedad. Se obtiene un aceite amarillo.

Rendimiento 100%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de trifluoroacetato TFA) 60-40 4,96 min.

**Ejemplo 3: Síntesis del ácido (2RS) 2-mercaptometil-3-tiofen-3-ilpropanoico (compuesto 3)**

Etapa 1: Una mezcla de dimetilmalonato (392 mmoles, 45 ml, 1 eq.), tiofen-3-ilaldehído (0,357 mmoles), piperidina (1,87 ml; 0,05 eq.) y ácido benzoico (4,58 g; 0,05 eq.) se lleva durante 12h a reflujo con la ayuda de un Dean-Stark en 270 ml de tolueno. La fase orgánica se lava mediante 2x140 ml de HCl 1N, 2x140 ml de carbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) al 10% y 140 ml de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora hasta sequedad. Se obtiene un aceite.

Rendimiento 100%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 60-40: 5,97 min.

Etapa 2: El compuesto de la etapa 1 (340 mmoles) se disolubiliza en MeOH (540 ml). La mezcla se enfría hasta 0°C y se añade poco a poco borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>). La mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición de 450 ml de HCl 1N. El metanol se evapora y la mezcla de reacción se extrae mediante 2x500 ml de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>). La fase orgánica se lava mediante NaCl sat. y después se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora hasta sequedad. Se obtiene un aceite.

Peso P=64,1 g. Rendimiento 82,4%.

HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 60-40: 5,91 min.

Etapa 3: El compuesto anterior (30 mmoles) se disuelve en MeOH (27 ml). La mezcla se enfría hasta 0°C y se añade poco a poco una disolución de potasa KOH (1,71 g 30,6 mmoles) en MeOH (365 ml). La mezcla se agita durante 48 horas a 4°C. El metanol se evapora y el sólido obtenido se tritura en éter etílico Et<sub>2</sub>O. El sólido obtenido se filtra, se lava y se seca. . P=25,2 g. Rendimiento 71,0%.

HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 60-40: 3,79 min.

Etapa 4: El compuesto anterior (21,9 mmoles) se disuelve en THF (30 ml). Se añaden dietilamina Et<sub>2</sub>NH (3,0 ml; 2 eq.) y formaldehído al 37% (3,7 ml; 1,5 eq.). La mezcla se lleva a reflujo durante la noche. El THF se evapora y la mezcla se recoge en 90 ml de AcOEt. La fase orgánica se lava mediante 3x30 ml HCl 1N, NaCl sat. y después se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora hasta sequedad. Se obtiene un aceite incoloro.

P=13,1 g. Rendimiento 72,0%.

HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 50-50: 14,75 min.

Etapa 5: El compuesto anterior (72 mmoles) se lleva a 80°C durante 5h en ácido tioacético CH<sub>3</sub>COSH (10 ml, 144 mmoles, 2 eq.). El ácido tioacético se evapora se evapora bajo presión reducida. La mezcla se coevapora varias veces con ciclohexano. Se obtiene un aceite anaranjado. P=18,6 g. Rendimiento 100%.

HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 50-50: 17,16 min.

**Etapa 6:** El compuesto de la etapa 5 se disuelve en MeOH desgasificado a 0°C. Se añaden, bajo atmósfera inerte, 3 eq. de NaOH 1N. La mezcla se agita durante 30 min. a T.A. La mezcla se acidifica mediante adición de HCl 6N (25 ml) y se evapora el MeOH bajo presión reducida. La fase acuosa se extrae mediante 2x125 ml AcOEt. La fase orgánica se lava mediante NaCl sat. y después se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora hasta sequedad. Se obtiene un aceite amarillo.

Rendimiento 100%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 50-50 6,80 min.

**Ejemplo 4: Síntesis del ácido (2S)-2-mercaptometil-3-tiofen-3-ilpropanoico (compuesto 4)**

**Etapa 1:** El éster metílico del ácido 2-acetiltiometil-3-tiofen-3-ilpropanoico, descrito en la etapa 5 de la síntesis del compuesto 3, se trata mediante la  $\alpha$ -quimotripsina, tal como se ha descrito en la síntesis de 2 (etapa 1). Rendimiento 87,3%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 50-50 7,37 min. ee= 76%

**Etapa 2:** El ácido (2S) acetiltiometil-3-tiofen-3-ilpropanoico, obtenido en la etapa 1, se trata tal como se ha descrito en la etapa 2 del compuesto 2.

Rendimiento 97,0%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 50-50 6,80 min.

**Ejemplo 5: Síntesis del ácido 2(2S)-bencilo 3((2S)2t.butiloxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butildisulfanil)-propanoico (compuesto 5)**

Una mezcla de 23 ml de MeOH y 23 ml de THF se enfría hasta 0°C bajo nitrógeno y se añade el clorosulfonilcloruro (1,3 ml, 15,25 mmoles, 1,09 eq.). La mezcla se agita durante 15 min. a 0°C para dar el cloruro de metoxi carbonilsulfenilo. Después, el compuesto 1 (14,86 mmoles, 1,06 eq.) en 16 ml de THF/MeOH se añade de una sola vez. La mezcla se dejar volver hasta temperatura ambiente y se agita durante 30 min. La disolución anterior se añade gota a gota a una disolución del compuesto 2 (14,02 mmoles, 1 eq.) en 100 ml de CHCl<sub>3</sub> desgasificado en presencia de Et<sub>3</sub>N (1 eq.). La disolución se agita durante 1h a temperatura ambiente. El disolvente se evapora bajo presión reducida. La mezcla se recoge en diclorometano CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se lava: ácido cítrico al 10%, NaCl sat., y después se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para dar un producto en bruto, que se cromatografía sobre sílice con una mezcla de ciclohexano (CHex)/AcOEt 8/2 y después 6/4 como eluyente. P=4,1 g Rendimiento 65,9%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 70-30: 8,20 min.

**Ejemplo 6: Síntesis del ácido 3-((2S)2-t.butiloxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butildisulfanil)-(2RS)2-tiofen-3-ilmetil-propanoico (compuesto 6)**

Siguiendo el protocolo descrito para la síntesis de 5 y sustituyendo el compuesto 2 por el compuesto 3, se obtiene el compuesto 6.

Rendimiento 77,0%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 70-30: 7,36 min.

**Ejemplo 7: Síntesis del ácido 3-((2S)2-t.butiloxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butildisulfanil)-(2S)2-tiofen-3-ilmetil-propanoico (compuesto 7)**

Siguiendo el protocolo descrito para la síntesis de 5 y sustituyendo el compuesto 2 por el compuesto 4, se obtiene el compuesto 7.

Rendimiento 77%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5%TFA) 70/30: 7,36 min.

**Ejemplo 8: Síntesis de los ésteres de alanina**

Compuesto 8a: alanina 2-metil sulfoniletil éster, TFA.

Una disolución de 1 eq. de BocAlaOH, HOBt (1,2 eq., 879 mg), EDCI (1,2 eq., 1,93 g), Et<sub>3</sub>N (trietilamina), (3 eq., 2,9 ml) en 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agita durante 12h a temperatura ambiente en presencia de 1,2 eq. de 2-metilsulfoniletanol en disolución en el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El disolvente se evapora bajo presión reducida. La mezcla de reacción se recoge en AcOEt/H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se lava mediante ácido cítrico al 10% (2x15 ml), NaHCO<sub>3</sub> al 10% (2x15 ml), NaCl saturado, secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporada bajo presión reducida para dar un producto en bruto que se cromatografía sobre sílice con una mezcla de CHex/AcOEt 8/2 como eluyente para dar 989 mg de producto.

Rendimiento: 61,8%. Rf (CHex/AcOEt: 6/4): 0,49.

Se solubilizan 435 mg (1,488 mmoles) de este producto en frío en 2,5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 1,2 ml de TFA. La mezcla se agita durante 2h a temperatura ambiente. Los disolventes son evaporados bajo presión reducida. La mezcla se coevapora mediante el ciclohexano. El producto 8a se precipita en frío en Et<sub>2</sub>O. Rendimiento: 100%. Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 9/1): 0,25.

Compuesto 8b: alanina 2,3-diacetoxipropil éster.

5 Una disolución de 1,026 g (5,428 mmoles, 1 eq.) de BocAlaOH, HOBt (1,2 eq., 879 mg), EDCI (1,2 eq., 1,93 g), Et<sub>3</sub>N (3 eq., 2,9 ml) en 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agita durante 12h a temperatura ambiente en presencia de 2,3-diacetoxipropanol (preparado según Jensen, Topics in Lipid Chemistry, 1972, 3, 1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El disolvente se evapora bajo presión reducida. La mezcla de reacción se recoge en AcOEt/H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se lava mediante ácido cítrico al 10% (2x15 ml), NaHCO<sub>3</sub> al 10% (2x15 ml), NaCl saturado, secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporada bajo presión reducida para dar 1,62 g de un producto en bruto. La mezcla se cromatografía sobre sílice con una mezcla de CHex/AcOEt 8/2 como eluyente para dar 1,29 g de producto. Rendimiento: 68,7%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% TFA) 70-30: 4,25 min.

15 Este producto se solubiliza en frío en 6 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 6 ml de TFA. La mezcla se agita durante 2h a temperatura ambiente. Los disolventes son evaporados bajo presión reducida. La mezcla se coevapora mediante ciclohexano. El producto 8b se precipita en frío en Et<sub>2</sub>O. P=1,33 g. Rendimiento: 100%. Rf (CHex, EtOAc: 6,4): 0,14.

Compuesto 8c: alanina 1,3-diacetoxi-2-propil éster, TFA

20 Se solubilizan 1,23 g de 1,3-diacetil-2-propanol (preparado según Bentley y McCrae, J. org. Chem, 1971, 35, 2082) (7 mmoles, 1,1 eq.) en 50 ml de Et<sub>2</sub>O. Se añade a continuación el azodicarboxilato de dietilo (DEAD) (1,2 eq., 1,1 ml), BocAlanina (5,83 mmoles, 1 eq.) seguido de la trietilfosfina (PPh<sub>3</sub>) (1,2 eq., 1,83 g) y la mezcla se agita durante una noche a temperatura ambiente. El disolvente se evapora bajo presión reducida. La mezcla se cromatografía sobre sílice con una mezcla de Heptano/AcOEt 8/2 como eluyente para dar 2,14 g de producto. Rendimiento: 84,6%. Rf (Hept/AcOEt: 6/4): 0,42.

25 Se solubilizan 2,0 g (4,7 mmoles) de este producto en frío en 6,5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 6,5 ml de TFA. La mezcla se agita durante 2h a temperatura ambiente. Se evaporan los disolventes bajo presión reducida. La mezcla se coevapora mediante el ciclohexano. Cromatografía sobre sílice con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH 9/1/0,5 como eluyente para dar 1,16 g de compuesto 8c.

30 Rendimiento: 65%. Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH: 9/1/0,5): 0,22.

Compuesto 8d: Alanina 1,3 (t.butildimetilsilil)hidroxi-2-propiléster

35 La dihidroxiacetona (2 g, 11,10 mmoles) se disuelve en 50 ml de dimetilformamida (DMF), se añaden el cloruro de terc-butil dimetilsililo (tBuDMSCl) (4,8 eq., 8,03 g) y el imidazol (10 eq., 7,56 g), y la mezcla se agita durante 12h a 20°C. La mezcla se evapora hasta sequedad, y se recoge en 150 ml de AcOEt. La fase orgánica se lava mediante agua H<sub>2</sub>O (2x50 ml), HCl al 10% (2x50 ml), NaCl saturado, y después secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporada bajo presión reducida para dar 20,1 g de producto en bruto. La mezcla se cromatografía sobre sílice con CHex/AcOEt 8/2 como eluyente para dar 5,96 g de producto. Rendimiento: 84,5%. Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH: 9/1/0,5): 0,24.

45 Este producto (8,82 g, 27,73 mmoles) se disuelve en THF (74 ml) y H<sub>2</sub>O (4,8 ml). La mezcla se enfría hasta 5°C, y se añade poco a poco NaBH<sub>4</sub> (965 mg, 1 eq.). La mezcla se agita durante 30 min. a 5°C. El exceso de NaBH<sub>4</sub> se destruye mediante adición de ácido acético (1 ml). El THF se evapora bajo presión reducida y la mezcla se recoge en CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se lava mediante H<sub>2</sub>O (2x50 ml), NaHCO<sub>3</sub> sat. (2x50 ml), NaCl saturado, y después secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporada bajo presión reducida para dar 8,24 g de producto. Rendimiento: 93,0%.

50 Se solubilizan 2,93 g de este compuesto (9,07 mmoles, 1,1 eq.) en 60 ml de Et<sub>2</sub>O. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se añaden DEAD (1,2 eq., 1,56 ml), BocAminoácido (8,25 mmoles, 1 eq.) seguido de PPh<sub>3</sub> (1,2 eq., 2,59 g). El disolvente se evapora bajo presión reducida. La mezcla se cromatografía sobre sílice con una mezcla de CHex/AcOEt 95/5 como eluyente para dar 4,42 g de producto.

Rendimiento: 92,9%. Rf (CHex/AcOEt: 9/1): 0,65.

55 Se solubilizan 881 mg (1,79 mmoles) de este producto en frío en 3 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 1,36 ml de TFA. La mezcla se agita durante 2h a temperatura ambiente. Se evaporan los disolventes bajo presión reducida. La mezcla se coevapora mediante el ciclohexano. La mezcla se precipita en frío en Et<sub>2</sub>O para dar 920 mg de compuesto 8d. Rendimiento: 100%. Rf (CHex/AcOEt: 9/1): 0,1.

60 Compuesto 8e: Alanina carbetoximetiléster, TFA.

65 Se disuelven BocAlaOH (5 g, 26,4 mmoles) y Et<sub>3</sub>N (3,7 ml, 1 eq.) en 40 ml de AcOEt. La mezcla se agita durante 10 min. a temperatura ambiente. El etilbromoacetato (6,62 g; 1,5 eq.) se añade y la mezcla se lleva durante 30 min. a reflujo. Se precipita el filtrado y después se añaden 30 ml H<sub>2</sub>O y 50 ml AcOEt al filtrado. La fase acuosa se extrae mediante 3x30 ml AcOEt. La fase orgánica se lava mediante ácido cítrico 10% (2x30 ml), NaHCO<sub>3</sub> 10% (2x30 ml), NaCl saturado, y después secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporada bajo presión reducida para dar 7,09 g de un producto

en bruto. La mezcla se cromatografía sobre sílice con una mezcla de CHex/AcOEt 6/4 como eluyente para dar 4,68 g de producto.

Rendimiento: 64,3%. Rf CHex/AcOEt: 6,4): 0,35.

5 Se solubilizan 500 mg (1,81 mmoles) de este producto en frío en 3 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 1,4 ml de TFA. La mezcla se agita durante 2h a temperatura ambiente. Se evaporan los disolventes bajo presión reducida. La mezcla se coevapora mediante el ciclohexano. El producto 8c se precipita en frío en Et<sub>2</sub>O.

10 P= 525mg. Rendimiento: 100%. Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 95/5): 0,14.

Compuesto 8f: alanina etilcarbonato-1-etiléster, TFA.

15 Se disuelven Boc Ala (76.54 mmoles) y Et<sub>3</sub>N (12,27 ml, 1,2 eq.) en 70 ml de AcOEt. La mezcla se agita durante 15 min. a temperatura ambiente. Se añaden el etil-1-cloroetilcarbonato (preparado según Barcelo *et al.* Synthesis, 1986, 627) (14,01 g; 1,2 eq.) y el yoduro de sodio NaI (926 mg, 0,1 eq.), y la mezcla se lleva durante 16h a reflujo. Se precipita el filtrado y después se añaden 200 ml de H<sub>2</sub>O y 200 ml de AcOEt al filtrado. La fase acuosa se extrae mediante 3x300 ml AcOEt. La fase orgánica se lava mediante ácido cítrico al 10% (2x150 ml), NaHCO<sub>3</sub> al 10% (2x150 ml), NaCl saturado, y después secada en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporada bajo presión reducida para dar 24,5 g de un producto en bruto. La mezcla se cromatografía sobre sílice con una mezcla de CHex/AcOEt 9/1 como eluyente para dar 18,1 g de producto.

Rendimiento: 77,51%. Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 9/1): 0,33.

25 Se solubilizan 9,15 g (30 mmoles) de este producto en frío en 23 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 23 ml de TFA. La mezcla se agita durante 2h a temperatura ambiente. Se evaporan los disolventes bajo presión reducida. La mezcla se coevapora mediante el ciclohexano. El producto 8f se precipita en frío en Et<sub>2</sub>O.

P=9,57g. Rendimiento: 77,5% (2 etapas). Rf (CHex/AcOEt: 6/4): 0,1.

30 Compuesto 8g: Alanina glucosil éster, TFA.

35 El pentaclorofenol (3 eq., 10 g, 37,54 mmoles) se solubiliza a 0°C en 12 ml AcOEt y se añade la N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC) (2,58 g, 12,51 mmoles). La mezcla se deja durante 12h a -20°C. Se añade hexano frío (10 ml) a la mezcla, se filtra el sólido, y se lava mediante hexano frío. El sólido se recristaliza en hexano para dar 10,3 g de sólido marrón. Rendimiento: 82,0%. P.f.: 115-130°C.

40 Se añade este complejo a 120 ml de AcOEt. Después de la disolución total, se añade la BocAlanina (1,0 eq., 10,25 mmoles), y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evapora bajo presión reducida y después se añaden 100 ml de Et<sub>2</sub>O. La suspensión se enfría durante 1h y después se filtra el sólido. Éste se pone en suspensión en 100 ml de dioxano, se filtra y se lava mediante 2x20 ml de dioxano. El filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se trata nuevamente mediante dioxano para eliminar la diciclohexilurea (DCU). Después, se pone en suspensión en 100 ml de Et<sub>2</sub>O y se introduce en el congelador durante una noche. El sólido se filtra y después se seca para dar 1,29 g de sólido marrón. Rendimiento: 27,8%.

45 A una disolución de glucosa (3 eq., 1,54 g) en 57 ml de piridina redestilada, se añade el compuesto anterior y el imidazol. La mezcla se agita durante una noche a temperatura ambiente. El disolvente se evapora bajo presión reducida para dar un producto en bruto. La mezcla se cromatografía sobre sílice con una mezcla de AcOEt/AcOH 20/1 como eluyente para dar 883 mg de producto. Rendimiento: 88,3%. Rf(AcOEt/AcOH: 20/1): 0,13.

50 Se enfrían 883 mg (2,51 mmoles) de este producto hasta 0°C y se añaden 61 ml de TFA. La mezcla se agita durante 5 min. a 0°C y después durante 30 min. a temperatura ambiente. El TFA se evapora bajo presión reducida. La mezcla se coevapora mediante el ciclohexano. La mezcla se precipita en frío en Et<sub>2</sub>O para dar 746 mg del compuesto 8g marrón. Rendimiento: 81,3%. Rf (AcOEt/AcOH: 10/1): 0,10.

55 **Ejemplo 9: Síntesis de los ésteres de la treonina**

Compuesto 9a: treonina 1,3-diacetil-2-propiléster, TFA

60 Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito para 8c, y sustituyendo la Boc-alanina por la Boc-treonina.

Compuesto 9b: treonina etilcarbonato-1-etiléster, TFA.

65 Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito para el compuesto 8f y sustituyendo la Boc-alanina por la Boc-treonina.

Rendimiento: 89,7% Rf(CHex/AcOEt :6/4) :0,1.

**Ejemplo 10: Síntesis de los ésteres de la glicina**

- 5 Compuesto 10a glicina etil carbonato-1-etil éster, TFA
- Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito para el compuesto 8f sustituyendo la Boc-alanina por la Boc-glicina.
- 10 Rendimiento 92% Rf(CHex/AcOEt 8/2) 0,22
- Compuesto 10b: glicina etil carbonato-1-(2-metil)propiléster, TFA
- 15 Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito para el compuesto 10a sustituyendo el etil-1-cloroetilcarbonato por el etil-1-cloro-2-metil-propilcarbonato.
- Rendimiento 88%; Rf(CHex/AcOEt 8/2) 0,12
- 20 Compuesto 10c: Glicina etil carbonato metilciclohexil éster, TFA
- Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito para el compuesto 10a sustituyendo el etil-1-cloroetil carbonato por el etil-clorometil ciclohexil carbonato.
- 25 Rendimiento 78 %; Rf(CHex/AcOEt 7/3) 0,31
- Compuesto 10d: Glicina etil carbonato metilfenil éster, TFA
- Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito para el compuesto 10a sustituyendo el etil-1-cloroetil carbonato por el etil clorometilfenil carbonato.
- 30 Rendimiento 82 %; Rf(CHex/AcOEt 7/3) 0,46
- Compuesto 10e: éster del ácido 1-(2-amino-acetoxi)-etil propiónico (Gly-OCH(CH<sub>3</sub>)O-COEt)
- 35 Este compuesto se obtiene mediante condensación entre la Boc-Gly y el 1-cloroetilpropionato (1,1 eq.) en presencia de NaI (0,2 eq.) y de Et<sub>3</sub>N (1,2 eq.) en el acetato de etilo (10 ml/mmol) a reflujo durante una noche. Después del enfriamiento, la fase orgánica se lava con agua, ácido cítrico al 10%, NaHCO<sub>3</sub> al 10%, H<sub>2</sub>O, NaCl sat. y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la evaporación, se obtiene un producto oleoso. Rendimiento 86%
- 40 La desprotección del grupo Boc se efectúa tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Producto: sólido blanco.
- Rendimiento cuantitativo. Rf(CHex/AcOEt 6/4) 0,64
- 45 Compuesto 10f: Éster propílico del ácido 1-(2-aminoacetoxi)-2-metil propiónico (Gly OCH(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)o-COEt)
- Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 10e sustituyendo el 1-cloroetil propionato por el 1-cloro-2-metil propil propionato.
- 50 Sólido blanco. Rendimiento 78% en las dos etapas. Rf(CHex/AcOEt 6/4) 0,56
- Compuesto 10g: éster del ácido (2-aminoacetoxi)-ciclohexil-metil propiónico (Gly-OCH(CHex)O-COEt)
- 55 Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 10e sustituyendo el 1-cloroetil propionato por el clorometil(ciclohexil)propionato.
- Sólido blanco. Rendimiento 72% en las dos etapas. Rf(CHex/AcOEt 6/4) 0,38
- 60 Compuesto 10h: éster del ácido (2-amino-acetoxi)-fenil-metil propiónico (GlyOCH(Ph)O-COEt)
- Este compuesto se obtiene siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 10e sustituyendo el 1-cloroetil propionato por el clorometil(fenil)propionato.
- 65 Sólido blanco. Rendimiento 75% en las dos etapas. Rf(CHex/AcOEt 6/4) 0,42.

**Ejemplo 11: Síntesis del 2-amino-5-etil-(1,3,4)tiadiazol**

Una mezcla de 25 g (0,27 moles) de tiosemicarbazida y de 46,6 ml de cloruro de propanoilo (0,54 moles, 2 eq.) se agita a 40°C durante 4h. El exceso de cloruro de propanoilo se evapora entonces al vacío y el residuo se tritura en éter. Se obtiene un producto sólido. Éste contiene el tiadiazol esperado y una impureza que se elimina mediante precipitación en etanol. Sólido blanco 33,6 g (Rdt 83%) HPLC Kromasil C18 Tr 6,32 min. a 30% CH<sub>3</sub>CN.

**Ejemplo 12: Síntesis de los inhibidores mixtos para los cuales R<sub>5</sub> = CH(R<sub>3</sub>)COOR<sub>4</sub>**

El disulfuro 5, 6 ó 7 (0,54 mmoles) se solubiliza en 4 ml de DMF. Se añade el benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio hexafluorofosfato (BOP) (1,2 eq.; 1,0 g) y la diisopropil-etil-amina (DIEA) (284 ml) y después el éster de aminoácido 8, 9 ó 10 (1,3 eq.). La mezcla se agita durante 20 min. a temperatura ambiente y después se evapora el DMF bajo presión reducida. El producto se recoge en AcOEt. La fase orgánica se lava mediante H<sub>2</sub>O, ácido cítrico al 10%, NaHCO<sub>3</sub> al 10%; NaCl sat. y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El producto en bruto se purifica mediante cromatografía sobre sílice. El compuesto obtenido (0,38 mmoles) se solubiliza en 640 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 320 ml de TFA. La mezcla se agita durante 1h a temperatura ambiente. El exceso de disolvente se evapora bajo presión reducida. La mezcla se coevapora con el ciclohexano. La mezcla se purifica mediante HPLC semi-preparativa o se precipita en una mezcla de Hexano/Et<sub>2</sub>O.

Compuesto 12a: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(2,3-diacetoxipropoxycarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 8b).

P: 176 mg; Rendimiento 66,9%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 40-60: 9,07 y 10,18 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 581. Log Kow = 1,31

Compuesto 12b: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(2-metanosulfoniletoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 8a).

P: 200 mg; Rendimiento 74,1%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 40-60: 5,0 y 5,35 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 529. Log Kow = -0,3

Compuesto 12c: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxietoxicarbonil))-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 8f).

P: 232 mg; Rendimiento 71,3%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50-50: 3,84 y 4,03 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 509. Log Kow = 1,63

Compuesto 12d: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(1-etoxicarbonilmetiloxicarboniletilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 8e).

P: 261 mg; Rendimiento 83,9%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50-50: 4,90 y 5,18 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 539. Log Kow = 1,35

Compuesto 12e: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxietoxicarbonil)-2-hidroxi-propilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 9b)

P: 285 mg; Rendimiento 47,8%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 40-60: 10,55 y 11,09 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 594. Log Kow = 0,76

Compuesto 12f: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(2-acetoxi-1-acetoximetiletoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanil-metil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 8c).

P: 171 mg; Rendimiento 70,1%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 40-60: 7,35 y 8,09 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 581. Log Kow = 1,31

Compuesto 12g: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(2-hidroxi-1-hidroxi-metiletoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanil-metil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 8d).

P: 166 mg; Rendimiento 67,2%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 40-60: 2,94 y 3,27 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 497. Log Kow = -0,29

Compuesto 12h: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidropiran-2-ilmetoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amonio (compuesto 6 ó 7 + compuesto 8g).

P: 85 mg; Rendimiento 93,2%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50-50: 2,34 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 585.

Log Kow = -1,15

Compuesto 12i: trifluoroacetato de 1-(2-((1-(1-etoxicarboniloxi-etoxicarbonil)-2-hidroxi-propil-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 9b).

P: 1,88 g; Rendimiento 83,8%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 45-55: 7,0 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 563. Log Kow = 0,76

Compuesto 12j: trifluoroacetato de 1-(2-(1-(2-acetoxi-1-acetoximetil-etoxicarbonil)-2-hidroxi-propil-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 9a).

P: 532 mg; Rendimiento 53,6%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 40-60: 6,16 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 605. Log Kow = 0,44

Compuesto 12k: trifluoroacetato de 1-(2-(1-etoxicarboniloxi-etoxicarbonil-metil)-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 10a).

P: 1,76 g; Rendimiento 89,5%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50-50: 5,33 min. ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 519. Log Kow 1,39

Compuesto 12l: trifluoroacetato de 1(2-((1-etoxicarboniloxi-2-metil-propoxycarbonil-metil)-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5+ compuesto 10b)

P: 1,2g. Rendimiento 82,3%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50/50 9,33 min., ESI: (M+H)<sup>+</sup> = 547

Compuesto 12m: trifluoroacetato de 1-2-((ciclohexil-etoxicarboniloxi-metoxicarbonil-metil)-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 10c)

P: 2,1g. Rendimiento 65,3%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50/50 12,65 min., ESI: (M+H)<sup>+</sup>=587

Compuesto 12n: trifluoroacetato de 1-(2-((etoxicarboniloxi-fenil-metoxicarbonil-metil)-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 10d)

P: 0,95 g. Rendimiento 68,1%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50/50 10,86 min. ESI (M+H)<sup>+</sup> = 581

Compuesto 12o: trifluoroacetato de 3-metilsulfanil-1-(3-fenil-2-((1-propioniloxi-etoxicarbonil-metil)-carbamoil)-propil-disulfanil-metil)-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 10e)

P: 1,6 g. Rendimiento 81,2%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50/50 6,82 min. ESI (M+H)<sup>+</sup> = 502.

Compuesto 12p: trifluoroacetato de 1-(2-((2-metil-1-propioniloxi-propoxycarbonil-metil)-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 10 f)

P: 1,05 g. Rendimiento 83%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50/50 8,17 min. ESI (M+H)<sup>+</sup> = 531

Compuesto 12q: trifluoroacetato de 1-(2-((ciclohexil-propioniloxi-metoxicarbonil-metil)-carbamoil)-3-fenil-propil-disulfanil-metil)-3-metilsulfanil-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 10g)

P: 1,8 g. Rendimiento 78,2%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50/50 12,24 min. ESI (M+H)<sup>+</sup> = 571

Compuesto 12r: trifluoroacetato de 3-metilsulfanil-1-(3-fenil-2-((fenil-propioniloxi-metoxicarbonil-metil)-carbamoil)-propil-disulfanil-metil)-propil-amonio (compuesto 5 + compuesto 10h)

P: 0,98 g. Rendimiento 76,3%. HPLC Kromasil C18 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,5% de TFA) 50/50 11,25 min. ESI (M+H)<sup>+</sup> = 565

### Ejemplo 13: Síntesis de los inhibidores mixtos para los cuales R<sub>5</sub> = heterociclo

El disulfuro 5, 6 ó 7 (0,54 mmoles) se disuelve en 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden sucesivamente el aminotriazol del ejemplo 11 (1,2 eq.), el TBTU (O-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluroniotetrafluoroborato) (3 eq.) y la DIEA (diisopropiletilamina) (3 eq.). La mezcla se agita durante 30 minutos a temperatura normal (temperatura ambiente, aproximadamente 20°C). El disolvente se evapora al vacío y el residuo se recoge en el acetato de etilo. La fase orgánica se lava con ácido cítrico, con agua, con NaCl saturado y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la filtración y de la evaporación al vacío, se obtiene un sólido blanco.

El compuesto obtenido se disuelve en ácido fórmico y la mezcla se agita durante 1h a temperatura ambiente. El exceso de ácido fórmico se evapora a vacío. El residuo se recoge mediante éter y da un precipitado blanco.

Compuesto 13a = 3-(2-amino-4-metilsulfanil-butildisulfanil)-2-bencil-N-(5-etil-(1,3,4)-tiadiazol-2-il)-propionamida.

P = 256 mg (Rendimiento 75%).

5

#### Ejemplo 14: Cambio de contra-ión

Los compuestos del ejemplo 12 y del ejemplo 13 (1 mmol) son solubilizados en 9 ml de AcOEt destilado. La fase orgánica se lava mediante 12 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1N. La fase orgánica se seca después y se evapora bajo presión reducida. El producto se recoge en AcOEt (3 ml), se enfría hasta 0°C y se añade 1 eq. del ácido AH seleccionado en 3 ml de AcOEt. El disolvente se evapora y el producto se precipita en frío en una mezcla de Et<sub>2</sub>O/hexano.

10

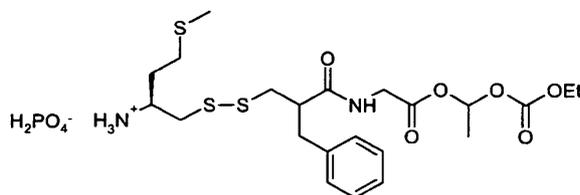
(A = fosfato, clorhidrato, acetato, metanosulfonato, borato, lactato, fumarato, succinato, hemisuccinato, citrato, tartrato, hemitartrato, maleato, ascorbato, hemifumarato, hexanoato, heptanoato, hipurato, hidrocinnamato, fenilgloxilato, nicotinato).

15

#### Ejemplo 15: Resultados farmacológicos - compuestos según la invención

El compuesto 15 de fórmula siguiente ha sido ensayado en los diferentes ensayos biológicos siguientes.

20



25

Ensayo de la placa caliente: Se refiere al reflejo de lamedura y de salto del ratón sobre una placa calentada a 52°C (medición de la latencia del salto en los ejemplos dados). Los resultados son expresados en % de efecto posible máximo (% MPE), es decir, en porcentaje de analgesia, utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ MPE} = \frac{(\text{Tiempo de latencia medido} - \text{tiempo de latencia de control})}{(\text{Tiempo de latencia máximo} - \text{tiempo de latencia de control})}$$

30

Tiempo de latencia máximo = 240 segundos.

Los resultados son expresados en términos de media  $\pm$  s.e.m. Las diferencias observadas se consideran significativas cuando los valores de P son inferiores a 0,05. El ensayo utilizado es el ensayo ANOVA con un ensayo de comparación múltiple.

35

a- respuestas antinociceptivas observadas después de la inyección por vía intravenosa (iv) del compuesto 15 en el ensayo de la placa caliente (52°C, respuesta mediante salto) en ratones machos (n=10).

El compuesto 15 se disuelve en la mezcla agua/manitol (50 mg/ml). Los tiempos de latencia de los saltos se determinan 10 minutos después de las inyecciones por vía intravenosa.

40

Tabla 2

Dosis mg/kg	% de analgesia
10	33,4 $\pm$ 7,5 ★★★
20	59,2 $\pm$ 9,6 ★★★
40	90,2 $\pm$ 7,0 ★★★

45

Los resultados (tabla 2) muestran que el compuesto 15 presenta una acción analgésica, que depende de la dosis.

★★ P<0,01; ★★★ P<0,001 frente a vehículo.

La dosis eficaz 50, ED50, es de 16,1 mg/kg.

50

ED50 es la dosis (en g/kg de cuerpo) que da el efecto buscado en 50% de la población en la que se ensaya.

b- Efecto antinociceptivo del compuesto 15 (100 mg *per os*) en el umbral de vocalización durante la presión de la

pata de una rata (macho Sprague Dawley) que tiene una pata inflamada, siendo la inflamación inducida por la inyección intraplantaria de carragenina.

5 El compuesto 15 y un vehículo (Etanol/polietilenglicol (PEG) 400/agua, 10/40/50) se administran 180 minutos después de una inyección intraplantaria de carragenina (1% en disolución salina).

Tabla 3

	Umbral de vocalización (g)
Umbral basal	298,8±18,7
Pata inflamada + vehículo	205,5±17,8
Pata inflamada + compuesto 15	292,5±20,1 ★★ ★

10 La línea de base para el umbral de vocalización durante la presión de la pata se mide antes de la inflamación (B) y para la pata inflamada 20 minutos después de la inyección del compuesto 15 o del vehículo. Los resultados se proporcionan en la tabla 3 y se expresan en media ± s.e.m., n = 10. Las diferencias observadas se consideran significativas cuando los valores de P son inferiores a 0,05. Estos resultados muestran que el compuesto 15 es eficaz en el tratamiento del dolor inflamatorio neurogénico. ★★ ★ P<0,001 frente al vehículo.

15 c- Respuestas antinociceptivas observadas después de la inyección *iv* del compuesto 15 disuelto en etanol/surfactante/agua (10/10/80) en el ensayo de la placa caliente (52°C, respuesta por salto) en unos ratones machos OF1 y comparación de las respuestas en función de la naturaleza del vehículo.

20 El compuesto 15 se disuelve en una mezcla etanol/Cremophor®EL/agua. Los tiempos de latencias del salto se determinan 10 minutos después de las inyecciones intravenosas. Los resultados se proporcionan en la figura 1.

25 La respuesta dosis-dependiente proporciona una respuesta analgésica con una dosis eficaz 50, DE 50 = 1,9 ± 0,4 mg/kg. Este valor es próximo al observado con la morfina (DE = 1,3 ± 0,2 mg/kg). ★★ P<0,01 frente al vehículo. ★★ ★ P<0,001.

El compuesto 15 es soluble asimismo en unos disolventes de tipo etanol/tween®/agua, que se utilizan frecuentemente para la administración por vía intravenosa en el ser humano.

30 En estos disolventes, las diferencias no son significativamente diferentes de las observadas con el Cremophor®EL. Esto se ilustra en la tabla 4 (tiempo de latencia antes de los saltos determinados 10 minutos después de las inyecciones) a una misma concentración de 2,5 mg/kg *i.v.* ★★ ★ P<0,001 frente al vehículo.

Tabla 4

35

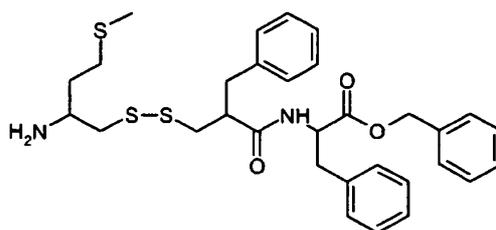
	% de analgesia
Cremophor EL	56,2±6,9 ★★ ★
Tween 80	44,7±6,2 ★★ ★
Tween 20	48,4±10,2 ★★ ★

d- Efecto antinociceptivo del compuesto 15 inyectado *per os* 20 minutos antes del ensayo de la placa caliente: a) curva dosis-respuesta; d) cinética del efecto después de la administración *p.o.* de 200 mg/kg.

40 El compuesto 15 se disuelve en una mezcla etanol/PEG400/agua 10/40/50. Los resultados, proporcionados en las figuras 2a y 2b, muestran que el compuesto 15 presenta un efecto analgésico dosis-dependiente (2a), DE50 = 135 mg/kg, y que el efecto analgésico del compuesto 15 es muy importante justo después de la administración y perdura, con un efecto menos importante, por lo menos durante dos horas (2b).

45 ★ P<0,05; ★★ P<0,01; ★★ ★ P<0,001 frente al vehículo.  
# P<0,05; ### P<0,001 frente al compuesto 15.

50 e- Respuestas antinociceptivas comparativas observadas después de la inyección *iv* del compuesto 15 (n = 14-17) o del compuesto A (n = 8-14), 5 mg/kg, en el ensayo de la placa caliente (52°C, respuesta por salto) en unos ratones machos. El compuesto A es el compuesto de fórmula:



que ha sido descrita en la solicitud de patente anterior WO 91/02718 (ejemplo 7). Es un inhibidor mixto de la neprilisina y de la aminopeptidasa, que presenta unas propiedades analgésicas. Es poco soluble en los disolventes acuosos o hidrófilos.

Los compuestos 15 y A se disuelven en una mezcla etanol/CremophorEL/agua, 10/10/80. Los tiempos de latencia del salto se miden 10 minutos después de las inyecciones intravenosas.

Tabla 5

	% de analgesia
Compuesto 15	87,6±4,6 ★★,###
Compuesto A	51,1 ±7,6 ★★

Los resultados proporcionados en la tabla 5 muestran que a dosis idénticas (bajas con el fin de permitir la administración del compuesto A por vía i.v.), el compuesto 15 es más activo que el compuesto A.

★★ P<0,01 frente al vehículo, ### P<0,001 frente al compuesto A.

f- Analgesia inducida por la morfina o el compuesto 15 inyectado por vía i.v. en el ratón (ensayo de la placa caliente 52°C)

Se ha determinado la analgesia producida por la morfina o el compuesto 15 en ratones (OF1 machos) en el ensayo de la placa caliente (52°C). La morfina en H<sub>2</sub>O (NaCl, 9/1000) o el compuesto 15, disuelto en el vehículo EtOH/CremophorEL/agua (10/10/80), se inyecta por i.v. Los resultados se determinan 10 minutos después de la inyección, y el tiempo de latencia es de 240 segundos (ecuación proporcionada en los ejemplos 15 y 17).

Los resultados se reproducen en la tabla 6 siguiente:

Tabla 6

Dosis (mg/kg)	1	2,5	5
% de analgesia con el compuesto 15	46,4±5,6 ★★	56,3±6,9 ★★	87,6±4,6 ★★
% de analgesia con morfina	45,5±4,5 ★★	66±6,0 ★★	100 ★★
★★★ P<0,001, ensayo Anova.			

Se observa que el compuesto 15 tiene unos efectos analgésicos comparables a los obtenidos con la morfina. Esto está de acuerdo con los resultados de otro experimento efectuado en condiciones idénticas (Figura 1, ejemplo 15c).

#### Ejemplo 16 - Efecto analgésico del $\Delta^9$ THC solo

Se ha determinado la analgesia producida por el  $\Delta^9$ THC en ratones (OF1 machos) en el ensayo de la placa caliente (52°C). El  $\Delta^9$ THC, disuelto en el vehículo EtOH/CremophorEL/agua (10/10/80), se inyecta por i.v. Los resultados se determinan 10 minutos después de la inyección, y el tiempo de latencia es de 240 segundos (ecuación proporcionada en los ejemplos 15 y 17).

Los resultados se reproducen en la tabla 7 siguiente:

Tabla 7

Dosis (mg/kg)	0,188	0,375	0,75	1,5
% de analgesia	0,4 ± 3,9	18,2 ± 6,4	41,2 ± 12,7 ★★	57,2 ± 10,9 ★★
★★ P<0,01; ★★★ P<0,001				

Se constata que el  $\Delta^9$ THC produce un efecto analgésico dosis-dependiente. Unos valores de analgesia significativos se observan para unas dosis de 0,75 mg/kg y 1,5 mg/kg. A dosis más bajas, el porcentaje de analgesia no es

significativo.

**Ejemplo 17 - Efectos analgésicos de los compuestos según la invención +  $\Delta^9$ THC**

5 Los experimentos descritos para demostrar la importancia de la sinergia de acción de los compuestos de la invención asociados al  $\Delta^9$ THC han sido efectuados en los roedores (ratas y ratones) gracias a unos ensayos antinociceptivos utilizados clásicamente en la industria farmacéutica para demostrar este tipo de propiedades, a saber:

- 10
- el ensayo de la placa caliente (Eddie y Leimbach, J.Pharmacol. Exp. Ther. 107,385-389, 1953) en el ratón,
  - el ensayo de la retracción de la cola en la rata (D'Amour y Smith, J. Pharmacol. Exp. Ther. 72, 74-79, 1941),
  - el ensayo del nadado forzado (ensayo de Porsolt) en el ratón (Porsolt Arch. Int. Pharmacodyn. 229, 327, 1977).

Para la realización de los ensayos centrales (placa caliente, retracción de la cola), los contenidos:

- 15
- en cannabinoides ( $\Delta^9$ THC) estarán preferentemente comprendidos entre 0,3 y 0,5 mg/kg,
  - en los compuestos según la invención (compuesto 15) estarán preferentemente comprendidos entre 1 y 2 mg/kg.

Las proporciones relativas dependen de la estimulación nociceptiva.

20 El  $\Delta^9$ THC utilizado en los ejemplos siguientes es el producto comercial comprado en Sigma-Aldrich (T2386).

El inhibidor mixto utilizado en los ejemplos siguientes es el compuesto 15 descrito anteriormente (ejemplo 15).

25 Puesta en disolución de los compuestos

Todos los compuestos han sido solubilizados en la mezcla etanol/Cremophor 80/agua = 10/10/80.

30 Para los experimentos de potenciación (sinergia), se utilizan unas dosis de  $\Delta^9$ THC y de inhibidores que, consideradas separadamente, no inducen ninguna respuesta significativa.

Modo de administración

35 Los diferentes compuestos se administran, en mezcla en la misma jeringa, por vía i.v. en la cola de la rata o del ratón.

Animales

40 Los ratones utilizados en estos ensayos son los ratones OF1 machos.

Las ratas utilizadas en estos ensayos son unas ratas sprague-Dawley machos.

Ensayos farmacológicos

45 - Ensayo de la placa caliente:

Este ensayo se refiere al reflejo de lamedura y de salto del ratón sobre una placa calentada a 52°C. Los resultados son expresados en porcentaje de efecto posible máximo (%MPE), es decir, en porcentaje de analgesia, utilizando la ecuación siguiente:

50

$$\% \text{ MPE} = \frac{(\text{Tiempo de latencia medido} - \text{tiempo de latencia de control})}{(\text{Tiempo de latencia máximo} - \text{tiempo de latencia de control})}$$

Tiempo de latencia máximo = 240 s.

55 Los resultados son expresados en términos de media +/- sem. Las diferencias observadas se consideran significativas cuando los valores de P son inferiores a 0,05.

- Ensayo de retracción de la cola:

60 Este ensayo se refiere al reflejo de retracción de la cola de la rata, estimulada por el calor radiante que emana de una fuente luminosa focalizada sobre una parte determinada de la cola. Los resultados son expresados tal como en el experimento anterior mediante la medición de un porcentaje de analgesia según la misma ecuación. El tiempo de

latencia máximo se fija arbitrariamente en 15 segundos.

- Ensayo del nadado forzado:

5 Este ensayo mide el tiempo de inmovilización de un ratón dispuesto en un baño de agua a 21-23°C, del que no puede escaparse. La duración de inmovilización refleja una forma de depresión, dejando de pelearse el ratón para escapar del medio hostil. Los resultados son expresados en duración de inmovilización. El tiempo máximo de inmovilización es de 4 min. Por necesidades de demostración de la sinergia de la asociación del compuesto 15 +  $\Delta^9$ THC, se efectúa una curva dosis-respuesta del compuesto 15 solo y del  $\Delta^9$ THC solo en el disolvente etanol/CremophorEL/H<sub>2</sub>O (1/1/8) puesto que el  $\Delta^9$ THC se puede utilizar solo por vía i.v. a concentración elevada únicamente en estas condiciones (ejemplo 16). El histograma (figura 3) de las respuestas analgésicas (placa caliente) muestra claramente la potenciación tan importante del efecto analgésico de la asociación  $\Delta^9$ THC + compuesto 15 con respecto a uno u otro de los productos solos.

15 a: Respuesta antinociceptiva inducida por la inyección de una mezcla del compuesto 15 y del  $\Delta^9$ THC por vía iv en el ratón OF1 macho en el ensayo de la placa caliente (figura 3).

20 La mezcla compuesto 15 (0,4 mg/kg) y  $\Delta^9$ THC (0,375 mg/kg) se inyecta en el vehículo etanol/Tween 80/agua (10/10/80). Los ratones pesan 25-30 gramos. Esta mezcla de disolventes es compatible con una administración por vía iv en el ser humano y en el animal.

La latencia del salto se determina 10 minutos después de la inyección intravenosa. Los resultados son expresados en porcentaje de analgesia, utilizando la ecuación definida anteriormente. Éstos se proporcionan en la figura 3.

25 La diferencia observada se considera significativa para un valor de  $p \leq 0,05$  - ANOVA 1 factor seguido de un ensayo de comparación múltiple \*\*\*:  $p \leq 0,01$  frente a control, ###:  $p \leq 0,01$  frente a grupo compuesto 15 y  $\Delta^9$ THC.

30 b: Respuesta antinociceptiva inducida por la inyección de una mezcla del compuesto 15 y del  $\Delta^9$ THC por vía iv en el ensayo de la retracción de la cola de la rata Sprague-Dawley macho. La mezcla compuesto 15 (5 mg/kg) y  $\Delta^9$ THC (0,375 mg/kg) se inyecta en el vehículo etanol/Tween 80/agua (10/10/80). La latencia de la retracción de la cola se determina antes de la inyección (pre-ensayo) y 10 minutos después de la inyección intravenosa (ensayo).

El tiempo de latencia es de 15 segundos. Las ratas pesan 260-300 gramos.

35 Los resultados se proporcionan en la tabla 8.

Tabla 8: Ensayo de retracción de la cola

	% de analgesia
Vehículo	-3,9 ± 3,3
Compuesto 15	-4,2 ± 1,9
$\Delta^9$ THC	23,3 + 2,4 ★★★
Compuesto 15 ± $\Delta^9$ THC	39,2 ± 7,7 ★★, ★★★#
★★★: $p < 0,001$ frente al vehículo, ★★: $< 0,001$ frente al compuesto 15, #: $p < 0,05$ frente al $\Delta^9$ THC	

40 La diferencia observada se considera significativa para un valor de  $p \leq 0,05$ . ANOVA dos factores seguido de un ensayo de comparación múltiple: ★★★ $p \leq 0,001$ , ★★ $\leq 0,01$  frente al grupo vehículo, #:  $p \leq 0,05$  frente al grupo  $\Delta^9$ THC; ★★★:  $p \leq 0,001$ , ★★ $\leq 0,01$  frente al grupo de compuesto 15.

45 c: Respuesta de tipo antidepresivo inducida por inyección de una mezcla del compuesto 15 y del  $\Delta^9$ THC por vía iv en el ensayo del nadado forzado en el ratón OF1 macho.

La mezcla compuesto 15 (5 mg/kg) y  $\Delta^9$ THC (0,375 mg/kg) se inyecta en el vehículo etanol/Tween 80/agua (10/10/80) por vía intravenosa 10 minutos antes del ensayo.

50 La duración de inmovilización total se mide durante 4 minutos.

55 Los resultados se proporcionan en la tabla 9. Los ratones pesan aproximadamente 25-30 gramos. La diferencia observada se considera significativa para un valor de  $p \leq 0,05$ . ANOVA 1 factor seguido de un ensayo de comparación múltiple: ★★★ $p \leq 0,001$ , \*:  $p \leq 0,05$  frente al grupo vehículo; ###:  $p \leq 0,001$  frente al grupo compuesto 15/ $\Delta^9$ THC; y grupo  $\Delta^9$ THC.

Tabla 9: Ensayo de depresión, nadado forzado

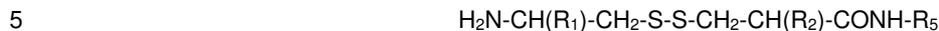
	Movilización, (segundos)
Vehículo	230,7 ± 4,5
Compuesto 15	180 ± 8,4 ★★★
Δ <sup>9</sup> THC	206 ± 6,1
Compuesto 15/Δ <sup>9</sup> THC	137,4 ± 8,8★★★, ###
★★★: p < 0,001 frente a control, ###: p<0,001 frente a THC y compuesto 15.	

Conclusión:

- 5 Se observa que la administración de una baja dosis de cannabinoide, el Δ<sup>9</sup>THC, es decir, a unas concentraciones inferiores a 0,5 mg/kg mediante administración iv en el ratón, permite potenciar las respuestas antinociceptivas o antidepressivas inducidas por el compuesto 15.
- 10 En estas condiciones, la sinergia se demuestra muy claramente cuando se comparan los efectos analgésicos obtenidos en el ensayo de la placa caliente en el ratón comparando las curvas dosis-respuestas para el Δ<sup>9</sup>THC y el compuesto 15 por un lado y el efecto producido por unas dosis sub-analgésicas de estos dos compuestos (Figura 3).
- 15 Se puede observar que los factores de amplificación dosis activa Δ<sup>9</sup>THC sola/dosis activa Δ<sup>9</sup>THC + compuesto 15, y a la inversa, dosis activa compuesto 15 solo/dosis activa compuesto 15 + Δ<sup>9</sup>THC, son en los dos casos muy superiores a 10 y difícilmente calculables de manera precisa puesto que las dosis utilizadas del compuesto 15 y del Δ<sup>9</sup>THC son inactivas cuando estas dos moléculas se utilizan solas a estas mismas dosis.
- 20 La intensidad de la respuesta antinociceptiva determinada por la asociación del compuesto según la invención (inhibidor mixto NEP/APN; por ejemplo el compuesto 15) y del Δ<sup>9</sup>THC, siendo las dos sustancias administradas a muy bajas dosis en las que están desprovistas de actividad, indica la existencia de una sinergia entre encefalinas endógenas (protegidas por los compuestos según la invención) y el Δ<sup>9</sup>THC. Esto se corrobora mediante un análisis isobolográfico de las respuestas farmacológicas.

**REIVINDICACIONES**

1. Compuestos que responden a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

R<sub>1</sub> representa:

- 10 - una cadena hidrocarbonada, saturada o insaturada, lineal o ramificada, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, eventualmente sustituida por:
- 15 \* un radical OR, SR o S(O)R, representando R en cada uno de estos radicales, un hidrógeno, una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de 1 a 4 átomos de carbono, un radical fenilo o bencilo,
- \* un radical fenilo o bencilo,
- 20 - un radical fenilo o bencilo eventualmente sustituido por:
- \* 1 a 5 halógenos, en particular el flúor,
- \* un radical OR, SR o S(O)R, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente,
- 25 - un radical metileno sustituido por un heterociclo de 5 ó 6 átomos, aromático o saturado, que posee como heteroátomo un átomo de nitrógeno o de azufre, eventualmente oxidado en forma de N-óxido o de S-óxido;

R<sub>2</sub> representa:

- 30 - un radical fenilo o bencilo, eventualmente sustituido por:
- \* 1 a 5 átomos de halógenos, en particular el flúor,
- \* un radical OR o SR, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente,
- 35 \* un grupo amino eventualmente mono- o di-sustituido por un grupo alifático de 1 a 6 átomos de carbono,
- \* un ciclo aromático de 5 ó 6 átomos,
- un heterociclo aromático de 5 ó 6 átomos, siendo el heteroátomo un oxígeno, un nitrógeno o un azufre,
- 40 - un grupo metileno sustituido por un heterociclo de 5 ó 6 átomos, aromático o saturado, siendo el heteroátomo un oxígeno, un nitrógeno o un azufre, estando los átomos de nitrógeno y de azufre eventualmente oxidados en forma de N-óxido o de S-óxido.

R<sub>5</sub> representa un radical CH(R<sub>3</sub>)-COOR<sub>4</sub> en el que

- 45 R<sub>3</sub> representa:
- un hidrógeno,
- 50 - un grupo OH u OR, teniendo R el mismo significado que anteriormente
- una cadena hidrocarbonada saturada (alquilo), lineal o ramificada, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, eventualmente sustituida por un radical OR o SR, teniendo R en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente,
- 55 - un radical fenilo o bencilo, eventualmente sustituido por:
- \* 1 a 5 halógenos, en particular el flúor,
- \* un radical OR o SR, teniendo R la misma definición que anteriormente.
- 60

y OR<sub>4</sub> representa

- un radical glicolato OCH<sub>2</sub>COOR' o lactato OCH(CH<sub>3</sub>)COOR', representando R' en cada uno de estos radicales
- 65 \* una cadena hidrocarbonada saturada (alquilo) de 1 a 6 átomos de carbono, lineal o ramificada, eventualmente sustituida por un grupo alcoxi de C1 a C3, preferentemente un grupo alquilo de C1-C4

eventualmente sustituido por un grupo metoxi

\* un grupo cicloalquilo de C5 a C8, preferentemente un grupo cicloalquilo de C5-C6,

5 \* un grupo fenilo, bencilo, heteroarilo, alquilheteroarilo

- un grupo  $\text{OCH(R'')O(CO)OR'}$  u  $\text{OCH(R'')O(CO)R'}$ , teniendo R' en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente y representando R''

10 \* un átomo de hidrógeno,

\* una cadena alquilo de C1-C6 lineal o ramificada eventualmente sustituida por un grupo alcoxi de C1 a C3, preferentemente un grupo alquilo de C1-C4 eventualmente sustituido por un grupo metoxi,

15 \* un grupo cicloalquilo de C5 a C8, preferentemente un grupo cicloalquilo de C5-C6,

\* un grupo fenilo, bencilo, heteroarilo, alquilheteroarilo,

20 - un radical triglicérido  $\text{OCH(CH}_2\text{OCOR')}_2$  u  $\text{OCH}_2\text{-CH(OCOR')-CH}_2\text{OCOR'}$ , teniendo R' en cada uno de estos radicales el mismo significado que anteriormente

- un radical glucósido tal como D-glucosa,  $\beta$ -D-glucopiranososa,  $\alpha$ - o  $\beta$ -galactopiranososa,

- un radical sulfonato  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{SO}_2)\text{CH}_3$ ,

25

- un radical  $\text{OCH(CH}_2\text{OH)}_2$ ;

así como las sales de adición de dichos compuestos (I) con unos ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables.

30

2. Compuestos según la reivindicación 1, caracterizados porque  $R_1$  representa un radical alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono sustituido por un radical SR, teniendo R el mismo significado que anteriormente, en particular R representa una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada de 1 a 4 átomos de carbono.

35

3. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados porque el radical  $R_2$  representa un radical bencilo o un radical metileno sustituido por un heterociclo de 5 ó 6 átomos, aromático o saturado, que posee como heteroátomo un átomo de nitrógeno o de azufre, eventualmente oxidado en forma de N-óxido o de S-óxido.

40

4. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados porque el radical  $R_3$  representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono sustituido por un radical OH o SH.

5. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados porque el radical  $OR_4$  representa un grupo  $\text{OCH(R'')O(CO)OR'}$  u  $\text{OCH(R'')O(CO)R'}$ ,

45

- representando el radical R' una cadena alquilo de C1-C4, en particular el radical etilo, y

- representando el radical R'' un radical metilo,  $\text{CH(CH}_3)_2$ , ciclohexilo o fenilo.

50

6. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados porque se seleccionan de entre los compuestos siguientes:

1-(2-(1-(2,3-diacetoxipropoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina,

55

1-(2-(1-(2-metanosulfoniletotoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxietoxicarbonil))-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metil-sulfanilpropil-amina,

1-(2-(1-etoxicarbonilmetiloxicarboniletilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

60

1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxietoxicarbonil)-2-hidroxipropilcarbamoil)-3-tiofen-3-ilpropildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

65

1-(2-(1-(2-acetoxi-1-acetoximetiletotoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

1-(2-(1-(2-hidroxi-1-hidroximetiletotoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-

amina,

1-(2-(1-(3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidropiran-2-ilmetoxicarbonil)-etilcarbamoil)-3-tiofen-3-il-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

5 1-(2-(1-(1-etoxicarboniloxi-etoxicarbonil)-2-hidroxi-propilcarbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

10 1-(2-(1-(2-acetoxi-1-acetoximetil-etoxicarbonil)-2-hidroxi-propilcarbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina,

1-(2-((1-etoxicarboniloxi-etoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanilpropil-amina.

15 3-(2-amino-4-metilsulfanil-butildisulfanil)-2-bencil-N-(5-etil-(1,3,4)-tiadiazol-2-il)-propionamida

1-(2-((1-etoxicarboniloxi-2-metil-propoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina

20 1-(2-((ciclohexil-etoxicarboniloxi-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina

1-(2-((etoxicarboniloxi-fenil-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metilsulfanil-propil-amina

25 3-metilsulfanil-1-(3-fenil-2-((1-propioniloxi-etoxicarbonilmetil)-carbamoil)-propildisulfanilmetil)-propil-amina

1-(2-((2-metil-1-propioniloxi-propoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metil-sulfanil-propil-amina

1-(2-((ciclohexil-propioniloxi-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-3-fenil-propildisulfanilmetil)-3-metil-sulfanil-propil-amina

30 3-metilsulfanil-1-(3-fenil-2-((fenil-propioniloxi-metoxicarbonilmetil)-carbamoil)-propildisulfanilmetil)-propil-amina

7. Compuestos de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, a título de medicamentos.

35 8. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende por lo menos un compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un excipiente farmacéuticamente apropiado, en particular un excipiente apropiado para una administración por vía oral, nasal o intravenosa.

40 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, caracterizada porque está destinada al tratamiento de la depresión y de los diferentes tipos de dolor, tales como el dolor agudo, el dolor nociceptivo, el dolor inflamatorio y el dolor neurogénico.

10. Utilización de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la depresión y del dolor.

45 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, caracterizada porque comprende además por lo menos un derivado de cannabinoides, en particular el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol.

50 12. Utilización de una combinación de por lo menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y de por lo menos un derivado de cannabinoides, en particular el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la depresión y del dolor.

13. Composición farmacéutica que comprende

55 i) por lo menos un compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,  
ii) por lo menos un derivado de cannabinoides,

como productos de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo.

60 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, 9 u 11, caracterizada porque comprende además morfina o uno de sus derivados.

15. Utilización de una combinación de por lo menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y de morfina o de uno de sus derivados, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la depresión y del dolor.

% de analgesia

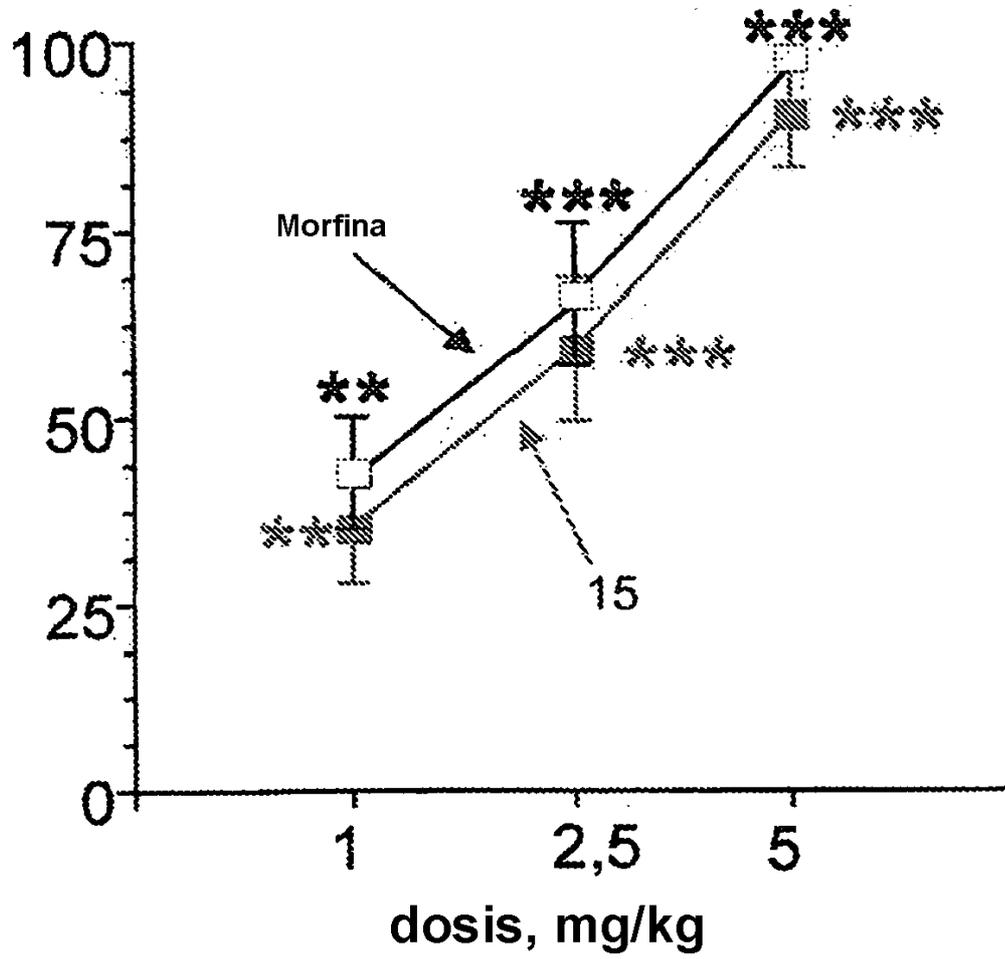


FIG. 1

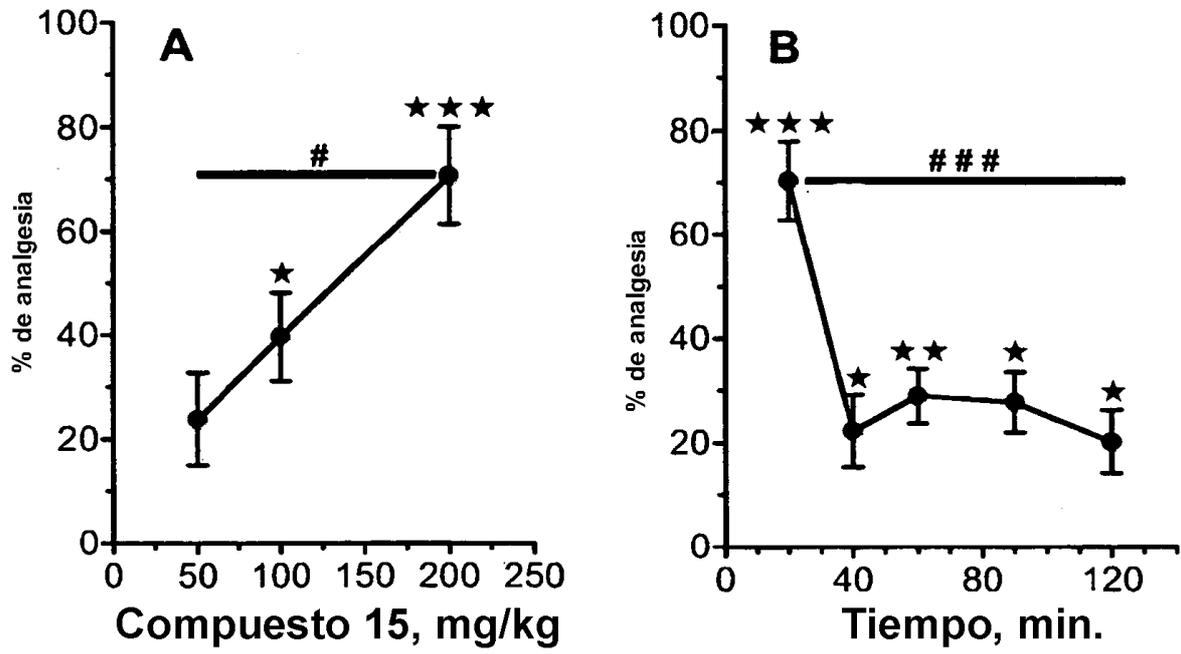


FIG. 2A y 2B

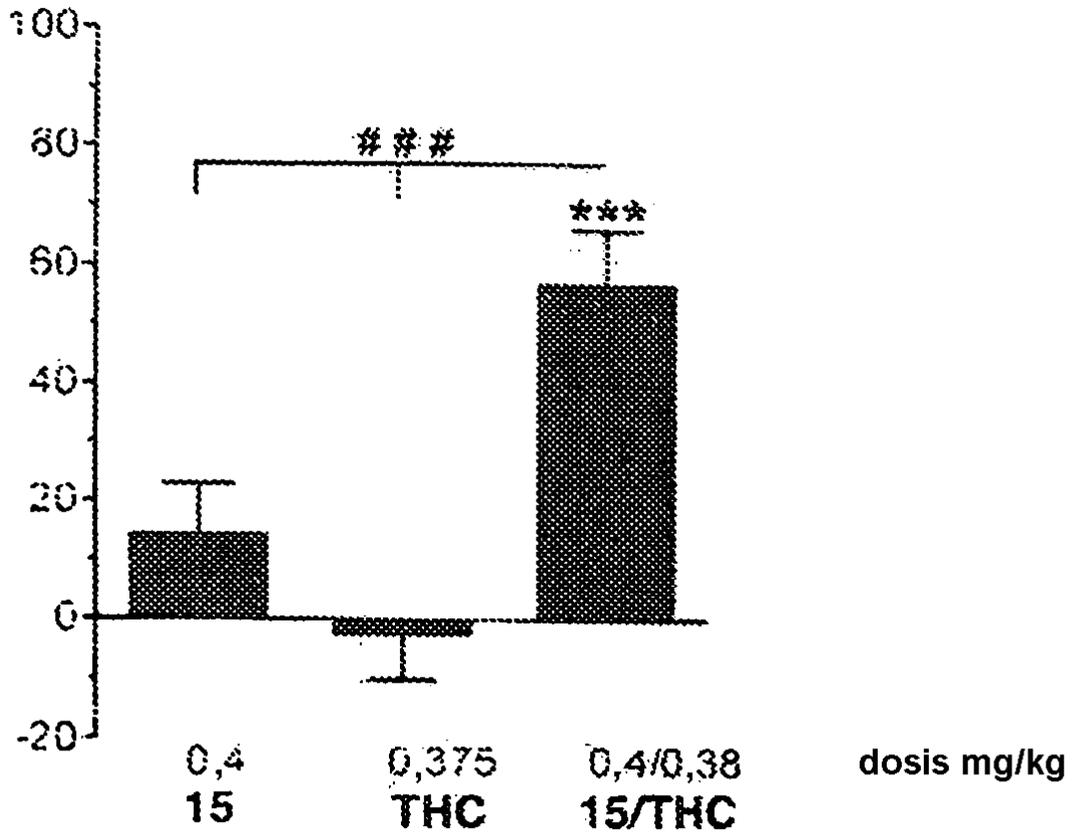


FIG. 3