

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 795**

51 Int. Cl.:

C07D 413/04 (2006.01)

A61K 31/4725 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08863529 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2225233**

54 Título: **Derivado de oxadiazol activo sobre 1-fosfato de esfingosina (S1P)**

30 Prioridad:

21.12.2007 GB 0725101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.11.2013

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**HEER, JAG PAUL y
HEIGHTMAN, THOMAS DANIEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 431 795 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

Derivado de oxadiazol activo sobre 1-fosfato de esfingosina (S1P)

La presente invención se refiere a un nuevo derivado de oxadiazol que tiene actividad farmacológica, procedimientos para su preparación, composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso en el tratamiento de diversos trastornos.

El 1-fosfato de esfingosina (E1P) es un mediador lípido bioactivo formado mediante la fosforilación de esfingosina por esfingosinas quinasas y se encuentra en niveles elevados en la sangre. Es producido y secretado por un cierto número de tipos de células, que incluyen las de origen hematopoyético como plaquetas y mastocitos (Okamoto et al 1998 *J Biol Chem* 273(42):27104; Sanchez and Hla 2004, *J Cell Biochem* 92:913). Tiene una amplia gama de acciones biológicas, que incluyen la regulación de la proliferación celular, diferenciación, movilidad, vascularización y activación de células inflamatorias y plaquetas (Pyne and Pyne 2000, *Biochem J.* 349: 385). Han sido descritos cinco subtipos de receptor sensible a S1P, S1P1 (Edg-1), 81P2 (Edg-5), S1P3 (Edg-3), S1P4 (Edg-6), y S1P5 (Edg-8) que forman parte de la familia de genes de diferenciación endotelial acoplada a proteína G de receptores (Chun et al 2002 *Pharmacological Reviews* 54:265, Sanchez and Hla 2004 *J Cellular Biochemistry*, 92:913). Estos cinco receptores muestran expresión de mRNA diferenciada, siendo ampliamente expresado S1P1-3, el S1P4 es expresado en tejidos linfoides y hematopoyéticos y S1P5 principalmente en el cerebro y en menor grado en el bazo. Señalizan a través de diferentes subconjuntos de proteínas G para favorecer una diversidad de respuestas biológicas (Kluk and Hla 2002 *Biochem et Biophysica Acta* 1582:72, Sanchez and Hla 2004, *J Cellular Biochem* 92:913).

Las funciones propuestas para el receptor de S1P1 incluyen el tráfico de linfocitos, inducción/supresión de citoquinas y efectos sobre células endoteliales (Rosen and Goetzl 2005 *Nat Rev Immunol.* 5:560). Los agonistas del receptor de S1P1 han sido usados en un cierto número de modelos autoinmunes y animales trasplantados, incluidos modelos de encefalomeilitis autoinmune experimental (EAE) DMS, para reducir la sensibilidad de la enfermedad inducida (Brinkman et al 2003 *JBC* 277:21453; Fujino et al 2003 *J Pharmacol Exp Ther* 305:70; Webb et al 2004 *J Neuroimmunol* 153:108; Rausch et al 2004 *J Magn Reson Imaging* 20:16). Esta actividad se informa que está mediada por el efecto de agonistas de S1P1 sobre la circulación de linfocitos a través del sistema linfático. El tratamiento con agonistas de S1P1 da lugar al secuestro de linfocitos en órganos linfoides secundarios como los nódulos linfáticos, induciendo una linfopenia periférica reversible en modelos de animales (Chiba et al 1998, *J Immunology* 160:5037, Forrest et al 2004 *J Pharmacol Exp Ther* 309:758; Sanna et al 2004 *JBC* 279:13839). Los datos publicados sobre los agonistas sugieren que el tratamiento con el compuesto induce una pérdida del receptor de S1P1 a partir de la internalización vía de superficie celular (Graler and Goetzl 2004 *FASEB J* 18:551; Matloubian et al 2004 *Nature* 427:355; Jo et al 2005 *Chem Bio* 12:703) y esta reducción del receptor de S1P1 sobre las células inmunes es lo que contribuye a la reducción del movimiento de células T desde los nódulos linfáticos para volver a la corriente sanguínea.

La detección de genes S1P1 provoca mortalidad embrionaria. Los experimentos para examinar la función del receptor de S1P1 en la migración y tráfico de linfocitos han incluido la transferencia adoptiva de células T deficientes en S1P1 marcado en ratones de tipo salvaje irradiados. Estas células mostraron una salida reducida desde órganos linfoides secundarios (Matloubian et al 2004 *Nature* 427:355).

Al S1P1 se le ha atribuido también una función en la modulación de la unión de células endoteliales (Allende et al 2003 *JBC* 277:21453, Blood Singelton et al 2005 *FASEB J* 19:1646). Con respecto a esta acción endotelial, los agonistas de S1P1 se ha informado que tienen un efecto sobre los nódulos linfáticos aislados que puede contribuir a una función moduladora de trastornos inmunes. Los agonistas de S1P1 provocaron un cierre de las puertas extramales endoteliales de los senos linfáticos que drenan los nódulos linfáticos y previenen la salida de linfocitos (Wei et al 2005, *Nat. Immunology* 6:1228).

El compuesto inmunosupresor FTY720 (documento JP11080026-A) se ha mostrado que reduce los linfocitos en circulación en animales y el hombre tienen una actividad moduladora en modelos de animales de trastornos inmunes y reduce las velocidades de remisión en la esclerosis múltiple de remisión recurrente (Brinkman et al 2002 *JBC* 277:21453, Mandala et al 2002 *Science* 296:346, Fujino et al 2003 *J Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305:45658, Brinkman et al 2004 *American J Transplantation* 4:1019, Webb et al 2004 *J Neuroimmunology* 153:108, Morris et al 2005 *Eur J Immunol* 35:3570, Chiba 2005 *Pharmacology and Therapeutics* 108:308, Kahan et al 2003, *Transplantation* 76: 1079, Kappos et al 2006 *New Eng J Medicine* 335: 1124). Este compuesto es un profármaco que es fosforilado in vivo por esfingosina quinasas para proporcionar una molécula que tiene actividad agonista en los receptores S1P1, S1P3, S1P4 y S1P5. Unos estudios clínicos han demostrado que el tratamiento con FTY720 da lugar a bradicardia en las primeras 24 horas de tratamiento (Kappos et al 2006 *New Eng J Medicine* 335:1124). La bradicardia se cree que es debida al agonismo en el receptor de S1P3, basado en un cierto número de experimentos basados en células y en animales. Estos incluyen el uso de animales aturdidos con S1P3 que, al contrario que los

ratones de tipo salvaje, no demuestran bradicardia a continuación de la administración de FTY720 y el uso de compuestos selectivos de S1P1 (Hale et al 2004 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14:3501, Sanna et al 2004 JBC 279:13839, Koyrakh et al 2005 American J Transplantation 5:529).

5 Por tanto, hay una necesidad de compuestos agonistas de receptores S1P1 con selectividad sobre S1P3 que se puede esperar que muestren una tendencia reducida a inducir bradicardia.

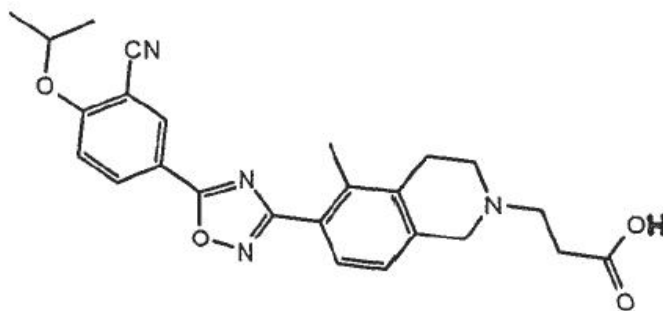
Las siguientes solicitudes de patente describen derivados de oxadiazol como agonistas de S1P1: WO 03/105771, WO 05/058848, WO 06/047195, WO 06/100S33, WO 06/115188, WO 06/131336, WO 07/024922 y W007/116866.

Las siguientes solicitudes de patentes describen derivados de tetrahidroisoquinolinilo-oxadiazol como agonistas de receptores de S1P: WO 06/064757, WO 06/001463, WO 04/113330.

10 Cooke et al., (Annual Reports in Medicinal Chemistry, 2007, vol 42, pag. 245-263) identifican la necesidad de agonistas de S1P1 selectivos y describe compuestos que son selectivos en el receptor de S1P1 sobre el receptor de S1P3.

Se ha encontrado una clase estructuralmente nueva de compuestos que proporciona agonistas del receptor de S1P1.

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona un compuesto de ácido 3-[6-(5-{3-ciano-4-[(1-metiletil)oxi]fenil}-1,2,4-oxadiazol-3-il)-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinil]propanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Debe entenderse que el compuesto de la invención puede contener grupos tanto ácidos como básicos y, por lo tanto puede existir como un ion híbrido a ciertos valores del pH.

20 La invención incluye cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de éster del compuesto de la invención que, tras una administración al receptor, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de fórmula (I) o un metabolito o residuo activo del mismo.

El compuesto de la invención puede formar sales. Se apreciará que para ser usadas en medicina, las sales del compuesto de la invención deben ser farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen las descritas en la publicación J. Pharm. Sci, 1977,66, 1-19, como sales por adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico o fosfórico; y ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido succínico, maleico, acético, fumárico, cítrico, tartárico, benzoico, p-toluenosulfónico, metanosulfónico o naftalenosulfónico. Algunos de los compuestos de fórmula (I) pueden formar sales por adición de ácidos con uno o más equivalentes del ácido. La presente invención incluye en su alcance todas las posibles formas estequiométricas y no estequiométricas. Las sales se prepararán también a partir de bases farmacéuticamente aceptables que incluyen bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, potasio, sodio, zinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se producen de forma natural y aminas cíclicas. Las bases orgánicas farmacéuticamente aceptables particulares incluyen arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibencilenodiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilenodiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidravamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, procaina, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, trometamol) y similares. Se pueden formar también sales a partir de resinas de intercambio iónico básicas, por ejemplo, resinas de poliaminas.

Las sales por adición farmacéuticamente aceptables pueden ser preparadas convencionalmente mediante reacción

con el ácido o derivado de ácido apropiado. Las sales farmacéuticamente aceptables con bases pueden ser preparadas convencionalmente mediante reacción con la base inorgánica u orgánica.

5 El compuesto de la invención puede ser preparado en forma cristalina o no cristalina y, si es cristalino, puede estar opcionalmente hidratado o solvatado. Esta invención incluye dentro de su alcance hidratos o solvatos estequiométricos así como compuestos que contienen cantidades variables de agua y/o disolvente.

Están incluidos dentro del alcance de la invención todas las sales, solvatos, hidratos, complejos, polimorfos, y derivados radiomarcados del compuesto de la invención.

10 Las potencias y eficacias de los compuestos de esta invención para el receptor de S1P1 pueden ser determinadas mediante un ensayo GTPS realizado sobre el receptor clonado humano como se describe en la presente memoria descriptiva. El compuesto de la invención ha demostrado actividad agonista en el receptor de S1P1, usando ensayos funcionales descritos en la presente memoria descriptiva.

15 El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, pueden ser usados en el tratamiento de estados o trastornos que están mediados a través del receptor S1P1. En particular, el compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados en el tratamiento de esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios crónicos, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplantes, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumores sólidos y metástasis tumorales, enfermedades asociadas con angiogénesis, enfermedades vasculares, estados de dolor, enfermedades virales agudas, estados de inflamación intestinal, diabetes dependiente de insulina y no dependiente de insulina (denominados en lo sucesivo como "trastornos de la invención").

20 El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, pueden ser usados en el tratamiento de lupus eritematoso.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, pueden ser usados en el tratamiento de soriasis.

25 El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, pueden ser usados en el tratamiento de esclerosis múltiple.

Debe entenderse que el "tratamiento", como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye profilaxis así como alivio de síntomas establecidos.

30 Por tanto, la invención proporciona el compuesto de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables, para ser usados como sustancias terapéuticas, en particular en el tratamiento de estados o trastornos mediados a través del receptor de S1P1. En particular, la invención proporciona un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para ser usado como una sustancia terapéutica en el tratamiento de esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios crónicos, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplantes, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumores sólidos y metástasis tumorales, enfermedades asociadas con angiogénesis, enfermedades vasculares, estados de dolor, enfermedades virales agudas, estados de inflamación intestinal, diabetes dependiente de insulina y no dependiente de insulina.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados como sustancias terapéuticas en el tratamiento de lupus eritematosos.

40 El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados como sustancias terapéuticas en el tratamiento de soriasis.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados como sustancias terapéuticas en el tratamiento de esclerosis múltiple.

45 En otro aspecto, la invención proporciona el uso del compuesto de la invención a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para ser usado en el tratamiento de estados o trastornos mediados a través del receptor de S1P1.

En particular, la invención proporciona el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para ser usado en la fabricación de un medicamento para ser usado en el tratamiento de esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios crónicos, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplantes, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumores sólidos

y metástasis tumorales, enfermedades asociadas con angiogénesis, enfermedades vasculares, estados de dolor, enfermedades virales agudas, estados de inflamación intestinal, diabetes dependiente de insulina y no dependiente de insulina.

5 El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados en la fabricación de un medicamento para ser usado en el tratamiento de lupus eritematoso.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados en la fabricación de un medicamento para ser usado en el tratamiento de soriasis.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados en la fabricación de un medicamento para ser usado en el tratamiento de esclerosis múltiple.

10 Con el fin de usar el compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables en terapia, normalmente serán formulados en forma de una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar. La invención proporciona también una composición farmacéutica, que comprende el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica comprendiendo el procedimiento mezclar el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Una composición farmacéutica de la invención, que puede ser preparada mediante mezcla, adecuadamente a temperatura ambiente y presión atmosférica, está habitualmente adaptada para una administración oral, parenteral o rectal y, como tal, puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, pastillas, polvos reconstituibles, soluciones o suspensiones inyectables o infusibles o supositorios. Generalmente son preferidas las composiciones administrables por vía oral.

25 Las pastillas y cápsulas para una administración oral pueden estar en forma de dosis unitaria y pueden contener excipientes convencionales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil-metil celulosa); materiales de carga (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno-fosfato de calcio); lubricantes para comprimidos (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón-glicolato de sodio) y agentes humectantes aceptables (por ejemplo, lauril-sulfato de sodio). Los comprimidos pueden ser revestidos según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.

30 Las preparaciones líquidas orales pueden estar en la forma, por ejemplo, de suspensiones acuosas o aceitosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires o pueden estar en la forma de un producto seco para ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes de ser usado. Estas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales como agentes suspensores (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica), vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados), conservantes (por ejemplo, metil- o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico) y, si se desea, aromas o colorantes convencionales, sales tamponantes y agentes edulcorantes en la medida apropiada. Las preparaciones para una administración oral pueden ser adecuadamente formuladas para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

40 Para una administración parenteral, se preparan formas de dosificaciones unitarias fluidas utilizando el compuesto de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables y un vehículo esterilizado. Las formulaciones para una inyección pueden ser presentadas en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en dosis múltiples, utilizando un compuesto de la invención o sus derivados farmacéuticamente aceptables y un vehículo esterilizado, opcionalmente, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para una constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua exenta de pirógenos, antes de ser usado. El compuesto, dependiendo del vehículo y la concentración usados, puede ser puesto en suspensión o disuelto en el vehículo. En la preparación de soluciones, el compuesto puede ser disuelto para inyección y esterilizado por filtración antes de ser introducido en un vial o ampolla adecuado y herméticamente sellado. Ventajosamente, se disuelven en el vehículo adyuvantes como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponantes. Para mejorar la estabilidad, la composición puede ser congelada después de ser introducida en el vial y puede ser separada agua bajo vacío. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera, con la excepción de que el compuesto se pone en suspensión en el vehículo en lugar de ser disuelto y no se puede realizar una esterilización por filtración. El compuesto puede ser esterilizado para una exposición a óxido de etileno antes de la suspensión en un vehículo esterilizado. Ventajosamente, es incluido un agente tensioactivo o humectante en la

55

composición para facilitar una distribución uniforme del compuesto.

Las lociones pueden ser formuladas con una base acuosa o aceitosa y generalmente contendrán también uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes suspensores, agentes espesantes o agentes colorantes. Pueden ser formuladas gotas con una base acuosa o no acuosa que comprenda también uno o más agentes dispersantes, agentes estabilizantes, agentes solubilizantes o agentes suspensores. Pueden contener también un conservante.

El compuesto de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser formulados también en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, que contengan, por ejemplo, bases convencionales para supositorios como manteca de cacao u otros glicéridos.

El compuesto de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser formulados también como preparaciones de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden ser administradas mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser formulados con materiales polímeros o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, en forma de una sal escasamente soluble.

Para una administración intranasal, el compuesto de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser formulados como soluciones para una administración a través de un método adecuado o dispositivo de dosis unitaria o alternativamente, en forma de una mezcla de polvo con un vehículo adecuado para una administración usando un dispositivo de suministro adecuado. Por tanto, el compuesto de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser formulados para una administración oral, bucal, parenteral, tópica, incluida la oftálmica y nasal), de depósito o rectal o en una forma adecuada para una administración mediante inhalación o insuflación (a través de la boca o la nariz).

Los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser administrados para una administración tópica en la forma de ungüentos, cremas, geles, lociones, pesarios, aerosoles o gotas (por ejemplo, gotas oculares, para los oídos o nasales). Los ungüentos y cremas pueden ser formulados, por ejemplo, con una base acuosa o aceitosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Los ungüentos para un administración ocular pueden ser fabricados de una manera estéril usando componentes esterilizados.

La composición puede contener de 0,1% a 99% en peso, preferentemente de 10 a 60% en peso del material activo, dependiendo del método de administración. La dosis del compuesto usado en el tratamiento de los trastornos anteriormente mencionados variará de la forma habitual con la gravedad de los trastornos, el peso del paciente y otros factores similares. Sin embargo, como norma general, las dosis unitarias adecuadas pueden tener de 0,05 a 1.000 mg, 1,0 a 500 mg o 1,0 a 200 mg y estas dosis unitarias pueden ser administradas más de una vez al día, por ejemplo, dos o tres veces al día.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usados en preparaciones de combinación. Por ejemplo, el compuesto de la invención puede ser usado en combinación con ciclosporina A, metotrepato, esteroides, rapamicina, inhibidores de citoquinas, proinflamatorias, compuestos inmunomoduladores que incluyen compuestos biológicos u otros compuestos terapéuticamente activos.

La invención incluye también compuestos marcados con isótopos, que son iguales que los del compuesto de la invención excepto por el hecho de que uno o más átomos están sustituidos con un átomo que tiene un peso atómico o número másico diferente del peso atómico o número másico habitualmente encontrado en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden ser incorporados en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, yodo y cloro como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{123}I y ^{125}I .

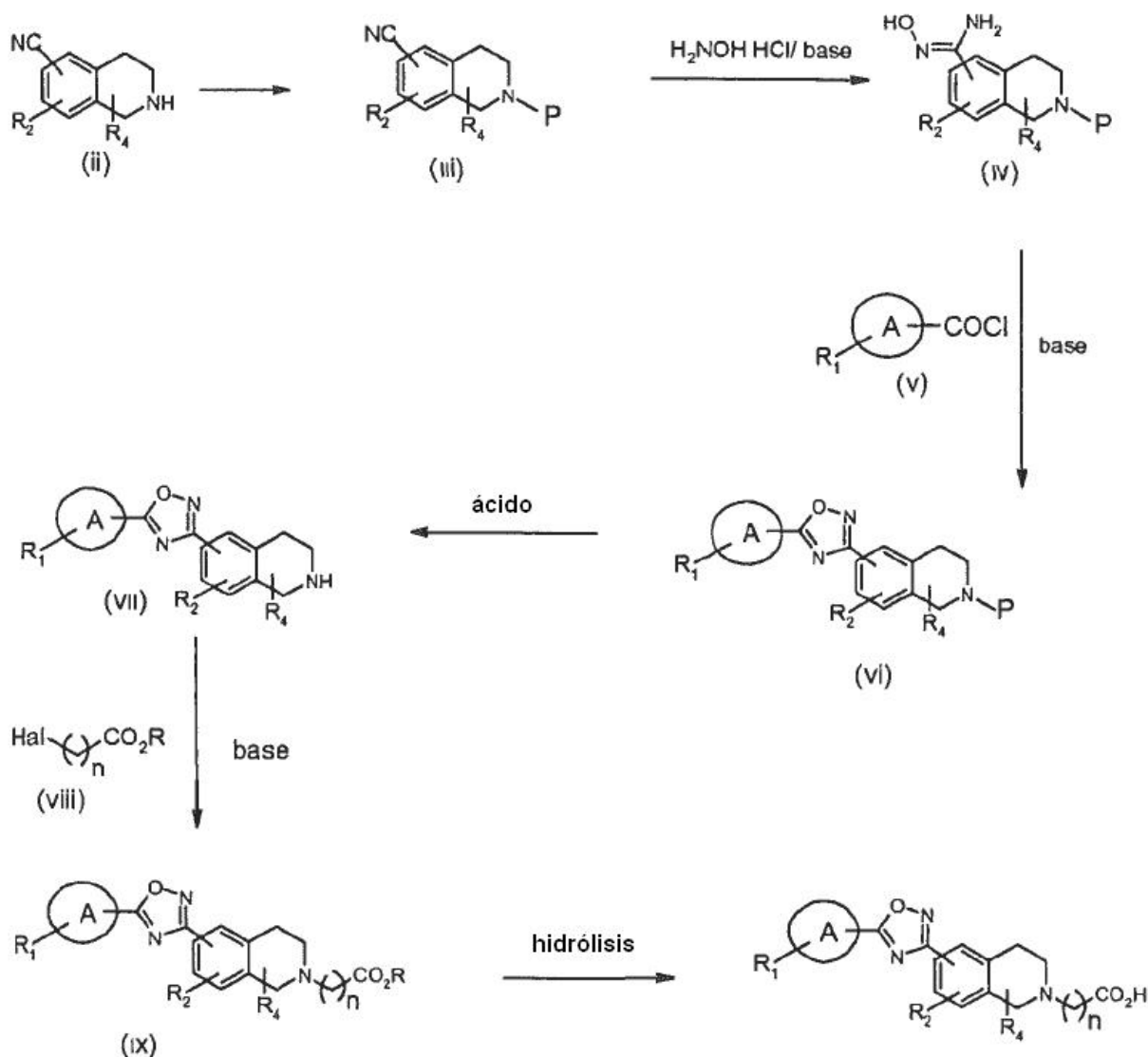
El compuesto de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos que contienen los isótopos anteriormente mencionados y/o otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos marcados con isótopos de la presente invención, por ejemplo, los isótopos radioactivos como ^3H o ^{14}C que son incorporados son útiles en ensayos de distribución en tejidos de fármaco y/o sustrato. Los isótopos tritados, es decir, de ^3H y de carbono 14 es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y capacidad de detección. Los isótopos ^{11}C y ^8F son particularmente útiles en PET (tomografía de emisión de positrones) y los isótopos de ^{125}I son particularmente útiles en SPST (tomografía controlada por ordenador de emisión de fotones únicos), todos ellos útiles para la formación de imágenes cerebrales. Además, la sustitución con isótopos más pesados como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una semivida in vivo aumentada o requisitos de dosificaciones inferiores y, por tanto, pueden ser preferidos en algunas circunstancias. El compuesto marcado con isótopos de la invención y siguiendo esta invención puede ser generalmente preparado llevando a cabo los procedimientos descritos en los esquemas y/o los ejemplos siguientes, sustituyendo un reactivo

no marcado con isótopos con reactivo marcado con isótopos fácilmente disponible.

En un aspecto adicional, esta solicitud describe procedimientos para la preparación de compuestos similares al compuesto de la invención en los que R_1 , R_2 , R_4 y A son como se definen para el compuesto de la invención, n es 3, hal es cloro, bromo o yodo, P es un grupo protector y R representa un grupo alquilo (por ejemplo, metilo o terc-butilo).

5

Esquema 1



Los compuestos de fórmula (ii) (por ejemplo, preparados como se describe en Tetrahedron (2006), 62(29), 6869-6875) pueden ser convertidos en un derivado protegido adecuado (iii), en el que P es, por ejemplo, t-butoxicarbonilo, usando un reactivo protector adecuado como dicarbonato de bis(1,1-dimetilo). Los compuestos de fórmula (iii) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (iv) mediante reacción con hidroxilamina en presencia de una base adecuada como bicarbonato de sodio. Los compuestos de fórmula (iv) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (vi) mediante reacción con un cloruro de ácido de fórmula (v) en presencia de una base adecuada como N,N-diisopropiletilamina, opcionalmente en presencia de un catalizador como 4-dimetilaminopiridina. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente inicialmente, seguido de calentamiento para efectuar una ciclación del oxadiazol. Los compuestos de fórmula (vi) pueden ser desprotegidos para proporcionar compuestos de fórmula (vii), por ejemplo, con un ácido adecuado como ácido clorhídrico en el que P representa t-butoxicarbonilo. Los compuestos de fórmula (vii) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (ix) mediante reacción con un agente de alquilación de fórmula (viii) en presencia de una base adecuada como carbonato de cesio. Los compuestos de fórmula (ix) pueden ser convertidos en ciertos compuestos de fórmula (I) mediante hidrólisis con una base adecuada

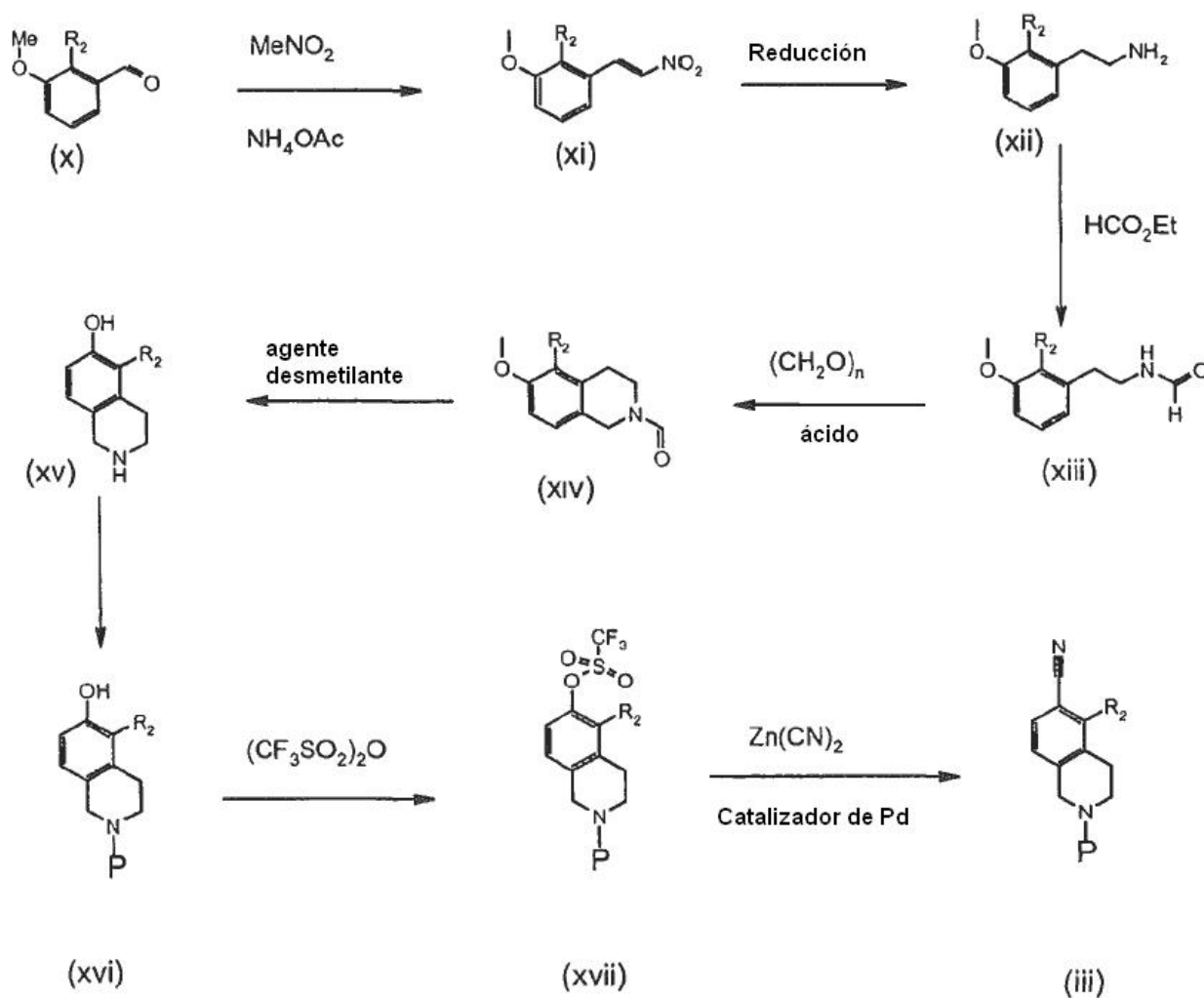
10

15

20

como hidróxido de litio o (para R = t-butilo) un ácido adecuado como ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético. Los compuestos de fórmula (v) son compuestos conocidos o pueden ser preparados por medios convencionales a partir de los correspondientes ácidos, que son por sí mismos compuestos conocidos o pueden ser preparados por medios convencionales.

- 5 Los compuestos de fórmula (iii) en la que R₂ está en la posición 5 y el grupo ciano está en la posición 6 del sistema de anillos de tetrahidroisoquinolina pueden ser preparados como se muestra en el esquema 2 en el que R₁ se define para la fórmula (I), R₄ es hidrógeno y P es un grupo protector.



- 10 Los compuestos de fórmula (x) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (xii) mediante reacción con nitrometano en presencia de una base adecuada como acetato de amonio. Los compuestos de fórmula (xi) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (xii) mediante reducción con un agente reductor adecuado como borohidruro de litio en presencia de clorotrimetil-silano. Los compuestos de fórmula (xii) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (xiii) mediante reacción con un agente de formilación adecuado como formiato de etilo. Los compuestos de fórmula (xiii) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (xiv) mediante reacción con una fuente de formaldehído adecuada como para formaldehído, en presencia de un catalizador ácido adecuado como ácido fórmico. Los compuestos de fórmula (xiv) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (xv) mediante
- 15 reacción con un agente desmetilante adecuado como tribromuro de boro.

- Los compuestos de fórmula (xv) pueden ser convertidos en derivados protegidos adecuados de fórmula (xvi) en la que P es, por ejemplo, t-butoxicarbonilo, usando un reactivo protector adecuado como dicarbonato de bis(1,1-dimetiletilo). Los compuestos de fórmula (xvi) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (xvii) mediante
- 20 reacción con un agente trifluorometanosulfonilante adecuado como anhídrido trifluorometanosulfónico. Los compuestos de fórmula (xvii) pueden ser convertidos en compuestos de fórmula (iii) en la que R₂ está en la posición 5, R₄ es hidrógeno y el grupo ciano está en la posición 6) mediante reacción con una fuente de cianuro adecuada como cianuro de zinc en presencia de un catalizador adecuado como tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0).

Las siguientes descripciones y ejemplos ilustran la preparación del compuesto de la invención.

Abreviaturas:

g	Gramos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
μl	Microlitros
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
Et ₂ O	Dietyl-éter
EtOAc	Acetato de etilo
DCM	Diclorometano
DIAD	Azodicarboxilato de isopropilo
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMAP	N,N-dimetil-4-piridinamina
DME	1,2-bis(metiloxi)etano
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDAC	Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDC	Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminapropil)-N'-eticarbodiimida
EDCI	Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminapropil)-N'-etilcarbodiimida
HOBT/HOBt	Hidroxibenzotriazol
IPA	Alcohol isopropílico
NCS	N-clorosuccinimida
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxipirrolidinofosfonio
THF	Tetrahidrofurano
Dbp	Dibencilideno-acetona
RT	Temperatura ambiente
°C	Grados Celsius
M	Molar
H	Protón

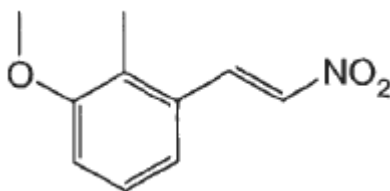
s	Singlete
d	Doblete
t	Triplete
q	Cuartete
MHz	Megahertzios
MeOD	Metanoldeuterado
LCMS	Espectrometría de masas por cromatografía líquida
LC/MS	Espectrometría de masas por cromatografía líquida
MS	Espectrometría de masas
ES	Electropulverización
MH ⁺	Ion másico + H ⁺
MDAP	Cromatografía líquida preparativa automatizada dirigida a masa
sat.	saturado
Boc	Terc-butiloxicarbonilo
SCx o SCX-3	Columna de extracción en fase sólida (SPE) con residuos de ácido benceno-sulfónico inmovilizados en la fase sólida (por ejemplo, columna IST isolate®)

Sección de química general

Los métodos descritos con posterioridad se proporcionan para fines ilustrativos, los intermedios en la preparación de los ejemplos puede que no se hayan preparado necesariamente a partir de las tandas específicas descritas.

Preparación 1

5 2- Metil-1-(metiloxi)-3-[(E)-2-nitroetnil]benceno



10 A una solución de 2-metil-3-(metiloxi)benzaldehído (disponible en la empresa Allichem Product List; 20g; 133 mmol) en nitrometano (400 ml) se añadió acetato de amonio (6,16 g, 80 mmol) y la mezcla naranja resultante se agitó durante 1 h a 100°C y seguidamente se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a vacío. El residuo se dividió en partes entre acetato de etilo (x2) y salmuera y las capas orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron a vacío. Una titulación con diclorometano/éter proporciona el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (6,6 g).

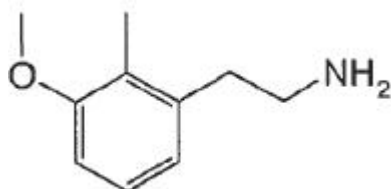
¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,35 (d, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,22 (t, 1H), 7,11 (d, 1H), 6,96 (d, 1H), 3,86 (s, 3H), 2,33 (s, 3H)

15 Después de una evaporación de los líquidos madre se obtuvo producto adicional (7,22 g) mediante titulación con dietil-éter. Los líquidos madre se evaporaron nuevamente y el residuo se purificó mediante cromatografía, eluyendo con 5-10% de acetato de etilo en ciclohexano para proporcionar producto adicional (3,45 g) después de una

titulación con éter.

Preparación 2

{2-[2-Metil-3-(metiloxi)fenil]etil}amina

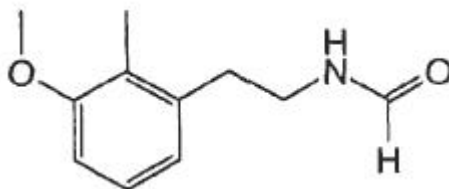


- 5 A borohidruro de litio (2 M en THF, 2,0 ml, 4,0 mmol) (turbio) a temperatura ambiente se añadió gota a gota durante 0,5 minutos clorotrimetilsilano (1,02 ml, 8,00 mmol). Se formó un precipitado y después de aproximadamente 3 minutos se añadió gota a gota 2-metil-1-(metiloxi)-3-[(E)-2-nitroetenil]benceno (preparación 1, 193 mg, 1,0 mmol) en THF (4 ml) a través de una jeringuilla durante 5 minutos asegurando que la temperatura permanecía a aproximadamente a 25°C (usando un baño enfriado con agua). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 10 1 noche. La mezcla se enfrió con un baño con hielo, se añadió lentamente metanol y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se dividió en partes entre hidróxido de sodio acuoso al 25% y diclorometano. La fase acuosa se separó y se extrajo tres veces con diclorometano y las capas orgánicas combinadas se evaporaron. Una purificación del residuo mediante extracción en fase sólida (columna SCX) eluyendo con metanol seguido de amoníaco 2N en metanol) seguido de la evaporación de la fracción que contenía amoníaco, proporcionó el compuesto del título (80 15 mg).

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 7,10 (t, 1H), 6,78 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,91 (t, 2H), 2,77 (t, 2H), 2,18 (s, 3H), 1,76 (br. s., 2H)

Preparación 3

{2-[2-Metil-3-(metiloxi)fenil]etil}formamida

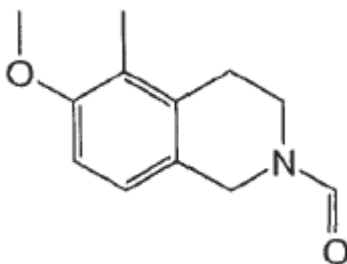


- 20 Se calentó {2-[2-metil-3-(metiloxi)fenil]etil}amina (preparación 2, 1,75 g, 10,6 mmol) bajo reflujo con formiato de etilo (97%, 15 ml) durante 15 h. La separación del disolvente proporcionó el producto en bruto (aproximadamente 2 g), que se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 13-63% en ciclohexano, para proporcionar el compuesto del título (1,57 g).

- 25 MS m/z 194 [MH^+]

Preparación 4

5-Metil-6-(metiloxi)-3,4-dihidro-2-(1H) isoquinolinocarbaldehído

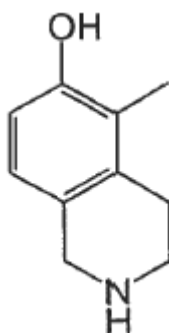


5 A una solución de {2-[2-metil-3-(metiloxi)fenil]etil}formamida (preparación 3, 1,93 g, 10,0 mmol) en ácido fórmico (20 ml) se añadió paraformaldehído 0,315 g, 10,5 mmol) y la mezcla resultante se calentó bajo reflujo (100°C durante 20 minutos. La mezcla se enfrió rápidamente a temperatura ambiente con agua enfriada con hielo y el disolvente se separó. Una purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de metanol en diclorometano, proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido blanco (1,64 g) que se usó sin purificación adicional.

MS m/z 206 [MH⁺]

Preparación 5

5-Metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-isoquinolinol

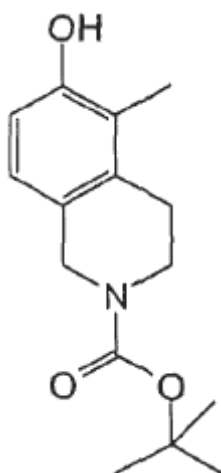


10 A una solución de 5-metil-6-(metiloxi)-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinocarbaldehído (preparación 4, 1,49 g, 7,26 mmol) en diclorometano (25 ml) a 0°C bajo nitrógeno se añadió lentamente tribromuro de boro(9,09 g, 36,3 mmol). Después de 85 minutos a 0°C se añadió lentamente metanol (25 ml) y la mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante tres días. La separación del disolvente y una trituración con metanol/diclorometano proporcionó un residuo sólido blanco; los líquidos madres se concentraron y el residuo se aplicó a un cartucho de extracción en fase sólida SCX (20 g) y se eluyó con metanol seguido de amoníaco 2 N en metanol para eluir el producto. Después de una evaporación del disolvente, se obtuvo el compuesto del título (780 mg) en forma de un sólido amarillo pálido.

15 ¹H RMN (DNSI-d₆) δ: 8,91 (br. s., 1H), 6,62 (d, 1H), 6,56 (d, 1H), 3,70 (s, 2H), 2,92 (t, 2H), 2,48 (t, 2H), 1,96 (s, 3H)

20 Preparación 6

6-Hidroxi-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo



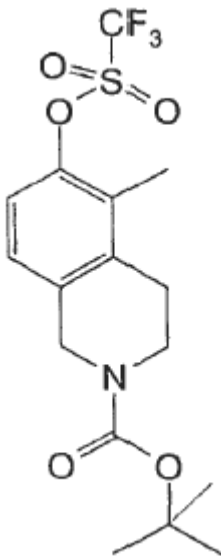
25 A una suspensión de 5-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-isoquinolinol (preparación 5, 163 mg, 1,0 mmol) en diclorometano (5 ml) a 0°C se añadió trietilamina (0,21 ml, 1,50 mmol) seguido de dicarbonato de bis (1,1-dimetiletilo) (240 mg, 1,10 mmol). El disolvente se evaporó y el residuo se dividió en partes entre acetato e etilo y salmuera. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se evaporaron

para proporcionar un aceite amarillo. Una purificación mediante cromatografía rápida eluyendo con un gradiente 5-25% de acetato de etilo en ciclohexano proporcionó el compuesto del título en forma de una espuma blanca (232 mg).

MS m/z 262 [M-H]

5 Preparación 7

5-Metil-6-[[trifluorometil]sulfonil]oxi]-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo

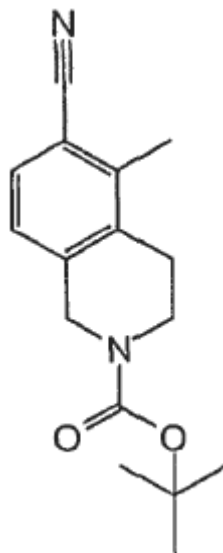


10 A una solución de 6-hidroxi-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo (preparación 6, 263 mg, 1,00 mmol) en diclorometano (5 ml) a -30°C bajo nitrógeno se añadió piridina (162 ml, 2,0 mmol) seguido de la adición lenta de anhídrido trifluorometanosulfónico (0,186 ml, 1,10 mmol). Después de 0,5 h entre -30°C y -20°C , el disolvente se separó y el residuo se recogió en acetato de etilo. La solución se lavó con ácido clorhídrico 1N seguido de solución saturada de bicarbonato de sodio, se secó (MgSO_4) y se concentró a vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite amarillo pálido (368 mg).

15 MS m/z 394[M-H]

Preparación 8

6-Ciano-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo

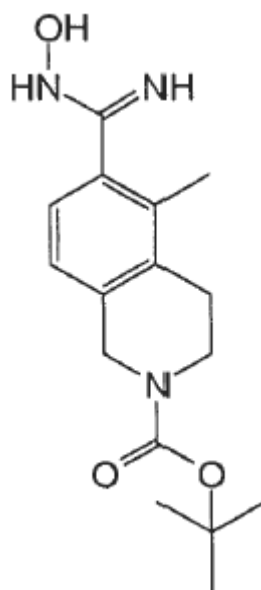


- 5 Una solución de 5-metil-6-[[trifluorometil]sulfonyloxi]-3,4-dihidro-2(1H)isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo (Preparación 7, 395 mg, 1,0 mmol) en DMF (4 ml) se desgasificó bajo alto vacío con agitación durante 15 minutos y seguidamente se añadió cianuro de zinc (153 mg, 1,30 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (116 mg, 0,10 mmol) bajo nitrógeno. La mezcla amarilla oscura resultante se agitó a 100°C durante 6 h. El disolvente se separó, el residuo se disolvió en acetato de etilo y la solución se lavó con bicarbonato de sodio saturado. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron
- 10 (MgSO₄) y se evaporaron para proporcionar el producto en bruto. Una purificación mediante cromatografía rápida sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 5-25% de acetato de etilo en ciclohexano, proporcionó el compuesto del título (214 mg) en forma de un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃) δ: 7,44 (d, 1H), 7,04 (d, 1H), 4,60 (s, 2H), 3,69 (t, 2H), 2,75 (t, 2H), 2,46 (s, 3H), 1,49 (s, 9H)

Preparación 9

- 15 6-[(Hidroxiamino)(imino)metil]-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo

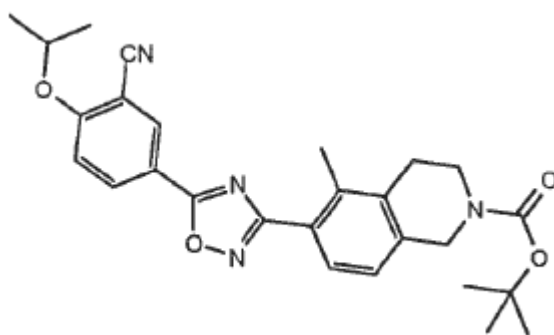


5 Se agitó 6-ciano-5-metil-3,4-dihidro-2-(1H) isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo (preparación 8, 404 mg, 1,48 mmol) durante una noche a 80°C con hidrocloreto de hidroxilamina (619 mg, 8,90 mmol) y bicarbonato de sodio (748 mg, 8,9 mmol) en etanol (10 ml). Se añadieron bicarbonato de sodio adicional (400 mg) e hidrocloreto de hidroxilamina (3 00 mg) y se continuó calentando durante aproximadamente 8 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el sólido resultante se separó, se lavo con etanol y se secó bajo alto vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido blanco (431 mg).

^1H RMN (DMSO- d_6) δ : 7,06 (d, 1H), 6,99 (d, 1H), 4,48 (br. s., 2H), 3,58 (t, 2H), 2,67 (t, 2H), 2,19 (s, 3H), 1,42 (s, 9H) (los datos intercambiables no se listan; no se observaron claramente).

Preparación 10

10 6-(5-{3-Ciano-4-[(1-metiletil)oxi]fenil}-1,2,4-oxadiazol-3-il)-5-metil-3,4 dihidro-2(1H)-isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo

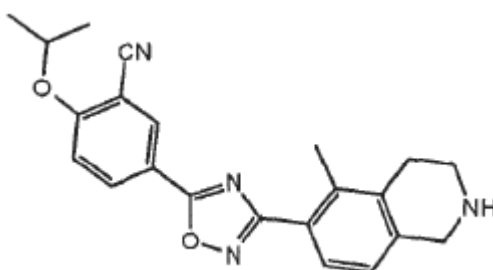


15 Se añadió cloruro de oxalilo (571 mg, 4,5 mmol) a una solución de ácido 3-ciano-4-[(1-metiletil)oxi]benzoico (disponible en AK Scientific Product Catalog; 800mg, 3,90mmol) en diclorometano (15 ml) [seguido de DMF (cantidad catalítica)]. La mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos, se añadieron cloruro de oxalilo adicional (0,1 ml) y DMF (1 gota) y se continuó agitando durante 20 minutos. El disolvente se evaporó, el residuo se evaporó conjuntamente con tolueno y se seguidamente se secó bajo alto vacío durante 30 minutos. El cloruro de ácido en bruto se disolvió en acetonitrilo (10 ml) y se añadió a una suspensión de 6-[(hidroxiamino)(imino)metil]-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo (preparación 9, 916 mg, 3,00 mmol) y trietilamina (607 mg, 6,0 mmol) en acetonitrilo (15 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos y seguidamente se calentó bajo reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfrió y el disolvente se evaporó. El residuo se dividió en partes entre acetato de etilo y solución saturada de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó (MgSO_4) y se evaporó para proporcionar el producto en bruto (1,3 g). El residuo se purificó por cromatografía, eluyendo con 8-38% de acetato de etilo en ciclohexano para proporcionar el compuesto del título (486 mg).

^1H RMN (cloroformo- d) δ : 8,42 (d, 1H), 8,33 (dd, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,12 (d, 1H), 7,11 (d, 1H), 4,80 (spt, 1H), 4,64 (s, 2H), 3,72 (t, 2H), 2,84 (t, 2H), 2,52 (s, 3H), 1,51 (s, 9H), 1,48 (d, 6H).

Preparación 11

30 Sal de ácido 2-[(1-metiletil)oxi]-5-[3-(5-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-isoquinolinil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]benzonitrilo-trifluoroacético

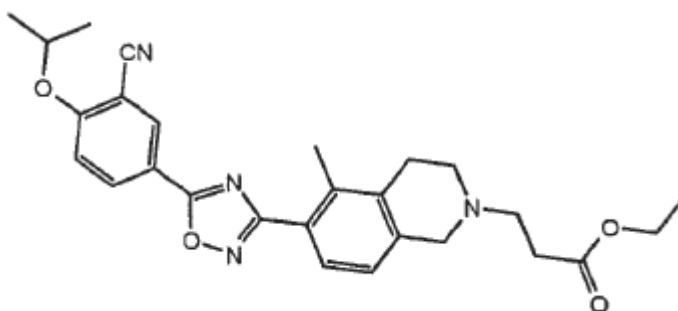


Se añadió ácido trifluoroacético (3 ml) a una solución enfriada con hielo de 6-(5-{3-ciano-4-[(1-metiletil)oxi]fenil}1,2,4-

5 oxadiazol-3-il)-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinocarboxilato de 1,1-dimetiletilo (preparación 10, 486 mg, 1,02 mmol) en diclorometano (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 30 minutos. El disolvente se evaporó y el residuo se evaporó conjuntamente en tolueno (x2). Una trituración del residuo con dietil-éter proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido incoloro que se separó por filtración y se secó (485 mg). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 1,48 (6H, d), 2,54 (3H, s), 3,09 (2H, m), 3,5 (2H, oscurecido por disolvente residual), 4,36 (2H, s), 4,80 (1 H, m), 7,08-7,15 (2H, m), 7,85 (1H,d), 8,33 (1H, d), 8,42 (1H, s), 10,20 (2H, br s). MS *m/z* 375 [MH⁺].

Preparación 12

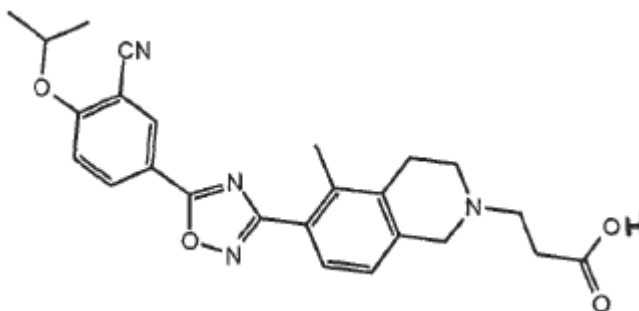
3-[6-(5-{3-Ciano-4-[(1-metiletil)oxi]fenil}-1,2,4-oxadiazol-3-il)-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinil]propanoato de etilo



10 Una mezcla de sal de ácido 2-[(1-metiletil)oxi]-5-[3-(5-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-isoquinolinil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]benzonitrilo trifluoroacético (Preparación 11, 100 mg, 0,20 mmol), acrilato de etilo, (31 mg, 33 μl, 0,31 mmol) y 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU, 187 mg, 185 μl, 1,23 mmol) en acetonitrilo (3 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en acetato de etilo (10 ml); la solución se lavó con agua (5 ml), se secó y se evaporó. La purificación del residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 10% de acetato de etilo en ciclohexano, proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (86 mg). MS *m/z* 475 [MH⁺].

Ejemplo 1

20 Sal de sodio de ácido 3-[6-(5-{3-ciano-4-[(1-metiletil)oxi]fenil}-1,2,4-oxadiazol-3-il)-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinil]propanoico



25 Se añadió hidróxido de sodio 2 M (2 ml) a una solución de 3-[6-(5-{3-ciano-4-[(1-metiletil)oxi]fenil}-1,2,4-oxadiazol-3-il)-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinil]propanoato de etilo (Preparación 12, 80 mg, 0,17 mmol) en etanol (2 ml) a 60°C. La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (2 ml). El sólido se separó por filtración, se lavó con una pequeña cantidad de agua y se secó para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (55 mg). ¹H RMN (400 MHz, d₆DMSO) δ: 1,39 (6H, d), 2,08 (2H, t), 2,44 (3H, s), 2,59-2,78 (6H, m), 3,56 (2H, s), 4,98 (1H, m), 7,09 (1H, d), 7,55 (1H, d), 7,65 (1H, d), 8,40 (1H, dd), 8,50 (1H, s). MS *m/z* 447 [MH⁺].

Preparación de membrana de para ensayo de GTP_γS de S1P1

30 Para las preparaciones de membranas todas las etapas se realizaron a 4°C. Células de hepatoma de rata que expresan establemente el receptor de S1P1 humano o células de leucemia basófilas de rata (RBL) que expresan establemente receptor de S1P3 humano se hicieron crecer hasta un 80% de confluencia antes de ser recolectadas en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos.

ES 2 431 795 T3

Después de separar la materia sobrenadante, el sedimento se volvió a poner en suspensión y las células fueron homogeneizadas en un mezclador Waring de vidrio durante 2 sesiones de 15 segundos en 200 ml de tampón (HEPES 50 mM, Leupeptina 1 mM, 25 µg/ml de vacitracina, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 2 µM). El mezclador se sumergió en hielo durante 5 minutos después de la primera pasada y 10-40 minutos después de la pasada final para permitir que se disipe la espuma. El material se centrifugó seguidamente a 500 g durante 20 minutos y la materia sobrenadante se centrifugó durante 36 minutos a 48.000 g. El sedimento se volvió a poner en suspensión en el mismo tampón que anteriormente pero sin PMSF y pepstatina A. Seguidamente el material se hizo pasar a través de una aguja de 0,6 mm, se reconstituyó hasta el volumen necesario (habitualmente x4 el volumen del sedimento celular original), se dividió en partes alícuotas y se almacenó congelado a -80°C.

10 Preparación de membrana alternativa para ensayo GTP γ S de S1P1

Todas las etapas se realizaron a 4°C. Las células fueron homogeneizadas en un mezclador Waring de vidrio durante 2 pasadas de 15 segundos en 200 ml de tampón (HEPES 50 mM, leupeptina 1 mM, 25 µg/ml de bacitracina, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y pepstatina A 2 µM). El mezclador se sumergió en hielo durante 5 minutos después de la primera pasada y 10-40 minutos después de la pasada final para permitir que la espuma se disipe. El material se centrifugó seguidamente a 500 g durante 20 minutos y la materia sobrenadante se centrifugó durante 30 minutos a 48.000 g. El sedimento se volvió a poner en suspensión en el mismo tampón que anteriormente pero sin PMSF ni pepstatina A. El material se hizo pasar a través de una aguja de 0,4 mm, se constituyó hasta el volumen requerido (habitualmente x4 el volumen del sedimento de células original) se dividió en partes alícuotas y se almacenó congelado a -80°C.

Ensayo GTP γ S de S1P1

20 Se adhirieron membranas de hepatoma de rata de S1P1 humano (1,5 µg/pocillo) a gránulos de ensayo de proximidad por centelleo (SPA) revestidos con aglutinina de germen de trigo (WGA) (0,125 mg/pocillo) en tampón del ensayo (HEPES 20 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM y pH ajustado a 7,4 usando KOH 5 M, GDP 10 µM FAC (concentración del ensayo final) y se añadió también 90 µg/ml en saponina)).

25 Después de 30 minutos de pre-acoplamiento en hielo, el gránulo y la suspensión de membrana se suministraron a una placa de pocillos LV384 de polipropileno Greiner blanca (5 µl/pocillo) que contenía 0,1 µl del compuesto. Seguidamente se añadieron 5 µl/pocillo de [³⁵S]-GTP γ S (concentración de radioligando final 0,5 nM) constituido en tampón del ensayo a placas de agonista. La combinación de ensayo final (10,1 µl) se centrifuge a 1.000 rpm durante 5 minutos y seguidamente se leyó inmediatamente en un lector Viewlux.

30 Todos los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM y se prepararon en DMSO al 100% usando una etapa de dilución de 1 en 4 para proporcionar curvas de respuesta a la dosis de 11 puntos. Las diluciones se transfirieron a las placas de ensayo asegurándose de que la concentración de DMSO era constante a través de la placa para todos los ensayos.

Todos los datos fueron normalizados a la media de pocillos testigos de 16 altos y 16 bajos en cada placa. Seguidamente se aplicó un ajuste de la curva de cuatro parámetros.

35 Método alternativo para ensayo GTP γ S de S1P1

Se homogeneizaron membranas RH7777 que expresa S₁P₁ (1,5 µg/pocillo) haciéndolas pasar a través de una aguja 23 g. Seguidamente estas fueron adheridas a gránulos de SPA revestidos con WGA (0,125 mg/pocillo) en tampón del ensayo (HEPES 20 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y pH ajustado a 7,4 usando KOH 5 M). Se añadieron también GDP 10 µM FAC y 90 µg/ml de FAC en saponina. Después de 30 minutos de pre-acoplamiento en hielo, el gránulo y la suspensión de membrana se suministraron a placas de 384 pocillos LV de polipropileno Greiner blancas (5 µg/pocillo) que contenían 0,1 µl de compuesto. Seguidamente se añadieron a las placas 5 µl/pocillo de [³⁵S]-GTP γ S (0,5 nM para S₁P₁ o 0,3 nM para S₁P₃) de concentración final de radioligando) preparados en tampón del ensayo. Seguidamente se selló la combinación final del ensayo (10,1 µl), se centrifugó en una centrifugadora y seguidamente se leyó inmediatamente en un instrumento Viewlux.

45 El ejemplo 1 tenía un pEC 50 de > 7.

S1P3

Se adhirieron membranas de S1P3 de células de leucemia basófilas de rata (RBL-2H3) (1,5 µg/pocillo) a gránulos de SPA revestidos con WGA (0,125 mg/pocillo) en tampón del ensayo (HEPES 20 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM y pH ajustado a 7,4 usando KOH 5 M), se añadieron también GDP 10 µM FAC y 90 µg/ml de FAC en saponina).

50 Después de 30 minutos de pre-acoplamiento en hielo, el gránulo y la suspensión de membrana se suministró a una

placa de 384 pocillos LV de polipropileno Greiner Blanca que contenía 0,1 µl de compuesto. Seguidamente se añadieron 5 µl/pocillo de [³⁵S]-GTPγS (concentración de radioligando final 0,5 nM) constituido en tampón del ensayo a placas de agonista. La combinación final (10,1 µl) se centrifugue a 1.000 rpm durante 5 minutos y seguidamente se leyó inmediatamente en un lector Viewlux.

5 Todos los compuestos del ensayo se disolvieron en DMSO a una concentración de 100 mM y se prepararon en DMSO al 100% usando una etapa de dilución de 1 en 4 para proporcionar curvas de respuestas a la dosis de 11 puntos. Las diluciones se transfirieron a placas del ensayo asegurándose de que la concentración de DMSO era constante a través de las placas para todos los ensayos.

10 Todos los datos fueron normalizados a la media de pocillos testigos de 16 altos y 16 bajos en cada placa. Seguidamente se aplicó un ajuste de la curva de cuatro parámetros.

Método alternativo para ensayo GTPγS de S1P1

15 Se homogeneizaron membranas RBL que expresan S₁P₃ (1,5 µg/pocillo) haciéndolas pasar a través de una aguja 23 G. Esta seguidamente fueron adheridas a gránulos de SPA revestidos con WGA (0,125 mg/pocillo) en tampón del ensayo (HEPES 20 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM y pH ajustado a 7,4 usando KOH 5 M). Se añadieron también se añadieron también GDP 10 µM FAC y 90 µg/ml de FAC en saponina).

20 Después de 30 minutos de pre-acoplamiento en hielo, la suspensión de gránulos y membranas se suministró a placas de 384 pocillos LV de polipropileno Greiner (5 µl/pocillo), que contenían 0,1 µl de compuesto. Seguidamente se añadieron a las placas 5 µl/pocillo de [³⁵S]-GTPγS (0,5 nM para S₁P₁ o 0,3 nM para concentración de radioligando final de S₁P₃) preparados en tampón del ensayo. La combinación de ensayo final (10,1 µl) fue seguidamente sellada, centrifugada en una centrifugadora y seguidamente se leyó inmediatamente en un instrumento Viewlux.

El ejemplo 1 tenía un p EC 50 < 5.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de ácido 3-[6-(5-{3-ciano-4-[(1-metiletil)oxi]fenil}-1,2,4-oxadiazol-3-il)-5-metil-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinil]propanoico

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 2. Un compuesto según la reivindicación 1, para ser usado en el tratamiento de estados o trastornos mediados por receptores de S1P1, en que el estado o trastorno es esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios crónicos, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplantes, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumores sólidos y metástasis tumorales, enfermedades asociadas con angiogénesis, enfermedades vasculares, estados de dolor, enfermedades virales agudas, estados de inflamación intestinal, diabetes dependiente de insulina y no dependiente de insulina

3. Un compuesto según la reivindicación 2, en que el estado es lupus eritematoso.

15 4. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, para fabricar un medicamento para ser usado en el tratamiento de estados o trastornos mediados por receptores de S1P1, en que el estado o trastorno es esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios crónicos, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplantes, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumores sólidos y metástasis tumorales, enfermedades asociadas con angiogénesis, enfermedades vasculares, estados de dolor, enfermedades virales agudas, estados de inflamación intestinal, diabetes dependiente de insulina y no dependiente de insulina.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que el estado es lupus eritematoso.

20 6. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto según la reivindicación 1.