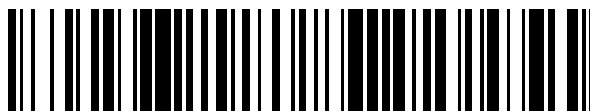


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 095**

51 Int. Cl.:

C07D 491/048 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2009 E 09783391 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2331548**

54 Título: **Inhibidores de proteasas**

30 Prioridad:

24.09.2008 GB 0817424

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

15.01.2014

73 Titular/es:

**MEDIVIR AB (100.0%)
P.O. Box 1086
141 22 Huddinge, SE**

72 Inventor/es:

**ODÉN, LOURDES SALVADORE;
NILSSON, MAGNUS;
KAHNBERG, PIA;
SAMUELSSON, BERTIL y
GRABOWSKA, URSZULA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 438 095 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de proteasas

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a inhibidores de cisteína proteasas, especialmente a las de la superfamilia de la papaína. La invención proporciona compuestos novedosos útiles en la profilaxis o el tratamiento de trastornos producidos por un desequilibrio de proteasas fisiológicas tales como catepsina K.

10

Descripción de la técnica relacionada

La superfamilia de la papaína de cisteína proteasas está distribuida ampliamente en diversas especies incluyendo mamíferos, invertebrados, protozoos, plantas y bacterias. Varias enzimas catepsina de mamífero, incluyendo catepsinas B, F, H, K, L, O y S, se han atribuido a esta superfamilia, y la regulación inapropiada de su actividad se ha implicado en varios trastornos metabólicos incluyendo artritis, distrofia muscular, inflamación, glomerulonefritis e invasión tumoral. Las enzimas similares a catepsina patógenas incluyen las gingipainas bacterianas, las falcipainas I, II, III y siguientes de la malaria y cisteína proteasas de *Pneumocystis carinii*, *Trypanosoma cruzi* y *brucei*, *Crithidia fusciculata*, *Schistosoma* spp.

15

20

La regulación inapropiada de catepsina K se ha implicado en varios trastornos incluyendo osteoporosis, enfermedades gingivales tales como gingivitis y periodontitis, enfermedad de Paget, hipercalcemia de tumor maligno y osteopatía metabólica. En vista de sus niveles elevados en los condrocitos de la membrana sinovial osteoartrítica, la catepsina K está implicada en enfermedades caracterizadas por degradación de cartílago o matriz excesiva, tales como osteoartritis y artritis reumatoide.

25

Es posible que el tratamiento de trastornos de los huesos y del cartílago tales como osteoartritis y osteoporosis requiera administración durante toda la vida de un inhibidor de la catepsina K, a menudo a una población de pacientes en o cerca de la fase geriátrica. Esto supone requisitos inusualmente altos en la facilidad de administración de los fármacos previstos para tales trastornos. Por ejemplo, están en marcha intentos de extender los regímenes de dosificación de los fármacos contra la osteoporosis actual de la clase de bifosfonato a regímenes de administración semanal o más largos para ayudar al cumplimiento. Sin embargo, incluso con una dosificación mejorada, sigue habiendo otros efectos secundarios de los bisfosfonatos. Los bisfosfonatos bloquean la renovación ósea en vez de atenuarla como lo hace un inhibidor de la catepsina K. Para tener los huesos sanos, es importante mantener el proceso de remodelación que los bisfosfonatos bloquean completamente. Además, los bisfosfonatos tienen una semivida muy larga en el hueso de modo que si se manifiestan efectos tales como osteonecrosis de la mandíbula por sí mismos, es imposible eliminar el bisfosfonato del hueso. Por el contrario, los inhibidores de catepsina K tienen normalmente un modo de acción de inicio y velocidad de disociación rápidos, lo que significa que si se identificaba un problema, podría detenerse la dosificación y no habría acumulación del inhibidor en la matriz ósea.

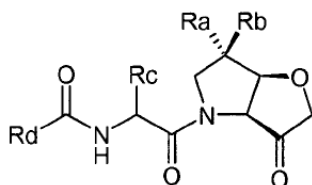
30

35

40

Por tanto, se desean fármacos contra la osteoporosis y la osteoartritis alternativos con propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas superiores.

45 La solicitud de patente internacional n.º WO 2008/007107 da a conocer compuestos de fórmula



50

en la que Rd es un anillo monocíclico sustituido, Rc es un cicloalquilo o alquilo ramificado y Ra y Rb son una variedad de grupos incluyendo H, metilo, etilo, éter, tioéter, amina, sulfonato etc. Los únicos compuestos que se preparan tienen H o metoxilo en esta posición.

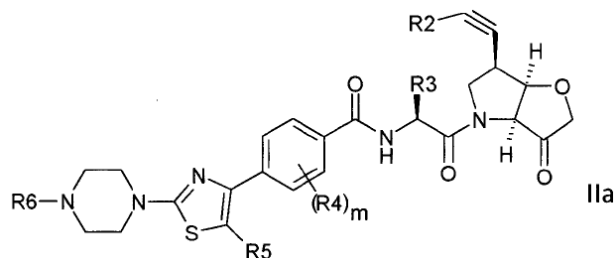
55

Sigue habiendo una necesidad en la técnica de inhibidores potentes de catepsina K. Son particularmente beneficiosos inhibidores de catepsina K que muestran selectividad por catepsina K con respecto a otras catepsinas (por ejemplo selectividad con respecto a catepsina S y/o catepsina L). Puede esperarse que inhibidores potentes de catepsina K que demuestran propiedades tales como permeabilidad alta y/o perfiles metabólicos ventajosos sean de gran valor en un entorno clínico. Indicaciones relacionadas con catepsina K tales como osteoporosis o artritis presuponen periodos de administración prolongados y por tanto es deseable que los compuestos tengan toxicidad o genotoxicidad mínimas.

60

Breve descripción de la invención

Según la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula IIa:



en la que:

10 R^2 es H o ciclopropilo;

R^3 es cicloalquilo C_3-C_6 o alquilo C_2-C_6 ramificado, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o dos flúor o con un trifluorometilo;

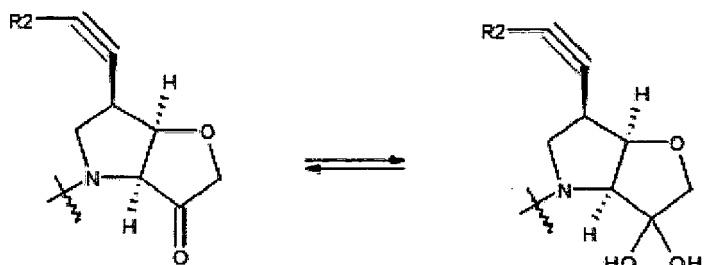
15 R^4 es metilo o flúor; m es 0, 1 ó 2;

R^5 es H, metilo o flúor;

R^6 es alquilo C_1-C_6 ;

20 o una sal, un N-óxido o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

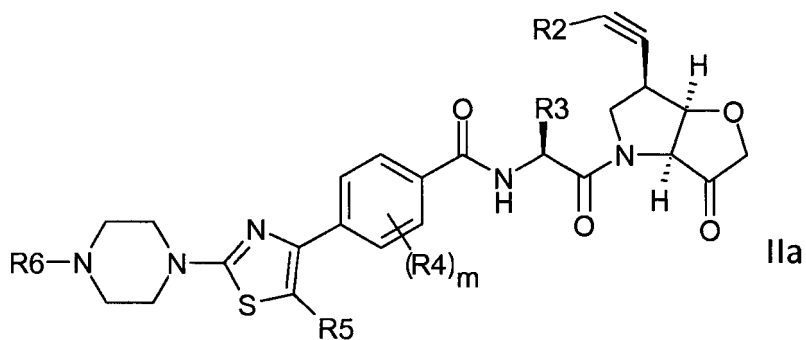
Se apreciará que los compuestos de la invención pueden existir como hidratos, tales como los de las fórmulas parciales:



y la invención se extiende a todas formas alternativas de este tipo.

30 En determinadas realizaciones de la invención, R^2 es H.

En otras realizaciones de la invención, R^2 es ciclopropilo. Por tanto, una realización de la invención define así compuestos de fórmula:

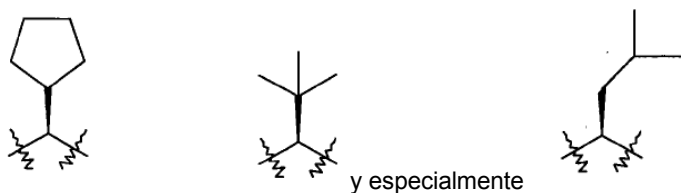


en la que m, R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son tal como se definieron anteriormente o cualquiera de las preferencias definidas anteriormente y R^2 es ciclopropilo.

Los valores representativos para cicloalquilo para R^3 incluyen ciclopropilo, ciclobutilo y especialmente ciclopentilo o ciclohexilo, estando cualquiera de los cuales sustituido con flúor o gem-flúor. Gem-flúor en la posición 2 de un ciclopropilo, la posición 3 de ciclobutilo o ciclopentilo o la posición 4 de ciclopropilo es a menudo conveniente. Gem-flúor en la posición 4 de ciclohexilo también es a menudo conveniente.

En una realización de la invención R^3 , representa la cadena lateral de leucina. En una segunda realización de la invención R^3 , representa la cadena lateral de isoleucina. En una tercera realización de la invención R^3 , representa la cadena lateral de ciclohexilglicina. En una cuarta realización de la invención R^3 , representa la cadena lateral de ciclopentilglicina. En una quinta realización de la invención R^3 , representa la cadena lateral de 4-fluoroleucina.

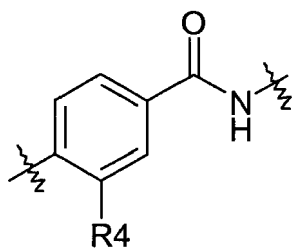
Los valores preferidos actualmente de R^3 incluyen los abarcados por las estructuras parciales:



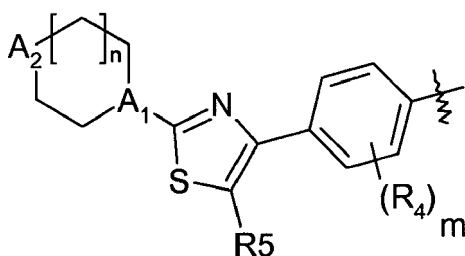
En una realización de la invención m representa 2. De particular interés son compuestos en los que m representa 1. Realizaciones todavía adicionales de la invención tienen m como 0, especialmente cuando el tiazolilo adyacente está sustituido con Me o preferiblemente F.

R^4 representa de manera adecuada metilo o flúor, especialmente flúor. Si m es 2, se prefiere actualmente que cada R^4 sea el mismo.

Cuando m representa 1, R^4 se ubica adecuadamente tal como se muestra mediante la estructura parcial:



La orientación preferida del anillo de tiazolilo es:



en la que A_1 y A_2 son N, n es 1, R^4 es metilo o flúor, m es 0, 1 ó 2 y R^5 es H, metilo o flúor.

Se entiende que las referencias a la fórmula II a continuación incluyen las realizaciones correspondientes de la fórmula IIa.

Las realizaciones representativas de la fórmula II, en la que el resto $-C=CR^1R^2$ es acetileno incluyen:

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclopentil-2-oxo-etil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-

benzamida;

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

5

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

10

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

15

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-4-5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

20

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

25

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclopentil-2-oxo-etil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

30

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

35

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclopentil-2-oxo-etil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

40

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida

y sales, N-óxidos e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Realizaciones adicionales preferidas de la fórmula II, en la que R¹ es un enlace etinilo y R² es ciclopropilo incluyen:

45

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

50

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclopentil-2-oxo-etil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

55

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

60

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

65

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-4-5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

5 N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

10 N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclopentil-2-oxo-etil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

15 N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

20 N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclohexil-2-oxo-etil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclopentil-2-oxo-etil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida;

25 N-[1-(6-(ciclopropiletinil)-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-2-metil-butil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida

y sales, N-óxidos e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

30 Aspectos adicionales de la invención incluyen una composición farmacéutica que comprende un compuesto tal como se definió anteriormente y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para el mismo.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de un compuesto tal como se definió anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado de:

35 osteoporosis,

enfermedades gingivales (tales como gingivitis y periodontitis),

40 enfermedad de Paget,

hipercalcemia de tumor maligno,

45 osteopatía metabólica,

enfermedades caracterizadas por degradación de cartílago o matriz excesiva (tales como osteoartritis y artritis reumatoide),

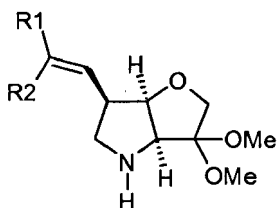
50 cánceres de hueso incluyendo neoplasia,

dolor (especialmente dolor crónico).

Se da a conocer un método para el tratamiento o la prevención de un trastorno mediado por catepsina K que comprende la administración de una cantidad segura y eficaz de un compuesto de la invención para el fin de tratar o prevenir dicho trastorno que está mediado por catepsina K.

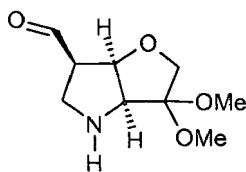
También se da a conocer un compuesto para el tratamiento o la prevención de un trastorno mediado por catepsina K. Además, se dan a conocer productos intermedios (tal como se describe en el presente documento) que pueden usarse en la preparación de los compuestos dados a conocer.

60 En particular se da a conocer un compuesto de fórmula:



en la que R¹ forma un enlace etinilo y R² es tal como se definió anteriormente, o un derivado protegido en N del mismo (por ejemplo protegido con Boc, CBz o Fmoc). También se da a conocer el análogo protegido con 1,3-dioxolano correspondiente y derivados protegidos en N del mismo (por ejemplo protegidos con Boc, CBz o Fmoc). Un ejemplo particular de este elemento estructural tiene tanto R¹ como R² como flúor, o ambos son metilo o el resto -C=C(R¹)R² es acetileno o ciclopropileno.

Un producto intermedio dado a conocer adicionalmente tiene la fórmula:



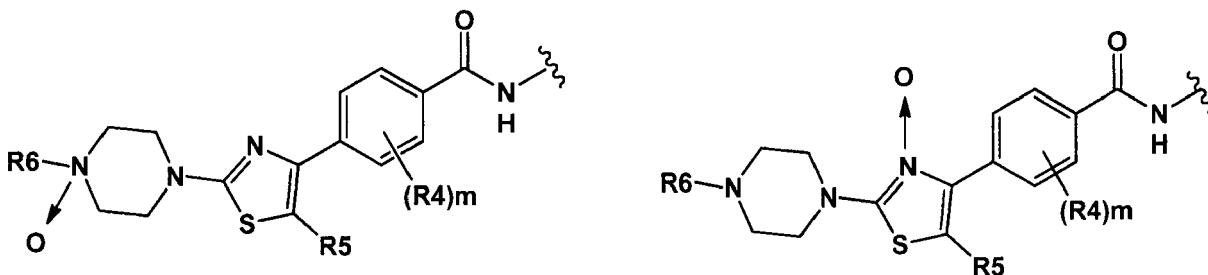
o el análogo protegido con 1,3-dioxolano correspondiente, en cada caso en el que la función N está protegida opcionalmente con un grupo protector convencional tal como Boc, CBz o Fmoc.

Los compuestos de la invención pueden formar sales que forman un aspecto adicional de la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables apropiadas de los compuestos de fórmula II incluyen sales de ácidos orgánicos, especialmente ácidos carboxílicos, incluyendo pero sin limitarse a acetato, trifluoroacetato, lactato, gluconato, citrato, tartrato, maleato, malato, pantotenato, isetionato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, butirato, digluconato, ciclopentanato, glucoheptanato, glicerofosfato, oxalato, heptanoato, hexanoato, fumarato, nicotinato, palmoato, pectinato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tartrato, lactobionato, pivalato, canforato, undecanoato y succinato, ácidos sulfónicos orgánicos tales como metanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, canforsulfonato, 2-naftalenosulfonato, bencenosulfonato, p-clorobencenosulfonato y p-toluenosulfonato; y ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, hemisulfato, tiocianato, persulfato, ácidos fósforico y sulfónico.

En algunos casos, los compuestos de la invención pueden aislarse como el hidrato. Los hidratos se preparan normalmente mediante recristalización en una mezcla de disolventes acuosos/orgánicos usando disolventes orgánicos tales como dioxina, tetrahidrofurano o metanol. Los hidratos también pueden generarse *in situ* mediante administración de la cetona correspondiente a un paciente.

Los N-óxidos de compuestos de la invención pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse N-óxidos tratando una forma no oxidada del compuesto de la invención con un agente oxidante (por ejemplo, ácido trifluoroperacético, ácido permaleico, ácido perbenzoico, ácido peracético, ácido meta-cloroperóxibenzóico, o similares) en un disolvente orgánico inerte adecuado (por ejemplo, un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano) a aproximadamente 0°C. Alternativamente, los N-óxidos de los compuestos de la invención pueden prepararse a partir del N-óxido de un material de partida apropiado.

Los ejemplos de N-óxidos de la invención incluyen aquellos con las estructuras parciales:



Pueden prepararse compuestos de la invención en forma no oxidada a partir de N-óxidos de los compuestos correspondientes de la invención mediante tratamiento con un agente reductor (por ejemplo, azufre, dióxido de

azufre, trifenilfosfina, borohidruro de litio, borohidruro de sodio, bicloruro de fósforo, tribromuro, o similares) en un disolvente orgánico inerte adecuado (por ejemplo, acetonitrilo, etanol, dioxano acuoso, o similares) a de 0 a 80°C.

5 Debe indicarse que las posiciones de radicales en cualquier resto molecular usadas en las definiciones pueden estar en cualquier parte en tal resto siempre que sea químicamente estable.

Los radicales usados en las definiciones de las variables incluyen todos los isómeros posibles a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo butilo incluye t-butilo, i-butilo, n-butilo etc.

10 Cuando aparece cualquier variable más de una vez en cualquier constituyente, cada definición es independiente.

A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación química de un compuesto abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles, que dicho compuesto puede poseer. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Se pretende que todas las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de la presente invención tanto en forma pura como mezclada entre sí estén abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

20 Las formas estereoisoméricas puras de los compuestos y productos intermedios tal como se mencionan en el presente documento se definen como isómeros sustancialmente libres de otras formas enantioméricas o diastereoméricas de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o productos intermedios. En particular, el término "estereoisoméricamente puro" se refiere a compuestos o productos intermedios que tienen un exceso estereoisomérico de al menos el 80% (es decir, mínimo el 90% de un isómero y máximo el 10% de los otros isómeros posibles) hasta un exceso estereoisomérico del 100% (es decir, el 100% de un isómero y nada del otro), más en particular, compuestos o productos intermedios que tienen un exceso estereoisomérico del 90% hasta el 100%, incluso más en particular que tienen un exceso estereoisomérico del 94% hasta el 100% y lo más particularmente que tienen un exceso estereoisomérico del 97% hasta el 100%. Los términos "enantioméricamente puro" y "diastereoméricamente puro" deben entenderse de manera similar, pero considerando entonces el exceso enantiomérico y el exceso diastereomérico, respectivamente, de la mezcla en cuestión.

30 Los compuestos de la invención pueden prepararse como sus estereoisómeros individuales haciendo reaccionar una mezcla racémica del compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisoméricos, separando los diastereómeros y recuperando el enantiómero ópticamente puro. Aunque la resolución de enantiómeros puede llevarse a cabo usando derivados diastereoméricos covalentes de compuestos de fórmula II, se prefieren complejos disociables (por ejemplo, sales diaestereoisoméricas; cristalinas). Los diastereómeros tienen propiedades físicas distintas (por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad, etc.) y pueden separarse fácilmente aprovechándose de estas diferencias. Los diastereómeros pueden separarse mediante cromatografía, por ejemplo HPLC o, preferiblemente, mediante técnicas de separación/resolución basadas en las diferencias de solubilidad. El enantiómero ópticamente puro se recupera entonces, junto con el agente de resolución, mediante cualquier medio práctico que no dé como resultado la racemización. Una descripción más detallada de las técnicas que pueden aplicarse a la resolución de estereoisómeros de compuestos a partir de su mezcla racémica puede encontrarse en Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, Enantiomers, Racemates and Resolutions, John Wiley & Sons, Inc. (1981).

45 Los compuestos de fórmula II o cualquier subgrupo de la fórmula II tal como se definió en el presente documento incluyen radioisótopos o compuestos radiomarcados, en los que uno o más de los átomos está sustituido por un isótopo de ese átomo, es decir, un átomo que tiene el mismo número atómico que, pero una masa atómica diferente del/de los que se encuentra(n) normalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de fórmula I o cualquier subgrupo de la fórmula I incluyen pero no se limitan a isótopos de hidrógeno, tales como ^2H y ^3H (también indicado D para deuterio y T para tritio respectivamente), carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , fósforo, tales como ^{31}P y ^{32}P , azufre, tal como ^{35}S , flúor, tal como ^{18}F , cloro, tal como ^{36}Cl , bromo tales como ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br y ^{82}Br y yodo, tales como ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I y ^{131}I .

55 La elección del isótopo incluido en un compuesto marcado con isótopo dependerá de la aplicación específica de ese compuesto. Por ejemplo, para ensayos de distribución tisular de fármaco o sustrato, los compuestos en los que se incorpora un isótopo radiactivo tal como ^3H o ^{14}C generalmente serán los más útiles. Para aplicaciones de obtención de radioimágenes, por ejemplo tomografía por emisión de positrones (PET) un isótopo que emite positrones tal como ^{11}C , ^{18}F , ^{13}N o ^{15}O será útil. La incorporación de un isótopo más pesado, tal como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar mayor estabilidad metabólica a un compuesto de fórmula I o cualquier subgrupo de la fórmula I, lo que puede dar como resultado, por ejemplo, un aumento de la semivida *in vivo* del compuesto o una reducción de los requisitos de dosificación.

60 Por conveniencia de síntesis, generalmente se preferirá que los compuestos de fórmula II estén en el estado isotópico natural.

65 Los compuestos marcados isotópicamente de fórmula I o cualquier subgrupo de la fórmula II pueden prepararse

mediante procedimientos análogos a los descritos en los esquemas y/o ejemplos a continuación en el presente documento usando el reactivo o material de partida marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo o material de partida no marcado isotópicamente correspondiente, o mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

5 Se apreciará que la invención se extiende a profármacos, solvatos, complejos y otras formas que liberan un compuesto de la invención *in vivo*.

10 Aunque es posible administrar el principio activo solo, es preferible presentarlo como parte de una formulación farmacéutica. Una formulación de este tipo comprenderá el principio activo definido anteriormente junto con uno o más portadores/excipientes aceptables y opcionalmente otros componentes terapéuticos. El/los portador(es) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de que sean compatibles con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el receptor.

15 Las formulaciones incluyen las adecuadas para la administración rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), pero preferiblemente la formulación es una formulación administrada por vía oral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo comprimidos y cápsulas de liberación sostenida, y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia.

20 Tales métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo definido anteriormente con el portador. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólido finamente divididos o ambos, y entonces si es necesario conformando el producto. La invención se extiende a métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende juntar o asociar un compuesto de fórmula II o su sal farmacéuticamente aceptable con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Si la fabricación de las formulaciones farmacéuticas implica el mezclado íntimo de excipientes farmacéuticos y el principio activo en forma de sal, entonces a menudo se prefiere usar excipientes que no son de naturaleza básica, es decir, son o bien ácidos o bien neutros.

25 30 Las formulaciones para la administración oral en la presente invención pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas, cachets o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión del principio activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite y como un bolo, etc.

35 Con respecto a composiciones para la administración oral (por ejemplo comprimidos y cápsulas), el término portador adecuado incluye vehículos tales como excipientes comunes por ejemplo agentes de unión, por ejemplo jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; cargas y portadores, por ejemplo almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro de sodio y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, fluido de silicona, talco, ceras, aceites y sílice coloidal. También pueden usarse agentes aromatizantes tales como menta, esencia de gaulteria, aromatizante de cereza o similares. Puede ser deseable añadir un agente colorante para hacer la forma farmacéutica fácilmente identificable. También pueden recubrirse los comprimidos mediante métodos bien conocidos en la técnica.

40 45 Puede prepararse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos preparados mediante compresión comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma de flujo libre tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente de dispersión. Pueden prepararse comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo.

50 55 Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.

60 La dosificación apropiada para los compuestos o formulaciones de la invención dependerá de la indicación y del paciente y se determina fácilmente mediante ensayos en animales convencionales. Normalmente, son deseables y pueden conseguirse dosificaciones que proporcionan concentraciones intracelulares (para la inhibición de proteasas fisiológicas de la superfamilia de la papaína) del orden de 0,01-100 uM, más preferiblemente de 0,01-10 uM, tal como 0,1-25 uM.

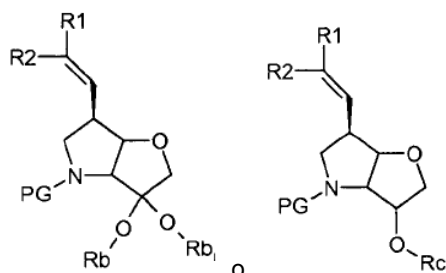
65 Los compuestos de la invención se preparan mediante una variedad de químicas de disolución y de fase sólida.

Normalmente, los compuestos se preparan como elementos estructurales que reflejan los restos P1, P2 y P3 del inhibidor de producto final. Sin querer limitarse de ninguna manera a la teoría o a la atribución de modos de unión provisionales para las variables específicas, los conceptos teóricos P1, P2 y P3 tal como se usan en el presente documento se proporcionan solo por conveniencia y tienen sustancialmente sus significados de Schlecter & Berger convencionales e indican las partes del inhibidor que se cree que ocupan los subsitios S1, S2 y S3 respectivamente de la enzima, en la que S1 está adyacente al sitio de escisión y S3 lejos del sitio de escisión. Se pretende que los compuestos definidos mediante la fórmula II estén dentro del alcance de la invención, independientemente del modo de unión.

5

En términos generales, el elemento estructural P1 tendrá la fórmula:

10



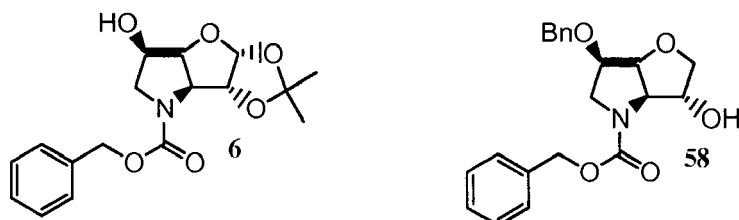
15 en las que:

R^1 forma un enlace etinilo y R^2 es tal como se definió anteriormente, los dos grupos Rb definen un cetal, tal como el *bis* metilcetal o juntos definen un cetal cíclico tal como 1,3-dioxolano;

20 y R_c es un grupo protector de hidroxilo. Menos comúnmente R_c es H o representa la función ceto del inhibidor de producto final en casos en los que el elemento estructural P1 como la cetona está alargado con P2 y P3.

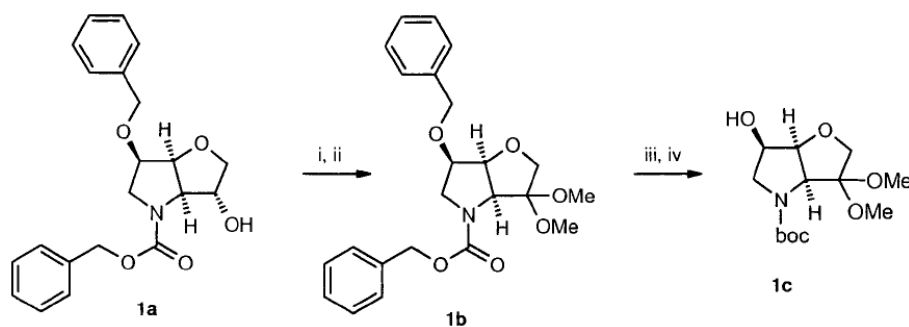
El documento WO 05/066180 describe la preparación de productos intermedios para dar los elementos estructurales P1 anteriores, incluyendo:

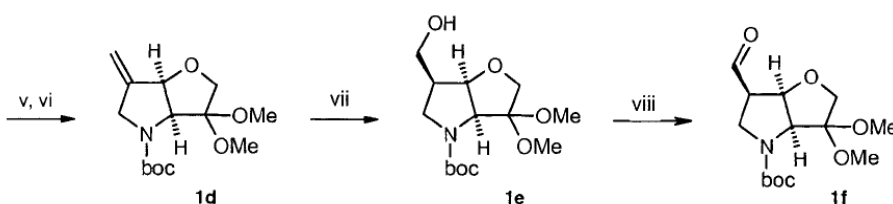
25



La primera fase en la síntesis de compuestos de la invención normalmente es la preparación en disolución de un elemento estructural P1 funcionalizado. El esquema 1 ilustra una ruta para dar un producto intermedio de 6-aldehído conveniente.

30



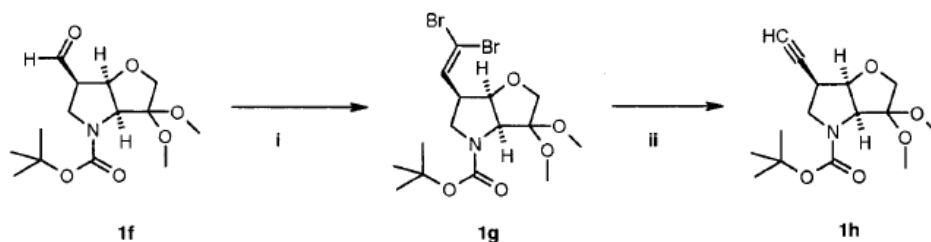


- 5 i) Peryodiano de Dess-Martin, DCM; ii) ortoformiato de trimetilo, pTs, MeOH; iii) Pd(OH)₂, H₂, MeOH; iv) Boc₂O, Na₂CO₃ al 10%, v) peryodiano de Dess-Martin, DCM; vi) 1) CH₃PPh₃Br, KOtBu, THF; vii) 9-BBN-H, THF, 2) NaBO₃, H₂O, THF; viii) peryodiano de Dess-Martin, DCM.

Esquema 1

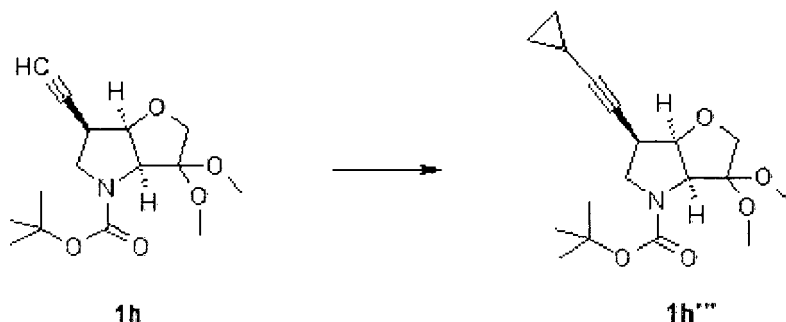
10 El alcohol bicíclico de partida (1a) puede prepararse tal como se describe en el documento WO 05/066180. La oxidación de la función hidroxilo, por ejemplo, con peryodiano de Dess-Martin seguido por la transformación de la función ceto proporcionada, para dar un dimetilcetal efectuada mediante tratamiento con ortoformiato de trimetilo en presencia de un ácido p-toluenosulfónico, proporciona el cetal (1b). La eliminación de grupos protectores Cbz y bencilo efectuada, por ejemplo, mediante hidrogenólisis usando un catalizador como Pd(OH)₂ o similares, seguido por la protección con boc de la amina libre producida, proporciona el alcohol (1c). La oxidación del alcohol libre producida usando, por ejemplo, peryodiano de Dess-Martin en un disolvente como diclorometano seguido por una reacción de Wittig usando bromuro de metil-trifenilfosfinio en presencia de KOt.Bu o similares, proporciona la olefina (1d). La hidroxilación del doble enlace efectuada, por ejemplo, mediante tratamiento con 9-BBN-H, proporciona el alcohol primario (1e) que posteriormente puede oxidarse para dar el aldehído (1f) correspondiente usando cualquier método de oxidación adecuado tal como tratamiento con peryodiano de Dess-Martin o similares.

20 El esquema 2 ilustra un procedimiento típico para un elemento estructural P1 de 6-acetileno comenzando a partir del producto intermedio de 6-aldehído del esquema 1.



- 25 i) CBr₄, PPh₃CH₂Cl₂, 0°C, ii) nBuLi, THF, -78°C

30 El elemento estructural de C-6-acetileno 1h se prepara tal como se muestra en el esquema 2. Esencialmente, el acetileno 1h se prepara fácilmente a partir del precursor de aldehído 1f mediante la metodología de Corey-Fuchs de dos etapas por medio la 1,1-dibromoolefina 1g correspondiente. El aldehído 1f se trata con dibromuro de trifenilfosfina, por ejemplo generado a partir de Ph₃PCH₂Cl₂ y CBr₄, a 0°C para proporcionar el dibromoalqueno 1g. El tratamiento posterior del dibromuro en un disolvente orgánico tal como THF a temperatura reducida, normalmente -78°C con n-butil-litio proporciona, tras el tratamiento final, el acetileno 1h, generalmente con buen rendimiento. Podrían usarse varios grupos protectores de N convencionales en lugar del grupo Boc mostrado en el presente documento. Además, el dimetilcetal puede sustituirse por varios grupos protectores de cetona habituales incluyendo cetales cíclicos o, menos comúnmente, el elemento estructural podría acumularse con la funcionalidad ceto activa en su lugar, antes del acoplamiento.



40

Los compuestos de fórmula II en la que R² es un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido pueden prepararse mediante la alquilación del elemento estructural de etinilo correspondiente. En el ejemplo anterior, se trata 1h con una base fuerte, por ejemplo amida de sodio, para conseguir la acetilida, que posteriormente se hace reaccionar con el haluro de cicloalquilo apropiado para proporcionar el elemento estructural 1h^m (en el ejemplo anterior cloruro de ciclopropilo, pero otros cicloalquilos activados también serán eficaces). Alternativamente, la función acetileno puede extenderse mediante la reacción con ClCH₂CH₂Br seguido por el tratamiento con una base para formar un anillo de ciclopropilo. Aunque el esquema se ha representado con los grupos protectores N-Boc y dimetilacetal, será evidente que otros grupos protectores convencionales pueden considerarse.

Normalmente para llegar hasta el compuesto final, los elementos estructurales P1 apropiados tales como 1h, 1h', 1h" o 1h^m, están desprotegidos en N de un modo convencional, tal como tratamiento con cloruro de acetilo en metanol para eliminar un grupo protector N-Boc. Con la posterior amina libre, se introduce el residuo P2, por ejemplo por medio de BocP2-OH usando condiciones de acoplamiento habituales tales como HATU, DIPEA en DMF. La protección con Boc terminal se elimina de nuevo con cloruro de acetilo en metanol y se introduce el residuo P3 por medio de P3-OH usando condiciones de acoplamiento habituales tales como HATU, DIPEA en DMF. Finalmente se elimina la protección de dimetilacetal con TFA para proporcionar el compuesto final requerido.

El alargamiento se lleva a cabo normalmente en presencia de un agente de acoplamiento adecuado, por ejemplo, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitrispirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio (HATU), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) o 1,3-diciclohexil-carbodiimida (DCC), opcionalmente en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), y una base tal como N,N-diisopropiletilamina, trietilamina, N-metilmorfolina, y similares. Normalmente, la reacción se lleva a cabo a de 20 a 30°C, preferiblemente a aproximadamente 25°C, y requiere de 2 a 24 h para completarse. Disolventes de reacción adecuados son disolventes orgánicos inertes tales como disolventes orgánicos halogenados (por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo, y similares), acetonitrilo, N,N-dimetilformamida, disolventes etéreos tales como tetrahidrofurano, dioxano, y similares.

Alternativamente, la etapa de acoplamiento de alargamiento anterior puede llevarse a cabo convirtiendo en primer lugar el elemento estructural P3/P2 en un derivado de ácido activo tal como éster de succinimida y entonces haciéndolo reaccionar con la amina P1. La reacción normalmente requiere de 2 a 3 h para completarse. Las condiciones utilizadas en esta reacción dependen de la naturaleza del derivado de ácido activo. Por ejemplo, si es un derivado de cloruro de ácido, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base adecuada (por ejemplo trietilamina, diisopropiletilamina, piridina, y similares). Los disolventes de reacción adecuados son disolventes orgánicos polares tales como acetonitrilo, N,N-dimetilformamida, diclorometano o cualquier mezcla adecuada de los mismos.

Normalmente, el elemento estructural P2 es normalmente un aminoácido protegido en N tal como L-leucina, L-isoleucina, O-metil-L-treonina, L-3-hidrovalina, 4-fluoroleucina, L-ciclopentilglicina o L-ciclohexilglicina y P3 normalmente comprende un grupo de ocupación de extremos tal como un derivado de ácido benzoico con, por ejemplo, el resto N-alquil-piperazinil-E ya introducido o proporcionado con un sintón para el mismo en la posición para.

Los elementos estructurales individuales adecuadamente protegidos pueden prepararse en primer lugar y posteriormente acoplarse entre sí, preferiblemente en la secuencia P2+P1 → P2-P1 seguido por ácido N-alquilpiperazinil-E-benzoico* +P2-P1 → N-alquilpiperazinil-E-benzoato-P2-P1, en el que * indica una forma activada, con el fin de minimizar la racemización en P2.

El acoplamiento entre dos aminoácidos, un aminoácido y un péptido, o dos fragmentos peptídicos puede llevarse a cabo usando procedimientos de acoplamiento habituales tales como el método de azida, el método de anhídrido de ácido carbónico-carboxílico mixto (cloroformiato de isobutilo), método de carbodiimida (diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida o carbodiimida soluble en agua), método del éster activo (éster p-nitrofenílico, imidoéster N-hidroxisuccínico), método del reactivo K de Woodward, método de carbonildiimidazol, métodos de reactivos de fósforo o de oxidación-reducción. Algunos de estos métodos (especialmente el método de carbodiimida) pueden potenciarse añadiendo 1-hidroxibenzotriazol o 4-DMAP. Estas reacciones de acoplamiento pueden realizarse o bien en fase de disolución (fase líquida) o bien en fase sólida.

Más explícitamente, la etapa de acoplamiento implica el acoplamiento por deshidratación de un carboxilo libre de un reactivo con el grupo amino libre del otro reactivo en presencia de un agente de acoplamiento para formar un enlace de amida de unión. Descripciones de tales agentes de acoplamiento se encuentran en libros de texto generales sobre la química de péptidos, por ejemplo, M. Bodanszky, "Peptide Chemistry", 2ª ed. rev., Springer-Verlag, Berlín, Alemania, (1993) mencionado a continuación en el presente documento simplemente como Bodanszky. Ejemplos de agentes de acoplamiento adecuados son N,N'-diciclohexilcarbodiimida, 1-hidroxibenzotriazol en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida o N-etil-N'-[(3-dimetilamino)propil]carbodiimida. Un agente de acoplamiento práctico y útil es el hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris-(dimetilamino)fosfonio disponible comercialmente, o bien por sí mismo o bien en presencia de 1-hidroxibenzotriazol o 4-DMAP. Otro agente de acoplamiento práctico y útil es

tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio disponible comercialmente. Todavía otro agente de acoplamiento práctico y útil es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio disponible comercialmente.

5 La reacción de acoplamiento se realiza en un disolvente inerte, por ejemplo diclorometano, acetonitrilo o dimetilformamida. Se añade un exceso de una amina terciaria, por ejemplo diisopropiletilamina, N-metilmorfolina, N-metilpirrolidina o 4-DMAP se añade para mantener la mezcla de reacción a un pH de aproximadamente 8. La temperatura de reacción oscila habitualmente entre 0°C y 50°C y el tiempo de reacción oscila habitualmente entre 15 min. y 24 h.

10 Generalmente, los grupos funcionales de los aminoácidos no naturales constituyentes deben estar protegidos durante las reacciones de acoplamiento para impedir la formación de enlaces no deseados. Los grupos protectores que pueden usarse se enumeran en Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Nueva York (1981) y "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", vol. 3, Academic Press, Nueva York (1981), mencionado a continuación en el presente documento simplemente como Greene.

15 El grupo alfa-carboxilo del residuo C-terminal se protege habitualmente como un éster que puede escindirse para dar el ácido carboxílico. Los grupos protectores que pueden usarse incluyen 1) ésteres alquílicos tales como metílico, trimetilsilílico y t-butílico, 2) ésteres aralquílicos tales como bencílicos y bencílicos sustituidos o 3) ésteres que pueden escindirse mediante una base suave o medios reductores suaves tales como ésteres tricloroetílico y fenacílico.

20 El grupo alfa-amino de cada aminoácido que va a acoplarse está normalmente protegido en N. Puede usarse cualquier grupo protector conocido en la técnica. Los ejemplos de tales grupos incluyen: 1) grupos acilo tales como formilo, trifluoroacetilo, ftalilo y p-toluenosulfonilo; 2) grupos carbamato aromáticos tales como benciloxycarbonilo (Cbz o Z) y benciloxycarbonilos sustituidos y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc); 3) grupos carbamato alifáticos tales como tercbutiloxycarbonilo (Boc), etoxycarbonilo, diisopropilmetoxi-carbonilo, y aliloxycarbonilo; 4) grupos carbamato de alquilo cíclicos tales como ciclopentiloxycarbonilo y adamantiloxycarbonilo; 5) grupos alquilo tales como trifenilmetilo y bencilo; 6) trialquilsililo tal como trimetilsililo; y 7) grupos que contienen tiol tales como feniltiocarbonilo y ditiassuccinoilo. El grupo protector de alfa-amino preferido es o bien Boc o Fmoc. Muchos derivados de aminoácido derivados protegidos adecuadamente para la síntesis de péptidos están disponibles comercialmente.

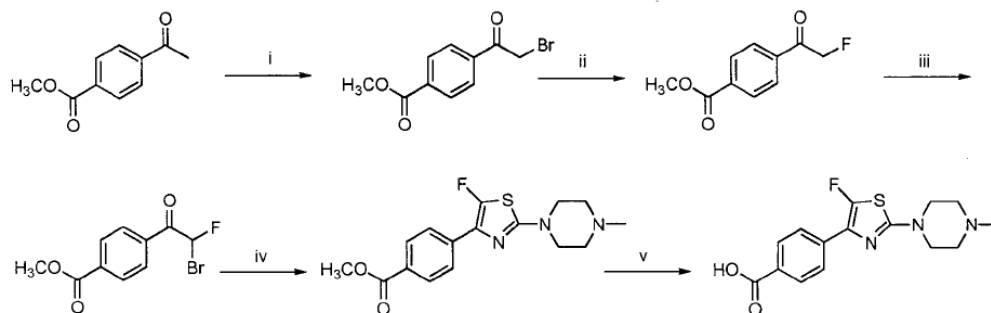
35 El grupo protector de alfa-amino se escinde normalmente antes de la siguiente etapa de acoplamiento. Cuando se usa el grupo Boc, los métodos de elección son ácido trifluoroacético, puro o en diclorometano, o HCl en dioxano o en acetato de etilo. Entonces la sal de amonio resultante se neutraliza o bien antes del acoplamiento o bien *in situ* con disoluciones básicas tales como tampones acuosos o aminas terciarias en diclorometano o acetonitrilo o dimetilformamida. Cuando se usa el grupo Fmoc, los reactivos de elección son piperidina o piperidina sustituida en dimetilformamida, pero puede usarse cualquier amina secundaria. La desprotección se lleva a cabo a una temperatura de entre 0°C y temperatura ambiente, habitualmente 20-22°C.

40 Una vez que se completa la secuencia del inhibidor, se elimina cualquier grupo protector restante de cualquier manera que se dicte por la elección de los grupos protectores. Los expertos en la técnica conocen bien estos procedimientos.

45 Los elementos estructurales P2 en forma de L-aminoácidos protegidos en N están fácilmente disponibles comercialmente, por ejemplo L-leucina, L-isoleucina, L-ciclohexilglicina, y otros están disponibles comercialmente con varias variantes del grupo protector tales como CBz, Boc o Fmoc. Otras variantes de R³ se preparan fácilmente a partir de materiales de partida disponibles comercialmente. Por ejemplo, pueden prepararse compuestos en los que R³ es -C(CH₃)₂OCH₃ haciendo reaccionar ácido (S)-(+)-2-amino-3-hidroxi-3-metilbutanoico protegido con CBz
50 con 3,3-dimetoxi-hexahidro-furo(3,2b)pirrol para formar la unidad P2-P1 deseada. El alcohol de la cadena lateral de P2 puede metilarse ahora usando yoduro de metilo en condiciones de hidruro de sodio, imidazol, THF convencionales para obtener el P2 deseado sin racemización sustancial del centro alfa. Este resto P2-P1 puede llevarse ahora a través de la síntesis descrita en el presente documento, concretamente eliminación de CBz y acoplamiento.

55 El documento WO 05/565299 describe la preparación de un elemento estructural gamma-fluoroleucina-P2. Una síntesis alternativa de elementos estructurales de Fmoc y N-Boc-gammafluoroleucina se muestra en Truong *et al* Syn. Lett. 2005 n.º 8 1278-1280.

60 La preparación de elementos estructurales P3 se describe en los documentos WO 05/066180, WO 08/007114 o se preparan fácilmente mediante métodos análogos. Por ejemplo, el esquema E a continuación muestra la preparación de un elemento estructural P3 en el que E es un tiazolilo sustituido con flúor:



- 5 i. HOAc, Br₂, TA, 2 h, rendimiento del 55%; ii. KF, 18-corona-6, CH₃CN, 90°C, 16 h, rendimiento del 31%; iii. HOAc, Br₂, 45°C, 4 h, rendimiento del 100%; iv. 4-metilpiperazin-1-carbotiamida, etanol, 70°C, 2 h, rendimiento del 74%, v. LiOH, THF, H₂O, TA, 16 h, rendimiento del 79%

Esquema E

Síntesis de ácido 4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzoico

- 10 El material de partida, 4-acetilbenzoato de metilo, está disponible comercialmente. La bromación en la posición □ para dar la cetona se logra con bromo en ácido acético para proporcionar el éster metílico del ácido 4-(2-bromo-acetil)-benzoico deseado. El tratamiento posterior de éster metílico del ácido 4-(2-bromo-acetil)-benzoico con fluoruro de potasio en presencia de 18-corona-6 a 90°C, proporciona éster metílico del ácido 4-(2-fluoro-acetil)-benzoico tras cromatografía en columna. La bromación repetida en la posición □ para dar la cetona se logra con bromo en ácido acético para proporcionar el éster metílico del ácido 4-(2-bromo-2-fluoro-acetil)-benzoico deseado. La formación del tiazol se lleva a cabo normalmente calentando el éster metílico del ácido 4-(2-bromo-2-fluoro-acetil)-benzoico con 4-metilpiperazin-1-carbotioamida a 70°C durante 2 horas. Con enfriamiento, el éster metílico del ácido 4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzoico deseado precipita. La desprotección del éster metílico se lleva a cabo usando una disolución de hidróxido de litio y el ácido deseado, ácido 4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzoico se obtiene generalmente con un buen rendimiento como la sal de clorhidrato tras tratamiento final con ácido clorhídrico.

- 25 El término "grupo protector de N" o "protegido en N" tal como se usa en el presente documento se refiere a los grupos previstos para proteger el extremo N-terminal de un aminoácido o péptido o para proteger un grupo amino frente a reacciones no deseadas durante procedimientos sintéticos. Se dan a conocer grupos protectores de N usados comúnmente en Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1981). Los grupos protectores de N incluyen grupos acilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, □-clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo, y similares; grupos sulfonilo tales como bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, y similares; grupos que forman carbamato tales como benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, □,□-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidroxibenciloxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxicarbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo, y similares; grupos alquilo tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo y similares; y grupos sililo tales como trimetilsililo y similares. Los grupos protectores de N favoritos incluyen formilo, acetilo, benzoilo, pivaloilo, t-butilacetilo, fenilsulfonilo, bencilo (bz), t-butoxicarbonilo (BOC) y benciloxicarbonilo (Cbz).

- 45 Grupos protectores de hidroxilo y/o carboxilo también se revisan extensamente en Greene *ibid.* e incluyen éteres tales como éteres de metilo, de metilo sustituido tales como metoximetilo, metiltiommetilo, benciloximetilo, t-butoximetilo, 2-metoxietoximetilo y similares, éteres de sililo tales como de trimetilsililo (TMS), t-butildimetilsililo (TBDMS), tribencilsililo, trifenilsililo, t-butildifenilsilil-triisopropil-sililo y similares, éteres de etilo sustituido tales como 1-etoximetilo, 1-metil-1-metoxietilo, t-butilo, alilo, bencilo, p-metoxibencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo y similares, grupos aralquilo tales como tritilo, y pixilo (derivados de 9-hidroxi-9-fenilxanteno, especialmente el cloruro). Los grupos protectores de hidroxilo de éster incluyen ésteres tales como formiato, bencilformiato, cloroacetato, metoxiacetato, fenoxiacetato, pivaloato, adamantoato, mesitoato, benzoato y similares. Los grupos protectores de hidroxilo de carbonato incluyen metilo vinilo, alilo, cinamilo, bencilo y similares.

Descripción detallada de las realizaciones

Ahora se describirán diversas realizaciones de la invención a modo de ilustración sólo con referencia a los siguientes

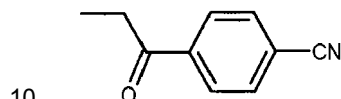
ejemplos y la figura 1 que representa la concentración plasmática frente al tiempo para ratones C57Bl macho a los que se les ha administrado por vía oral un compuesto de la invención o un compuesto de la técnica anterior.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

5

Un elemento estructural P3

Etapa a) 4-cianopropiofenona

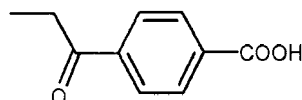


15 Tal como se describe para la preparación de 4-cianoacetofenona (Synth. Commun 1994, 887-890), se sometió a reflujo una mezcla de 4-bromopropiofenona (5,65 g, 26,4 mmol), $Zn(CN)_2$ (1,80 g, 15,3 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (2,95 g, 2,6 mmol) a 80°C en DMF desoxigenado (35 ml, almacenado sobre tamices moleculares 4 A, se burbujeó con Ar antes de su uso) durante 18 h. Se repartió la mezcla entre tolueno (100 ml) y NH_4OH 2 N (100 ml). Se extrajo la fase orgánica con NH_4OH 2 N (100 ml), se lavó con NaCl acuoso saturado (2 x 100 ml), se secó y se evaporó. Se realizó de manera similar una reacción a escala de 10 mmol y se combinaron los productos brutos. La cromatografía ultrarrápida (330 g de sílice, éter de petróleo-EtOAc 6/1) dio sólidos de color blanco (5,17 g, 89%).

20 1H -RMN ($CDCl_3$) δ ppm: 1,22 (t, 3H, J = 7,2 Hz), 3,00 (q, 2H, J = 7,3 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 8,03 (d, 2H, J = 8,4 Hz)

^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ ppm: 7,8, 32,1, 116,1, 117,9, 128,3, 132,4, 139,7, 199,2

25 Etapa b) ácido 4-propionilbenzoico

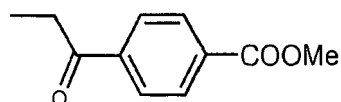


30 Se sometió a reflujo 4-cianopropiofenona (4,67 g, 29,3 mmol) con NaOH 2 N (90 ml, 180 mmol) y dioxano (90 ml) a 95°C durante la noche. Se diluyó la mezcla con agua (150 ml), se lavó con éter (75 ml), se acidificó hasta pH 2 con HCl concentrado y se extrajo con éter (3 x 75 ml). Se lavó la fase orgánica con NaCl acuoso saturado (3 x 75 ml), se secó y se evaporó dando sólidos de color amarillo (5,12 g, 98%).

35 1H -RMN ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ ppm: 1,18 (t, 3H, J = 7,2 Hz), 2,99 (q, 2H, J = 7,1 Hz), 7,95 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 8,08 (d, 2H, J = 8,8 Hz)

^{13}C -RMN ($CDCl_3$) δ ppm: 7,9, 32,1, 127,7, 130,0, 134,0, 140,0, 168,0, 200,8

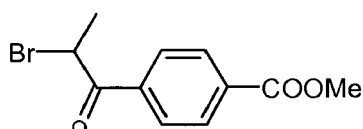
40 Etapa c) 4-propionilbenzoato de metilo



45 Se agitaron el ácido benzoico anterior (890 mg, 5 mmol), $NaHCO_3$ (1,26 g, 15 mmol) y yodometano (935 ml, 15 mmol) en DMF (10 ml) a TA durante la noche. Se diluyó la mezcla con NaCl acuoso saturado (50 ml) y se extrajo con éter (3 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica con agua (50 ml), se secó y se evaporó. La cromatografía ultrarrápida (90 g de sílice, éter de petróleo-EtOAc 2/1) dio sólidos de color blanco (744 mg, 77%).

1H -RMN ($CDCl_3$) δ ppm: 1,24 (t, 3H, J = 7 Hz), 3,03 (q, 2H, J = 7 Hz), 3,95 (s, 3H), 8,0 y 8,12 (ABq, 4H)

50 Etapa d) 4-(2-bromopropionil)benzoato de metilo

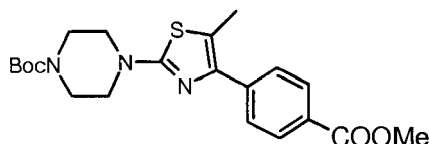


Se alentaron 4-propionilbenzoato de metilo (744 mg, 3,87 mmol), tribromhidrato de pirrolidona (1,98 g) y 2-

pirrolidinona (380 mg, 4,5 mmol) en THF (38 ml) a 50°C bajo nitrógeno durante 3 h. Se enfrió la mezcla, se filtró, se concentró y entonces se volvió a disolver en éter (50 ml). Se lavó la disolución de éter sucesivamente con agua (20 ml), Na₂S₂O₅ acuoso saturado (20 ml), NaCl acuoso saturado (20 ml) y agua (20 ml), se secó y se evaporó dando un aceite de color amarillo (1,025 g) que se usó directamente en el acoplamiento de Hantzsch. Este material contenía el 91% de la bromocetona deseada, el 5% de la cetona de partida y el 4% de 4-bromo-1-butanol, tal como se determinó mediante ¹H-RMN.

¹H-RMN (CDCl₃) δ ppm: 1,92 (d, 3H, J = 7 Hz), 3,96 (s, 3H), 5,28 (q, 1 H, J = 7 Hz), 8,07 y 8,14 (ABq, 4H)

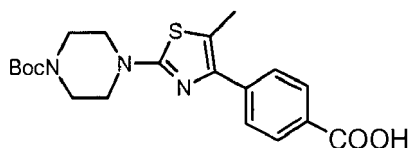
10 Etapa e) éster metílico del ácido 4-[2-(4-terc-butoxicarbonilpiperazin-1-il)-5-metiltiazol-4-il]benzoico



Se sometieron a reflujo toda la α-bromocetona anterior y éster terc-butílico del ácido 4-tionocarbonilpiperazin-1-carboxílico (J. Med. Chem., 1998, 5037-5054, 917 mg, 3,73 mmol) en 36 ml de THF a 70°C durante 2 h, bajo N₂. Se filtró el precipitado y se evaporó el filtrado dando sólidos de color amarillo. La cromatografía en columna ultrarrápida (sílice, éter de petróleo-EtOAc 5/1) dio 624 mg de sólidos de color amarillo claro. La cromatografía del precipitado (sílice, éter de petróleo-EtOAc 2/1) dio 32 mg más de compuesto. El rendimiento total es del 44%.

20 ¹H-RMN (CDCl₃) δ ppm: 1,46 (s, 9H), 2,43 (s, 3H), 3,42, (m, 4H), 3,54 (m, 4H), 3,90 (s, 3H), 7,68 y 8,04 (ABq, 4H).

Etapa f) ácido 4-[2-(4-terc-butoxicarbonilpiperazin-1-il)-5-metiltiazol-4-il]benzoico



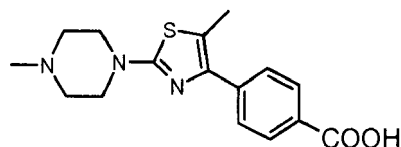
25 Se calentó el éster metílico anterior (564 mg, 1,35 mmol) con 1,35 ml de NaOH 2 N, 5 ml de THF y 3,65 ml de agua a 60°C durante 4 h. Se evaporó la mezcla de reacción, se vertió en 20 ml de NaCl acuoso saturado y 20 ml de CH₂Cl₂, y entonces se acidificó hasta pH 3 con ácido cítrico al 5%, en un baño de hielo. Se separaron las fases y se extrajo la fase orgánica adicionalmente con 2 x 10 ml de CH₂Cl₂. Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con agua (10 ml), se secaron y se evaporaron dando sólidos de color amarillo claro (537 mg, 98%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ ppm: 1,48 (s, 9H), 2,47 (s, 3H), 3,47 (m, 4H), 3,57 (m, 4H), 7,74 y 8,12 (ABq, 4H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ ppm: 12,6, 28,3, 42,8, 48,1, 80,3, 119,1, 127,8, 128,2, 130,1, 140,5, 145,6, 154,6, 167,2, 171,4.

35 CL-EM: (M + H)⁺ 404, (M-H)⁻ 402.

Etapa g) ácido 4-[5-metil-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]benzoico



40 Ácido 4-[4-(4-carboxi-fenil)-5-metil-tiazol-2-il]-piperazin-1-carboxílico

45 Se disolvió éster terc-butílico del ácido (0,421 mmol) en HCl 4 M en 1,4-dioxano y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Entonces se eliminó el disolvente a vacío y se suspendió el residuo ácido 4-(5-metil-2-piperazin-1-il-tiazol-4-il)-benzoico en metanol (10 ml) y se trató con tampón AcOH/AcONa (pH ~5,5, 5 ml) y formaldehído (0,547 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h, entonces se trató con NaCNBH₃ (0,547 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Entonces se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna proporcionando el compuesto del título (0,403 mmol, 95%).

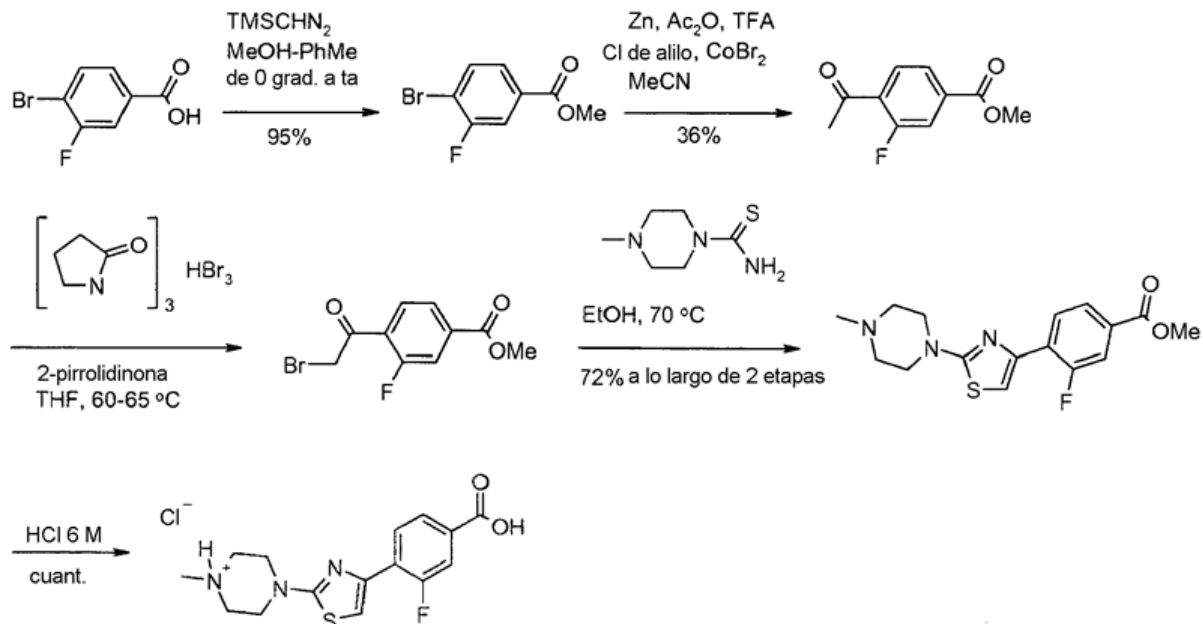
50 EM(ES) m/z 318 (100%, [M+H]⁺).

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Un elemento estructural P3 alternativo

Sal de HCl del ácido 3-fluoro-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)-tiazol-4-il]benzoico

5



Etapa a) 4-bromo-3-fluorobenzoato de metilo

- 10 Se disolvió ácido 4-bromo-3-fluorobenzoico (2,46 g, 11,2 mmol) en MeOH (9 ml) y tolueno (4 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió gota a gota (trimetilsilil)diazometano (11 ml, 2,0 M en hexanos, 22 mmol) hasta que persistió el color amarillo. Se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 40 min. y entonces se concentró a vacío. Se trató de manera similar un segundo lote de ácido carboxílico (2,43 g). Se combinaron los productos brutos de ambos lotes y se sometieron a cromatografía ultrarrápida (sílice, pentano-EtOAc 5/1) dando el éster metílico como sólidos de color blanco (4,92 g, rendimiento del 95%).
- 15

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) delta ppm 7,77 (m, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,64 (m, 1H), 3,93 (s, 3H).

Etapa b) 4-acetoxi-3-fluorobenzoato de metilo

- 20 Se añadieron cloruro de alilo (105 μl , 1,28 mmol) y TFA (20 μl , 0,26 mmol) a una suspensión de polvo de zinc (480 mg, 7,34 mmol) y bromuro de cobalto (II) anhidro (96,6 mg, 0,44 mmol) en MeCN (4 ml), bajo gas inerte. Tras agitar a temperatura ambiente durante 10 min., se añadió el bromuro de arilo (1,003 g, 4,30 mmol) disuelto en 5 ml de MeCN de (a), seguido por anhídrido acético (0,45 ml, 4,79 mmol) y más MeCN (1 ml). Se agitó la mezcla durante la noche, se extinguió con HCl 1 M (20 ml) y entonces se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con NaHCO_3 acuoso saturado (20 ml) y NaCl saturado (2 x 20 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La cromatografía ultrarrápida (sílice, éter de petróleo-EtOAc de 6/1 a 4/1) dio el bromuro recuperado (161,1 mg, 16%) y la cetona deseada (sólidos de color blanco, 305,5 mg, 36%).
- 25

- 30 RMN (CDCl_3) δ ppm: ^1H (400 MHz) 7,94-7,86 (m, 2H), 7,80 (dd, 1H, $J = 11,2, 1,6$ Hz), 3,95 (s, 3H), 2,67 (d, 3H, $J = 4,4$ Hz); ^{19}F (376 MHz) -109,2 (m); ^{13}C (100 MHz) 195,4 (d, $J = 3,7$ Hz), 165,1 (d, $J = 2,2$ Hz), 161,6 (d, $J = 255$ Hz), 135,8 (d, $J = 8,1$ Hz), 130,7 (d, $J = 2,9$ Hz), 129,0 (d, $J = 14$ Hz), 125,2 (d, $J = 3,6$ Hz), 117,9 (d, $J = 26$ Hz), 52,7 (s), 31,4 (d, $J = 7,3$ Hz).

Etapa c) 4-(2-bromoacetoxi)-3-fluorobenzoato de metilo

- 35 Se añadieron THF (10 ml) y 2-pirrolidinona (91 μl , 1,20 mmol) a una mezcla de la cetona de b) (198 mg, 1,01 mmol) y tribromhidrato de pirrolidona (532 mg, 1,07 mmol). Tras calentar a 60-65°C durante 2 h, se concentró la mezcla a vacío y entonces se repartió entre EtOAc (20 ml) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturado (10 ml). Se extrajo la fase acuosa con EtOAc (10 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con NaCl saturado (2x10 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. La cromatografía ultrarrápida (sílice, éter de petróleo-EtOAc 7/1) dio sólidos de color blanco (0,2634 g) que contenían el 84% del bromuro deseado (tal como se determinó mediante integración de picos de $^{19}\text{F-RMN}$).
- 40

RMN (CDCl_3) δ ppm: ^1H (400 MHz) 7,93 (m, 1H), 7,88 (m, 1H), 7,79 (dd, 1H, $J = 11,2, 1,6$ Hz), 4,50 (d, 2H, $J = 2,4$

Hz), 3,94 (s, 3H); ^{19}F (376 MHz) -108,4 (m).

Etapas d) 3-fluoro-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)-tiazol-4-il]benzoato de metilo

5 Se añadió EtOH (5,0 ml) a la bromocetona anterior (193 mg, 0,70 mmol) y amida del ácido 4-metil-piperazin-1-carbotioico (113 mg, 0,71 mmol) y se calentó la mezcla a 70°C durante 2 h y 15 min. Se filtraron los precipitados, se lavaron con EtOH frío y se secaron a vacío y se caracterizaron. Se repitió el procedimiento a una escala mayor para dar 1,75 g de bromocetona (6,36 mmol).

10 RMN ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ 1/1) δ ppm: ^1H (400 MHz) 8,20 (m, 1 H), 7,86 (dd, 1 H, $J = 8,4, 1,6$ Hz), 7,76 (dd, 1H, $J = 11,4, 1,8$ Hz), 7,38 (d, 1 H, $J = 2,4$ Hz), 4,23 (a, 2H), 3,95, (s, 3H), 3,65 (a, 4H), 3,32 (a, 2H), 2,98 (s, 3H); ^{19}F (376 MHz) -114,0 (m). CL-EM $[\text{M}+\text{H}]^+ = 336$.

15 Se combinaron los precipitados de ambas preparaciones y se suspendieron en NaHCO_3 saturado (50 ml). Se extrajo la mezcla con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó (Na_2SO_4) y se evaporó dando el compuesto del título como sólidos cremosos (1,76 g).

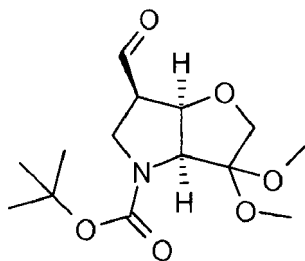
Etapas e) sal de HCl del ácido 3-fluoro-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)-tiazol-4-il]benzoico

20 Se calentó el éster metílico (1,76 g, 5,25 mmol) de (d) a 80°C con HCl 6 M (40 ml) durante 5,5 h. Se añadió más HCl 6 M (10 ml) y se calentó la mezcla a 90°C durante 1 h y 15 min. Tras enfriar, se evaporó entonces la mezcla a vacío y se liofilizó en agua dando el producto final como sólidos cremosos con un rendimiento cuantitativo.

25 RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm: ^1H (400 MHz) 11,60 (a, 1H), 8,18 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,82 (dd, 1 H, $J = 8,4, 1,6$ Hz), 7,72 (dd, 1 H, $J = 12,0, 1,6$ Hz), 7,48 (d, 1 H, $J = 2,8$ Hz), 4,11 (m, 2H), 3,58 (m, 2H), 3,49 (m, 2H), 3,19 (m, 2H), 2,80 (d, 3H, $J = 4,4$ Hz); ^{19}F (376 MHz) -113,5 (m); ^{13}C (100 MHz) 168,9, 166,0, 159,0 (d, $J = 250$ Hz), 143,4, 131,4 (d, $J = 8$ Hz), 129,8, 125,8 (d, $J = 11$ Hz), 125,6, 116,6 (d, $J = 24$ Hz), 111,1 ($J = 15$ Hz), 51,1, 45,0, 41,9. CL-EM $[\text{M}+\text{H}]^+ = 322$.

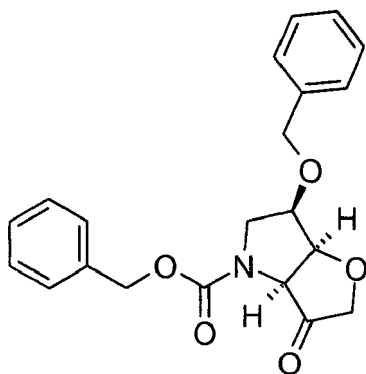
30 EJEMPLO DE REFERENCIA 3

Producto intermedio de 6-aldehído



35 Éster terc-butílico del ácido 6-formil-3,3-dimetoxi-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico

Etapas a

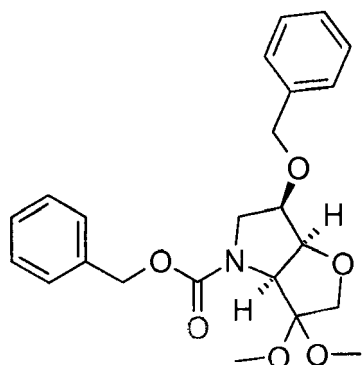


40 Éster bencílico del ácido (3as, 6aS)-6R-benciloxi-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (1a)

45 Se disolvió reactivo de Dess-Martin (12,5 g, 30 mmol) en DCM (250 ml). Se añadió éster bencílico del ácido 6-benciloxi-3-hidroxi-hexahidrofuro[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (preparado tal como se describió en el documento WO

05/066180) (7,4 g, 20 mmol) en DCM (50 ml) a una disolución agitada de oxidante a ta bajo una atmósfera de nitrógeno a lo largo de 45 min. Tras agitar 90 min. adicionales, se consideró que la reacción era completa mediante CCF. Se añadió $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% acuoso (200 ml) y se agitó la mezcla a ta durante otros 15 minutos. Se transfirió el sistema de dos fases a un embudo de decantación y se extrajo dos veces con EtOAc (200 ml y 100 ml respectivamente). Se lavaron las fases orgánicas combinadas una vez con NaHCO_3 acuoso saturado (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se eliminó el disolvente a vacío, proporcionando el producto bruto del compuesto del título como un aceite transparente (7,69 g.); ESI+, m/z: 368 ($\text{M}^+ + 1$).

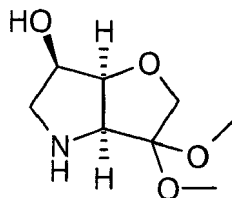
Etapa b



Éster bencílico del ácido (3aS,6aS)-6R-benciloxi-3,3-dimetoxi-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (1b)

Se disolvió el derivado de ceto (1a) (7,6 g) en metanol seco (100 ml). Se añadieron ortoformiato de trimetilo (30 ml) y pTsOH (0,2 g) a ta bajo una atmósfera de nitrógeno. Se calentó la mezcla a 60°C durante 8 horas. Cuando se consideró que la reacción se había completado según CCF, se enfrió hasta ta y se concentró a vacío. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo-heptano (1:4) lo que dio el compuesto del título como un aceite transparente (5,9 g, 71% a lo largo de 2 etapas); ESI+, m/z: 382 ($\text{M}^+ - \text{OMe}$).

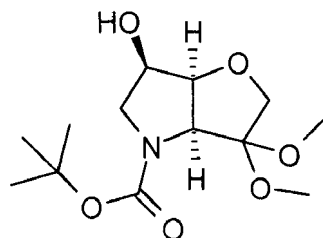
Etapa c



(3aS,6aS)-3,3-Dimetoxi-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-6R-ol (1c)

Se agitó una disolución del compuesto (1b) (2,5 g, 6,4 mmol) en metanol (60 ml) y $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (0,7 g) a ta bajo atmósfera de H_2 durante 48 horas. Cuando se consideró que la reacción se había completado según CCF, se filtró la mezcla y se concentró a vacío proporcionando el compuesto del título bruto como un aceite parduzco (1,15 g); ESI+, m/z: 190 ($\text{M}^+ + 1$).

Etapa d



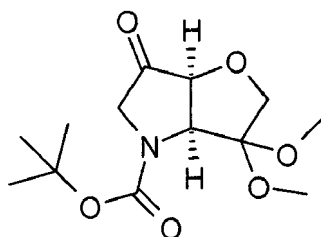
Éster terc-butílico del ácido (3aS, 6aS)-6R-hidroxi-3,3-dimetoxi-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (1d)

Se disolvió 3,3-dimetoxi-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-6-ol (1c) (2,80 g, 14,8 mmol) en 75 ml de una mezcla de dioxano/agua (2:1). Se añadió gota a gota una disolución de Na_2CO_3 al 10% (25 ml) hasta pH 9-9,5. Se enfrió la

- mezcla hasta 0°C en un baño de hielo-agua y se añadió anhídrido de Boc en una porción. Se agitó la reacción a ta durante la noche y se mantuvo el pH de la mezcla a 9-9,5 mediante adición de más disolución al 10% de Na₂CO₃ si era necesario. Se monitorizó la reacción mediante CCF (acetato de etilo:isohexano 50:50). Una vez completada, se filtró la mezcla para eliminar las sales formadas y se evaporó el disolvente a vacío. Se extrajo la mezcla acuosa con 3 x 100 ml de EtOAc, se lavaron las fases orgánicas combinadas con 100 ml de agua y 100 ml salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporó el disolvente a vacío proporcionando 3,79 g del carbamato del título como un aceite transparente (89%), puro al 94% (HPLC), ESI+, m/z: 312 (M⁺+Na).

Etapa e

10

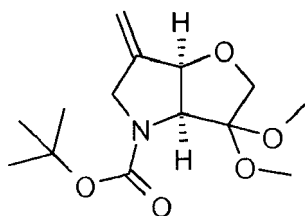


Éster terc-butílico del ácido 3,3-dimetoxi-6-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (1e)

- 15 Al alcohol (1e) (3,674 g, 12,70 mmol) disuelto en DCM (80 ml) se le añadió peryodinano de Dess-Martin (7,00 g, 16,5 mmol) y se agitó la disolución durante 3 h a temperatura ambiente. Entonces se extinguió la reacción mediante la adición de Na₂S₂O₃ al 10% (ac.) (150 ml) y se agitó la suspensión resultante durante 15 minutos. Se transfirió la mezcla a un embudo de decantación y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa tres veces con DCM y posteriormente se lavaron las fases orgánicas combinadas dos veces con disolución de NaHCO₃ sat. y entonces se secaron, filtraron y concentraron. Se purificó el material bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (tolueno/acetato de etilo 3:1) lo que dio el compuesto del título (2,882 g, 79%).

20

Etapa f



25

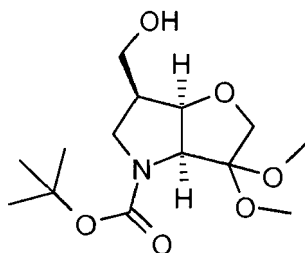
Éster terc-butílico del ácido 3,3-dimetoxi-6-metilen-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (1f)

- 30 Se disolvió el compuesto ceto 1e (1,10 g, 3,83 mmol) en THF seco (30 ml) y se enfrió la disolución hasta 0°C. Se añadió una disolución de bromuro de metiltrifenilfosfonio (4,0 g, 11,2 mmol) y KOtBu (1,17 g, 10,5 mmol) en THF seco (40 ml) en 3 alícuotas con 2 horas de intervalo. Tras 6 h, se vertió la disolución en un embudo de decantación con dietil éter (70 ml) y se extrajo con ácido cítrico al 10% (ac.) (2*40 ml). Se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ acuoso saturado (40 ml), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó el disolvente a vacío. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida (heptano:acetato de etilo 4:1) lo que dio el compuesto del título (524 mg, 48%) ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,48 (s, 9H), 3,27 (s, 3H), 3,40 (d, 3H, J = 16,6), 3,57-3,64 (m, 1H), 3,84 (d, 1H, J = 9,5), 3,92 (d, 1 H, J = 16,3), 4,07-4,25 (m, 1 H), 4,35-4,49 (m, 1H), 4,98 (sa, 1H), 5,22 (d, 1H, J = 16,4), 5,34 (s, 1H).

35

Etapa g

40

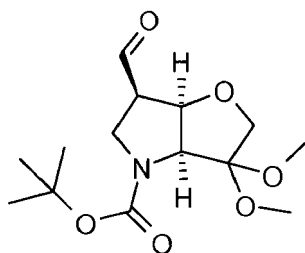


Éster terc-butílico del ácido 6-hidroximetil-3,3-dimetoxi-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (1g)

Se disolvió la olefina 1e (524 mg, 1,84 mmol) en THF seco (70 ml). Se añadió 9-BBN-H (0,5 M en THF) (7,34 ml, 3,67 mmol) y se agitó la disolución durante la noche. Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria y volvió a disolverse en THF (20 ml). Se añadió lentamente MeOH (10 ml) a la disolución y cuando había cesado el desprendimiento de gas, se añadió H₂O (20 ml) a la disolución seguido por NaBO₃. Se filtró la disolución tras haberla agitado durante 18 h y se diluyó el filtrado con EtOAc (70 ml) y se lavó con salmuera (2*50 ml). Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó el disolvente a vacío. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida (heptano:acetato de etilo 2:1) lo que dio el compuesto del título (477 mg, 86%).

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,47 (s, 9H), 2,09-2,25 (m, 2H), 3,02-3,20 (m, 1 H), 3,29 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,65-3,93 (m, 4H), 4,44 (d, 1 H, J = 5,7), 4,70-4,84 (m, 1 H).

Etapa h



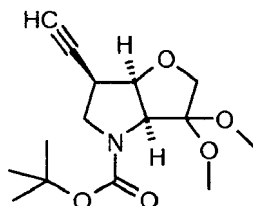
Éster terc-butílico del ácido 6-formil-3,3-dimetoxi-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carboxílico (1h)

A una disolución del alcohol 1g (370 mg, 1,22 mmol) disuelto en DCM seco (10 ml) se le añadió peryodinano de Dess Martin (673 mg, 1,59 mmol). Se agitó la reacción durante 40 minutos y entonces se extinguió mediante adición de 10 ml de Na₂S₂O₃ al 10%:NaHCO₃ (sat.) 1:1. Se diluyó la disolución con DCM (50 ml) y se extrajo con una mezcla 1:1 de Na₂S₂O₃ al 10%: NaHCO₃ (sat.) (50 ml). Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida (heptano:acetato de etilo (2:1) lo que dio el compuesto del título (290 mg, 79%).

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,47 (s, 9H), 2,90-3,06 (m, 1 H), 3,29 (s, 3H), 3,38 (s, 3H), 3,67-3,85 (m, 2H), 3,88-4,55 (m, 3H), 4,93-5,19 (m, 1 H), 9,64* y 9,80* (s, 1H). *Dos picos debido a los rotámeros.

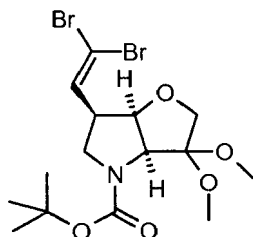
EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Elemento estructural P1 de 6-acetileno



Éster terc-butílico del ácido 6-etinil-3,3-dimetoxi-hexahidro-furo(3,2-b)pirrol-4-carboxílico

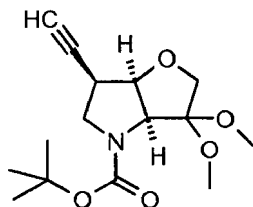
Etapa a)



Se añadió gota a gota el aldehído del ejemplo de referencia 3 (318,3 mg, 1,06 mmol) en 6 ml de diclorometano (DCM) a una disolución de CBr₄ (700 mg, 2,11 mmol) y PPh₃ (1,10 g, 4,19 mmol) en 10 ml de DCM, con enfriamiento en un baño de hielo. Tras agitar a 0°C durante 2 h, se diluyó la mezcla con 30 ml de iso-hexano y entonces se filtró a través de una columna de Celite corta. Se lavó la columna con 20 ml de i-hexano, seguido por i-hexano-DCM 3/1. Se evaporó el filtrado dando sólidos de color amarillo claro. La cromatografía ultrarrápida (sílice, i-

hexano-EtOAc 3/1) dio el compuesto 2 (339,5 mg, rendimiento del 70%). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6,55 (d, 1 H, $J = 8,8$ Hz, $\text{HC}=\text{CBr}_2$), 4,64 (s a, 1 H), 4,42 (d, 1 H, $J = 5,2$ Hz), 4,10-3,90 (m a, 1 H), 3,85-3,65 (m, 2H), 3,37 (s, 3H, OMe), 3,29 (s, 3H, OMe), 3,00 (m, 1H), 2,84 (s a, 1H).

5 Etapa b)



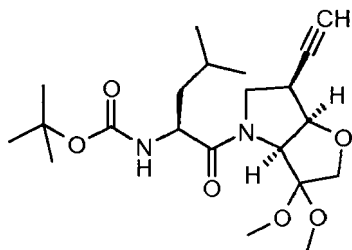
10 Se añadió gota a gota disolución de butil-litio (1,6 M en hexanos, 1,50 ml) a una disolución del dibromoalqueno de la etapa a (327,5 mg, 0,72 mmol) en 13 ml de THF. Tras agitar a -78°C durante 1,75 h, se extinguió la reacción con 3 ml de NH_4Cl acuoso saturado. Se concentró la mezcla de reacción, entonces se repartió entre 30 ml de NaCl acuoso saturado y 30 ml de EtOAc. Se extrajo la fase acuosa con 2 x 30 ml de EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron (Na_2SO_4) y se evaporaron dando un aceite de color amarillo. La cromatografía ultrarrápida (sílice, i-hexano-EtOAc 3/1) dio el compuesto del título como sólidos de color blanco
15 (161,7 mg, rendimiento del 67%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4,67 (s a, 1 H), 4,40 (s a, 1 H), 4,16-4,0 (m a, 1 H), 3,88-3,74 (m, 2H), 3,37 (s, 3H, OMe), 3,29 (s, 3H, OMe), 3,16 (s a, 1 H), 2,81 (s a, 1 H, $\text{HC}-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2,20 (d, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1,47 (s, 9H, tBu).

20 EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Un acoplamiento y desprotección de P1/P2 típicos

25 Etapa a)

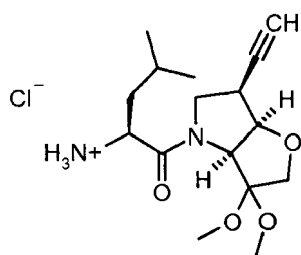


30 Se añadió gota a gota cloruro de acetilo (0,51 ml) a una disolución del alquino terminal del ejemplo de referencia 4 (153 mg, 0,514 mmol) en MeOH (4,6 ml), se enfrió de manera brusca en un baño de hielo. Se agitó la mezcla de reacción a TA durante la noche y entonces se evaporó. Se añadió Boc-Leu-OH- H_2O (145 mg, 0,58 mmol) y se evaporó la mezcla conjuntamente de DMF, entonces volvió a disolverse en 5 ml de DMF y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió DIEA (0,36 ml, 2,1 mmol), seguida por HATU (220 mg, 0,578 mmol). Tras agitar a 0°C durante 15 min., se agitó la mezcla a TA durante 3 h y entonces se concentró. Se disolvió la mezcla en 20 ml de EtOAc, se lavó sucesivamente con NaHCO_3 acuoso saturado (10 ml) y NaCl acuoso saturado (2 x 10 ml), se secó (Na_2SO_4) y se evaporó dando un aceite de color amarillo parduzco. La cromatografía ultrarrápida (sílice, i-hexano-EtOAc 1/1) dio el compuesto del título (213 mg, cuantitativo).
35

HPLC-EM: pico individual, masa 411 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $R_t = 3,15$ min. (gradiente del 5 al 99% de B en 3 min., entonces el 100% de B durante 1,5 min.)

40 Método-Flujo: 0,8 ml/min., UV=210-400 nm, ACE C8 3 x 50 mm; Fase móvil A: NH_4Ac 10 mM en un 90% de H_2O , B: NH_4Ac 10 mM en un 90% de MeCN

45 Etapa b)

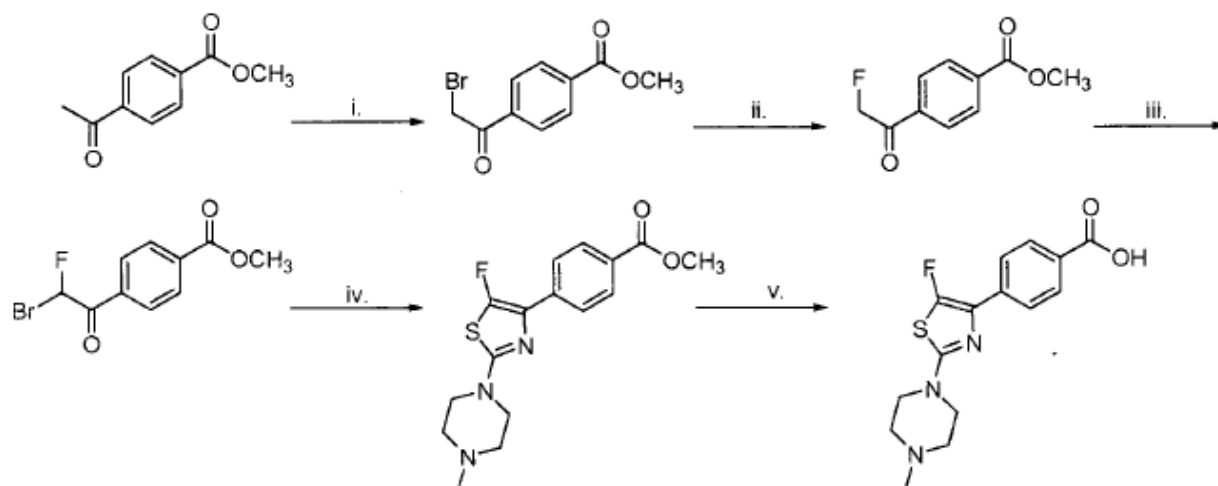


Se realizó la desprotección de Boc del compuesto de la etapa a) (0,514 mmol) como para el ejemplo de referencia 4 anterior dando la sal de HCl del título. Se disolvió la sal en CH_2Cl_2 y se dividió en tres porciones, se evaporaron por separado dando 0,17 mmol por muestra.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

Un elemento estructural P3 alternativo

10



i. AcOH, bromo, TA, 2 h, rendimiento del 55%; ii. KF, acetonitrilo, 18-corona-6, 90°C, 16 h; rendimiento del 31%; iii. AcOH, bromo, 45°C, 4 h, rendimiento del 100%; iv. amida del ácido 4-metil-piperazin-1-carbotioico, Δ , 2 h, rendimiento del 74%; LiOH, TA, 16 h, rendimiento del 100%.

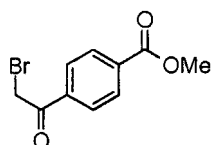
15

Disponibilidad de materiales de partida -

El 4-acetilbenzoato de metilo está disponible de Aldrich; se encontraron 11 proveedores de amida del ácido 4-metil-piperazin-1-carbotioico en SciFinder (quizás el más conveniente es Chem Pur Products Ltd en Alemania).

20

Etapa a) éster metílico del ácido 4-(2-bromo-acetil)-benzoico

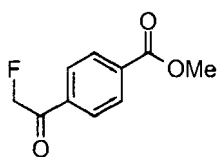


25

A una disolución de éster metílico del ácido 4-acetil-benzoico (8,4 mmol) en ácido acético (20 ml) se le añadió bromo (8,4 mmol). Se agitó la reacción a TA durante 2 h, tiempo a lo largo del cual desapareció el color rojo y se formó un precipitado de color blanquecino. Se recogió el producto mediante filtración y se lavó con metanol/agua fríos (200 ml 1:1) proporcionando un polvo de color blanco (55%). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) 3,98 (3H, s), 4,20 (2H, s), 8,02 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8,18 (2H, d, $J = 8$ Hz).

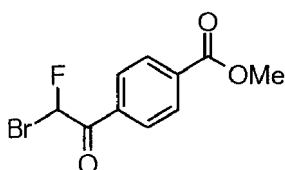
30

Etapa b) éster metílico del ácido 4-(2-fluoro-acetil)-benzoico



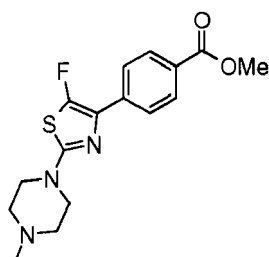
- 5 A una suspensión de fluoruro de potasio (3,11 mmol) en acetonitrilo (1 ml) se le añadió 18-corona-6 (0,1 mmol) y se calentó la reacción a 90°C durante 30 min. Se añadió ácido 4-(2-bromo-acetil)-benzoico (1,56 mmol) y se calentó la reacción a 90°C durante 16 h. Se diluyó la reacción con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se purificó el producto sobre sílice eluyendo con acetato de etilo al 5-15% en iso-hexano proporcionando con concentración a vacío de las fracciones deseadas el producto del título como un sólido de color blanco (31%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) 3,98 (3H, s), 5,55 (2H, d, J = 50 Hz), 7,95 (2H, d, J = 8 Hz), 8,18 (2H, d, J = 8 Hz).

10 Etapa c) éster metílico del ácido 4-(2-bromo-2-fluoro-acetil)-benzoico



- 15 A una suspensión de ácido 4-(2-fluoro-acetil)-benzoico (1,19 mmol) en ácido acético (5 ml) se le añadió bromo (1,19 mmol). Se calentó la reacción a 45°C durante 4 h, tiempo a lo largo del cual se formó una disolución de color verde. Se concentró la reacción a vacío y sometió a destilación azeotrópica dos veces con tolueno proporcionando el compuesto del título como un sólido de color verde (100%). Se usó el producto bruto en la siguiente etapa. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) 3,98 (3H, s), 7,04 (1H, s), 8,05-8,10 (4H, m).

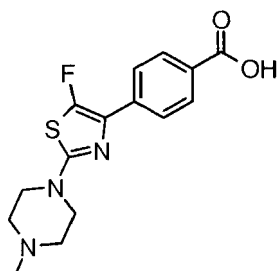
20 Etapa d) éster metílico del ácido 4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzoico



- 25 Se disolvieron éster metílico del ácido 4-(2-bromo-2-fluoro-acetil)-benzoico (1,18 mmol) y amida del ácido 4-metil-piperazin-1-carbotioico (1,18 mmol) en etanol (10 ml). Se calentó la reacción a reflujo durante 2 h. Se enfrió la reacción hasta TA provocando que precipitara el producto. Se recogió el producto mediante filtración y se lavó con etanol frío. Se le dio al producto un tratamiento final con bicarbonato de sodio acuoso proporcionando el compuesto del título como un aceite incoloro (74%). EM (ES+) 337 (M+H, 100%).

30 Etapa f)

Diclorhidrato del ácido 4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzoico

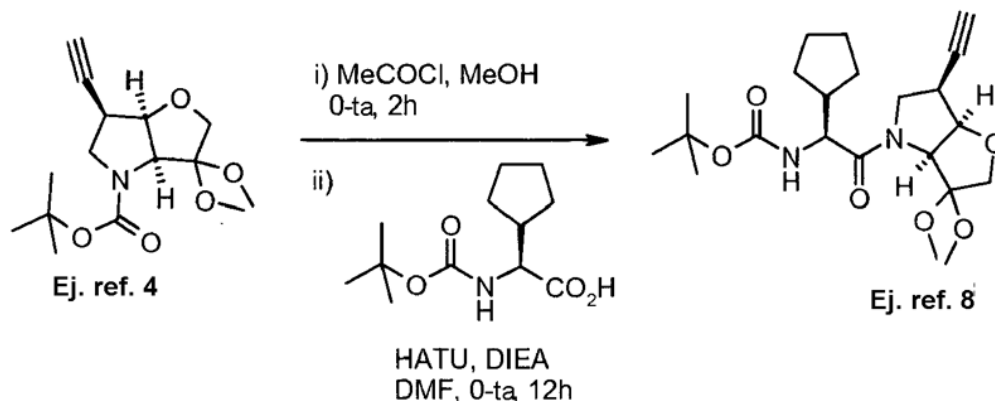


- 35 A una disolución de éster metílico del ácido 4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzoico (0,43 mmol) en tetrahidrofurano/agua (2,5 ml, 4:1) se le añadió hidróxido de litio (0,5 mmol). Se agitó la reacción a TA durante 16 h. Se concentró la reacción a vacío y se añadió ácido clorhídrico (2 N, 3 ml) provocando que precipitara el producto como un sólido de color blanco. Se recogió el producto mediante filtración proporcionando el producto del título

como un sólido de color blanco (79%). EM (ES+) 322 (M+H, 100%).

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

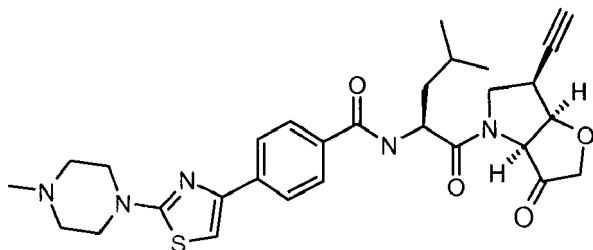
5 Un elemento estructural P1-P2 alternativo



Se llevó a cabo la reacción inicial de manera similar a la notificada para el ejemplo de referencia 5, pero usando en su lugar 4 (0,2 g, 0,67 mmol) en MeOH seco (15 ml) y cloruro de acetilo (0,66 ml) para conseguir el compuesto de amina desprotegido con Boc que entonces se trató con Boc-ciclopentil-glicina (0,17 g, 0,7 mmol) y HATU (0,27 g, 0,7 mmol) y DIEA (0,45 ml, 2,6 mmol) en DMF seco (7 ml) para conseguir el compuesto del título puro [0,195 g, rendimiento del 68%].

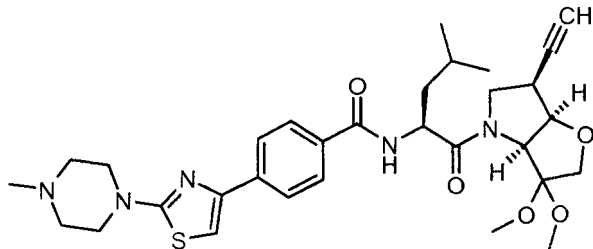
15 Sistema de CCF: EtOAc:éter de pet. 1:1 v/v, $R_f = 0,4$

EJEMPLO 1



20 N-[1-6-(etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)tiazol-4-il]-benzamida

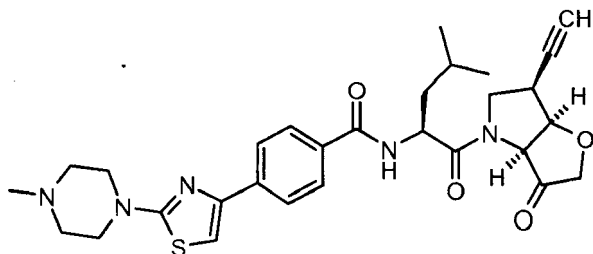
Etapa a)



Se añadió DMF (2 ml) a una mezcla de bromhidrato del ácido 4-[2-(4-metil-1-piperazinil)-4-tiazolil]-benzoico (73,9 mg, 0,19 mmol), el compuesto del ejemplo de referencia 5 (0,17 mmol) y HATU (73,4 mg, 0,19 mmol) con enfriamiento en un baño de hielo. Se añadió DIEA (0,12 ml, 0,69 mmol). Tras agitar a TA durante 2,5 h, se concentró la mezcla, se volvió a disolver en 20 ml de EtOAc y entonces se lavó con 10 ml de NaHCO_3 acuoso saturado. Se extrajo la fase acuosa con 10 ml de EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con NaCl acuoso saturado (2 x 15 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se evaporaron dando el producto bruto. La cromatografía ultrarrápida inicial (sílice 40-63 μm , MeOH al 5-8% en EtOAc) dio material purificado que se sometió a una segunda cromatografía (gel de sílice de YMC 6 nm S-50 μm , MeOH al 1-5% en CH_2Cl_2) dando el compuesto del título como sólidos de color amarillo claro (50,1 mg, rendimiento del 49%).

HPLC-EM: masa 596 [M+H]⁺, pico individual, R_t = 3,18 min. (gradiente del 5 al 99% de B en 3 min., entonces el 100% de B durante 1,5 min.)

5 Etapa b)

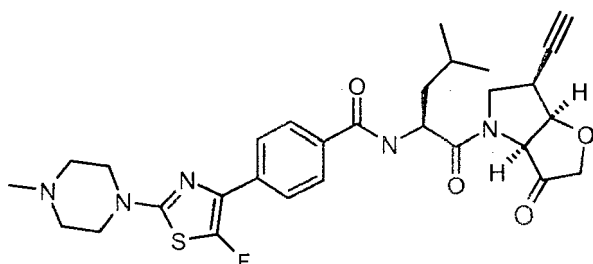


10 Se disolvió el compuesto de la etapa a) (50 mg, 0,0839 mmol) en 10 ml de TFA:H₂O (97,5:2,5) y se agitó durante 4 horas. Se vertió el disolvente en un embudo de decantación, se extrajo con EtOAc y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se purificó el producto bruto mediante HPLC semiprep. En una columna de 5 μm XBridge Phenyl con fases móviles A (H₂O: acetonitrilo 90:10, NH₄Ac 10 mM) y B (H₂O:acetonitrilo 10:90, NH₄Ac 10 mM) que van desde el 25-60% de B. Se obtuvo el producto como un sólido de color blanco con un rendimiento del 62% (29 mg). EMBR (M+H) 550.

15 ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): 0,95 (d, J = 6,4, 3H), 1,03 (d, J = 6,4, 3H), 1,57-2,10 (m 4H), 2,37 (s, 3H), 2,60-2,54 (m, 4H), 3,17-3,26 (m, 1 H), 3,55-3,64 (m, 5H), 4,07 (d, J = 17,1, 1 H), 4,27 (d, J = 17,2, 1H), 4,50 (dd, J = 7,8, 9,9, 1H), 4,77 (d, J = 5,1, 1H), 4,91 (dd, J = 4,6, 4,6, 1 H), 4,97-5,06 (m, 1 H), 6,85-6,91 (m, 2H), 7,79 (d, J = 8,3, 2H), 7,89 (d, J = 8,4, 3H).

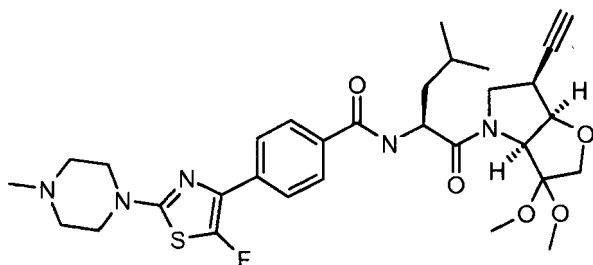
20

EJEMPLO 2



25 N-[1-6-(etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)tiazol-4-il]-benzamida

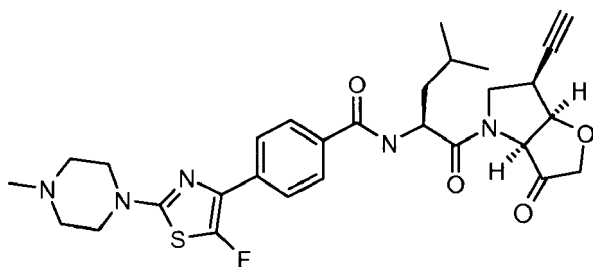
Etapa a)



30

35 Se añadió DMF (1,7 ml) a una mezcla de clorhidrato del ácido 4-[5-fluoro-2-(4-metil-1-piperazinil)-4-tiazolil]-benzoico (68,0 mg, 0,19 mmol), el compuesto del ejemplo de referencia 5 (0,17 mmol) y HATU (73,8 mg, 0,19 mmol) con enfriamiento en un baño de hielo. Se añadió DIEA (0,12 ml, 0,69 mmol). Tras agitar a TA durante 2,75 h, se trató la mezcla con para el ejemplo 1 dando el análogo de fluorotiazol bruto. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice de YMC, MeOH al 1-3% en CH₂Cl₂) dio el compuesto del título como sólidos de color amarillo claro (62,8 mg, rendimiento del 60%).

40 HPLC-EM: masa 614 [M+H]⁺, pico individual en UV, R_t = 3,39 min. (gradiente del 5 al 99% de B en 3 min., entonces el 100% de B durante 1,5 min.)

Etapa b)

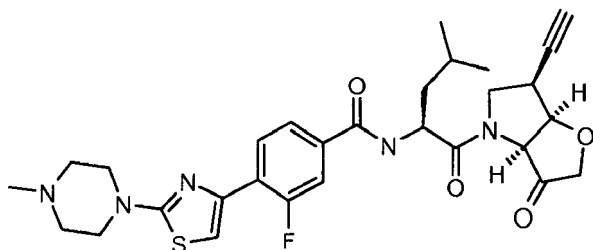
5

Se disolvió el compuesto de la etapa a) (63 mg, 0,102 mmol) en 10 ml de TFA:H₂O (97,5:2,5) y se agitó durante 4 horas. Se vertió el disolvente en un embudo de decantación, se extrajo con EtOAc y se lavó con NaHCO₃ (ac.) sat. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se purificó el producto bruto mediante HPLC semiprep. en una columna de 5 μ m XBridge Phenyl con fases móviles A (H₂O:acetonitrilo 90:10, NH₄Ac 10 mM) y B (H₂O:acetonitrilo 10:90, NH₄Ac 10 mM) que van desde el 25-60% de B. Se obtuvo el producto como un sólido de color blanco con un rendimiento del 46% (26 mg). EMBR (M+H) 568.

10

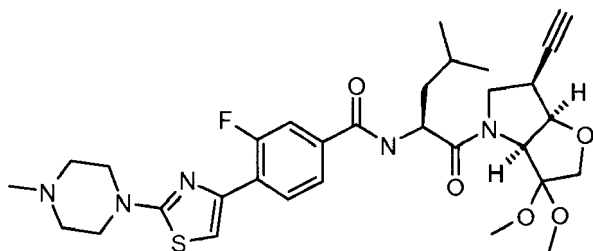
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): 0,95 (d, *J* = 6,4, 3H), 1,03 (d, *J* = 6,4, 3H), 1,58-2,15 (m, 4H), 2,37 (s, 3H), 2,61-2,48 (m, 4H), 3,18-3,25 (m, 1 H), 3,53-3,42 (m, 4H), 3,60 (t, *J* = 10,5, 1 H), 4,07 (d, *J* = 17,1, 1 H), 4,27 (d, *J* = 17,2, 1 H), 4,56-4,46 (m, 1 H), 4,91 (t, *J* = 4,5, 1 H), 4,96-5,06 (m, 1 H), 6,87 (d, *J* = 8,2, 1 H), 7,81 (d, *J* = 8,4, 2H), 7,90 (t, *J* = 9,4, 2H).

15

EJEMPLO 3

20

N-[1-6-(etnil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-carbonil)-3-metil-butil]-3-fluoro-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)tiazol-4-il]-benzamida

25 Etapa a)

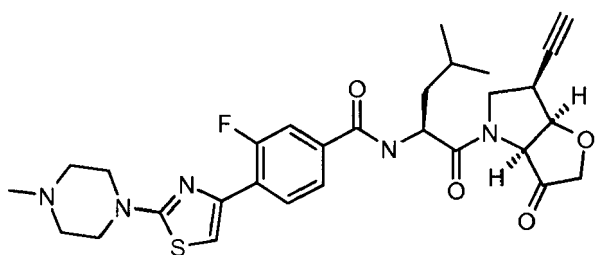
30

Se añadió DMF (1,7 ml) a una mezcla de clorhidrato del ácido 3-fluoro-4-[2-(4-metil-1-piperazinil)-4-tiazolil]-benzoico (68,9 mg, 0,19 mmol), el compuesto del ejemplo de referencia 5 (0,17 mmol) y HATU (80 mg, 0,21 mmol) con enfriamiento en un baño de hielo. Se añadió DIEA (0,12 ml, 0,69 mmol). Tras agitar a TA durante 3 h, se concentró la mezcla, volvió a disolverse en 30 ml de EtOAc, se lavó sucesivamente con 15 ml de NaHCO₃ acuoso saturado y entonces con 30 ml de NaCl acuoso saturado. Se secó la fase orgánica (Na₂SO₄) y entonces se evaporó. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice de YMC, MeOH al 1-3% en CH₂Cl₂) dio el compuesto del título como sólidos de color blanquecino (72,4 mg, rendimiento del 70%).

35

HPLC-EM: masa 614 [M+H]⁺, R_t = 3,46 min. (gradiente del 5 al 99% de B en 3 min., entonces el 100% de B durante 1,5 min.)

40 Etapa b)



Se agitó el cetal de la etapa a) (67 mg, 0,11 mmol) con 1,10 ml de TFA-H₂O 97,5/2,5 (v/v) durante 2 h y entonces se concentró. Se diluyó la mezcla con EtOAc (10 ml), se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (5 ml), seguido por NaCl acuoso saturado (2 x 5 ml), se secó (Na₂SO₄) y se evaporó. Se disolvió el material bruto en 2 ml de MeCN y 1 ml de H₂O y se purificaron 0,9 ml de esta disolución mediante HPLC prep. dando la cetona del compuesto del título como sólidos de color blanco (8,2 mg).

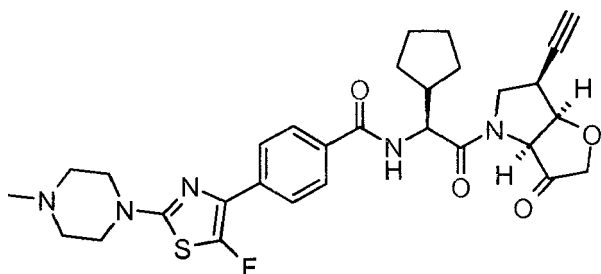
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) 2 rotámetros δ 8,22 (m, 1 H, Ph), 7,63-7,55 (m, 2H, Ph), 7,21 (m, 1 H, tiazol), mayoritario 6,91 y minoritario 6,87 (d, 1H, J = 8,0 y 7,5 Hz, NHC=O), minoritario 5,05 y mayoritario 5,00 (m, 1H), 4,93 (m, 1H), 4,79 (d, 1 H, J = 5,0 Hz), 4,48 (dd, 1 H, J = 10,2, 7,7 Hz), 4,28 y 4,09 (ABq, 1 H cada uno), 3,64-3,59 (m, 5H), 3,23 (m, 1H, HC-C≡CH), 2,58 (m, 4H), 2,38 (s, 3H, NMe), 2,35 (d, 1H, J = 2,0 Hz, C≡CH), 1,78-1,59 (m, 3H), 1,04 (d, 3H, J = 6,0 Hz), 0,96 (d, 3H, J = 6,5 Hz).

CL-UV/EM: masa molecular monoisotópica 567,2 Da, pureza del 97,6%

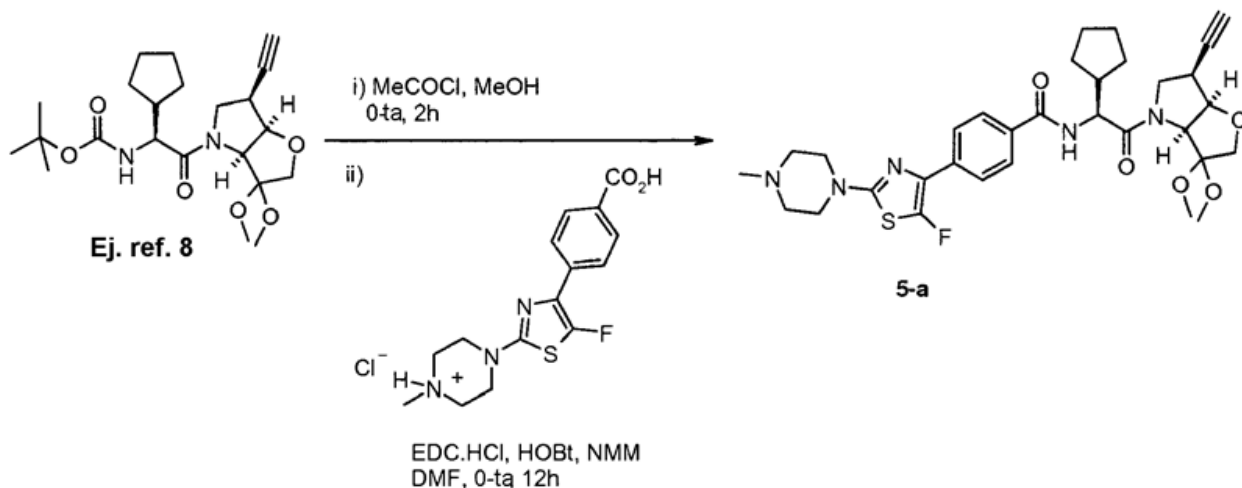
(Columna: ACE C₈ 50 x 3,0 mm, partículas de 3 μm; fases móviles A: NH₄Ac 10 mM, B: NH₄Ac 10 mM en un 90% de MeCN; gradiente: el 20-100% de B en 10 min. seguido por un lavado durante 2 min. a 100%; flujo: 0,8 ml/min., Detección: UV a 210-400 nm y ESI-EM)

EJEMPLO 5

N-[1-(6-etinil-3-oxo-hexahidro-furo[3,2-b]pirrol-4-il)-1-ciclopentil-2-oxo-etil]-4-[5-fluoro-2-(4-metil-piperazin-1-il)-tiazol-4-il]-benzamida



Etapa a)



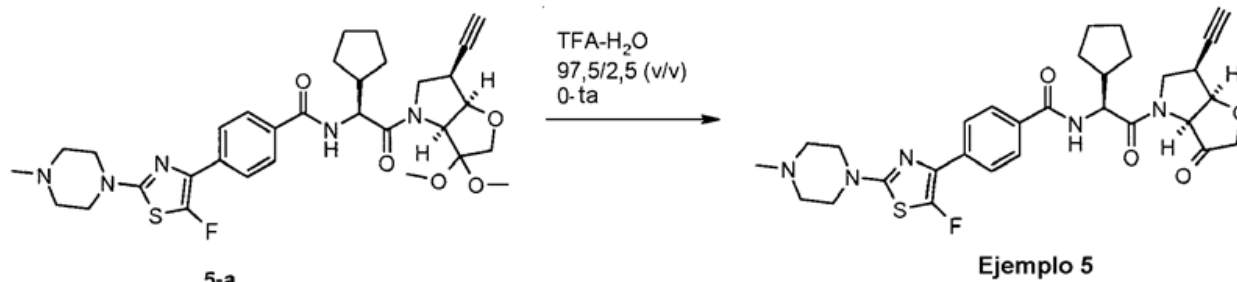
Se llevó a cabo la reacción de manera similar a la notificada en el caso del ejemplo 3 pero usando el elemento

estructural P1-P2 del ejemplo de referencia 8 (0,14 g, 0,33 mmol) en MeOH seco (15 ml) y se usó cloruro de acetilo (0,5 ml) para obtener la amina desprotegida con Boc que se trató adicionalmente con la sal de HCl (0,132 g, 0,33 mmol), HOBt (0,04 g, 0,3 mmol), EDC.HCl (0,117 g, 0,61 mmol) y NMM (0,11 ml, 1,0 mmol) en DMF seco (10 ml) para obtener el compuesto puro 5-a [0,05 g, rendimiento del 26%].

5

Sistema de CCF: CHCl₃: MeOH 9,5:0,5 v/v, R_f= 0,25.

Etapa b)



10

Se realizó la desprotección del cetal 5-a (40,5 mg, 0,065 mmol) para dar la cetona del título como para el compuesto 3 usando 0,65 ml de la disolución de TFA-agua, con reacción a ta durante 2 h y 15 min. La purificación mediante HPLC prep. dio 11 como sólidos de color amarillo pálido (14,75 mg).

15

CL-UV/EM Rt = 5,3 y 6,0 min., (hidrato y cetona), puro al 96,7%, masa molecular monoisotópica 579,2 Da (Método-Flujo 0,8 ml/min.; UV=210-400 nm y ESI-EM; Fenomenex Gemini-NX C18 50 x 3,0 mm, partículas de 3 μm; fases móviles A: NH₄Ac 5 mM, B: NH₄Ac 5 mM en MeCN, gradiente del 20-99% de B en 10 min. seguido por un lavado durante 2 min. al 100% de B)

20

EJEMPLOS BIOLÓGICOS

Determinación de la actividad catalítica proteolítica de catepsina K

25 Se llevan a cabo ensayos convenientes para catepsina K usando enzima recombinante humana, tal como la descrita en PDB.

Patrón iD BC016058; ARNm; HUM; 1699 PB.

30 Catepsina K de *Homo sapiens* DE (picnodisostosis), ARNm (clon de ADNc MGC:23107)

RX MEDLINE; RX PUBMED; 12477932.

DR RZPD; IRALp962G1234.

35

DR SWISS-PROT; P43235;

La catepsina K recombinante puede expresarse en una variedad de sistemas expresión disponibles comercialmente incluyendo sistemas de *E coli*, *Pichia* y *Baculovirus*. La enzima purificada se activa mediante la eliminación de la prosecuencia mediante métodos convencionales.

40

Las condiciones de ensayo habituales para la determinación de constantes cinéticas usaron un sustrato peptídico fluorogénico, normalmente H-D-Ala-Leu-Lys-AMC, y se determinaron o bien en Mes/Tris 100 mM, pH 7,0 que contenía EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM o fosfato de Na 100 mM, EDTA 1 mM, PEG4000 al 0,1% pH 6,5 o bien acetato de Na 100 mM, pH 5,5 que contenía EDTA 5 mM y cisteína 20 mM, en cada caso opcionalmente con DTT 1 M como estabilizador. La concentración enzimática usada era de 5 nM. Se preparó la disolución madre de sustrato a 10 mM en DMSO. Se llevaron a cabo exámenes a una concentración de sustrato fijada de 60 μM y estudios cinéticos detallados con diluciones a la mitad de sustrato a partir de 250 μM. La concentración de DMSO total en el ensayo se mantuvo por debajo del 3%. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiental. Se monitorizó la fluorescencia del producto (excitación a 390 nm, emisión a 460 nm) con un lector de placas fluorescente Fluoroskan Ascent de Labsystems. Se generaron curvas de progreso de producto a lo largo de 15 minutos tras la generación del producto de AMC.

45

50

Determinación de Ki de catepsina S

55

El ensayo usa catepsina S humana expresada en baculovirus y el sustrato fluorescente boc-Val-Leu-Lys-AMC

disponible de Bachem en un formato de placa de 384 pocillos, en el que pueden someterse a prueba 7 compuestos de prueba en paralelo con un control positivo que comprende un comparador de inhibidor de catepsina S conocido.

Diluciones de sustrato

5 Se añaden 280 μl /pocillo de DMSO al 12,5% a las filas B-H de dos columnas de una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos. Se añaden 70 μl /pocillo de sustrato a la fila A. Se añaden 2 x 250 μl /pocillo de tampón de ensayo (fosfato de Na 100 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5) a la fila A, se mezclan y se diluyen a la mitad en la placa hasta la fila H.

Diluciones de inhibidor

10 Se añaden 100 μl /pocillo de tampón de ensayo a las columnas 2-5 y 7-12 de 4 filas de una placa de polipropileno de fondo en V de 96 pocillos. Se añaden 200 μl /pocillo de tampón de ensayo a las columnas 1 y 6.

15 Se añade el primer compuesto de prueba preparado en DMSO a la columna 1 de la fila superior, normalmente a un volumen para proporcionar entre 10 y 30 veces la K_i aproximada determinada inicialmente. Se calcula la K_i aproximada a partir de una ejecución preliminar en la que se dispensan 10 μl /pocillo de boc-VLK-AMC 1 mM (dilución 1/10 de disolución madre 10 mM en DMSO diluido en tampón de ensayo) a las filas B a H y 20 μl /pocillo a la fila A de una placa Microfluor™ de 96 pocillos. Se añaden 2 μl de cada compuesto de prueba 10 mM a un pocillo separado en la fila A, columnas 1-10. Añadir 90 μl de tampón de ensayo que contiene DTT 1 mM y catepsina S 2 nM a cada pocillo de las filas B-H y 180 μl a la fila A. Mezclar la fila A usando una pipeta de múltiples canales y diluir a la mitad hasta la fila G. Mezclar la fila H y leer en el espectrofotómetro de fluorescencia. Las lecturas son datos de Prism ajustados a la ecuación de inhibición competitiva, parámetro $S = 100 \mu\text{M}$ y $K_M = 100 \mu\text{M}$ para obtener una estimación de la K_i , hasta un máximo de 100 μM .

20 Se añade el segundo compuesto de prueba a la columna 6 de la fila superior, el tercero a la columna 1 de la segunda fila etc. Añadir 1 μl de comparador a la columna 6 de la fila inferior. Mezclar la columna 1 y diluir a la mitad hasta la columna 5. Mezclar la columna 6 y diluir a la mitad hasta la columna 10.

30 Usando una pipeta múltiple de 8 canales ajustada a 5 x 10 μl , distribuir 10 μl /pocillo de sustrato a la placa de ensayo de 384 pocillos. Distribuir la primera columna de la placa de dilución de sustrato a todas las columnas de la placa de ensayo empezando en la fila A. La separación de las puntas de la pipeta multicanal saltará correctamente las filas alternas. Distribuir la segunda columna a todas las columnas empezando en la fila B.

35 Usando una pipeta múltiple de 12 canales ajustada 4 x 10 μl , distribuir 10 μl /pocillo de inhibidor a la placa de ensayo de 384 pocillos. Distribuir la primera fila de la placa de dilución de inhibidor a las filas alternas de la placa de ensayo empezando en la A1. La separación de las puntas de la pipeta multicanal saltará correctamente las columnas alternas. De manera similar, distribuir la segunda, tercera y cuarta fila a las filas y columnas alternas empezando en A2, B1 y B2 respectivamente.

40 Mezclar 20 ml de tampón de ensayo y 20 μl de DTT 1 M. Añadir suficiente catepsina S para dar una concentración final de 2 nM.

45 Usando un distribuidor tal como un Multidrop 384, añadir 30 μl /pocillo a todos los pocillos de la placa de ensayo y leer en un espectrofotómetro de fluorescencia tal como un Ascent.

50 Las lecturas de fluorescencia, (longitudes de onda de excitación y emisión 390 nm y 460 nm respectivamente, fijadas usando filtros de paso de banda) que reflejan el grado de escisión enzimática del sustrato fluorescente, a pesar del inhibidor, son tasas lineales ajustadas para cada pocillo.

Las tasas ajustadas para todos los pocillos para cada inhibidor se ajustan a la ecuación de inhibición competitiva usando SigmaPlot 2000 para determinar los valores de V , K_M y K_i .

55 *K_i de catepsina L*

Se usa el procedimiento anterior con las siguientes modificaciones para la determinación de K_i para catepsina L.

60 La enzima está disponible comercialmente a partir de catepsina L humana (por ejemplo Calbiochem). El sustrato es H-DVal-Leu-Lys-AMC disponible de Bachem. El tampón de ensayo es acetato de sodio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 5,5). Se diluye la disolución madre de DMSO (10 mM en un 100% de DMSO) hasta el 10% en tampón de ensayo. Se prepara enzima a una concentración 5 nM en tampón de ensayo más ditiotreitól 1 mM justo antes de su uso. Se dispensan 2 μl de inhibidor 10 mM constituido en un 100% de DMSO en la fila A. 10 μl de sustrato 50 μM (=dilución 1/200 de disolución madre 10 mM en DMSO, diluido en tampón de ensayo).

65

Estudios de inhibición

Se examinan posibles inhibidores usando el ensayo anterior con concentraciones variables de compuesto de prueba. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de enzima a disoluciones tampones de sustrato e inhibidor.
 5 Se calcularon los valores de K_i según la ecuación 1.

$$v_0 = \frac{VS}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S} \quad (1)$$

10 en la que V_0 es la velocidad de la reacción, V es la velocidad máxima, S es la concentración de sustrato con la constante de Michaelis de K_M , e I es la concentración de inhibidor.

Los resultados se presentan como:

- 15 A menos de 50 nanomolar
- B 50-500 nanomolar
- C 501-1000 nanomolar
- 20 D 1001-5000 nanomolar
- E 5001-10000 nanomolar
- F en exceso de 10000 nanomolar

25 Tabla 1

Ejemplo	Número de prueba	K_i de catepsina K	K_i de catepsina S	K_i de catepsina L
1	Prueba 1	A	F	D
2	Prueba 1	A	F	D
3	Prueba 1	A	F	C
1	Prueba 2	1,6 nM	25000 nM	2000 nM
2	Prueba 2	1,1 nM	21000 nM	1700 nM
3	Prueba 2	4 nM	22000 nm	1400 nM
5	-	0.6 nM	2900 nM	1170 nm
Ej. ref. 9	-	2.6 nM	6100 nM	NA

30 Por tanto, los compuestos de fórmula II son potentes inhibidores de catepsina K y aún son selectivos con respecto a la catepsina S y L estrechamente relacionadas. El compuesto del ejemplo de referencia 9 proporciona la confianza de que los compuestos de difluorovinilo correspondientes también son activos y selectivos.

Estabilidad metabólica

35 Se sometieron a prueba compuestos de la invención y los ejemplos comparativos indicados para determinar la estabilidad metabólica en un ensayo de citosol en el que se incubaron los compuestos con fracciones de citosol hepático humano disponible comercialmente y se monitorizó la desaparición del compuesto mediante HPLC o CL/EM. Es menos probable que las fracciones de citosol de hígado humanas combinadas representen individuos de resultados atípicos que la sangre de un único individuo y pueden almacenarse congeladas, a diferencia de la sangre completa. Por tanto, el ensayo de citosol proporciona así un banco de pruebas de ensayo constante como guía para
 40 determinar la estabilidad de un compuesto en el entorno *in vivo*, tal como cuando se expone a sangre completa.

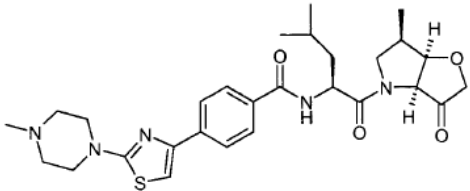
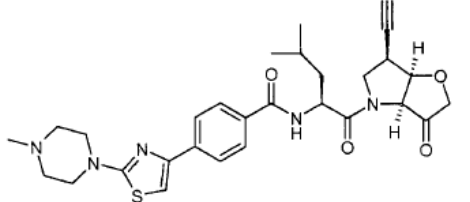
Resumidamente, se incuban compuestos de prueba (2 μ M) en citosol de hígado humano combinado (Xenotech LLC Lenexa EE.UU., proteína 1 mg/ml en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4) a 37° grados centígrados a lo largo de un periodo de una hora. Se inician las incubaciones mediante la adición de cofactor NADPH 1 mM. Se tomaron
 45 submuestras en el tiempo a 0, 20, 40 y 60 minutos y “precipitaron por choque” mediante la adición de 3 volúmenes de acetonitrilo helado. Se centrifugaron las muestras a temperatura reducida y se separaron los sobrenadantes y se

analizaron mediante CL-EM-EM.

Alternativamente, se lleva a cabo un ensayo de estabilidad análogo en sangre completa de ser humano o de mono y/o microsomas de hígado disponibles comercialmente, tales como XEN 025.

5

Tabla 2

Ejemplo	Estructura	CLint de sangre completa ul/min./mg	CLint de HLM ul/min./mg
Ejemplo comparativo		9	49
Ejemplo 1		3	16

El ejemplo comparativo 1 representa un compuesto que porta un enlace carbono-carbono en la posición 6 dentro del alcance del documento WO 2008/007107 citado anteriormente. Se preparó de una manera fácil a partir del compuesto 1d (esquema 1). Por tanto, teniendo el alqueno exocíclico 1d, la hidrogenación estereoselectiva del alqueno con catalizador de Adams (dióxido de platino) en acetato de etilo bajo una atmósfera de hidrógeno avanzó con adición syn de hidrógeno. Esta hidrogenación proporcionó esencialmente un producto, concretamente el isómero de metilo C-6 (CL-EM [M+H] = 288 hallado) con estereoquímica R con buen rendimiento. La selectividad facial observada en este caso para la etapa de hidrogenación es similar a la notificada previamente en la bibliografía para una estructura bicíclica estrechamente relacionada (Srinivas *et al*, Synlett, 1999, 555-556). Se desprotegió el elemento estructural así preparado, se alargó y se oxidó para dar la forma activa ceto como para los compuestos de la invención mostrados a modo de ejemplo anteriormente.

Será evidente a partir del ejemplo comparativo 1 que un grupo metilo en la posición 6 proporciona un compuesto con un valor de CLint de sangre completa de 9 microgramos/minuto/mg, que representa una semivida en sangre completa estimada de poco más de una hora. Por el contrario, el acetileno proporcionó un valor de CLint de 3, que representa una semivida en sangre completa calculada que se aproxima a las 4 horas. Obsérvese también que los aclaramientos de microsomas HLM (que representan la contribución del hígado al metabolismo de los compuestos respectivos) son significativamente superiores para la especie de 6-metilo que para el compuesto de la invención, lo que acentuará adicionalmente la mejor estabilidad de la presente invención. La estabilidad mejorada *in vivo* permite una mejor distribución del compuesto en el organismo a lo largo de todo el día, a pesar de la dosificación una vez al día o dos veces al día. Esto es particularmente importante para indicaciones tales como osteoporosis en las que la variación diurna es significativa.

30 Permeabilidad

Este experimento mide el transporte de inhibidores a través de las células del canal gastroentérico humano. El ensayo usa células Caco-2 bien conocidas con un número de pase de entre 40 y 60.

35 Transporte apical a basolateral

Generalmente, cada compuesto se someterá a prueba en 2-4 pocillos. Los pocillos basolaterales y apicales contendrán 1,5 ml y 0,4 ml de tampón de transporte (TB), respectivamente, y la concentración patrón de las sustancias sometidas a prueba es de 10 μ M. Además, todas las disoluciones de prueba y tampones contendrán DMSO al 1%. Antes del experimento se cubren previamente las placas de transporte con medio de cultivo que contiene suero al 10% durante 30 minutos para evitar la unión inespecífica al material de plástico. Después de 21 a 28 días en cultivo sobre soportes de filtro, las células están listas para experimentos de permeabilidad.

La placa de transporte n.º 1 comprende 3 filas de 4 pocillos cada una. La fila 1 se indica como lavado, la fila 2 "30 minutos" y la fila 3 "60 minutos". La placa de transporte n.º 2 comprende 3 filas de 4 pocillos, una fila 4 indicada "90 minutos", fila 5 "120 minutos" y las demás filas sin asignar.

Se elimina el medio de cultivo de los pocillos apicales y se transfieren los insertos a una fila de lavado (n.º 1) en una placa de transporte (placa n.º 1) de 2 placas sin insertos, que ya se habían preparado con 1,5 ml de tampón de transporte (HBSS, HEPES 25 mM, pH 7,4) en la filas 1 a 5. En el examen A→B, el TB en el pocillo basolateral también contiene albúmina sérica bovina 1%.

5 Se añaden 0,5 ml de tampón de transporte (HBSS, MES 25 mM, pH 6,5) a los insertos y se equilibran las monocapas celulares en el sistema de tampón de transporte durante 30 minutos a 37°C en un agitador Polimix. Tras equilibrarse al sistema de tampón, se mide el valor de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en cada pocillo mediante un instrumento de “palillos” de EVOM. Los valores TEER están habitualmente entre 400 y 1000 Ω por pocillo (dependiendo del número de pases usado).

10 Se elimina el tampón de transporte (TB, pH 6,5) del lado apical y se transfiere el inserto a la fila de 30 minutos (n.º 2) y se añaden 425 µl de TB (pH 6,5) nuevo, incluyendo la sustancia de prueba al pocillo apical (donador). Se incuban las placas en un agitador Polimix a 37°C con un velocidad de agitación baja de aproximadamente 150 a 300 rpm.

15 Tras 30 minutos de incubación en la fila 2, se desplazarán los insertos a nuevos pocillos basolaterales (receptores) calentados previamente cada 30 minutos; fila 3 (60 minutos), 4 (90 minutos) y 5 (120 minutos).

20 Se tomarán muestras de 25 µl de la disolución apical tras ~2 minutos y al final del experimento. Estas muestras representan muestras de donadores del inicio y del final del experimento.

25 Se tomarán 300 µl de los pocillos basolaterales (receptores) a cada punto de tiempo programado y se mide el valor posterior de TEER al final del experimento. Se añadirá acetonitrilo a todas las muestras recogidas hasta una concentración final del 50% en las muestras. Las muestras recogidas se almacenarán a -20°C hasta el análisis mediante HPLC o CL-EM.

Transporte basolateral a apical

30 Generalmente, cada compuesto se someterá a prueba en 2-4 pocillos. Los pocillos basolaterales y apicales contendrán 1,5 ml y 0,4 ml de TB, respectivamente, y la concentración patrón de las sustancias sometidas a prueba es de 10 µM. Además, todas las disoluciones de prueba y tampones contendrán DMSO al 1%. Antes del experimento se cubren previamente las placas de transporte con medio de cultivo que contiene suero al 10% durante 30 minutos para evitar la unión inespecífica al material de plástico.

35 Después de 21 a 28 días en cultivo sobre soportes de filtro, las células están listas para experimentos de permeabilidad. Se eliminan los medios de cultivo de los pocillos apicales y se transfieren los insertos a una fila de lavado (n.º 1) en una nueva placa sin insertos (placa de transporte).

40 La placa de transporte comprende 3 filas de 4 pocillos. La fila 1 se indica como “lavado” y la fila 3 es la “fila experimental”. La placa de transporte se ha preparado previamente con 1,5 ml de TB (pH 7,4) en la fila de lavado n.º 1 y con 1,55 ml de TB (pH 7,4), incluyendo la sustancia de prueba, en la fila experimental n.º 3 (lado donador).

45 Se añaden 0,5 ml de tampón de transporte (HBSS, MES 25 mM, pH 6,5) a los insertos en la fila n.º 1 y se equilibran las monocapas celulares en el sistema de tampón de transporte durante 30 minutos, 37°C en un agitador Polimix. Tras equilibrarse al sistema de tampón, se mide el valor de TEER en cada pocillo mediante un instrumento de “palillos” de EVOM.

50 Se elimina el tampón de transporte (TB, pH 6,5) del lado apical y se transfiere el inserto a la fila 3 y se añaden 400 µl de TB nuevo, pH 6,5 a los insertos. Tras 30 minutos se retiran 250 µl del pocillo apical (receptor) y se sustituyen por tampón de transporte nuevo. Después de eso, se retiran 250 µl de muestras y se sustituyen por tampón de transporte nuevo cada 30 minutos hasta el final del experimento a los 120 minutos, y finalmente se mide un valor posterior de TEER al final del experimento. Se tomarán 25 µl de muestras del compartimento basolateral (donador) tras -2 minutos y al final del experimento. Estas muestras representan muestras de donadores del inicio y del final del experimento.

55 Se añadirá acetonitrilo a todas las muestras recogidas hasta una concentración final del 50% en las muestras. Las muestras recogidas se almacenarán a -20°C hasta el análisis mediante HPLC o CL-EM.

Cálculos

60 Determinación de la fracción acumulativa absorbida, FA_{cum} , frente al tiempo. FA_{cum} se calcula partir de:

$$FA_{cum} = \sum \frac{C_{RI}}{C_{DI}}$$

En la que C_{Ri} es la concentración en el receptor al final del intervalo i y C_{Di} es la concentración en el donador al principio del intervalo i . Debe obtenerse una relación lineal.

- 5 La determinación de coeficientes de permeabilidad (P_{app} , cm/s) se calcula a partir de:

$$P_{app} = \frac{(k \cdot V_R)}{(A \cdot 60)}$$

- 10 en la que k es la tasa de transporte (min^{-1}) definida como la pendiente obtenida mediante regresión lineal de la fracción acumulativa absorbida (FA_{cum}) como función del tiempo (min), V_R es el volumen en la cámara de receptor (ml) y A es el área del filtro (cm^2).

Compuestos de referencia

Categoría de absorción en el hombre	Marcadores	% de absorción en el hombre
TRANSPORTE PASIVO		
Bajo (0-20%)	Manitol	16
	Metotrexato	20
Moderado (21-75%)	Aciclovir	30
Alto (76-100%)	Propranolol	90
	Cafeína	100
TRANSPORTE ACTIVO		
Transportador de aminoácidos	L-Fenilalanina	100
FLUJO DE SALIDA ACTIVO		
PGP-MDR1	Digoxina	30

- 15 La mayor permeabilidad a través del tejido gastrointestinal es ventajosa ya que permite el uso de una dosis más pequeña para lograr niveles similares de exposición con respecto a un compuesto menos permeable administrado a una dosis más alta. Una dosis baja es ventajosa ya que minimiza el coste de los productos para una dosis diaria, lo que es un parámetro crucial en un fármaco que se toma durante periodos de tiempo prolongados.

- 20 El compuesto del ejemplo 2 mostró un valor de P_{app} de $9,1 \times 10^{-6}$ cm/s en el ensayo de Caco-2, mientras que el compuesto de la técnica anterior del ejemplo 2 del documento WO 2008/007107 mostró un valor de P_{app} de $2,7 \times 10^{-6}$ cm/s en una ejecución de ensayo paralela. En este sistema de ensayo podría decirse que el compuesto de la técnica anterior N-((S)-1-((3aS,6R,6aS)-6-metoxi-oxodihidro-2H-furo[3,2-b]pirrol-4(5H,6H,6aH)-il)-4-metil-oxopentan-2-il)-4-(2-(4-metilpiperazin-1-il)tiazol-4-il)benzamida que se menciona en la página 33 del documento WO 25 2008/007107 (pero cuya preparación no se da a conocer) muestra un valor de P_{app} de $0,9 \times 10^{-6}$ cm/s.

- 30 Como regla general, un valor de P_{app} de alrededor de 2 representa una absorción *in vivo* de solo el 10-30% mientras que un valor de P_{app} que se aproxima a 10 representará generalmente absorción completa.

- 35 La diferencia sustancial en los valores de P_{app} entre el ejemplo 2 y el ejemplo 2 de la técnica anterior mencionado anteriormente del documento WO 2008/007107 se correlaciona bien con experimentos de PK en ratón *in vivo*, tal como se ilustra en la figura 1. Los respectivos compuestos se administraron por vía oral (60 $\mu\text{mol/kg}$ en un vehículo convencional de Metocel A4C al 1%). Como se observa claramente en la figura 1, la exposición *in vivo* (medida o bien como $C_{m\acute{a}x}$ o bien como AUC) era mucho mayor para el compuesto de la invención que para el compuesto de la técnica anterior (ejemplo 2 del documento WO 2008/007107). Obsérvese que el gráfico tiene una escala logarítmica

Mutagenicidad

- 40 Se somete a prueba convenientemente el potencial mutagénico de los compuestos en la prueba de Ames, que se lleva a cabo normalmente en una variedad de cepas bacterianas tales como *Salmonella typhimurium* TA100, TA102, TA 1535, TA 1537 con y sin activación de la fracción S9 de hígado, por ejemplo a concentraciones de 30, 300 y 3000 $\mu\text{g/placa}$.

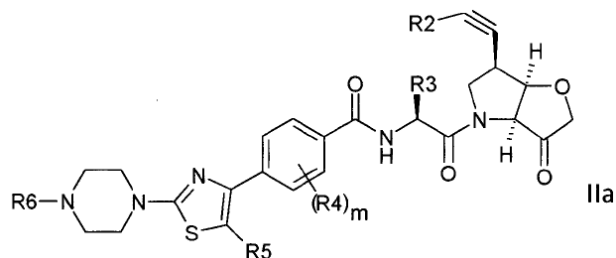
- 45 La prueba de Ames está fácilmente disponible en varios CRO alrededor del mundo.

Abreviaturas

DMF	dimetilformamida	DCM	diclorometano
TBDMS	<i>terc</i> -butildimetilsililo	TA	temperatura ambiente
THF	tetrahidrofurano	Ac	acetilo
CCF	cromatografía en capa fina	DMAP	dimetilaminopiridina
EtOAc	acetato de etilo	uM	micromolar

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula IIa:



5

en la que:

R^2 es H o ciclopropilo;

10

R^3 es cicloalquilo C_3-C_6 o alquilo C_2-C_6 ramificado, cualquiera de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o dos flúor o con un trifluorometilo;

R^4 es metilo o flúor; m es 0, 1 ó 2;

15

R^5 es H, metilo o flúor;

R^6 es alquilo C_1-C_6 ;

20

o una sal, un N-óxido o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 es H, definiendo de ese modo acetileno.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 es ciclopropilo.

25

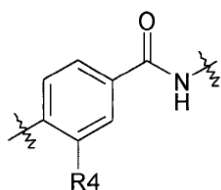
4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R^3 es la cadena lateral de leucina.

5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que m representa 0 y R^5 representa F.

30

6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que m representa 1, R^4 es F y R^5 es H.

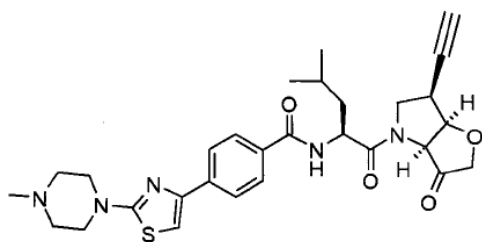
7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que R^4 se ubica tal como se muestra mediante la estructura parcial:



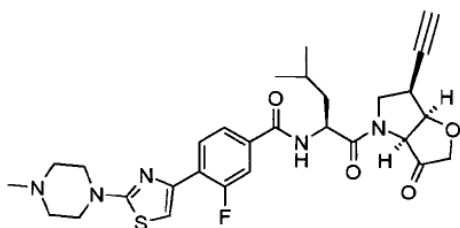
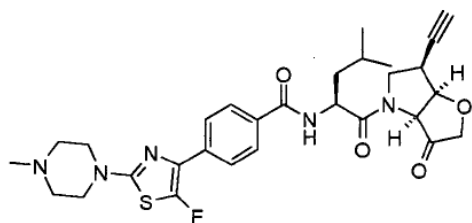
35

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R^6 es CH_3 .

9. Compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona de:

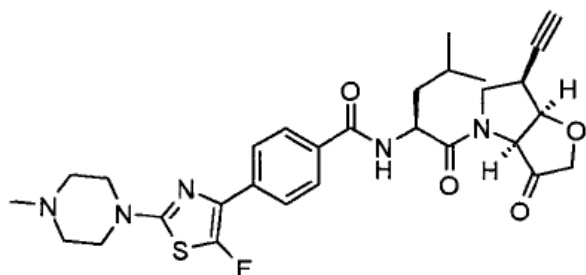


40



o una sal, un hidrato o un N-óxido farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 10. Compuesto según la reivindicación 9, con la fórmula



o una sal, un hidrato o un N-óxido farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para el mismo.

15 12. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno seleccionado de:

osteoporosis,

enfermedades gingivales (tales como gingivitis y periodontitis),

20 enfermedad de Paget,

hipercalcemia de tumor maligno,

25 osteopatía metabólica,

enfermedades caracterizadas por degradación de cartílago o matriz excesiva (tales como osteoartritis y artritis reumatoide),

30 cánceres de hueso incluyendo neoplasia,

dolor (especialmente dolor crónico).

35 13. Uso de un compuesto según la reivindicación 12, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de osteoporosis.

14. Uso de un compuesto según la reivindicación 12, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de osteoartritis.

15. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno seleccionado de:

osteoporosis,

5 enfermedades gingivales (tales como gingivitis y periodontitis),

enfermedad de Paget,

10 hipercalcemia de tumor maligno,

osteopatía metabólica,

15 enfermedades caracterizadas por degradación de cartílago o matriz excesiva (tales como osteoartritis y artritis reumatoide),

cánceres de hueso incluyendo neoplasia,

dolor (especialmente dolor crónico).

20 16. Compuesto según la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento o la prevención de osteoporosis.

17. Compuesto según la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento o la prevención de osteoartritis.

FIGURA 1

Administración oral individual a ratones C57Bl macho a 60 $\mu\text{mol/kg}$ v.o.
 Formulación: Methocel A4C al 1%

