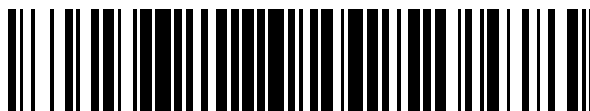


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 134**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/5415** (2006.01)  
**C07D 417/12** (2006.01)  
**C07D 279/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06820232 .4**  
96 Fecha de presentación: **18.10.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1954288**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54 Título: **Derivados de amidina y sus aplicaciones como medicamento**

30 Prioridad:  
**21.10.2005 FR 0510751**  
**07.03.2006 FR 0601999**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.11.2012**

73 Titular/es:  
**IPSEN PHARMA (100.0%)**  
**65 QUAI GEORGES GORSE**  
**92100 BOULOGNE-BILLANCOURT, FR**

72 Inventor/es:  
**AUVIN, SERGE;**  
**BIGG, DENNIS;**  
**CHABRIER DE LASSAUNIÈRE, PIERRE-ETIENNE y**  
**PIGNOL, BERNADETTE**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 390 134 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 amidina y sus aplicaciones como medicamento.

5 La presente invención tiene por objeto derivados de amidina que presentan una actividad inhibidora de las calpaínas y/o una actividad de captura de las especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés "reactive oxygen species"). La invención también se refiere a sus métodos de preparación, las composiciones farmacéuticas que los contienen y sus utilidades para fines terapéuticos, en particular como inhibidores de calpaínas y/o capturadores de especies reactivas del oxígeno de forma selectiva o no.

10 Teniendo en cuenta el papel potencial de las calpaínas y de las ROS en fisiopatología, los nuevos derivados según la invención pueden producir efectos benéficos o favorables en el tratamiento de patologías en las que estas enzimas y/o especies de radicales están implicadas, y principalmente:

- las enfermedades inflamatorias e inmunológicas como por ejemplo la artritis reumatoide, las pancreatitis, la esclerosis en placas y las inflamaciones del sistema gastrointestinal (por ejemplo la colitis ulcerativa o no, la enfermedad de Crohn),
- 15 • las enfermedades cardiovasculares y/o cerebrovasculares que comprenden por ejemplo hipertensión arterial, choque séptico, infartos cardiacos o cerebrales de origen isquémico o hemorrágico, isquemias así como trastornos unidos a la agregación plaquetaria,
- los trastornos del sistema nervioso central o periférico como por ejemplo las enfermedades neurodegenerativas entre las que se pueden citar principalmente los traumatismos cerebrales o de la médula espinal, la hemorragia subaracnoide, la epilepsia, el envejecimiento, las demencias seniles, incluida la enfermedad 20 de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y las neuropatías periféricas,
- la caquexia,
- la sarcopenia,
- 25 • la pérdida de audición, en particular la pérdida de audición provocada por la presbiacusia, por un traumatismo acústico, o por la administración de un medicamento tal como antibióticos como por ejemplo la gentamicina, los agentes anticancerígenos como por ejemplo el cisplatino, los agentes anti-inflamatorios no esteroideos como por ejemplo los derivados del ácido salicílico o el ibuprofeno. los diuréticos tal como por ejemplo la furosemida, los agentes anti-ulcerosos tal como por ejemplo la cimetidina o el omeprazol, los agentes anticonvulsivos tal como por ejemplo la carbamazepina o el ácido valproico,
- la osteoporosis,
- 30 • las distrofias musculares, como por ejemplo en particular la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker, la distrofia muscular miotónica o enfermedad de Steiner, la distrofia muscular congénita, la distrofia muscular de cinturas y la distrofia muscular facio-escápulo-humeral,
- las enfermedades proliferativas no cancerígenas como por ejemplo la aterosclerosis o la reestenosis,
- la catarata,
- 35 • los trasplantes de órganos,
- las enfermedades auto-inmunes o virales como por ejemplo el lupus, el sida, las infecciones parasitarias o virales, la diabetes y sus complicaciones,
- el cáncer y las enfermedades proliferativas cancerígenas,
- cualquier patología caracterizada por una producción excesiva de las ROS y/o una activación de las 40 calpaínas.

Todas estas patologías, existen evidencias experimentales que demuestran la implicación de las ROS (Free Radic. Biol. Med. (1996) 20, 675-705; Antioxid. Health. Dis. (1997) 4 (Handbook of Synthetic Antioxidants), 1-52) así como la implicación de las calpaínas (Trends Pharmacol. Sci. (1994) 15, 412419 ; Drug News Perspect (1999) 12, 73-82). A modo de ejemplo, las lesiones cerebrales asociadas al infarto cerebral o al traumatismo craneal experimental se reducen con agentes antioxidantes (Acta. Physiol. Scand. (1994) 152, 349-350 ; J. Cereb. Blood Flow Metabol. (1995) 15, 948-952 ; J Pharmacol Exp Ther (1997) 2, 895-904) así como con inhibidores de calpaínas (Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93, 3428-33 ; Stroke, (1998) 29, 152-158 ; Stroke (1994) 25, 2265-2270).

Con el fin de responder a las exigencias de los industriales, se ha hecho necesario encontrar otros compuestos que tengan una actividad inhibidora de las calpaínas y/o una actividad de captura de las formas reactivas del oxígeno.

Así, el problema que la invención se propone resolver es proporcionar nuevos compuestos que tengan una actividad inhibidora de las calpaínas y/o una actividad de captura de las formas reactivas del oxígeno.

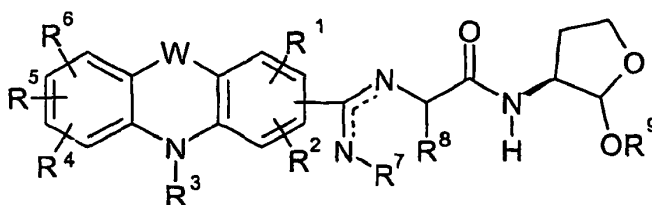
- 5 De manera inesperada, los inventores han puesto en evidencia que los compuestos de fórmula general (I) descritos a continuación o sus sales, en forma racémica, de diastereoisómeros o cualquier combinación de estas formas presentan una actividad inhibidora de las calpaínas y/o una actividad de captura de las formas reactivas del oxígeno.

La invención tiene la ventaja de poder llevarse a cabo en cualquier industria, particularmente la industria farmacéutica, veterinaria, cosmética, alimentaria, así como en el campo de la agricultura.

- 10 Los compuestos según la invención o sus sales presentan una solubilidad aumentada en los medios biológicos, en particular en los medios acuosos.

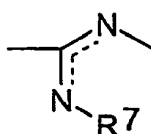
De la lectura de la descripción y de los ejemplos siguientes, que se ofrecen de manera meramente ilustrativa y no limitativa, se deducirán con claridad otras ventajas y características de la invención.

La presente invención tiene por lo tanto por objeto un compuesto de fórmula general (I) o su sal,

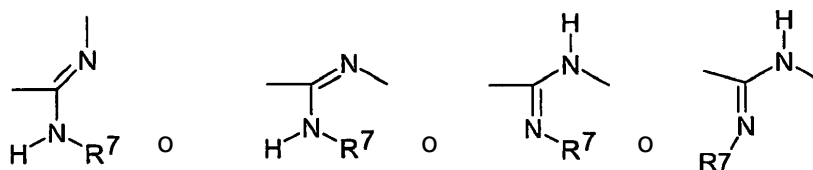


(I)

- 15 en forma racémica, de diastereoisómeros o cualquier combinación de estas formas en la que :
- R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan, independientemente, un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, el grupo OH, un radical alquilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, alquilamino o ácido carboxílico ;
- R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo o un grupo -COR<sup>10</sup> ;
- 20 R<sup>10</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo, alcoxi, arilo o un radical heterocíclico ;
- W representa un átomo de azufre ;
- R<sup>7</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo;
- R<sup>8</sup> representa un átomo de hidrógeno, un radical haloalquilo o alquenoilo, un radical cicloalquilo, un radical alquilo lineal o ramificado, sustituido o no que cuando está sustituido lleva una función química tal como ácido carboxílico, amina, alcohol, guanidina, amidina, tiol, tioéter, tioéster, alcoxi, heterocíclico o carboxamida ;
- 25 R<sup>9</sup> representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo, arilo, arilalquilo, bisarilalquilo, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico alquilo o un grupo -COR<sup>10</sup>;
- entendiéndose que :



- 30 significa



- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>1</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>2</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>3</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>4</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- 5 De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>5</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>6</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>7</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>8</sup> que es un radical isobutilo.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>9</sup> que es un átomo de hidrógeno.
- 10 De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>9</sup> que es un radical acetilo.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>9</sup> que es un radical metilo.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>9</sup> que es un radical bencilo.
- De preferencia el compuesto según la invención posee un radical R<sup>9</sup> que es un radical naftilmetilo.
- 15 Por alquilo, cuando no se precisa más, se entiende un radical alquilo lineal o ramificado que cuenta de 1 a 12 átomos de carbono, y de preferencia de 1 a 6 átomos de carbono, incluso más preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Se entiende, en particular, por alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, los radicales metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo, pentilo, neopentilo, isopentilo, hexilo e isohexilo.
- 20 Por haloalquilo, se entiende un radical alquilo del que uno al menos de los átomos de hidrógeno está sustituido con un átomo de halógeno. Por haloalquilo, se entiende por ejemplo el radical -CF<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>Cl.
- Por alqueno, cuando no se precisa más, se entiende un radical alqueno lineal o ramificado que comprende al menos 1 insaturación y que comprende de 2 a 12 átomos de carbono, y de preferencia de 2 a 6 átomos de carbono.
- Se entiende por alcoxi, cuando no se precisa más, un radical R-O- en el que la cadena carbonada R es lineal o ramiificada y comprende de 1 a 6 átomos de carbono.
- 25 Se entiende por cicloalquilo, cuando no se precisa más, un radical carbocíclico saturado que comprende de 3 a 7 átomos de carbono. Se entiende en particular por cicloalquilo que comprende de 3 a 7 átomos de carbono, un radical ciclohexilo.
- Por arilo, cuando no se precisa más, se entiende un radical carbocíclico aromático que comprende de preferencia de 1 a 3 ciclos condensados. Se entiende por arilo, principalmente los radicales fenilo, naftilo y fenantrilo, preferentemente los radicales fenilo y naftilo y más preferentemente el radical fenilo.
- 30 Por radicales arilalquilo, se entiende radicales arilalquilo en los que respectivamente los radicales alquilo y arilo que los componen tienen los significados indicados anteriormente, entendiéndose que el radical arilo está unido a la molécula (I) o (IS) a través de un radical alquilo.
- 35 Por bisarilalquilo se entiende en el sentido de la presente invención un radical carbocíclico aromático que comprende al menos 2 ciclos, de los que al menos uno es aromático, y que comprende como máximo 14 átomos de carbono, de preferencia como máximo 10 átomos de carbono, entendiéndose que el radical bisarilalquilo está unido a la molécula (I) o (IS) a través de un radical alquilo.
- Por heterocíclico, se entiende en el sentido de la presente invención un radical cíclico aromático o que no comprende de 1 a 14 átomos, eligiéndose estos átomos entre carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre, o una de sus combinaciones. Se entiende que el radical heterocíclico puede estar parcialmente insaturado. Por heterocíclico se entiende por ejemplo un radical heteroarilo o un radical heterocicloalquilo.
- 40 Por heterocíclico alquilo, se entiende en el sentido de la presente invención un radical heterocíclico alquilo cuyos radicales heterocíclico y alquilo que los comprenden tienen los significados indicados anteriormente y cuyo radical heterocíclico está unido a la molécula (I) o (IS) a través de un radical alquilo.
- 45 Por átomo de halógeno, se entiende un átomo elegido entre los átomos de flúor, cloro, bromo o yodo.
- Por amino, se entiende en el sentido de la presente invención un radical -NH<sub>2</sub>.

Por alquilamino, se entiende en el sentido de la presente invención un radical -NRH o -N(R)<sub>2</sub> siendo R un radical alquilo tal como se ha definido anteriormente.

Los ejemplos siguientes indican los grupos protectores que pueden proteger las funciones que lleva el radical R<sup>8</sup> :

- los ésteres de metilo, de etilo, de *terc-butilo* o de bencilo pueden proteger funciones ácidas ;
- 5 • los carbamatos de *terc-butilo* de bencilo o de fluorenilmetilo pueden proteger funciones aminas ;
- las acetamidas pueden proteger funciones aminas ; y
- los éteres de *terc-butilo*, de bencilo, de tetrahidropirano o de sililo pueden proteger funciones alcoholes ; y
- los acetilos pueden proteger funciones alcoholes ; y
- los tioéteres de metilo o los tioésteres de metilo pueden proteger funciones tiol.

10 En particular, la invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) elegida entre los siguientes compuestos o su sal:

N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-metoxitetrahidrofuran-3-il]-L-leucinamida ;

N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahidrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida ;

N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(2-naftilmetoxi) tetrahidrofuran-3-il]-L-leucinamida ;

15 acetato de (3S)-3-((N-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucil)amino)tetrahidrofuran-2-ilo ;

N<sup>1</sup>-[(3S)-2-hidroxitetrahidrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida.

La terminología utilizada para la nomenclatura de los compuestos anteriores la terminología inglesa IUPAC.

La presente invención tiene igualmente por objeto un compuesto de fórmula general (I) o su sal, tal como se define anteriormente, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa.

20 Más particularmente, los compuestos según la invención o sus sales se pueden utilizar como sustancia terapéuticamente activa para el tratamiento de patologías caracterizadas por una producción excesiva de ROS y/o una activación de las calpainas.

Incluso más particularmente, los compuestos según la invención o sus sales pueden utilizarse como sustancia terapéuticamente activa para tratar las enfermedades y los trastornos elegidos entre las enfermedades inflamatorias o inmunológicas, las enfermedades cardio-vasculares, las enfermedades cerebro-vasculares, los trastornos del sistema nervioso central o periférico, la caquexia, la sarcopenia, la pérdida de audición, la osteoporosis, las distrofias musculares, las enfermedades proliferativas cancerígenas o no, las cataratas, las reacciones de rechazo después de trasplantes de órganos, las enfermedades autoinmunes, enfermedades virales, o el cáncer.

30 De preferencia la invención tiene por objeto un compuesto de fórmula general (I) o su sal, tal como se define anteriormente, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa para tratar la pérdida de audición o las distrofias musculares.

La presente invención tiene igualmente por objeto un medicamento que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) tal como se define anteriormente o una de sus sales. De preferencia se trata de sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

35 La presente invención tiene igualmente por objeto como medicamentos, los compuestos de fórmula general (I) tal como se define anteriormente o sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención se refiere igualmente las composiciones farmacéuticas que contienen al menos un compuesto de fórmula general (I) tal como se define anteriormente, o al menos una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto. De preferencia la composición farmacéutica comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. De preferencia el compuesto de fórmula general (I) tal como se define anteriormente, o su sal está contenido en la composición farmacéutica como principio activo.

40 Por sal farmacéuticamente aceptable, se entienden principalmente las sales de adición de ácidos inorgánicos, tales como por ejemplo hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, fosfato, difosfato y nitrato, o de ácidos orgánicos, tales como por ejemplo acetato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, lactato, metanosulfonato, p-toluensulfonato, pamoato y estearato. Para otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables, se puede recurrir a la referencia "Salt selection for basic drugs", Int. J. Pharm. (1986), 33, 201-217.

45

El compuesto de fórmula general **(I)** o su sal utilizado según la invención puede estar en forma de un sólido, por ejemplo polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, liposomas o supositorios. Los soportes sólidos apropiados pueden ser, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetil-celulosa de sodio, polivinilpirrolidina o cera.

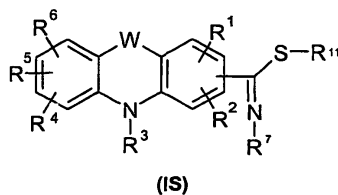
- 5 El compuesto de fórmula general **(I)** según la invención o su sal puede también presentarse en forma líquida, por ejemplo, disoluciones, emulsiones en el sentido amplio, geles, suspensiones, vaporizaciones o siropes. Los soportes líquidos apropiados pueden ser, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos tales como glicerol o glicoles, lo mismo que sus mezclas, en proporciones variadas, en agua.

- 10 La invención se refiere además a la utilización de un compuesto de fórmula general **(I)** tal como se define anteriormente, o de una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, para preparar un medicamento destinado a tratar cualquier patología caracterizada por una producción excesiva de ROS y/o una activación de las calpainas, y en particular las enfermedades y trastornos elegidos entre las enfermedades inflamatorias o inmunológicas, las enfermedades cardio-vasculares, las enfermedades cerebro-vasculares, los trastornos del sistema nervioso central o periférico, la caquexia, la sarcopenia, la pérdida de audición, la osteoporosis, las distrofias musculares, las enfermedades proliferativas cancerígenas o no, las cataratas, las reacciones de rechazo después de trasplantes de órganos, las enfermedades auto-inmunes, las enfermedades virales, o el cáncer.

- 15 La administración de un compuesto de fórmula general **(I)** según la invención o su sal se podrá realizar por vía tópica, oral, parenteral, por inyección intramuscular, subcutánea, etc.

- 20 La dosis de un producto según la presente invención, prevista para el tratamiento de las enfermedades o los trastornos mencionados anteriormente, varía según el modo de administración, la edad y el peso corporal de sujeto que se va a tratar, así como el estado este último, y será decidido en definitiva por el médico o el veterinario que da el tratamiento. Tal cantidad determinada por el médico o el veterinario que da el tratamiento se denomina aquí "cantidad terapéuticamente activa".

La presente invención tiene igualmente por objeto un compuesto de fórmula general **(IS)** o su sal,



- 25 en forma de estereoisómeros o sus combinaciones  
en la que

W, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> tienen el mismo significado que para los compuestos de fórmula **(I)**, y

- 30 R<sup>11</sup> representa un radical alquilo, arilo, arilalquilo, bisarilalquilo, un radical heterocíclico o un radical heterocíclico alquilo.

La presente invención tiene igualmente por objeto compuestos o sus sales, que son intermedios de síntesis obtenidos durante la síntesis de los compuestos de fórmula general **(I)**, elegidos entre los compuestos siguientes :

*10H-fenotiazin-2-carbimidotioato de metilo;*

*N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-metoxitetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida ;*

- 35 *N'-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahydrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida ;*

*N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(2-naftilmetoxi) tetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida ;*

*acetato de (3S)-3-({N-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucil}amino)tetrahydrofuran-2-ilo ;*

*N-etil-10H-fenotiazin-2-carboxamida ;*

*N-etil-10H-fenotiazin-2-carbotioamida ;*

- 40 *N-etil-10H-fenotiazin-2-carbimidotioato de metilo*

La terminología utilizada para la nomenclatura de los compuestos anteriores la terminología inglesa IUPAC.

La presente invención tiene igualmente por objeto un compuesto o su sal, que es uno de los intermedios de síntesis **(IS)** descritos anteriormente, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa. Más

particularmente, estos compuestos según la invención o sus sales se pueden utilizar como sustancia terapéuticamente activa para el tratamiento de patologías caracterizadas por una producción excesiva de ROS y/o una activación de las calpaínas.

5 Incluso más particularmente, los compuestos según la invención o sus sales pueden utilizarse como sustancia terapéuticamente activa para tratar las enfermedades y los trastornos elegidos entre las enfermedades inflamatorias o inmunológicas, las enfermedades cardio-vasculares, las enfermedades cerebro-vasculares, los trastornos del sistema nervioso central o periférico, la caquexia, la sarcopenia, la pérdida de audición, la osteoporosis, las distrofias musculares, las enfermedades proliferativas cancerígenas o no, las cataratas, las reacciones de rechazo después de trasplantes de órganos, las enfermedades autoinmunes, enfermedades virales, o el cáncer.

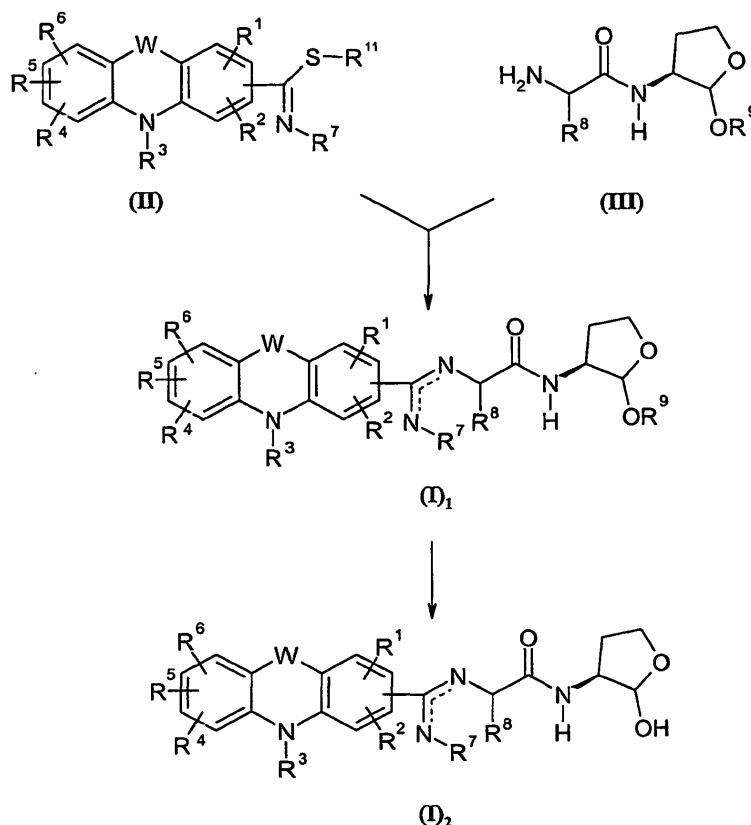
10 La presente invención tiene igualmente por objeto un medicamento que comprende al menos un compuesto o su sal, que es uno de los intermedios de síntesis (IS) descritos anteriormente. De preferencia se trata de sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

La presente invención tiene igualmente por objeto, como medicamento, al menos un compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable, que es uno de los intermedios de síntesis (IS) descritos anteriormente.

15 La invención se refiere igualmente a las composiciones farmacéuticas que contienen al menos un compuesto o su sal, que es uno de los intermedios de síntesis (IS) descritos anteriormente, o al menos una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto. De preferencia la composición farmacéutica comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. De preferencia, el compuesto o su sal, que es uno de los intermedios de síntesis (IS) descritos anteriormente, está contenido en la composición farmacéutica como principio activo.

20 **Preparación de los compuestos de fórmula general (I):**

Los compuestos de fórmula general (I) según la invención se pueden preparar según la vía de síntesis representada en el esquema 1 anterior. Los compuestos de fórmula general (I) en la que R<sup>9</sup> representa un radical alquilo, arilo, arilalquilo, bisarilalquilo, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico alquilo o un grupo - COR<sup>10</sup> con R<sup>10</sup> representando un átomo de hidrógeno o un radical alquilo, alcoxi, arilo, o un radical heterocíclico se denominan compuestos de fórmula general (I)<sub>1</sub>. Los compuestos de fórmula general (I) en la que R<sup>9</sup> representa un átomo de hidrógeno se denominan compuestos de fórmula general (I)<sub>2</sub> en lo que sigue de exposición. En el esquema 1 a continuación, así como en el esquema 2, el significado de W, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> en los compuestos de fórmulas generales (II), (III), (I)<sub>1</sub> y (I)<sub>2</sub>, es tal como se describe más arriba en la descripción :

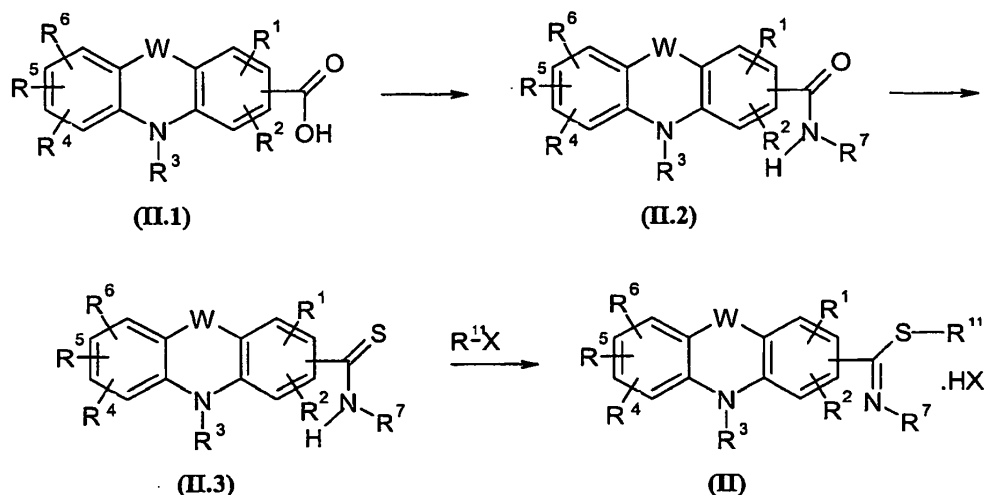


**Esquema 1**

Los compuestos de fórmulas generales (I)<sub>1</sub> y (I)<sub>2</sub> se obtienen según el esquema 1 por condensación de derivados tioimidatos de fórmula general (II) sobre los amino-lactoles de fórmula general (III), de preferencia por calentamiento entre 25 y 60° C, preferentemente en un disolvente polar, tales como por ejemplo isopropanol, DMF o bien THF, durante un período de 4 a 20 horas. La función hemiacetálica de los compuestos de fórmula general (I)<sub>1</sub> puede desprotegerse a continuación para conducir al compuesto de fórmula general (I)<sub>2</sub>, por ejemplo en medio ácido, con ayuda de un ácido mineral tal como HCl o HBr o bien de un ácido orgánico, tal como por ejemplo el ácido benceno sulfónico, en disolución en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, acetona, THF, dioxano, acetonitrilo o etanol. La reacción se efectúa generalmente a alrededor de 20° C y durante un tiempo que puede variar de 4 a 20 horas según la naturaleza de R<sup>9</sup>.

#### 10 Preparación de los intermedios de fórmula general (II):

Los tioimidatos de fórmula general (II) no comerciales, en los que W, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son tal como se describen más arriba en la descripción, se pueden preparar según la vía de síntesis detallada en el esquema 2.



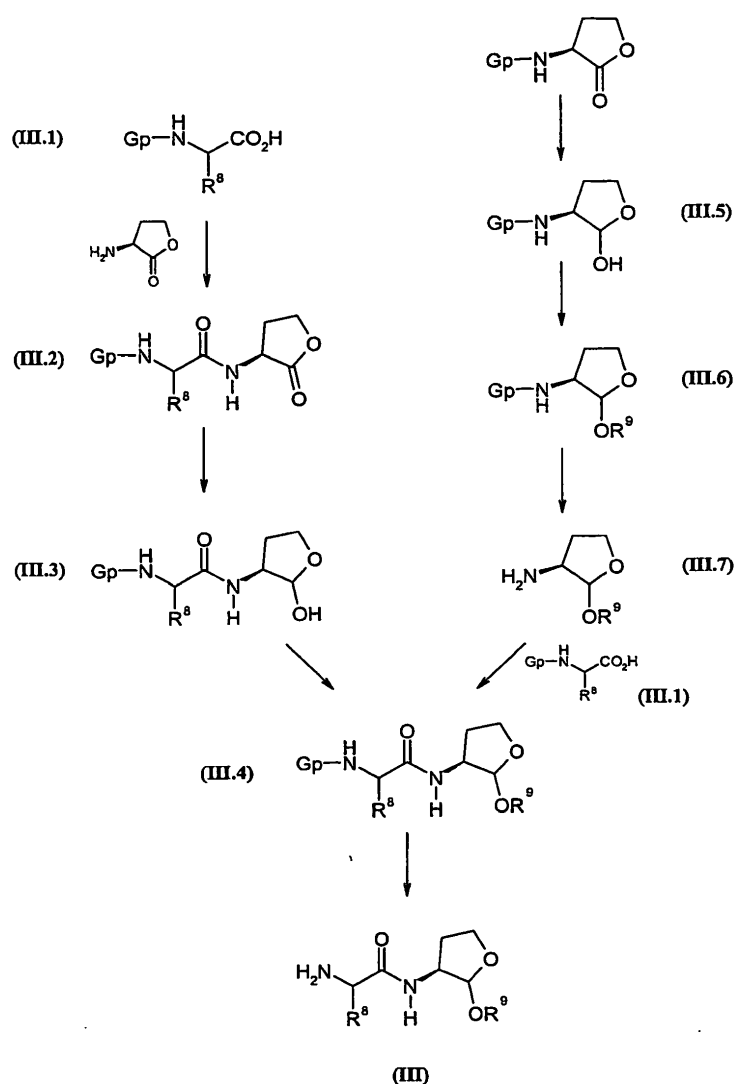
**Esquema 2**

Los tioimidatos de fórmula general (II), derivados de la fenotiazina (W = S), se pueden obtener en 3 etapas a partir de los ácidos carboxílicos de fórmula general (11.1) correspondientes. Estos ácidos carboxílicos son accesibles a partir de métodos descritos en la bibliografía tal como, por ejemplo, Pharmazie 1984, 39(1), 22-3; Bull. Soc. Chim. 1968, (7), 2832-42, Pharmazie 1966, 21(11), 645-9, Synthesis 1988, (3), 215-17, J. Med. Chem. 1992, 35(4), 716-24, J. Org. Chem. (1960), 25, 747-53, Heterocycles (1994), 39(2), 833-45; J. Indian Chem. Soc. (1985), 62(7), 534-6; J. Chem. Soc. Chem. Comm. (1985), (2), 86-7. La formación de las carboxamidas de fórmula general (11.2) se efectúa en presencia de un disolución acuosa concentrada de amoníaco (R<sup>7</sup> = H) o bien de una amina (R<sup>7</sup> = alquilo), con ayuda de un reactivo de acoplamiento peptídico, tal como por ejemplo DCC o HBTU, en un disolvente tal como, por ejemplo, DMF. Las tiocarboxamidas de fórmula general (11.3) se pueden obtener por acción del reactivo de Lawesson en disolución en 1,4-dioxano. La alquilación de las tiocarboxamidas para generar los tioimidatos de fórmula general (II) se puede realizar con ayuda de R<sup>11</sup>-X, siendo X un grupo saliente tal como por ejemplo un átomo de halógeno, un grupo sulfato o toflato. La mezcla de reacción se agita, por ejemplo en acetona durante 15 horas. Los tioimidatos (II) se obtienen en forma de sales, por ejemplo iodhidrato si se utiliza iodometano (R<sup>11</sup>-X) y se pueden desalificar opcionalmente con ayuda de una base tal como, por ejemplo, el carbonato de sodio.

Preparación de los intermedios de fórmula general (III):

Los derivados amino-lactoles de fórmula general (III), en los que R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son tal como los descritos anteriormente, con Gp siendo un grupo protector de preferencia de tipo carbamato, son accesibles utilizando por ejemplo las vías de preparación representadas en el esquema 3 a continuación.



**Esquema 3**

Los derivados de amino-butirilactona de fórmula general (III.2) se pueden obtener por condensación de los aminoácidos protegidos de fórmula general (III.1), en la que  $\text{R}^{\text{a}}$  es un radical de aminácido tal como el anteriormente definido en la fórmula general (I) y Gp es un grupo protector tal como, por ejemplo, un carbamato de bencilo, de *tert*-butilo o de fluorenilmetilo, sobre la (S)- $\alpha$ -aminobutilactona en las condiciones clásicas de la síntesis peptídica para conducir a las carboxamidas intermedias de fórmula general (III.2). La lactona (III.2) se reduce después a lactol con ayuda de un agente reductor tal como, por ejemplo, hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL), en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, THF o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a una temperatura de preferencia inferior a  $-50^\circ\text{C}$ , por ejemplo a alrededor de  $-78^\circ\text{C}$ . La función hemiacetal de los derivados lactoles de fórmula general (III.3) se protege después bien en medio alcohólico, por ejemplo en metanol o alcohol bencilico, con ayuda de un ácido fuerte tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético o ácido camforsulfónico, bien en presencia de un anhídrido de ácido carboxílico, por ejemplo anhídrido acético, en presencia de 4-dimetilaminopiridina en un disolvente inerte, tal como diclorometano, para conducir a los acetales de fórmula general (III.4).

Alternativamente, los amino-lactoles de fórmula general (III), se pueden preparar en 5 etapas a partir de (S)- $\alpha$ -aminobutilactona protegidas comerciales. Las etapas sucesivas de reducción de la lactona y de protección del hemiacetal para conducir a los intermedios (III.5) y (III.6) son idénticas a las descritas para la generación de los intermedios (III.3) y (III.4). La preparación de los intermedios (III.7) se efectúa de preferencia por hidrogenólisis, en presencia de Pd/C, del grupo benciloxicarbonilo principalmente utilizado en esta estrategia. Los intermedios de fórmula general (III.4) se pueden después obtener por condensación peptídica en las condiciones anteriormente descritas para (III.2), entre los intermedios (III.7) y los aminoácidos de fórmula general (III.1). La función amina de los intermedios de fórmula general (III.4) se desprotege después según los métodos descritos en la bibliografía (T.W. Greene et P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Segunda edición (Wiley-Interscience, 1991)).

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen el mismo significado que el que comprende habitualmente un experto común en el campo al que pertenece esta invención. Asimismo, todas las publicaciones, solicitudes de patentes, todas las patentes y cualquier otra referencia mencionada aquí se incorporan como referencia.

- 5 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar los procedimientos anteriores y en ningún caso deben ser considerados como un límite al alcance de la invención.

### **EJEMPLOS**

La terminología utilizada para la nomenclatura de los ejemplos a continuación la terminología inglesa IUPAC.

- 10 En los siguientes ejemplos, los puntos de fusión se han medido gracias a un capilar con ayuda de un aparato de la marca Büchi, modelo B-545.

**Ejemplo 1:** Iodhidrato de  $N^2$ -[imino(10H-fenotiazina-2-il)metil]- $N^1$ -[(3S)-2-metoxitetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida ;

#### **1.1) $N^2$ -[(benciloxi)carbonil]- $N^1$ -[(3S)-2-oxotetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :**

- 15 Se disuelven, en 60 ml de DMF anhidro, 3,51 g (13,25 mmoles) de Cbz-L-Leucina, 2,41 g (1 eq.) de hidrobromuro de (S)-2-amino-4-butirolactona, 1,97 g de HOBT (1,1 eq.) y 5,59 g (2,2 eq.) de hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida (EDC) y luego se añaden 7,64 ml (3,3 eq.) de N,N-di-isopropiletilamina. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas a 20°C antes de verterse en 200 ml de una mezcla 1/1 de acetato de etilo/agua. Después de agitar y decantar, la disolución orgánica se lava sucesivamente con 100 ml de una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, 50 ml de agua, 100 ml de una disolución 1M de ácido cítrico y finalmente 100 ml de una disolución de salmuera. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra a sequedad a vacío. El aceite obtenido se lava con isopentano y se cristaliza a continuación en una mezcla de diclorometano/isopentano. Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 68%.
- 20

Punto de fusión: 130-131°C.

#### **1.2) $N^2$ -[(benciloxi)carbonil]- $N^1$ -[(3S)-2-hidroxitetrahydrofuran-3 il]-L-leucinamida:**

- 25 En un matraz de tres bocas que contiene 60 ml de diclorometano anhidro, se disuelven 1,24 g (3,56 mmoles) del intermedio 1.1, en argón. El conjunto se enfría a -60°C antes de la adición, gota a gota, de 10,7 ml (3 eq.) de una disolución 1M de DIBAL en diclorometano. Al final de la adición, se retira el baño refrigerante y se mantiene la agitación durante 15 minutos suplementarios. El medio de reacción se vierte a continuación, con precaución, en 100 ml de una disolución de sal de Rochelle al 20%. Después de 2 horas de agitación enérgica, se añaden 100 ml de diclorometano y todo se vierte en un matraz de decantación. La fase orgánica se recupera y se lava con 50 ml de agua y 50 ml de salmuera. Después de secar sobre sulfato de sodio y filtración, la disolución orgánica se concentra hasta sequedad a vacío. El residuo de evaporación se purifica sobre una columna de sílice (eluyente: heptano/AcOEt: 1/1 hasta 2/8). Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 72%. Punto de fusión: 48-49°C.
- 30

#### **1.3) $N^2$ -[(benciloxi)carbonil]- $N^1$ -[(3S)-2-metoxitetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :**

- 35 Se añade, gota a gota a 20°C, un exceso de ácido trifluoroacético (5 ml) a una disolución de 0,82 g (2,34 mmoles) del intermedio 1.2 en 50 ml de metanol. La agitación se mantiene 15 horas a 20°C. La mezcla de reacción se concentra a continuación de forma parcial a vacío y se vuelven a disolver en 50 ml de diclorometano. La disolución orgánica se lava sucesivamente con 50 ml de una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, 50 ml de agua y 50 ml de salmuera. Después de secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar a vacío, el residuo de evaporación se purifica en una columna de sílice (eluyente: heptano/AcOEt: 1/1 hasta 3/7). Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 80%. Punto de fusión: 112-113°C.
- 40

#### **1.4) $N^1$ -[(3S)-2-metoxitetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :**

- 45 En un reactor en acero inoxidable que contiene 60 ml de metanol, se introducen 2 g (5,5 mmoles) del intermedio 1.3 y 600 mg de Pd/C al 10%. La mezcla se agita a 2 atm. de presión de hidrógeno durante 1 hora. Después de filtrar el catalizador, el metanol se evapora a vacío. El residuo aceitoso obtenido (1,20 g; 94%) se utiliza tal cual en la siguiente etapa.

#### **1.5) 10H-fenotiazina-2-carboxamida :**

- 50 Una mezcla de reacción del compuesto de 3,4 g (14 mmoles) de 10H-fenotiazina-2-carboxamida (J. Org. Chem. 1961, 26, 1138-1143) y de 3,4 g (8,4 mmoles) de reactivo de Lawesson en disolución en 40 ml de 1,4-dioxano al que se adicionan 20 ml de piridina se calienta a 110° C durante 1 h 30. La disolución marrón se concentra después a vacío y el residuo se diluye en 200 ml de AcOEt y 100 ml de H<sub>2</sub>O. Después de agitación y decantación, la fase orgánica se lava sucesivamente con 100 ml de una disolución acuosa 1N de HCl y 100 ml de salmuera. Después de secado sobre sulfato de sodio, filtración y evaporación del disolvente a vacío, se obtiene un polvo naranja. Este

polvo se lava con Et<sub>2</sub>O, el filtrado se elimina, y se extrae con acetona. El filtrado acetónico se concentra entonces a vacío y el residuo de evaporación se purifica después sobre una columna de sílice (eluyente: heptano/AcOEt: 1/1 hasta 4/6). Polvo naranja. Punto de fusión: 208-209°C.

#### 1.6) Iodhidrato de 10H-fenotiazin-2-carbimidatoato de metilo

- 5 A una disolución de 1,05 g (4,1 mmoles) del intermedio 1.5 en 10 ml de acetona, se añaden 0,3 ml (1,2 eq.) de iodometano a 23° C. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas. El precipitado formado se filtra y se enjuaga sucesivamente con acetona e isopentano. Se obtiene un sólido marrón violeta con un rendimiento de 85%. Punto de fusión: 207-208°C.

#### 1.7) Iodhidrato de N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-metoxitetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :

- 10 A una disolución de 0,68 g (2,95 mmoles) del intermedio 1.4 en 20 ml de isopropanol se añaden 1,18 g (1 eq.) del intermedio 1.6. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas a 60°C. El metanotiol liberado durante la reacción es atrapado sucesivamente con ayuda de una disolución de sosa y de una disolución de permanganato de potasio. El sólido formado se aísla por filtración y se enjuaga con Et<sub>2</sub>O antes de purificarse sobre una columna de sílice (eluyente: heptano/AcOEt: 1/1 a 0/1). Se obtiene un sólido naranja con un rendimiento del 70%. Punto de fusión: 155-165°C.

#### **Ejemplo 2:** Iodhidrato de N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahydrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida

##### 2.1) N<sup>2</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-oxotetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :

- 20 El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 1.1, reemplazando la Fmoc-L-Leucina la Cbz-L-Leucina. Se obtienen por cristalización en AcOEt 3,15 g de un sólido blanco con un rendimiento de 72 %. Punto de fusión: 175-176°C.

##### 2.2) N<sup>2</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-hidroxitetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :

- 25 El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 1.2, reemplazando el intermedio 2.1 al intermedio 1.1. Se obtienen después de purificación sobre columna de sílice (heptano/AcOEt: 1/1) 2,16 g de un sólido blanco con un rendimiento de 68 %. Punto de fusión: 155-156°C.

##### 2.3) N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahydrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-leucinamida :

- 30 Se añaden 0,41 ml (1,1 eq.) de alcohol bencílico y 0,11 g (0,13 eq.) de ácido camforsulfónico a una suspensión de 1,57 g (3,58 mmoles) del intermedio 2.2 en 7 ml de diclorometano. A medida que la reacción avanza, el medio de reacción se vuelve homogéneo. Después de 24 horas de agitación, el conjunto se diluye con 25 ml de agua y 25 ml de diclorometano, se agita y se decanta. La disolución orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra a sequedad. El residuo se purifica sobre una columna de sílice (heptano/AcOEt : 1/0 hasta 1/1). Después de evaporación, se obtienen 1,43 g de un sólido blanco con un rendimiento del 76%. Punto de fusión: 116-117°C.

##### 2.4) N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :

- 35 A una disolución de 0,2 g (0,38 mmol) del intermedio 2.3 en disolución en 3,5 ml de diclorometano, se añaden gota a gota 0,2 ml (5 eq.) de dietilamina. La mezcla de reacción se agita a 23°C durante 5 h 30 antes de concentrarse a sequedad a vacío. El residuo se redisuelve parcialmente con Et<sub>2</sub>O y se almacena a 4° C durante algunas horas.

El precipitado blanco formado se elimina por filtración y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo de evaporación se utiliza tal cual en la etapa siguiente.

##### 2.5) Iodhidrato de N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahydrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida :

- 40 El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 1.7, por reacción del intermedio 1.6 con el intermedio 2.4 que se utiliza en lugar del intermedio 1.4. El producto de la reacción se purifica sobre una columna de sílice (heptano/AcOEt : 1/1 hasta 0/1). Después de evaporación de las fracciones más puras, el residuo se mezcla en isopentano/AcOEt para conducir a un precipitado naranja claro. Se obtienen 430 mg del producto esperado con un rendimiento del 53%. Punto de fusión: 140-145°C.

#### **Ejemplo 3:** Iodhidrato de N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(2-naftilmetoxi)tetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida

##### 3.1) N<sup>2</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(2-naftilmetoxi) tetrahydrofuran-3-il]-L-leucinamida :

El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 2.3 a partir del intermedio 2.2 y de 2-hidroximetilnaftaleno utilizado en lugar del alcohol bencílico. Se obtienen después de

purificación sobre una columna de sílice (heptano/AcOEt: 7/3) 1,38 g de un sólido blanco con un rendimiento de 66 %.

Punto de fusión: 79-80°C.

**3.2) N<sup>1</sup>-(3S)-2-(2-naftilmetoxi)tetrahidrofuran-3-il)-L-leucinamida :**

- 5 El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 2.4, reemplazando el intermedio 3.1 al intermedio 2.3. El producto se obtiene después de la eliminación de los derivados dibenzofulvenos y se utiliza tal cual en la etapa siguiente.

**3.3) Iodhidrato de N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(2-naftil metoxi)tetrahidrofuran-3-il)-L-leucinamida :**

- 10 El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 1.7, a partir del intermedio 1.6 y del intermedio 3.2 utilizado en lugar del intermedio 1.4. El producto de la reacción de condensación se purifica sobre una columna de sílice (heptano/AcOEt : 1/1 hasta 0/1). Después de evaporación de las fracciones más puras, el residuo se mezcla en isopentano/AcOEt para conducir a un precipitado naranja. Se obtienen 530 mg del producto esperado con un rendimiento del 64%. Punto de fusión: 145-148°C.

- 15 **Ejemplo 4:** Iodhidrato de acetato de (3S)-3-({N-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucil}amino)tetrahidrofuran-2-ilo

**4.1) acetato de (3S)-3-({N-[(benciloxi)carbonil]-L-leucil}amino)tetrahidrofuran-2-ilo:**

- 20 En atmósfera de argón, se disuelven 2 g (5,73 mmoles) del intermedio 1.2 y 0,14 g (0,2 eq.) de 4-dimetilaminopiridina en 13 ml de diclorometano anhidro. A esta disolución se añaden, gota a gota, 5,4 ml (10 eq.) de anhídrido acético. Después de 5 horas de agitación a 23° C, la mezcla de reacción se diluye con 50 ml de diclorometano y 50 ml de agua. La fase orgánica se lava después sucesivamente con 50 ml de una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, 50 ml de agua y finalmente salmuera. La disolución de diclorometano se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra a sequedad a vacío. El residuo obtenido se mezcla con Et<sub>2</sub>O, se filtra y se lava con isopentano. Se obtienen 1,14 g de un sólido blanco con un rendimiento de 50%. Punto de fusión: 158-159°C.

- 25 **4.2) acetato de (3S)-3-(L-leucilamino)tetrahidrofuran-2-ilo :**

- 30 En un reactor de acero inoxidable que contiene 30 ml de ácido acético, se introducen 1,14 g (2,89 mmoles) del intermedio 4.1 y 227 mg de Pd/C al 10%. La mezcla se agita a 2 atm. de presión de hidrógeno durante 4 h 30. Después de la filtración del catalizador, el ácido acético se evapora a vacío. El residuo aceitoso obtenido se divide entre 50 ml de diclorometano y 50 ml de una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La agitación y decantación son seguidas de un lavado de la fase orgánica con agua y salmuera. Después de secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtración y concentración a sequedad, el aceite incoloro obtenido cristaliza espontáneamente para conducir a 0,45 g de un sólido blanco con un rendimiento de 60 %. Punto de fusión: 75-80°C.

**4.3) Iodhidrato de acetato de (3S)-3-({N-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucil}amino) tetrahidrofuran-2-ilo :**

- 35 El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 1.7, a partir del intermedio 1.6 y del intermedio 4.2 excepto el disolvente de la reacción que en este caso es THF y el tiempo de calentamiento que está limitado a 4 horas. La mezcla de reacción es adsorbida directamente sobre la sílice y se deposita en la parte superior de una columna de cromatografía (heptano/AcOEt : 3/7 hasta 0/1) para purificación. Después de recoger y evaporar las fracciones puras, se obtienen 0,27 g de un sólido naranja con un rendimiento del 18 %. Punto de fusión: 130-131°C.

- 40 **Ejemplo 5 :** Iodhidrato de N<sup>1</sup>-[(3S)-2-hidroxitetrahidrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida

- 45 A una disolución de 0,42 g (0,69 mmol) del intermedio 4.3 en 42 ml de THF, se añaden, a 23° C, 12 mg (0,1 eq.) de ácido benzenosulfónico. Después de 5 h 30 de agitación a 23° C, se añaden 137 µl de una disolución 0,5 M de NaHCO<sub>3</sub> (0,1 eq.). La agitación se mantiene 5 minutos adicionales antes de la filtración del precipitado formado. El filtrado se concentra a sequedad y el residuo se purifica sobre una columna de sílice (diclorometano/EtOH : 95/5 hasta 90/10). Las fracciones puras se recogen y se evaporan para conducir a 171 mg de un sólido naranja con un rendimiento del 43 %. Punto de fusión: 148-150°C.

**Ejemplo 6:**

**6.1) N-etil-10H-fenotiazin-2-carboxamida:**

- 50 A una disolución de 2,43 g (10 mmoles) de ácido 0H-fenotiazin-2-carboxílico, de 1,79 g (2,2 eq.) de hidrocloreuro de etilamina y de 4,17 g (1,1 eq.) de HBTU en 50 ml de DMF, enfriado a 0° C, se añaden gota a gota 5,8 ml (3,3 eq.) de DIEA. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas, a 23° C, y se vierte a continuación en una mezcla de 100 ml

de una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y 100 ml de  $\text{AcOEt}$ . Después de algunos minutos de agitación, el precipitado formado se elimina por filtración y el filtrado se decanta. La fase orgánica se lava sucesivamente con agua, una disolución 1M de ácido cítrico y salmuera. La disolución orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra a sequedad a vacío. El sólido obtenido se suspende en  $\text{Et}_2\text{O}$ , se tritura y se filtra. Se obtiene un sólido beige con un rendimiento cuantitativo. Punto de fusión: 150-151°C.

### 6.2) *N-etil-10H-fenotiazin-2-carbotioamida* :

El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 1.5, reemplazando el intermedio 6.1 la 10H-fenotiazin-2-carboxamida. Se obtienen 2,17 g de un sólido amarillo con un rendimiento de 60%. Punto de fusión: 155-156°C.

### 6.3) *Hidrocloreto de N-etil-10H-fenotiazin-2-carbimidotioato de metilo* :

El protocolo experimental utilizado es el mismo que el descrito para la síntesis del intermedio 1.6, con ayuda de iodometano, reemplazando el intermedio 6.2 al intermedio 1.5. El compuesto obtenido salificado, en forma iodhidrato, se divide a continuación entre una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{AcOEt}$ . Después de la decantación, la fase orgánica se lava con agua y salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se filtra. A esta disolución orgánica enfriada a 0° C, se añade a continuación 1,1 eq. de una disolución titulada 1N de HCl en  $\text{Et}_2\text{O}$  anhidro. Después de una hora de agitación a 23° C, la mezcla de reacción se concentra a sequedad a vacío. El residuo de evaporación se suspende finalmente en  $\text{Et}_2\text{O}$  y se filtra. Se obtiene un sólido rojo oscuro. Punto de fusión: 142-143°C.

Estudio farmacológico de los compuestos de la invención:

Todos los porcentajes se indican en volumen.

### **Efecto in situ de los compuestos según la invención sobre la actividad enzimática calpaína de las células esqueléticas humanas (SKM)**

El principio del ensayo es el siguiente : la maitotoxina es una toxina que provoca la apertura de los canales cálcicos de las células. El flujo intra-celular de calcio que resulta está en el origen de la muerte de la célula. Durante este proceso de muerte celular, se activa una proteasa dependiente de cisteína, la calpaína. El ensayo consiste en incubar células en presencia de maitotoxina, para activar la enzima calpaína, y añadir un sustrato de la calpaína que se vuelve fluorescente cuando la enzima escinde este sustrato. Por último, se ensayan los inhibidores de la calpaína.

Los mioblastos se siembran a 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos en un medio de cultivo DMEM 10 % FBS (suero de vaca fetal) suplementado con anfotericina B, el factor epidérmico de crecimiento recombinante humano y la dexametasona. Tres días después de la siembra, las células se han adherido al fondo de los pocillos, se induce la diferenciación de las células en miotubos por adición de 100  $\mu\text{l}$  de medio DMEM F12 que contiene 2 % de suero de caballo. Después de tres días adicionales, se depositan 100  $\mu\text{l}$  del compuesto a ensayar en el fondo de los pocillos. Después de una hora de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , se añade sustrato fluorescente de la calpaína (Suc-Leu-Tyr-AMC) y maitotoxina (Sigma, ref: M-9159). Para determinar la actividad total de la enzima celular, se preparan sobre la placa pocillos testigo sin compuestos a ensayar (100  $\mu\text{l}$  DMSO diluido a la centésima al que se adicionan 10  $\mu\text{l}$  de MTX y sustrato). Se determinan los ruidos de fondo preparando pocillos suplementarios de control sin MTX. Cada concentración de los productos se ensaya por triplicado. Las placas se agita, se lee la fluorescencia a 380/460 nm con ayuda del aparato denominado Victor a tiempo cero. La incubación tiene lugar durante tres horas a 30°C en la oscuridad.

Los valores de fluorescencia permiten calcular un efecto-concentración para cada uno de los compuestos. La  $\text{Cl}_{50}$  (concentración de la sustancia a ensayar que inhibe 50 % de la actividad de la enzima) se calcula a partir de este efecto-concentración.

El compuesto del ejemplo 5 presenta una  $\text{Cl}_{50}$  inferior a 20  $\mu\text{M}$  en este ensayo.

### **Estudio de los efectos sobre la peroxidación lipídica del córtex cerebral de rata**

La actividad inhibidora de los productos de la invención se determina mediante la medida de sus efectos sobre el grado de peroxidación lipídica, determinada por la concentración de malondialdehído (MDA). El MDA producido por la peroxidación de los ácidos grasos insaturados es un buen índice de la peroxidación lipídica (H Esterbauer y KH Cheeseman, Meth. Enzymol.(1990), 186, 407-421). Se han sacrificado ratas macho Sprague Dawley de 200 a 250 g (Charles River) por decapitación. El córtex cerebral se recoge, y luego se homogeneiza en una rejilla de Thomas en tampón Tris-HCl 20 mM, pH = 7,4. El homogeneizado se centrifuga dos veces a 50000 g durante 10 minutos a 4°C. El centrifugado se conserva a -80°C. El día del experimento, el centrifugado se vuelve a poner en suspensión con una concentración de 1 g/15 ml y se centrifuga a 515 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se utiliza inmediatamente para la determinación de la peroxidación lipídica. El homogeneizado de córtex cerebral de rata (500 $\mu\text{l}$ ) se incuba a 37°C durante 15 minutos en presencia de los compuestos que se van a ensayar o del disolvente (10 $\mu\text{l}$ ). La reacción de peroxidación lipídica se inicia con la adición de 50 $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_2$  1 mM, EDTA 1 mM y ácido

ascórbico 4 mM. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, la reacción se detiene con la adición de 50µl de una disolución de di-*tert*-butil- tolueno hidroxilado (BHT, 0,2%). El MDA se cuantifica mediante un ensayo colorimétrico, haciendo reaccionar un reactivo cromógeno (R), el N-metil-2-fenilindol (650µl), con 200µl del homogeneizado durante 1 hora a 45°C. La condensación de una molécula de MDA con dos moléculas de reactivo R produce un cromóforo estable cuya longitud de onda de absorbancia máxima es igual a 586 nm. (Caldwell et coll., European J. Pharmacol. (1995), 285, 203-206).

Los compuestos de los ejemplos 1 a 5 presentan una  $CI_{50}$  inferior a 5 µM en este ensayo.

**Efecto protector de los compuestos según la invención sobre la muerte celular inducida por la maitotoxina sobre las células esqueléticas humanas ( SKM)**

10 El principio del ensayo es el siguiente : la maitotoxina es una toxina que provoca la apertura de los canales cálcicos de las células. El flujo intra-celular de calcio que resulta está en el origen de la muerte de la célula. durante este proceso de muerte celular, se activa una proteasa dependiente de cisteína, la calpaína, y se producen de forma abundante radicales libres. El ensayo consiste en incubar las células en presencia de las moléculas que se van a ensayar, con el fin de retardar o inactivar la muerte celular y así determinar su efecto protector.

15 Los mioblastos se siembran a 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos en un medio de cultivo DMEM 10 % FBS (suero de vaca fetal) suplementado con anfotericina B, el factor epidérmico de crecimiento recombinante humano y la dexametasona. Tres días después de la siembra, las células se han adherido al fondo de los pocillos, se induce la diferenciación de las células en miotubos por adición de 100 µl de medio DMEM F12 que contiene 2 % de suero de caballo. Después de tres días adicionales, se depositan 100 µl del compuesto a ensayar en el fondo de los pocillos. Después de una hora de incubación a 37°C bajo una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, se añade maitotoxina (MTX) (Wako, ref : 131-10731) para evaluar el efecto protector (efecto-concentración) del compuesto a ensayar sobre la muerte celular.

25 Después de un tiempo de incubación de 3 h o 96 h, el medio de cultivo se reemplaza por un medio DMEM 10 % FBS suplementado con 10 % de WST-1. El WST-1 (Roche, referencia 1644807) es un reactivo colorante de las células metabólicamente activas, es decir, de las células en vida. Las células se incuban durante 1 hora en presencia de WST-1. Después se determina el número de células en vida con ayuda de un aparato Perkin Elmer Wallac Envision 2101 por lectura de la absorbancia a 450 nm. A continuación se calcula el efecto-concentración de los productos sobre la tasa de supervivencia de las células.

30 La  $CE_{50}$  (concentración de la sustancia a ensayar que protege 50 % de las células de la muerte celular) se calcula a partir de este efecto-concentración.

El compuesto del ejemplo 5 presenta, en este ensayo, una  $CE_{50}$  inferior a 16,4 µM después de 3 horas de incubación en presencia de maitotoxina, y 18,3 µM después de 96 horas de incubación en presencia de maitotoxina.

35 Se realiza un ensayo comparativo con  $\alpha$ -metilprednisolona que es un compuesto utilizado para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. En comparación, con el mismo ensayo y en las mismas condiciones, la  $\alpha$ -metilprednisolona presenta una  $CE_{50}$  de 354,3 µM después de 3 horas de incubación en presencia de maitotoxina, y 195,7 µM después de 96 horas de incubación en presencia de maitotoxina.

**Ototoxicidad inducida después de un tratamiento con gentamicina: Efecto protector de los compuestos según la invención**

40 Demostración del efecto protector de los compuestos según la invención, administrados en co-tratamiento, frente a la pérdida de las células ciliadas iducida por la gentamicina.

45 Principio del ensayo : la gentamicina y otros aminoglicósidos provocan un daño de las células ciliadas y una pérdida de audición en el ser humano. Los peces cebra (Zebrafish) presentan órganos sensoriales en la superficie de su cuerpo, denominados neuromasts. Estas células ciliadas neuromasts son similares estructural y funcionalmente a las células ciliadas internas del oído humano. En estos peces, las células ciliadas neuromasts pueden marcarse con DASPEI (ioduro de 2,4-dimetil-aminostiril-N-etil piridinio) y esta marcación refleja en número de células ciliadas funcionales.

50 El daño de las células ciliadas internas está inducido en los peces cebra por el tratamiento de gentamicina. Para ensayar el efecto protector del compuesto que se va a ensayar sobre la protección de las células ciliadas dañadas por la gentamicina, se ha administrado el compuesto en cotratamiento con gentamicina. A continuación se marcan y se cuantifican las células ciliadas internas.

El estudio se realiza en peces de 5 días de edad incubados con 1 µg/ml de gentamicina durante 24 horas en presencia o en ausencia del compuesto. Se realizan controles en paralelo; vehículo solo (1% de DMSO; control positivo). Los peces tratados con gentamicina solo son los controles negativos.

La CE<sub>50</sub> (concentración de la sustancia a ensayar que protege 50 % de las células de la muerte celular) se calcula a partir de este efecto-concentración.

5 La coloración DASPEI se efectúa para visualizar las células ciliadas *in vivo* (n = 6 por grupo). Se usa análisis morfométrico para cuantificar la señal de marcado de las células ciliadas. La señal de coloración DASPEI de los controles positivos se ha definido como 100%.

Los resultados de la tabla 1 muestran que :

- la señal de coloración del control negativo representa 20 % +/- 0,6 de la señal control, es decir una pérdida de 80% de las células ciliadas como consecuencia del tratamiento con gentamicina.
- 10 • La señal de coloración de los animales tratados con la gentamicina y el compuesto del ejemplo 5 ensayado a 50 µM representa 52 % +/- 10 de la señal de control, es decir una protección altamente significativa de 40 % de las células ciliadas dañadas por el tratamiento con la gentamicina. Sobre una gama de concentraciones que va de 25 µM a 100 µM, la CE<sub>50</sub> que corresponde a la concentración eficaz que permite visualizar 50 % de células ciliadas marcadas es de 32 µM.
- 15 • La señal de coloración de los animales tratados con la gentamicina y el compuesto del ejemplo 4 a 50 µM representa 49 % +/- 5 de la señal de control, es decir una protección altamente significativa de 36,2 % de las células ciliadas dañadas por el tratamiento con la gentamicina. Sobre una gama de concentraciones que va de 25 µM a 100 µM, la CE<sub>50</sub> que corresponde a la concentración eficaz que permite visualizar 50 % de células ciliadas marcadas es de 51 µM.

**Tabla 1 :**

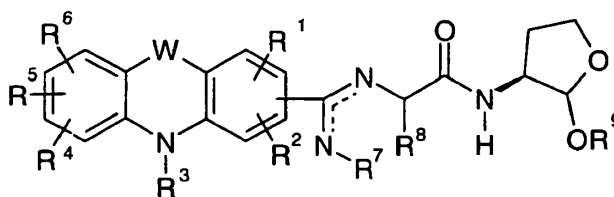
Compuesto	[C]	% de control (% de señal de coloración de las células ciliadas)	Significación Estadística (Valor P)	CE <sub>50</sub> µM (supervivencia de las células ciliadas en % del control) (0, 25, 50, 100 µM)
Control		100		
Gentamicina	1 µg/m	20 ± 0,6		
Compuesto del ejemplo 5	50 µM	52 ± 10	< 0,0005 *	32 µM
Compuesto del ejemplo 4	50 µM	49 ± 5	< 0,0005 *	51 µM

**Tabla 1 :** Porcentaje de células ciliadas marcadas por el DASPEI.

20 Control positivo (Pez cebra-1% de DMSO); Control negativo (Pez cebra - 1 % DMSO-gentamicina 1 µg/ml) y efecto de los productos (Pez cebra - 1 % DMSO-gentamicina-compuesto). Experimento realizado con 6 animales por grupo.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I) o su sal



(I)

en forma racémica, de diastereoisómeros o cualquier combinación de estas formas en la que :

5 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan, independientemente, un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, el grupo OH, un radical alquilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, alquilamino o ácido carboxílico ;

R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo o un grupo -COR<sup>10</sup> ;

R<sup>10</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo, alcoxi, arilo o un radical heterocíclico ;

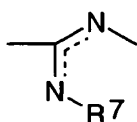
W representa un átomo de azufre ;

10 R<sup>7</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo;

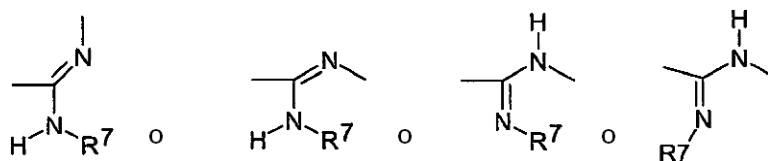
R<sup>8</sup> representa un átomo de hidrógeno, un radical haloalquilo o alqueno, un radical cicloalquilo, un radical alquilo lineal o ramificado, sustituido o no que cuando está sustituido lleva una función química tal como ácido carboxílico, amina, alcohol, guanidina, amidina, tiol, tioéter, tioéster, alcoxi, heterocíclico o carboxamida ;

15 R<sup>9</sup> representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo, arilo, arilalquilo, bisarilalquilo, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico alquilo o un grupo -COR<sup>10</sup> ;

entendiéndose que :



significa



20 2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno.

3. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno.

4. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno.

5. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>4</sup> es un átomo de hidrógeno.

6. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno.

25 7. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>6</sup> es un átomo de hidrógeno.

8. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>7</sup> es un átomo de hidrógeno.

9. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>8</sup> es un radical isobutilo.

10. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>9</sup> es un átomo de hidrógeno.

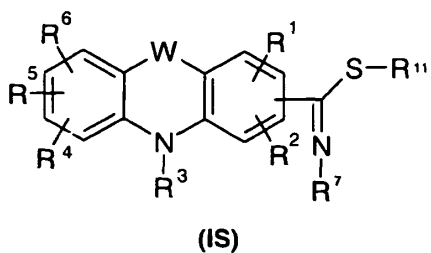
11. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>9</sup> es un radical acetilo.



12. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>9</sup> es un radical metilo.
13. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>9</sup> es un radical bencilo.
14. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>9</sup> es un radical naftilmetilo.
- 5 15. Compuesto según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se elige entre los compuestos siguientes o sus sales :
- N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-metoxitetrahidrofuran-3-il]-L-leucinamida ;
- N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahidrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida ;
- N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(2-naftilmetoxi)tetrahidrofuran-3-il]-L-leucinamida ;
- acetato de (3S)-3-({N-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucil}amino)tetrahidrofuran-2-ilo ;
- 10 N1-[(3S)-2-hidroxitetrahidrofuran-3-il]-N2-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida.
16. compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 15, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa.
17. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 15, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa para el tratamiento de patologías caracterizadas por una producción excesiva de ROS y/o una activación de las calpaínas.
- 15 18. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 15, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa para tratar las enfermedades y los trastornos elegidos entre las enfermedades inflamatorias o inmunológicas, las enfermedades cardio-vasculares, las enfermedades cerebro-vasculares, los trastornos del sistema nervioso central o periférico, la caquexia, la sarcopenia, la pérdida de audición, la osteoporosis, las distrofias musculares, las enfermedades proliferativas cancerígenas o no, las cataratas, las reacciones de rechazo después de trasplantes de órganos, las enfermedades autoinmunes, enfermedades virales, o el cáncer.
- 20 19. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 15, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa para tratar la pérdida de audición, en particular la pérdida de audición provocada por la presbiacusia, por un traumatismo acústico, o por la administración de un medicamento tal como los antibióticos, los agentes anticancerígenos, los agentes anti-inflamatorios no esteroideos, los diuréticos, los agentes anti-ulcerosos, los agentes anticonvulsionantes.
- 25 20. según una de las reivindicaciones 1 a 15, para su utilización como sustancia terapéuticamente activa para tratar las distrofias musculares, en particular la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker, la distrofia muscular miotónica o enfermedad de Steiner, la distrofia muscular congénita, la distrofia muscular de la cintura y la distrofia muscular facio-escapulo-humeral.
- 30 21. Medicamento que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) tal como se define en las reivindicaciones 1 a 15 o una de sus sales.
22. Como medicamento, los compuestos de fórmula general (I) tal como se define en las reivindicaciones 1 a 15 o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 35 23. Composiciones farmacéuticas que contienen al menos un compuesto de fórmula general (I) tal como se define en las reivindicaciones 1 a 15, o al menos una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto.
24. Compuesto o su sal elegido entre los siguientes compuestos:
- 10H-fenotiazin-2-carbimidotioato de metilo;
- N<sup>1</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-metoxitetrahidrofuran-3-il]-L-leucinamida ;
- 40 N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(benciloxi)tetrahidrofuran-3-il]-N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucinamida ;
- N<sup>2</sup>-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-N<sup>1</sup>-[(3S)-2-(2-naftilmetoxi) tetrahidrofuran-3-il]-L-leucinamida ;
- acetato de (3S)-3-({N-[imino(10H-fenotiazin-2-il)metil]-L-leucil}amino)tetrahidrofuran-2-ilo ;
- N-etil-10H-fenotiazin-2-carboxamida ;
- N-etil-10H-fenotiazin-2-carbotioamida ;

*N-etil-10H-fenotiazin-2-carbimidotioato de metilo*

25. Compuesto de fórmula general **(IS)** o su sal



en forma de estereoisómeros o sus combinaciones,

5 en la que

W, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> tienen el mismo significado que para los compuestos de fórmula **(I)** de la reivindicación 1, y

R<sup>11</sup> representa un radical alquilo, arilo, arilalquilo, bisarilalquilo, un radical heterocíclico o un radical heterocíclico alquilo.

10