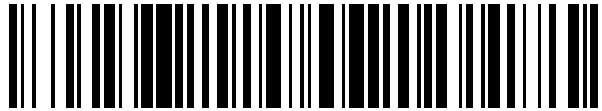


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 802**

51 Int. Cl.:

C07D 213/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2011** **E 11776241 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014** **EP 2590945**

54 Título: **Inhibidores de serina proteasa**

30 Prioridad:

07.07.2010 US 362127 P

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

07.08.2014

73 Titular/es:

**THE MEDICINES COMPANY (LEIPZIG) GMBH
(100.0%)
Deutscher Platz 5d
04103 Leipzig, DE**

72 Inventor/es:

**STEINMETZER, TORSTEN y
SAUPE, SEBASTIAN, MARTIN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 483 802 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 serina proteasa

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 61/362,127, presentada el 7 de julio del 2010.

Campo de la invención

La invención se relaciona a los campos de química orgánica, serina proteasas (particularmente plasmina y calicreína en plasma), hemostasia, y fibrinólisis.

Antecedentes de la invención

10 La plasmina (EC 3.4.21.7, fibrinolisisina) es una serina proteasa similar a tripsina que efectúa división de proteínas en residuos de arginina o lisina; sus sustratos principales son fibrina y proteínas de matriz extracelular (ECM) tales como fibronectina. Otros sustratos de plasmina incluyen diversas proteínas de la membrana basal, por ejemplo, laminina y colágeno tipo IV, y zimógenos, tales como las proformas de uroquinasa y matriz de metaloproteasas. En la sangre, la plasmina es responsable en particular de la fibrinólisis, ya que divide la fibrina en fragmentos solubles.
15 La plasmina se activa mediante división a partir de su precursor zimógeno, plasminógeno, por la acción de activadores del plasminógeno, principalmente proteasas serina tales como uroquinasa, tPA, y calicreína en plasma (EC 3.4.21.34; quininogenina, PK).

20 Los inhibidores de plasmina endógena tales como α_2 -macroglobulina y α_2 -antiplasmina, al moderar los efectos anticoagulantes de los activadores de plasminógeno, desempeñan una función clave en regular la fibrinólisis. Ciertas afecciones patológicas (hiperplasminemias) se caracterizan por una desregulación de la plasmina y la activación espontánea de fibrinólisis. La degradación resultante de la fibrina que cierra la herida se ve agravada por las propiedades anticoagulantes de los productos de degradación de fibrinógeno, que llevan a un deterioro grave de la hemostasia.

25 Los fármacos antifibrinolíticos se utilizan clínicamente para tratar dichas afecciones; entre los agentes comúnmente utilizados están los ácidos carboxílicos sustituidos con amino sintéticos tales como ácido p-aminometilbenzoico, ácido ϵ -aminocaproico, y ácido trans-4-(aminometil)-ciclohexanocarboxílico (ácido tranexámico). Estos compuestos bloquean la unión del plasminógeno a la fibrina, y por lo tanto inhiben la generación de plasmina, pero no son inhibidores directos de plasmina y no inhiben la actividad de la plasmina ya formada. Un antifibrinolítico directo es la aprotinina (TRASYLOL™, Bayer AG, Leverkusen), un polipéptido de 58 aminoácidos obtenido de pulmón de bovino.
30 La aprotinina inhibe la plasmina con una constante de inhibición de 1 nM, pero es relativamente no específica: inhibe efectivamente la tripsina ($K_i = 0.1$ nM), la calicreína en plasma ($K_i = 30$ nM) y, en menor medida, una variedad de otras enzimas.

35 El principal uso de la aprotinina es para reducción de la pérdida de sangre, especialmente en procedimientos quirúrgicos cardíacos con circulación extracorpórea (CEC), donde se reduce distintamente la necesidad de transfusiones de sangre perioperatoria (Sodha et al., Expert Rev. Cardiovasc. Ther., 4, 151-160, 2006). La aprotinina se emplea también para inhibir la pérdida de sangre en otras operaciones, por ejemplo, en los trasplantes de órganos; también se utiliza en conjunción con adhesivos de fibrina.

40 El uso de la aprotinina tiene diversas desventajas. Desde que se aísla de los órganos de bovinos, existe en principio el riesgo de contaminación patogénica y reacciones alérgicas. El riesgo de choque anafiláctico es relativamente bajo con la primera administración de aprotinina (<0.1%), pero aumenta en la administración repetida dentro de los 200 días al 4 a 5%. Se ha informado de que la administración de aprotinina, en comparación directa con ácido ϵ -aminocaproico o ácido tranexámico, induce un aumento del número de efectos secundarios (Mangano et al., New Engl. J. Med., 354, 353-365, 2006). La administración de aprotinina conduce a una duplicación del número de casos de daño renal que requiere diálisis, la incidencia de infarto de miocardio y se aumenta el ataque de apoplejía en comparación con los grupos de control. Después de la Conservación de la Sangre Utilizando Antifibrinolíticos en un estudio de Ensayo Aleatorio (BART) ha mostrado un aumento del riesgo de mortalidad asociado al uso de aprotinina en comparación con los análogos de lisina en pacientes de cirugía cardíaca de alto riesgo (Fergusson et al., New Engl. J. Med., 358, 2319-2331, 2008), se retira el fármaco del mercado.
45

Se ha descrito un número de inhibidores sintéticos de la plasmina. Sanders and Seto, *J. Med. Chem.*, 42, 2969-2976, 1999, han descrito derivados de 4 hetero ciclohexanona con actividad relativamente débil, con constantes de inhibición de $\geq 50 \mu\text{M}$ para plasmina. Xue and Seto, *J. Med. Chem.*, 48, 6.908-6917, 2005, han informado sobre los derivados de ciclohexanona peptídicos con valores de $\text{IC}_{50} \geq 2 \mu\text{M}$, pero no se ha reportar desarrollo adicional. Okada (Okada et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 1964-1972, 2000; Okada et al, *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 10, 2217-2221, 2000) y Tsuda (Tsuda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 1457-1463, 2001) describen derivados del ácido 4-aminometil-ciclohexanoico que inhibe la plasmina con valores de $\text{CI}_{50} \geq 0,1 \mu\text{M}$, pero el uso clínico de estos inhibidores no se ha informado. Se han descrito recientemente inhibidores de plasmina potentes (documento WO 2008/049595;. Dietrich et al., *Anesthesiology*, 110, 123-130, 2009), pero estos compuestos tienen selectividad limitada e inhiben otras proteasas de serina del tipo tripsina.

Sturzebecher et al. ha descrito una serie de peptidomiméticos de benzamidina sulfonilada N-terminal que tienen diversos efectos sobre las proteasas de serina. Se incluyen dentro de esta clase inhibidores del factor Xa, útiles como anticoagulantes y antitrombóticos (Patente Estadounidense No. 6841701.); inhibidores de uroquinasa, útiles como supresores de tumores (Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2005/0176993, Patente Estadounidense No. 662.169); los inhibidores de calicreína en plasma (PK), el factor XIa y el factor XIIa, útiles como anticoagulantes y antitrombóticos (Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2006/0148901); e inhibidores matriptase, útiles como supresores de tumor (Publicación De solicitud de Patente Estadounidense No. 2007/0055065).

Se han publicado las constantes de inhibición para algunos compuestos que afectan la actividad de la plasmina en diversos estudios sobre inhibidores de proteasas de coagulación. Los compuestos en cuestión, sin embargo, se han investigados como antitrombóticos, y por lo tanto, se prefiere un bajo nivel de inhibición de plasmina. Por ejemplo, el inhibidor de trombina melagatrán inhibe la plasmina con un valor de K_i de $0.7 \mu\text{M}$, y el compuesto estructuralmente relacionado H317/86 tiene una constante de inhibición de $0.22 \mu\text{M}$ (Gustafsson et al., *Thromb. Haem.*, 79, 110-118, 1998). Sin embargo, debido a que ambos compuestos inhiben la proteasa trombina mucho más fuertemente ($K_i \leq 2 \text{nM}$), el efecto neto de la administración es la inhibición de la coagulación. La posibilidad de utilizar dichos compuestos como pro-coagulantes, por ejemplo, para reducir la pérdida de sangre en los procedimientos quirúrgicos cardíacos, no se menciona en ninguno de estos documentos.

Como se observó anteriormente, la aprotinina inhibe no sólo la plasmina, sino también la calicreína en plasma (PK). La PK es una serina proteasa multifuncional del tipo tripsina para las que se conocen diversos sustratos fisiológicos. Por lo tanto, mediante la división proteolítica, el PK es ablc para liberar el péptido vasoactivo bradiquinina del quinínogeno de alto peso molecular, y para activar zimógenos tales como el factor XII de la coagulación, pro-uroquinasa, el plasminógeno y pro-MMP 3. Por lo tanto, se supone que el sistema de PK/cinina cumple una función importante en muchas afecciones patológicas, por ejemplo, en situaciones tromboembólicas, coagulación intravascular diseminada, choque séptico, alergias, síndrome de post-gastrectomía, artritis y ARDS (síndrome de dificultad respiratoria del adulto) (Tada et al., *Biol. Pharm. Bull*, 24, 520-524, 2001).

De acuerdo con lo anterior, la aprotinina, a través de su efecto inhibitorio sobre PK, inhibe la liberación de la bradiquinina de hormona peptídica, que a su vez tiene diversos efectos a través de la activación del receptor B2 de bradiquinina. La liberación inducida por bradiquinina de tPA, NO y prostaciclina de células endoteliales (Schmaier, *J. Clin. Invest.*, 109, 1007-1009, 2002) influye en la fibrinólisis, presión arterial y eventos inflamatorios. Se ha sugerido que los procesos inflamatorios sistémicos que pueden ocurrir como un efecto secundario en las operaciones quirúrgicas se pueden reducir mediante al inhibir la liberación de bradiquinina.

Diversas bisbenzamidinas, tales como pentamidina y compuestos relacionados, y ésteres de ácidos ω -amino-y ω -guanidinoalquilcarboxílicos, se han descrito como inhibidores de PK con valores de K_i micromolares (Asghar et al., *Biochim Biophys Acta*, 438, 250-264, 1976; Muramatu and Fuji, *Biochim. Biophys. Acta*, 242, 203-208, 1971; Muramatu and Fuji, *Biochim. Biophys. Acta*, 268, 221-224, 1972; Ohno et al., *Thromb. Res.*, 19, 579-588, 1980; Muramatu et al., *Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 363, 203-211, 1982; Satoh et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 647-654, 1985; Teno et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 2930-2936, 1991).

Los primeros inhibidores selectivos de PK competitivos que se deben notificar (Okamoto et al., *Thromb. Res.*, Supl. VIII, 131-141, 1988) se obtienen a partir de arginina o fenilalanina, e inhiben los PK con valores K_i de alrededor de $1 \mu\text{M}$. Diversos documentos sobre el desarrollo de inhibidores de PK competitivos han sido publicados por el grupo Okada, con los compuestos más activos, derivados de trans-4-aminometilciclohexanocarbonil-Phe-4-carboximetilamida, que tienen constantes de inhibición de alrededor de $0.5 \mu\text{M}$ (Okada et al., *Biopolymers*, 51, 41-50, 1999; Okada et al., 2000, Tsuda et al., 2001). Es característico de estos inhibidores de PK que tengan un relativamente alto valor de K_i .

Los inhibidores de PK 4 amidinoanilina potentes, con valores K_i de alrededor de 1 nM, se describen en el documento WO 00/41531, pero no se ha reportado un mayor desarrollo de estos compuestos.

5 Garrett et al. ha descrito inhibidores de PK análogos de estado de transición (Garrett et al., J. Pept. Res. 52, 60-71, 1998, Garrett et al., Bioorg. Med. Chem. Lett 9, 301-306, 1999), pero estos compuestos son propensos a reacción no específica con nucleófilos.

10 Aliaga-Martin et al., en la Patente Estadounidense No. 6472393, describe una amplia variedad de 4-amidinoanilidas que son inhibidores potentes de PK, que tienen constantes de inhibición de alrededor de 1 nM. Antonsson et al. en forma similar describe un amplio rango de inhibidores PK de amidina y guanidina en la Patente Estadounidense No. 5602253. Sturzebecher et al. han descrito 4-amidino y 4-guanidino-bencilaminas como inhibidores de PK, algunos de los cuales son inhibidores del Factor Xa (publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2005/0119190), algunos de los cuales tienen un efecto inhibitor leve sobre la plasmina (Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2006/0148901), y algunos de los cuales son inhibidores duales plasmina/PK (publicación PCT No. 2008/049595).

15 Dyax Corp. ha desarrollado un inhibidor de calicreína en plasma selectivo, DX-88 (ecalantida, Kalbitor™), para el tratamiento de ataques agudos en angioedema hereditario. La ecalantida es una pequeña proteína recombinante que se ha identificado utilizando una tecnología de exhibición de fagos con base en el primer dominio de Kunitz de inhibidor de la ruta del factor de tejido humano (TFPI). La ecalantida también está experimentando ensayos clínicos de fase II de para la reducción de la pérdida de sangre durante la cirugía con bomba cardiotorácica (Lehmann, Expert Opin. Biol. Ther., 8, 1187-1199, 2008).

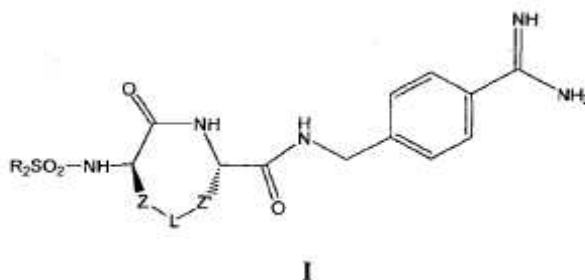
20 La plasmina y la calicreína en plasma, junto con aproximadamente otras 70 enzimas, pertenecen a la familia de serina proteasas similar a tripsina que comparten homología de secuencia significativa. En general, esto hace que sea difícil desarrollar inhibidores selectivos para una proteasa particular, con base en análogos de sustrato. Sin embargo, la plasmina carece de diversos aminoácidos en un bucle alrededor del aminoácido en la posición 99, que limita el tamaño del bolsillo S2 en la mayoría de las serina proteasas similares a tripsina (terminología de bolsillo de Schechter and Berger, Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 157-162, 1967). Esto conduce a un bolsillo S2 relativamente abierto en el centro activo de plasmina, lo que puede explicar por qué la plasmina tiene una especificidad de sustrato muy amplia. La calicreína en plasma (PK) ofrece una glicina en la posición 99, y la ausencia de una cadena lateral significa que la calicreína en plasma también tiene un bolsillo relativamente abierto S2. Con base en las estructuras de rayos X de las serina proteasas similares a tripsina en complejo con inhibidores análogos de sustrato (Schweinitz et al., Med. Chem. 2, 349-361, 2006), parece que las cadenas laterales de un L-aminoácido P^2 y una D-amino ácido $P3$ (terminología de la cadena lateral de Schechter and Berger, Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 157-162, 1967) se deben dirigir hacia la superficie de la enzima.

35 Subsiste la necesidad de sustancias de bajo peso molecular, adecuadas para aplicaciones terapéuticas, que de forma reversible y competitivamente inhiben la plasmina, y, preferiblemente, la plasmina y la calicreína en plasma juntas, con alta actividad y especificidad. Los presentes inventores han descubierto que es posible obtener potentes inhibidores de la plasmina por una ciclación adecuada entre las cadenas laterales de los aminoácidos $P3$ y P^2 en inhibidores análogos de sustrato. También algunos de estos compuestos inhiben potentemente la calicreína en plasma.

40 Los compuestos de la presente invención, de acuerdo con lo anterior, son adecuados para modular y/o mantener la hemostasia en diversas situaciones, especialmente durante y después de cirugías con circulación extracorpórea, trasplantes de órganos, y otras intervenciones quirúrgicas importantes. Se espera que los compuestos de la presente invención, como inhibidores de calicreína en plasma, también reducirá la liberación de quininas, suprimiendo de este modo ambas reacciones inflamatorias mediadas por quininas y liberación inducida por quinina de tPA a partir de células endoteliales. El último efecto proporciona un mecanismo adicional para regulación descendente de la fibrinólisis.

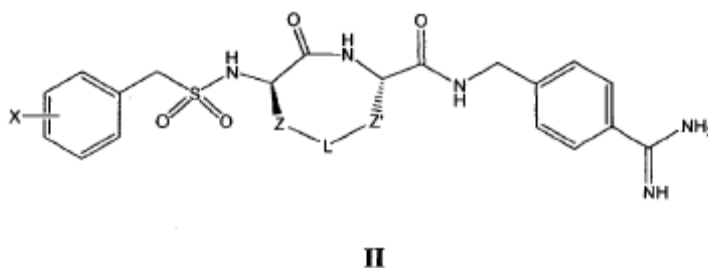
45 Breve descripción de la invención

La invención proporciona análogos de péptido ciclizados de la fórmula general I, en



donde los ligadores Z y Z' y el grupo de puente L son como se define en detalle adelante, y en donde R² es un grupo alquilo ramificado, no ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de C; un anillo heteroaromático de 5 o 6 miembros que tiene 1 a 3 heteroátomos independientemente seleccionados de N, S y O; un grupo arilo que tiene 6 o 10 átomos de C; o un grupo CH₂ que lleva ya sea un anillo heteroaromático de 5 o 6 miembros que tiene 1 a 3 heteroátomos independientemente seleccionados de N, S y O, o un grupo arilo que tiene 6 o 10 átomos de C. Los grupos heteroarilo o arilo pueden ser no sustituidos o sustituidos con 1 a 3 residuos independientemente seleccionados de -CH₂NH₂, -CN, -CF₃, tetrazol-5-ilo, F, Cl, Br, -CO₂H, CO₂Me, -CO₂Et metilo, etilo, propilo, e isopropilo

En realizaciones preferidas, los compuestos de la invención tienen la siguiente fórmula II:



en donde X es H, -CF₃, CO₂H, CO₂Me, o CO₂Et.

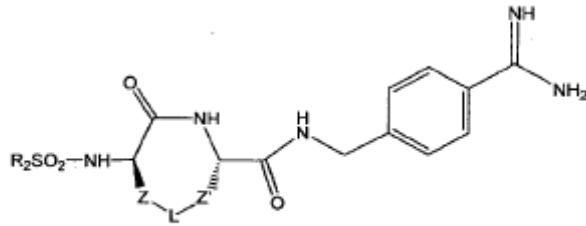
Los compuestos de la invención son inhibidores efectivos y particularmente selectivos de la plasmina humana, y en ciertas realizaciones son inhibidores de plasmina y calicreína en plasma. La invención de acuerdo con lo anterior proporciona compuestos de la fórmula I, los métodos para la preparación de compuestos de la fórmula I, y composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la fórmula I. La invención también describe métodos para inhibir solo plasmina, o plasmina y PK, en un paciente; métodos para modulación terapéutica de la cascada de coagulación sanguínea y fibrinólisis; y métodos para prevención y tratamiento de pérdida de sangre en un paciente, mediante administración de los compuestos de fórmula I.

La invención describe adicionalmente métodos para el uso de estos compuestos en la fabricación de medicamentos para inhibir solo plasmina o plasmina y PK en un paciente, y medicamentos para modulación terapéutica de la cascada de coagulación y fibrinólisis, especialmente para prevención y tratamiento de pérdida de sangre en un paciente. Los sujetos quienes se tratan con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, pacientes que experimentan afecciones hiperfibrinolíticas, trasplantea de órganos, y procedimientos quirúrgicos cardiacos, especialmente aquellos que involucran circulación extracorpórea.

La presente invención también proporciona un adhesivo de fibrina que comprende los compuestos de la invención, y métodos para el uso de los compuestos de la invención en la fabricación de un adhesivo de fibrina.

Descripción detallada de la invención

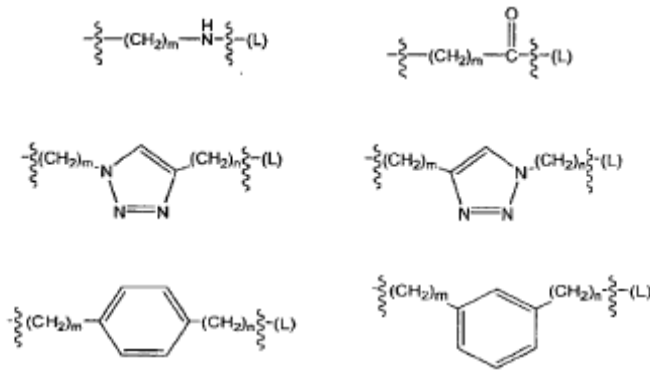
La invención proporciona análogos de péptido ciclizados de la fórmula general I,



I

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en donde R² es como se definió anteriormente. Los ligadores Z y Z' se seleccionan independientemente entre las siguientes unidades estructurales:

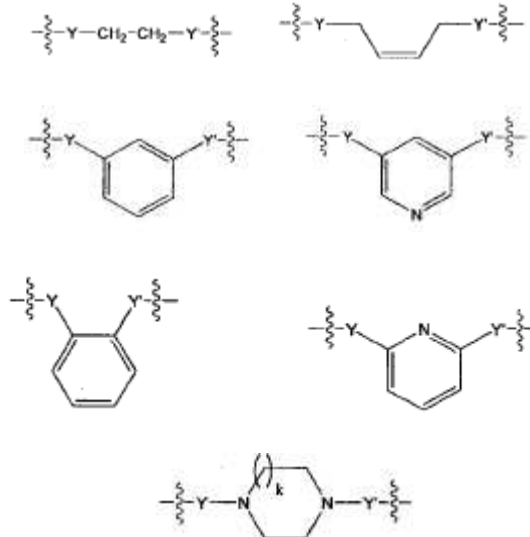
5



en donde los valores de m y n están independientemente en el rango 0 a 3.

El grupo de puente L se selecciona de entre las siguientes unidades estructurales divalentes:

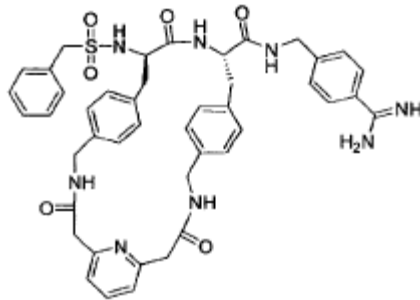
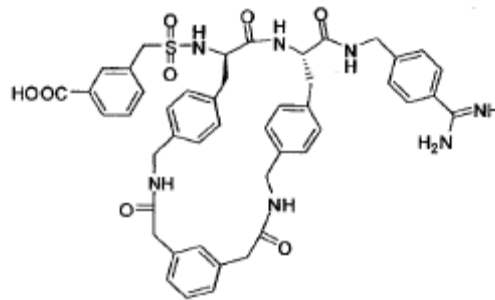
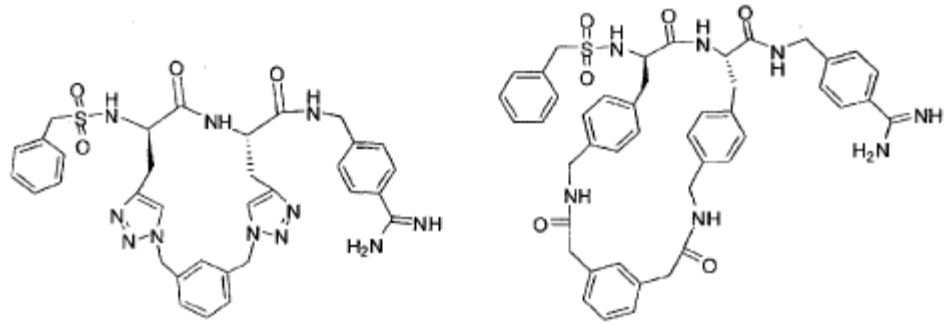
10



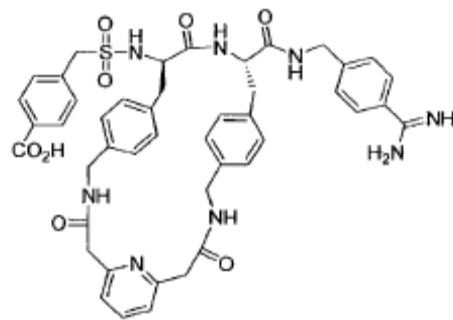
15

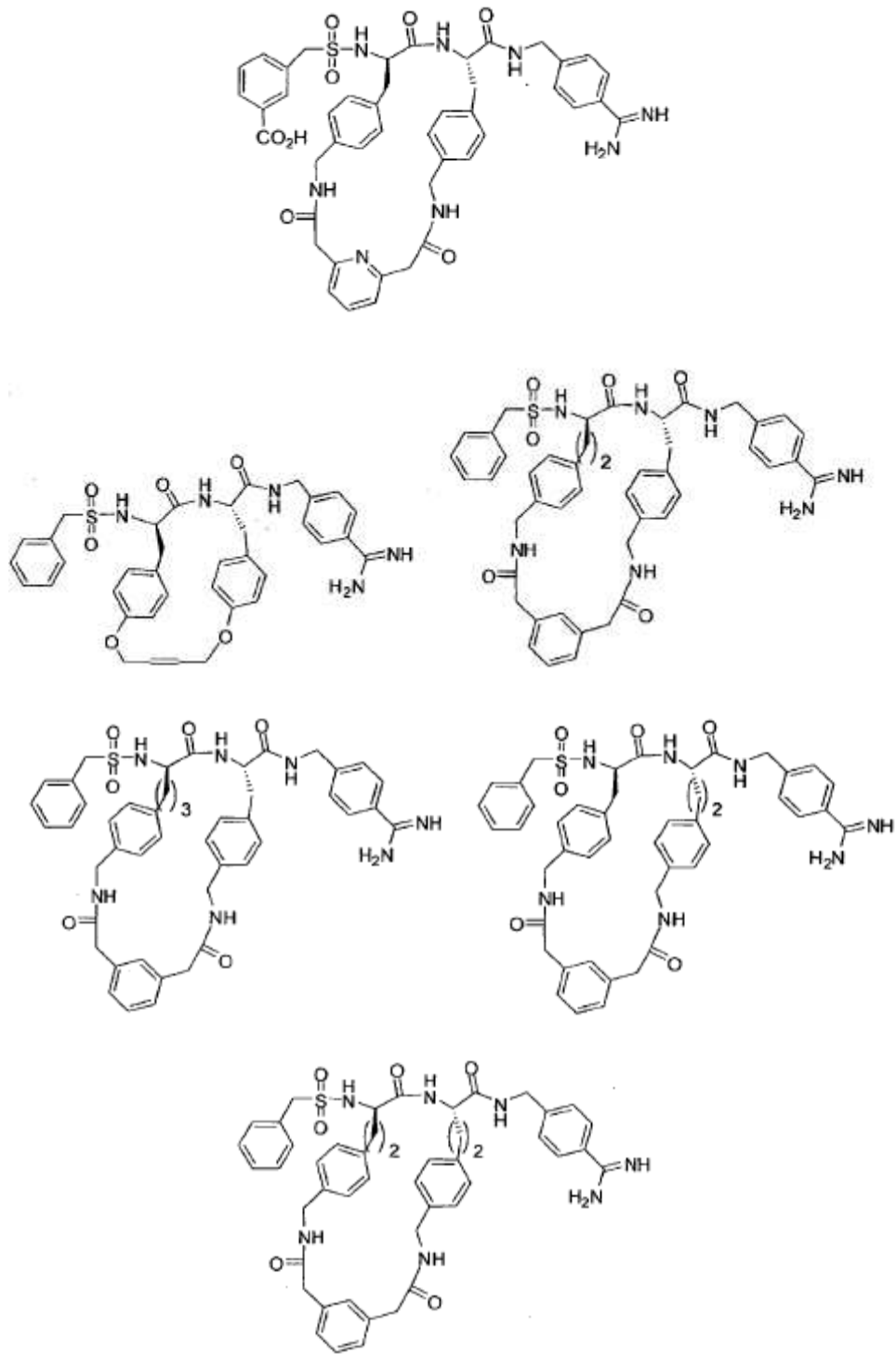
en donde k es 1 o 2, Y y Y' se seleccionan independientemente de: un enlace covalente, $-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_pO(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pS(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pSS(CH_2)_q-$, $(CH_2)_pC(=O)(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=O)(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pC(=O)NH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pOC(=O)(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pOC(=O)NH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=O)O(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=O)NH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=NH)NH(CH_2)_q-$, y $-(CH_2)_pNHC(=O)(CH_2)_qS-$. En las estructuras anteriores, las unidades estructurales Y y Y', cuando no son asimétricas, pueden estar presentes en cualquier orientación, y p y q varían independientemente desde 0 hasta 3.

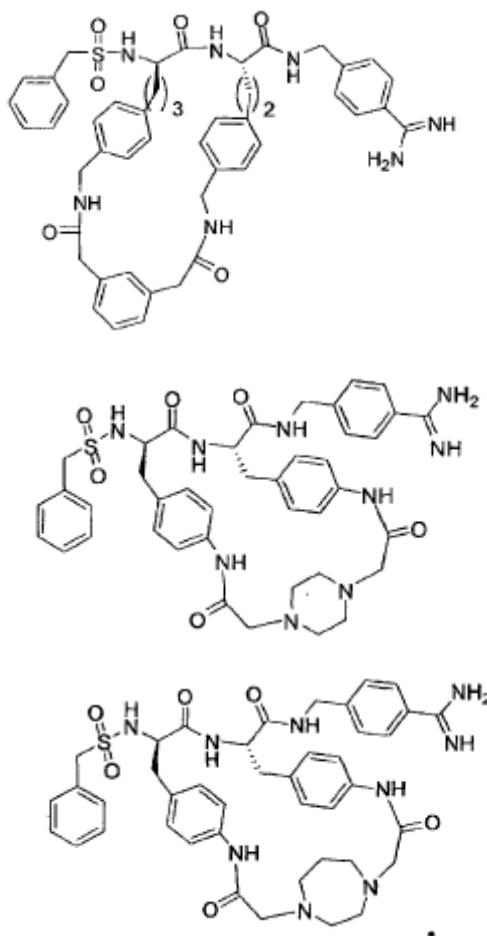
Las realizaciones representativas seleccionadas se los compuestos de la fórmula I incluyen, por ejemplo, las siguientes estructuras:



5

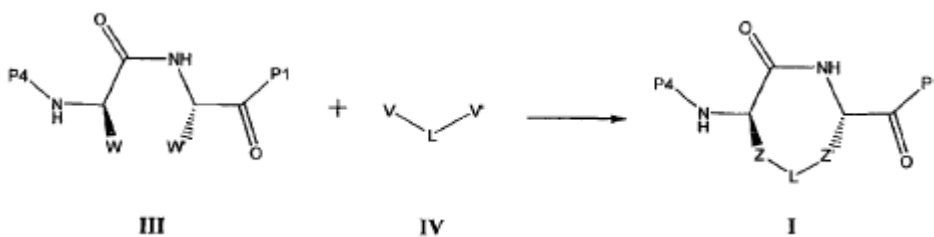






5 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención se forman preferiblemente mediante la adición de un ácido conocido por ser útil en la formación de sales farmacéuticas. Las sales ácidas adecuadas arco se establecen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of pharmacy, 21st edition, Univ. of the Sciences in Philadelphia (2005). Los ácidos inorgánicos preferidos para la formación de sales incluyen HCl, HBr, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos preferidos incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido bencenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido trifluoroacético, y ácido p-toluenosulfónico.

15 Los compuestos de la fórmula general I se pueden preparar mediante una reacción de ciclación entre una molécula precursora lineal III y un reactivo bifuncional de puente IV, como se muestra en el Esquema 1 adelante. Las unidades estructurales W, W', V y V' comprenden separadores opcionales, tales como cadenas de alquileo C₁-C₄ y/o separadores de fenileno, y grupos funcionales mutuamente reactivos. Los grupos funcionales en W y V (y W'y V') se eligen por ser mutuamente reactivos, y selectivos el uno con el otro en la presencia de grupos protectores y enlaces de péptidos presentes en precursores III.



Esquema I

20 Por ejemplo, si los residuos de W y W' contienen grupos amino o imino libres, entonces se puede realizar una ciclización utilizando como reactivo IV un cloruro de ácido di-carboxílico alifático, aromático o heteroaromático, éster activo de ácido di-carboxílico, o una ácido dicarboxílico en presencia de un reactivo de acoplamiento, tal como

PyBOP, HBTU, DCC, cloroformato de isobutilo o similares. Los reactivos de acoplamiento adecuados y los métodos son bien conocidos en la técnica de síntesis de péptidos.

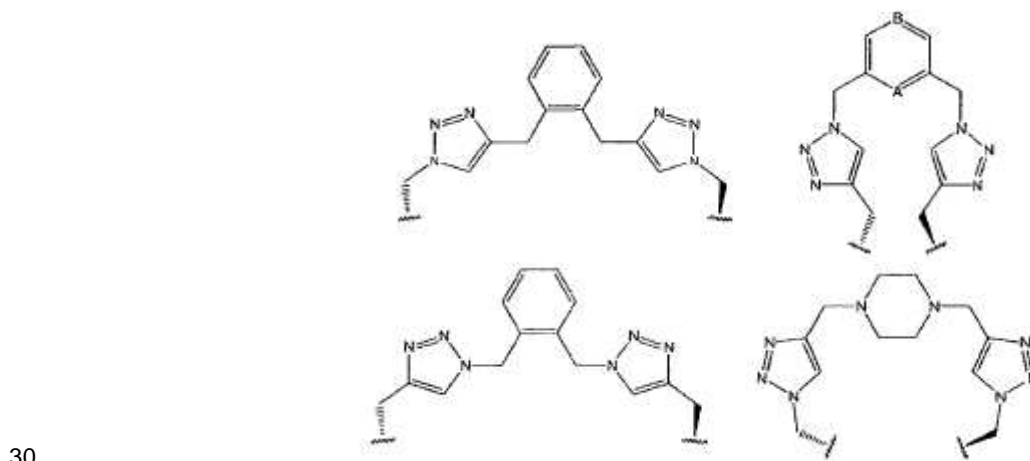
5 Si los residuos de W y W' contienen grupos de ácido carboxílico, se puede realizar una ciclización utilizando como reactivo IV una diamina alifática, aromática o heteroaromática, y formar enlaces amida en presencia de un reactivo de acoplamiento apropiado.

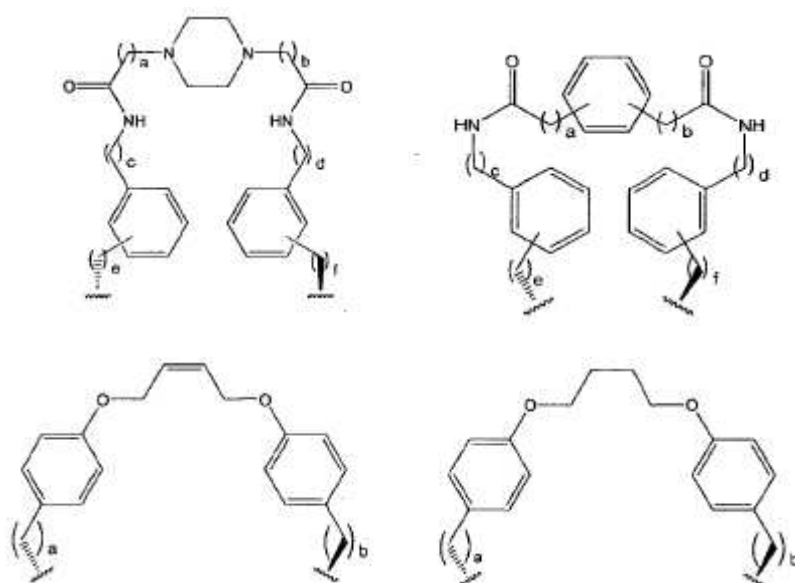
10 Si los residuos de W y W' contienen grupos alquino, una cicloadición 1,3-dipolar catalizada con cobre (I), da lugar a 1,4- triazoles disustituidos en los ligadores Z y Z', se puede llevar a cabo mediante el empleo de bis-azida alifática, aromática o heteroaromática como reactivo IV. Por el contrario, si los residuos de W y W' contienen unidades estructurales de azida, se pueden realizar cicloadiciones 1,3-dipolares similares catalizadas con cobre (I) utilizando un dialquino alifático, aromático o heteroaromático como reactivo IV, generando de nuevo el producto ciclado I que tiene triazoles 1,4-disustituido en los ligadores Z y Z'.

15 Otras reacciones de formación de enlaces bien establecidas, adecuadas para uso en el proceso de ciclación del Esquema 1, serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. En general, las reacciones adecuadas serán altamente selectivas y de altas en rendimiento. En particular, en las reacciones adecuadas para la denominada "química de clic" se prefieren candidatos para el proceso de ciclación. (H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40:2004 (2001); E. Van der Eycken y K. B. Sharpless, "Click Chemistry", *QSAR Comb. Sci.*, 26:1115 (2007)).

20 En realizaciones alternativas, en lugar de emplear un reactivo de enlace IV, los residuos de W y W' se ciclan directamente. Por ejemplo, si los residuos de W y W' contienen grupos alqueno, se puede llevar a cabo una metátesis de alqueno (por ejemplo, utilizando catalizadores de rutenio de Grubbs'), dando el producto I en la que L es-CH = CH que conecta los ligadores enlazadores Z y Z'. El enlace olefínico se puede reducir mediante hidrogenación si se desea un enlace alifático en el producto.

25 Al someter los reactivos apropiados III y IV a condiciones de reacción adecuadas, como se ha expuesto anteriormente, el proceso de ciclación del Esquema 1 produce compuestos I que tienen las siguientes disposiciones de puente L y ligadores Z y Z'. Se apreciará que a medida que las definiciones de las unidades estructura W y W' (y V y V') son intercambiables, las definiciones de Z y Z' en la misma forma son intercambiables. Por lo tanto, con respecto al precursor III, ambas orientaciones de subestructuras asimétricas se describen en los siguientes ejemplos representativos de la unidad estructura Z-L-Z':





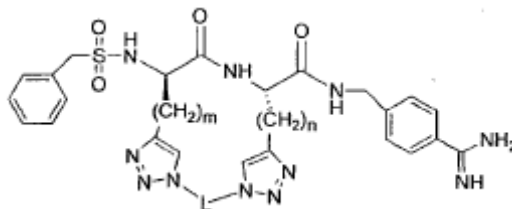
En las fórmulas anteriores, A y B son independientemente CH o N. Los valores de a, b, c, d, e y f son independientemente 0, 1, 2 o 3.

- 5 Los precursores de la fórmula III se preparan fácilmente mediante acoplamiento secuencial de aminoácidos a 4-amidinobencilamina, que es N protegida en el grupo amidino mediante el grupo de protección PG1, seguido por sulfonilación. Se debe entender que se puede utilizar cualquier grupo protector de N adecuado conocido en la técnica en el grupo amidino. Los grupos protectores de N adecuados para el grupo imidino incluyen pero no se limitan a, 1,2,4-oxadiazol-5-ona, 5-metil-1,2,4-oxadiazol, N-Boc, N-Cbz, N-benciloxi, y N-acetoxi. Se prefieren los grupos 1,2,4-oxadiazol-5-ona, 5-metil-1,2,4-oxadiazol, N-benciloxiamidino, y N-acetoxiamidino, porque se preparan fácilmente a partir del nitrilo correspondiente.

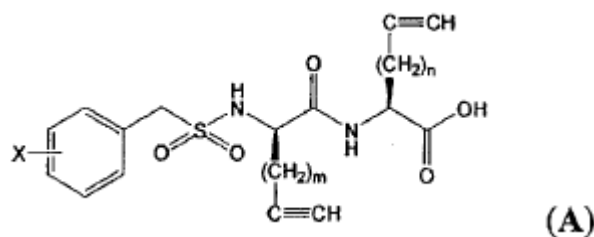
15 Se pueden preparar los precursores III de diversas maneras. Los métodos sintéticos preferidos implican la formación de enlaces amida y sulfonamida entre los componentes pre-sintetizados. Los métodos y procedimientos descritos en la Publicación PCT No. 2008/049595, que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad, se pueden adaptar fácilmente a la síntesis de los compuestos de la presente invención.

20 Como se utiliza aquí, la expresión "un ácido carboxílico activado derivado de" un ácido dado se refiere a derivados de ácidos carboxílicos que son reactivos frente a las aminas, que incluyen pero no se limitan a, ésteres activos, anhídridos mixtos, y haluros de acilo, tal como se conocen bien en la técnica de síntesis de péptidos. Ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxi-benzotriazol, isoureas O-aciladas, ésteres de pentacloro-y pentafluoro-fenilo, ésteres de fosfonio, cloruros de acilo, anhídridos mezclados con monoésteres de ácido carbónico. Los ácidos carboxílicos activados preferidos son ésteres de N-hidroxibenzotriazol, y anhídridos mezclados obtenidos por reacción con cloroformato de isobutilo.

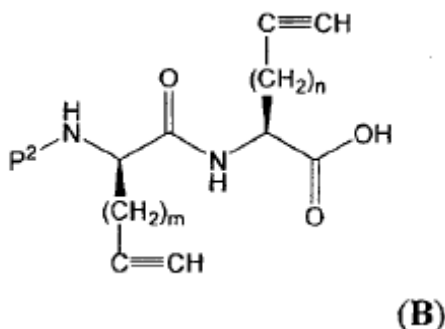
Una primera síntesis representativa se ilustra por la preparación de compuestos de la fórmula



- 25 Un 4-amidino protegido - (amkometil) benzamidina, tal como 4-(aminometil)-N-acetoxibenzamidina (i), se obtiene de la 4- cianobencilamina comercialmente disponible (Showa Denko K.K., Japón) por el método descrito en el suplemento de Schweinitz et al., J. Biol. Chem., 279, 33613-33622 (2004). Las 4- (metilamino)-benzamidinas alternativas protegidas incluyen (II), (III), (IV), (V), o (VI) como se describe adelante. Este material es N-acilado con un ácido carboxílico activado derivado a partir del compuesto A

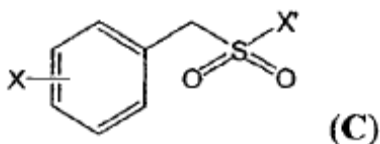


- 5 en donde X puede ser, por ejemplo, H, -CN, -CF₃, tetrazol-5-ilo, F, Cl, Br, -CO₂Me, -CO₂Et, metilo, etilo, propilo, o isopropilo; y m y n pueden ser, por ejemplo, 1, 2, 3, o 4. Luego de la acilación, la ciclación catalizada por cobre o rutenio con una bis-azida N₃-L-N₃, tal como se describió anteriormente, y se lleva a cabo la división del grupo protector de benzamidina, proporcionando un compuesto de fórmula I. A pequeña escala, se lleva a cabo la purificación final de los inhibidores de fórmula I preferiblemente mediante HPLC de fase inversa preparativo. Las preparaciones más grandes se purifican mediante cromatografía de intercambio iónico o columna en contracorriente, y/o mediante recristalización del compuesto, o una sal adecuada cristalina del mismo, como es de rutina en la técnica.
- 10 Una segunda síntesis representativa comprende la acilación de 4-(aminometil)-N-acetoxibenzamidina (I) (o, alternativamente, (ii), (iii), (iv) o (v)) con un ácido carboxílico activado derivado del compuesto B,



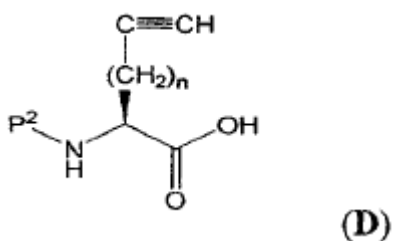
- 15 en donde P² es un grupo protector de amino y m y n son como se describió anteriormente. P² puede ser cualquier grupo protector de amino conocido en la técnica, que incluye pero no se limita a Fmoc, Alloc, Boc, benciloxycarbonilo (Cbz), 4-nitrobenciloxycarbonilo (4-NO₂-Cbz), trifluoroacetilo, tritilo, benzhidrido y. La ciclación con una bis-azida se puede llevar en el compuesto B (o en un éster del mismo), o en cualquier punto entre las transformaciones posteriores.

Después de la acilación, el grupo protector de amino P² se divide, y el grupo α-amino desprotegido resultante se sulfonila con un agente de sulfonilación, por ejemplo como se muestra por la fórmula C:

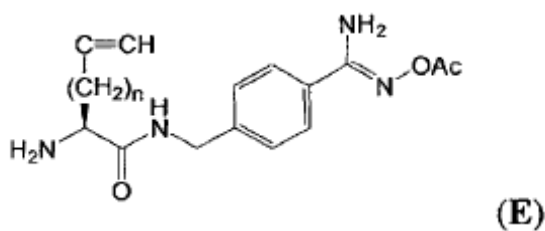


- 20 en donde X' es un grupo saliente, preferiblemente Cl, y X es como se definió anteriormente. Después de sulfonilación, el grupo protector de amino en la benzamidina se divide como se describió anteriormente.

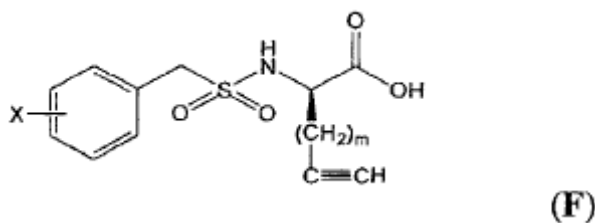
Un tercer método preferido, sintético comprende la acilación de 4-(aminometil)-N-acetoxibenzamidina (i) (o, alternativamente, cualquiera de (ii), (iii), (iv), (v) y (vi)) con un ácido carboxílico activado derivado del compuesto D



en donde P² es un grupo protector de amino como se describió anteriormente. Después de la acilación, se divide el grupo protector de amino P², para generar un intermedio tal como E:

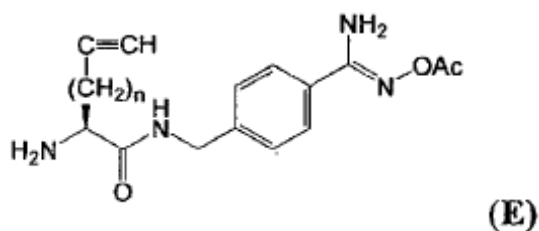


- 5 El intermedio E luego se puede acilar con un derivado de ácido carboxílico activado derivado del compuesto F

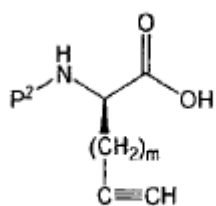


en donde X y m son como se definió anteriormente. La ciclación con una bis-azida de acuerdo con el Esquema 1, seguido por la eliminación del grupo protector de amidina, como se describió anteriormente, proporciona un compuesto de estructura I.

- 10 Un cuarto método comprende la acilación de un N-acilada-amidino-protégida 4-(aminometil) benzamidina, tal como la estructura E

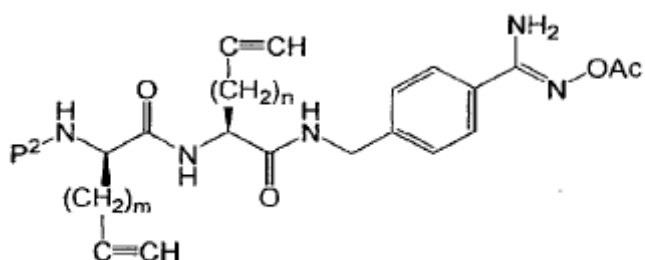


con un ácido carboxílico activado derivado de estructura G



(G)

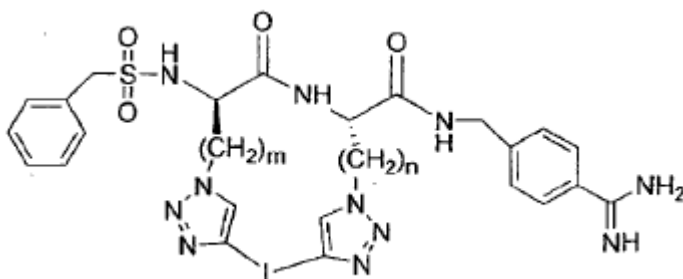
donde P^2 y n son como se definió anteriormente, para producir un intermedio tal como estructura H



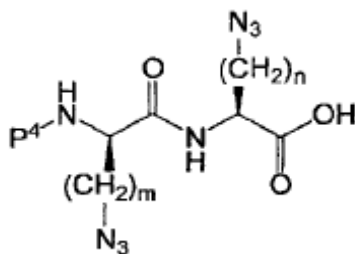
(H)

- 5 Se puede llevar a cabo ciclación de acuerdo con el Esquema 1 en este punto, o en cualquier punto entre las transformaciones posteriores. El grupo protector de amino P^2 luego se divide del H intermedio, y el grupo α -amino desprotegido resultante se sulfonilad con un agente de sulfonilación de fórmula C como se describió anteriormente. Después de sulfonilación, el grupo protector en la benzamidina se divide como se describió anteriormente.

Los compuestos de síntesis de la fórmula



- 10 se pueden llevar a cabo de forma similar, mediante ciclación de un compuesto de bis-alquino de fórmula $HC = CH = CLC$ con un éster, amida, o ácido protegido derivado de un dipéptido de bis-azida de la estructura (J):

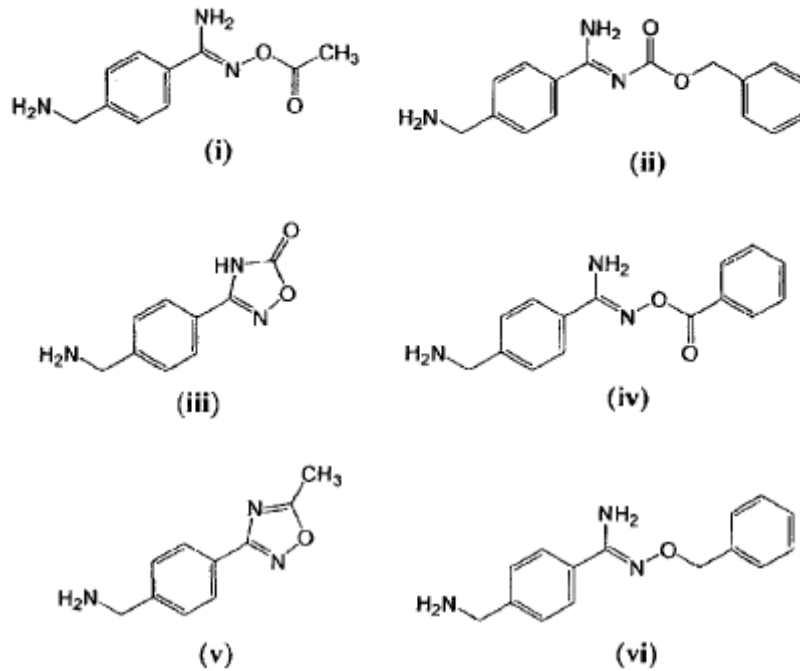


(J)

(los aminoácidos-azido se preparan fácilmente; véase, por ejemplo, A. J. Link et al., J. Am. Chem. Soc., 126, 10598-10602, 2004.). En la estructura J, P^4 puede ser un grupo protector P^2 como se describió anteriormente, que se

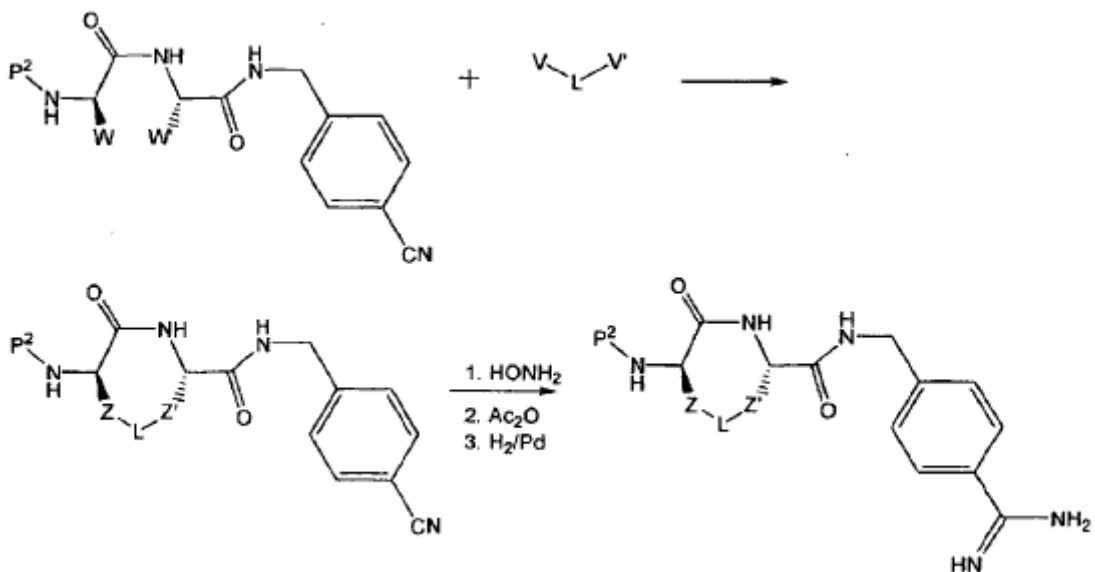
elimina posteriormente y se reemplaza en una reacción de sulfonilación, o, alternatively, P^4 puede representar el grupo sulfonilo (R^2SO_2-) deseado en el producto final.

5 En realizaciones adicionales de la invención, cualquiera de los métodos anteriores de preparación se llevan a cabo utilizando grupos protectores alternativos para la funcionalidad amidina. Los grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos N-benciloxi sustituido y no sustituido, N-benzoiloxi y N-benciloxicarbonilo, y los anillos heterocíclicos 1,2,4-oxadiazol y 1,2,4-oxadiazol-5-ona, que se introducen fácilmente por la sustitución de (i) de los materiales de partida alternativos, tales como (II) - (VI) se muestra adelante.



10

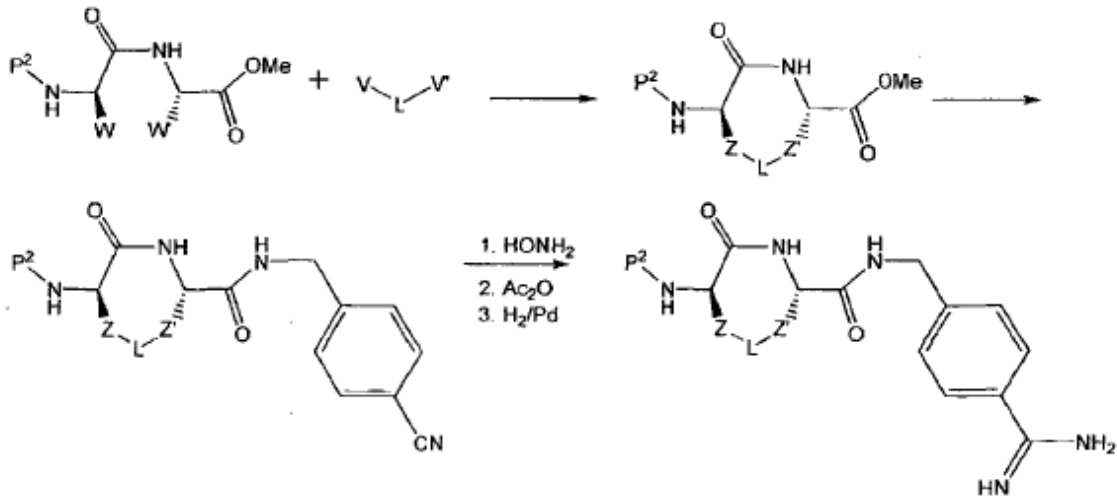
Un esquema alternativo, descrito en los ejemplos adelante, emplea los mismos reactivos, pero lleva un grupo 4-ciano en P^1 a través de la ciclación (Esquema 2). En este método, el grupo amidina se genera en la etapa final en la síntesis:



15

Esquema 2

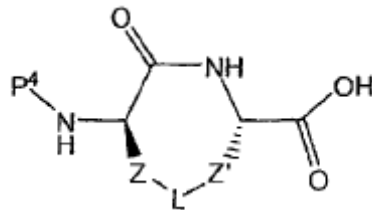
En otra realización, mostrada en el Esquema 3 adelante, un éster de carboxilato se lleva a través de la ciclación en lugar de P¹. Después de la ciclación, el éster se convierte a la amida correspondiente de 4-Amba.



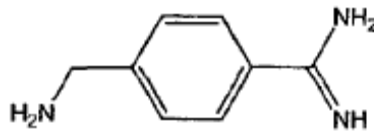
5

Esquema 3

Los esquemas 2 y 3 se pueden abreviar al acoplar un éster, amida, o ácido protegido derivado de un compuesto de fórmula

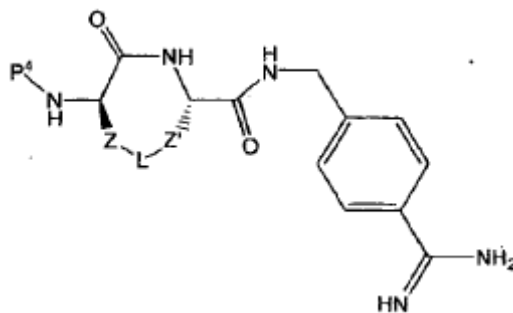


con 4- (aminometil) benzamida (4-Amba)



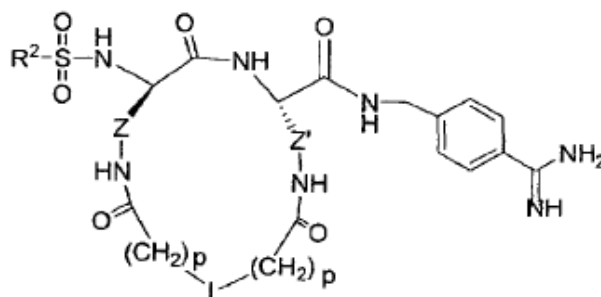
10

para producir un compuesto de fórmula

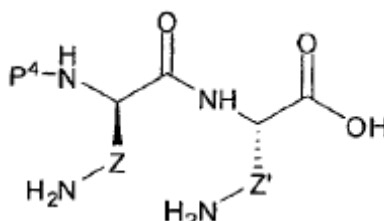


En los esquemas 2 y 3 anteriores, P^4 puede representar un grupo protector de amino convencional P^2 , como se definió anteriormente, que se elimina posteriormente y se reemplaza en una reacción de sulfonilación, o, alternativamente, P^4 puede representar el grupo sulfonilo (R^2SO_2-) deseado en el producto final. Las amidas adecuadas derivadas del grupo carboxilo incluyen, pero no se limitan a, 4-cianobencilo amida; ésteres adecuados incluyen, pero no se limitan a, ésteres de metilo y trimetilsililo, y los ácidos protegidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ésteres de etilo, t-butilo y bencilo.

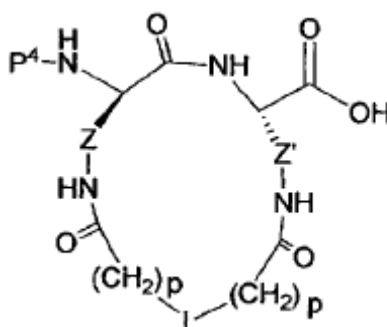
En otro método representativo; los compuestos de la fórmula



se preparan al acoplar una amida, éster, ácido protegido o derivado de un compuesto de fórmula



con un ácido bis-carboxílico de fórmula $HOOC-(CH_2)_p-L-(CH_2)_p-COOH$ para formar la correspondiente amida, éster, o ácido protegido derivado de un compuesto de fórmula



Una vez más, el grupo P^4 puede ser un grupo protector de amino P^2 o el grupo (R^2SO_2-).

Las realizaciones adicionales serán evidentes para aquellos expertos en la técnica, en donde una o más de las etapas que efectúan la conversión de un carboxilato a una amida, la conversión de un nitrilo a una amidina, y sulfonilación, se pueden llevar a cabo antes o después de la ciclación.

Los compuestos de la invención son útiles para la modulación terapéutica de la cascada de coagulación sanguínea y fibrinólisis. Como se utiliza aquí, "la modulación terapéutica" incluye actividades pro y anti-coagulantes, y la estabilización in vivo o promoción de actividades hemostáticas innatas o fibrinolíticas. En particular, los compuestos son útiles para la prevención o el tratamiento de la pérdida de sangre. Los pacientes en necesidad de dicho tratamiento incluyen aquellos sometidos a cirugía (especialmente aquellos procedimientos, tales como cirugía cardíaca, que implican la circulación extracorpórea), y aquellos que sufren de un trastorno adquirido o innato de hemostasia o fibrinólisis.

La invención también proporciona la composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la invención, en combinación con o uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos excipientes incluyen, pero no se limitan a, rellenos, agentes aglutinantes, lubricantes, conservantes, agua, reguladores, y desintegrantes. Las composiciones pueden estar en forma de sólidos o líquidos, compuestas para administración oral, o soluciones o suspensiones adecuadas para administración parenteral. En particular, se proporciona una solución salina reguladora adecuada para administración parenteral, como son composiciones en polvo o liofilizadas adecuadas para reconstitución en una solución salina regulada.

También se proporcionan adhesivos de fibrina que comprenden, en por lo menos uno de los componentes del adhesivo de fibrina, uno o más compuestos de fórmula I. Los métodos y composiciones para adhesivos de fibrina son bien conocidos en la técnica; véase Sierra, J. Biomater. Appl., 7:309-352 (1993). Los adhesivos de fibrina generalmente consisten en un adhesivo de dos componentes fisiológicos que comprenden como un primer componente fibrinógeno, factor XIII y aprotinina, y como un segundo componente de trombina y cloruro de calcio para la activación de factor XIII. En dichas composiciones, el material de aprotinina de la técnica anterior se aumentará o reemplazará por un inhibidor de plasmina adecuado de la presente invención. Los métodos y materiales para la preparación de adhesivos de fibrina se describen en la Patente Estadounidense 7572769, que se incorpora mediante referencia en su totalidad. También se pueden preparar composiciones sin fibrinógeno, como se describe en la Patente Estadounidense 6410260, que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad.

La invención también describe métodos para prevenir la pérdida de sangre en un paciente, que comprenden administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto de fórmula I. dichos pacientes incluyen, pero no se limitan a, individuos con afecciones hiperfibrinolíticas, o trasplantes de órganos o se someten a procedimientos quirúrgicos cardíacos, en particular, aquellos procedimientos que implican la circulación extracorpórea. Preferiblemente, el compuesto o compuestos se administran en la forma de una composición farmacéutica como se describió anteriormente. Los expertos en la técnica apreciarán que las dosis adecuadas variarán con el compuesto particular, la ruta de administración, la afección a tratar, y el estado hemostático del paciente. En general, las dosis diarias en el rango de 1 mg a 500 mg serán efectivas. Se pueden determinar los niveles de dosificación efectivos mediante ensayos de búsqueda de dosis de rutina, que están dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica. La dosificación puede ser continua (por ejemplo, a través de una línea intravenosa), o se puede administrar la dosis unitaria una o más veces al día, según sea necesario para mantener una concentración eficaz in vivo. Preferiblemente, la dosificación se ajusta con el fin de mantener un nivel en sangre medio que varía de 0.01 a 10 µg/ml durante el periodo para el que se desea la prevención de la pérdida de sangre.

La invención describe adicionalmente métodos para inhibir solo plasmina humana, o plasmina y PK, en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de uno o más compuestos de la fórmula I. Se determinan las dosis efectivas como se describió anteriormente.

La invención también proporciona el uso de un compuesto de la fórmula I en la fabricación de medicamentos para la prevención de pérdida de sangre, para inhibición de solo plasmina, o para inhibición de plasmina y PK, y en la fabricación de un adhesivo de fibrina.

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ejemplo, y están destinados a ilustrar y explicar la invención en detalle. El alcance de la invención no se limita a los ejemplos presentados.

40 EJEMPLOS

HPLC analítico

Variable	Parámetros
Dispositivo	Shimadzu LC-10A sistema con detector de matriz de fotodiodo
Columna	Nucleodur™ 100-5 C18 ec, 250 x 4.6 mm, Macherey-Nagel, Düren, Alemania
Fase Móvil	A: TFA, 0.1%(v/v) en agua; B: TFA, 0.1 %(v/v) en acetonitrilo
Método	gradiente lineal, 1% de aumento en solvente B per min
Índice de flujo	1.0 mL/min

Detección UV 220 nm

Temperatura de Columna 30° C

HPLC preparativa

Variable Parámetros

Dispositivo Varian PrepStar™ 218

Columna A: Nucleodur™ C8, 5 µm, 100 Å, 32 x 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Alemania

B: Prontosil™ 120-5-C18-SH, 32 x 250 mm, Bischoff, Leonberg, Alemania

(la columna A se utiliza de forma rutinaria, la columna B se utiliza cuando se anota)

Fase Móvil A: TFA, 0.1 %(v/v) en H₂O; B: TFA, 0.1 %(v/v) en acetonitrilo

Método gradiente lineal,

Índice de flujo 20.0 mL/min

Detección UV 220 nm

Temperatura de Columna (ambiente)

Cromatografía de capa fina

5 La cromatografía de capa fina (TLC) de los inhibidores de la final se realiza en placas de gel de sílice (Adamant™ UV254, Macherey-Nagel, Düren, Alemania) utilizando n-butanol/ácido acético/agua 4/1/1 (v/v/v). Las manchas se detectan por absorbancia UV, seguido por tratamiento con pulverización de ninhidrina, o mediante incubación de las placas de TLC en una atmósfera de cloro y visualización con o-toluidina.

Espectroscopia de masas

Los espectros de masas se registran en un espectrómetro QTrap™ 2000 ESI (Applied Biosystems), o un espectrómetro Autospec™ (Micromass).

10 Espectroscopía de RMN

Los espectros ¹H y ¹³C se registran a 400 y 100 MHz, respectivamente, en un espectrómetro de ECX-400 (Jeol Inc., EE.UU.), y se hace referencia a señales de solvente internos.

Abreviaturas

4-Amba 4 - (aminometil) benzamidina

15 Ac acetilo

AMe aminometilo

Boc tert-butiloxycarbonilo

BSA albúmina de suero bovino

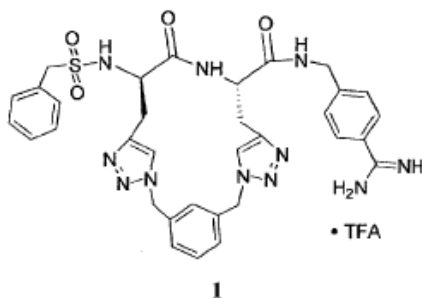
Bzl bencilo

20 Bzls bencilsulfonilo

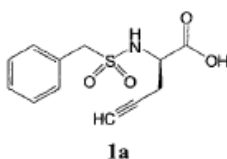
- Cbz benciloxycarbonilo
- DCM diclorometano
- DIPEA diisopropiletilamina
- DMF N, N-dimetilformamida
- 5 DMSO dimetilsulfóxido
- HBTU hexafluorofosfato de 2- (1H -benzotriazol-1-il) 1,1,3,3-tetrametiluronio
- HPLC cromatografía líquida de alto desempeño
- MTBE t-butilmetiléter
- MS espectroscopía de masas
- 10 NMM N-metil-morfolina
- Phe(4-NH₂) 4 aminofenilalanina
- Phe(4-AME) 4 -aminometilfenilalanina
- Phe (4-CN) 4-cianofenilalanina
- Phe (4-NO₂) 4-nitrofenilalanina
- 15 Ppg propargilglicina
- PyBop hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfonio
- TFA ácido trifluoroacético
- THF tetrahidrofurano
- TLC cromatografía de capa fina
- 20 TMS-Cl cloruro de trimetilsililo

Los productos químicos, solventes, reactivos y derivados de aminoácidos comerciales se adquieren de las compañías Aldrich, Fluka, Acros, Bachem, Iris Biotech, Orpegen Pharma, Novabiochem y Peptech.

Ejemplo 1:



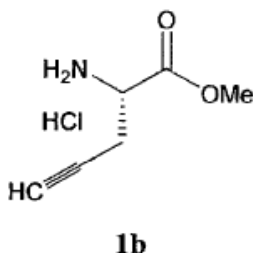
Bzls-D-Ppg-OH



500 mg de (3.34 mmol) H-D-Ppg-OH·HCl se suspenden en 10 ml de DCM seco y se trata con 912 μ l (7.35 mmol) de TMS-Cl y 1.861 ml (10.69 mmol) de DIPEA. La mezcla se somete a reflujo durante una hora. A 0° C, 705 mg (3.70 mmol) de cloruro de bencilsulfonilo se agrega en diversas porciones durante 35 min. El pH se mantiene a 8 a 9 mediante adición de DIPEA adicional (700 μ l, 4.02 mmol). La mezcla se agita en el baño de hielo durante 30 min y a temperatura ambiente durante la noche.

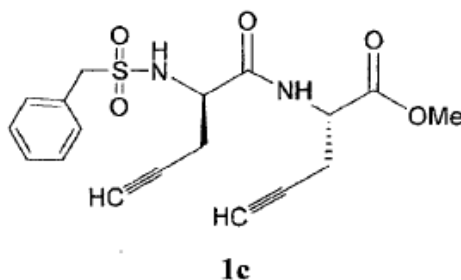
El solvente se elimina en vacío, y el residuo marrón se disuelve en agua ajustada a pH 8 a 9 (con NaOH 1 N). La solución se extrae 2x con EtOAc, la fase de agua se ajusta a pH 1 con una solución de KHSO₄ al 5% y se extrae 3x con EtOAc. La fase orgánica combinada se lava 2x con 5% de KHSO₄ y 2x con solución salina. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 481 mg (aceite marrón, HPLC: 26.7 min, inicia a 10% de B; MS: calc.: 267.06 encontrado: 285 (M+NH₂)⁺, 290 (M+Na)⁺).

H-Ppg-OMe-HCl



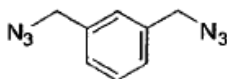
498 mg (3.33 mmol) de H-Ppg-OH se suspende en 2 ml de metanol y se trata en forma de gotas con 267 μ l de cloruro de tionilo a -15 ° C. La mezcla se agita 1 h a -15 5 ° C, y se trata con 27 μ l de cloruro de tionilo adicionales a temperatura ambiente. La mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente y el producto se precipita mediante adición de éter de dietilo. Se obtiene el producto mediante filtración y se seca en vacío. Rendimiento: 490.3 mg (sólido marrón, MS: calc.: 127.06 encontrado: 128 (M+H)⁺).

20 Bzls-D-Ppg-Ppg-OMe

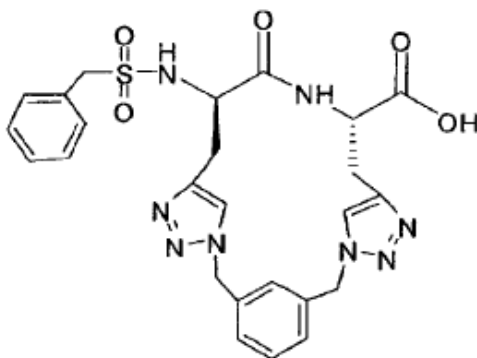


473 mg (1.77 mmol) de Bzls-D-Ppg-OH y 292 mg (1.78 mmol) de H-Ppg-OMe se disuelven en 23.5 ml de DMF y se trata con 1.02 g (1.96 mmol) de PyBOP y 928 μ l (5.33 mmol) de DIPEA (pH 8-9) a 0° C. La mezcla se agita 1 h en el baño de hielo y a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío, y el residuo se disuelve en EtOAc. La fase orgánica se lava 3x con 5% de KHSO₄, 1x solución salina, 3x con NaHCO₃ saturado y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se filtra. El solvente se elimina en vacío y el producto se cristaliza a partir de EtOAc. Rendimiento: 236.7 mg (ligeramente sólido marrón/blanco, HPLC: 35.6 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 376.11 encontrado: 399 (M+Na)⁺ 775 (2M+Na)⁺).

1,3-Bis(azidometil)benzeno

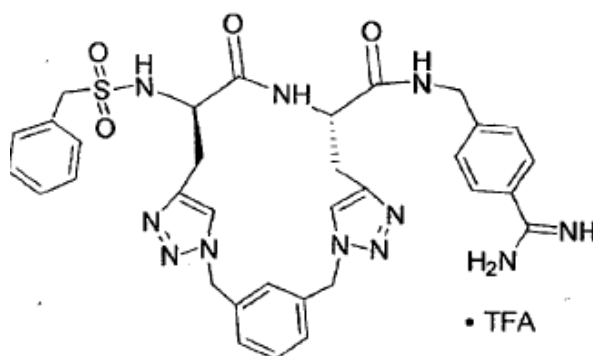
**1d**

1.32 g (5.0 mmol) de α,α -dibromo-*m*-xileno se disuelven en 30 ml de DMSO y se trata con 810 mg (12.5 mmol) de azida de sodio. La mezcla se agita 2 h a temperatura ambiente. La solución amarilla se trata con agua helada y se extrae 3x con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavan 2x con agua y 1x con solución salina, se seca con Na_2SO_4 se filtra y el solvente se evapora. Rendimiento: 880 mg de sólido amarillo (HPLC: 20.8 min, inicia a 40% de B).

**1e**

150 mg (0.399 mmol) de BzIs-D-Ppg-Ppg-OMe, 63 mg (0.399 mmol) de 1,3-bis(azidometil)benzeno y 19 mg (0.159 mmol) de CuBr se disuelven en 50 ml de DMF, 1 ml de agua y 416 ml (2.391 mmol) de DIPEA. Se realiza la reacción a 120° C en un reactor de microondas (Discover™, CEM) durante 5 min (150 W, prioridad de temperatura). (Véase P. Cintas et al., Coll.Czech. Chem. Commun., 72, 1014-1024, 2007.) El solvente se elimina en vacío y se obtiene el éster de metilo como un aceite verde. (HPLC: 13.3 min, inicia a 30% de B, MS: calc.: 564.19 encontrado: 565.12 (M+H)⁺). Este procedimiento se repite dos veces.

Los residuos combinados de estas tres reacciones se disuelven en 30 ml de DMF y se trata con 3.6 ml de solución de NaOH 1 N. La mezcla se agita durante 1 h a temperatura ambiente. El solvente se elimina en vacío, el residuo se suspende en una mezcla de EtOAc y 5% de solución de KHSO_4 . La fase de agua se extrae dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavan 1x con 5% de solución de KHSO_4 , 3x con solución salina, se seca con Na_2SO_4 , se filtra, y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 208 mg de sólido amorfo, ligeramente amarillo (HPLC: 10.8 min, inicia a 30% de B).

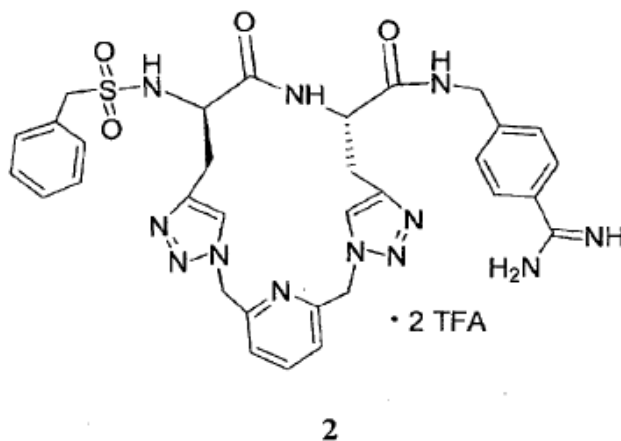
**1**

20

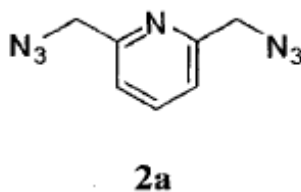
108 mg del compuesto 1e (0.196 mmol) y 21.6 μl de NMM (0.196 mmol) se disuelven a -20° C y se tratan con 25.5 μl de clorofornato de isobutilo (0.196 mmol). La mezcla se agita durante 10 min a -15 ° C y se trata con 65.4 mg (0.294 mmol) de 4-amidinobencilamina-2HCl y 21.6 μl de NMM (0.196 mmol). La suspensión se agita a -20° C durante una

hora adicional y a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío. El residuo ligeramente amarillo se disuelve en 35% de solvente B y se purifica mediante HPLC preparativo (inicio de gradiente a 20% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan y el solvente se elimina parcialmente en vacío, seguido por liofilización del producto. Rendimiento: 78 mg de sólido liofilizado blanco (HPLC: 24.7 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 681.26 encontrado: 341.58 (2M+H)⁺ 682.08 (M+H)⁺, TLC: R_f= 0.43).

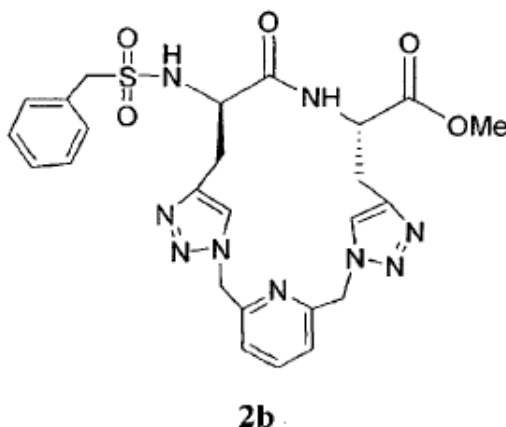
Ejemplo 2:



2,6-Bis(bromometil)piridina (1.0 g, 3.77 mmol) se disuelve en 30 ml de DMSO y se trata con 613 mg (9.44 mmol) de azida de sodio. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante dos horas. La solución ligeramente amarilla se trata con agua helada y se extrae 3x con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan dos veces con agua y 1x con solución salina, se secan con Na₂SO₄, y se filtran, y el solvente se elimina en vacío para proporcionar 528 mg de 2,6-bis(azidometil) piridina (2a) como un aceite amarillo.

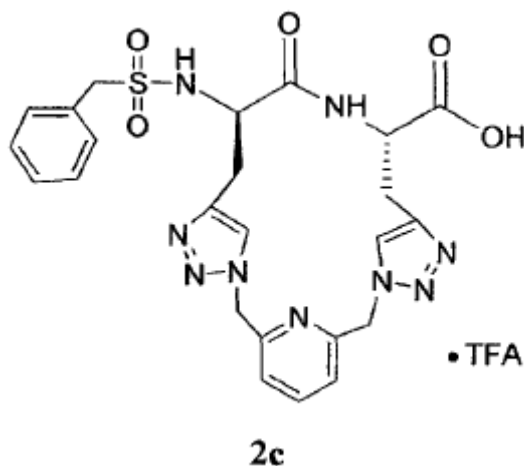


(HPLC: 19.7 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 189.08 encontrado: 190.0 (M+H)⁺).

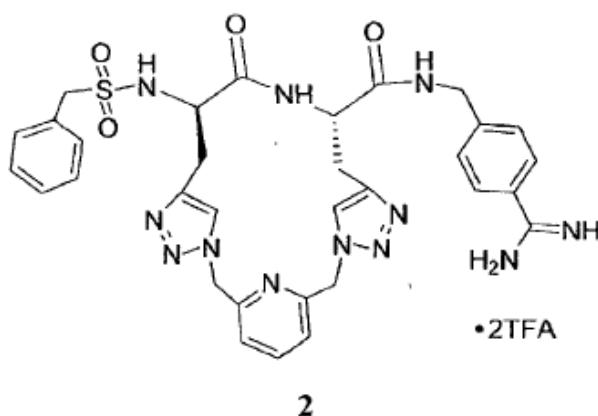


Bzls-D-Ppg-Ppg-OMe (208 mg, 0.5526 mmol), 2,6-bis(azidometil)piridina (104.5 mg, 0.553 mmol), y CuBr (31.7 mg, 0.2210 mmol) se disuelven en 50 ml de DMF, 1 ml de agua y 577 μl (3.316 mmol) de DIPEA. La reacción se realiza en el reactor de microondas a 120° C (5 min, 150 W, prioridad de temperatura). El solvente se elimina en vacío, y el residuo se trata con una mezcla de una solución saturada de NaHCO₃ y acetato de etilo. La fase de agua se extrae

dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan 1 x con NaHCO_3 saturado y 3x con solución salina. Rendimiento: 60.9 mg de 2b como un sólido amorfo, blanco (HPLC: 18.5 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 565.2, encontrado: 566.5 $(\text{M}+\text{H})^+$).

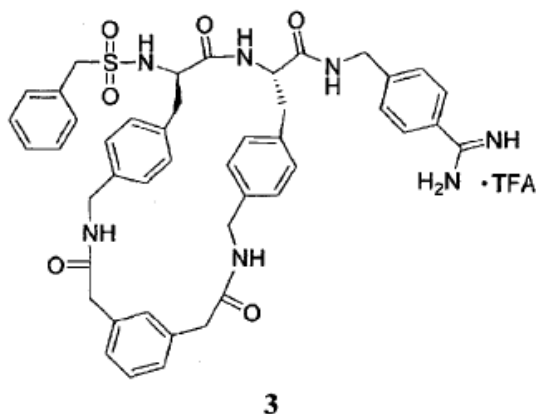


- 5 El intermedio 2b (60.9 mg, 0.1079 mmol) se disuelve en 20 ml de etanol/agua y se trata con 1 ml de NaOH 1 N. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla se neutraliza mediante adición de TFA y el solvente se elimina en vacío. El residuo marrón oscuro se disuelve en 30% de solvente B y se purifica mediante HPLC preparativo (columna C18, inicio de gradiente a 15% de B). Las fracciones que contienen producto se combina, el solvente se elimina parcialmente y el producto se liofiliza. Rendimiento: 33.4 mg de 2c como un sólido ligeramente amarillo (HPLC: 13.6 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 551.2, encontrado: 552.4 $(\text{M}+\text{H})^+$).
- 10

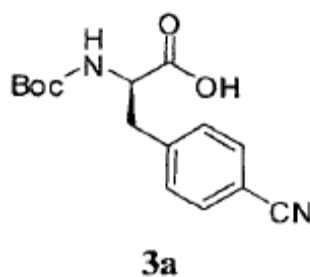


- 15 El intermedio 2c (30 mg, 0.04507 mmol) se disuelve en 5 ml de DMF y se trata con 5 μl de NMM (0.04507 mmol). Se agregan a -20°C 5.9 μl de cloroformato de isobutilo (0.045 mmol). Después de 10 min a -15°C se agregan 15.6 mg (0.0676 mmol) 4- amidinobencilamina-2HCl y 5 μl de NMM (0.04507 mmol). La mezcla se agita a -20°C durante una hora y a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío, y el sólido amarillo claro resultante se disuelve en 30% de solvente B y se purifica mediante HPLC preparativo (columna B, inicio de gradiente a 15% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan, el solvente se elimina parcialmente, y el producto liofilizado. Rendimiento: 9.8 mg de 2 como un polvo liofilizado blanco (HPLC: 10.7 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 682.76 encontrado: 683.46 $(\text{M}+\text{H})^+$, TLC: $R_f=0.25$).

20 **Ejemplo 3:**

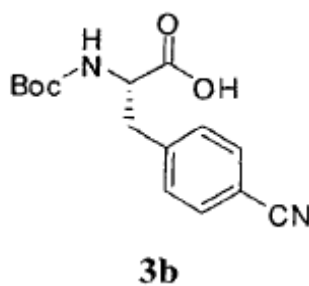


Boc-D-Phe(4-CN)-OH



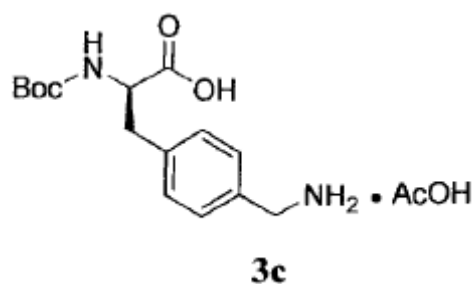
5 El H-D-Phe(4-CN)-OH (3.0 g, 13.2 mmol) se disuelve en 14 ml de t-butanol, y se agregan 20 ml de agua y 1.63 g (41 mmol) de NaOH. La mezcla se trata con 4.35 g (19.8 mmol) de Boc_2O durante un periodo de una hora. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche, y el solvente se elimina en vacío. El residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO_4 y acetato de etilo, y la fase de agua se extrae dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan 3x con solución salina, se secan con Na_2SO_4 , se filtran, y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 3.7 g de 3a como un sólido blanco (HPLC: 35.6 min, inicia a 10% de B).

10 Boc-Phe(4-CN)-OH



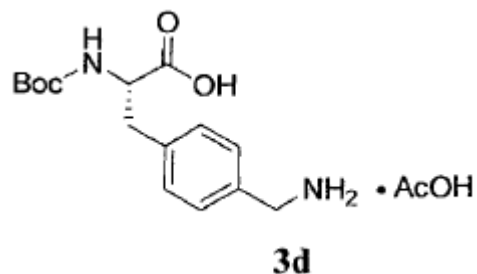
El compuesto 3b se prepara por el método utilizado para preparar el intermedio 3a. Rendimiento: 2.8 g de 3b como un sólido blanco (HPLC: 35.6 min, inicia a 10% de B).

Boc-D-Phe(4-AMe)-OH· CH_3COOH



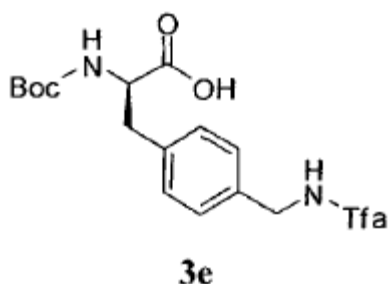
- 5 2.3 g (7.9 mmol) de Boc-D-Phe(4-CN)-OH se disuelve en 450 ml de AcOH (90 %), y se agrega 250 mg de Pd/C (10% Pd). La mezcla se hidrogena con hidrógeno a 40 ° C durante la noche. El catalizador se elimina mediante filtración y el solvente se evapora. El residuo se disuelve en una pequeña cantidad de metanol y se precipita con éter de dietilo. Rendimiento: 1.7 g de 3c como un sólido blanco (HPLC: 16.8 min, inicia a 10% de B).

Boc-Phe(4-AMe)-OH·CH₃COOH



El intermedio 3b (2.8 g) se convierte a 3d por el método descrito para la preparación del intermedio 3c. Rendimiento: 2.5 g de sólido blanco (HPLC: 16.8 min, inicia a 10% de B).

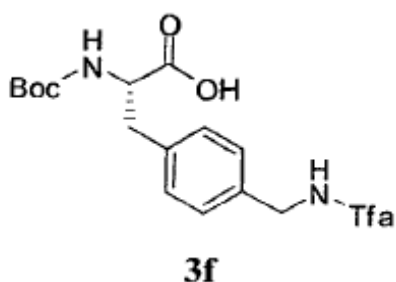
- 10 Boc-D-Phe(4-Tfa-AMe)-OH



- 15 El Boc-D-Phe(4-AMe)-OH·CH₃COOH (1.7 g, 4.80 mmol) se suspende en 10 ml de metanol y se trata con 737 μl (6.195 mmol) de trifluoroacetato de etilo y 1.92 ml (11.05 mmol) de DIPEA. La mezcla se agita para una hora. El solvente se elimina en vacío y el residuo se disuelve con una mezcla de 5% de solución de KHSO₄ y acetato de etilo. La fase orgánica se lava dos veces con una solución de KHSO₄ al 5% y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra, y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 2.2 g de 3e como un sólido amorfo amarillo (HPLC: 38.8 min, inicia a 10% de B).

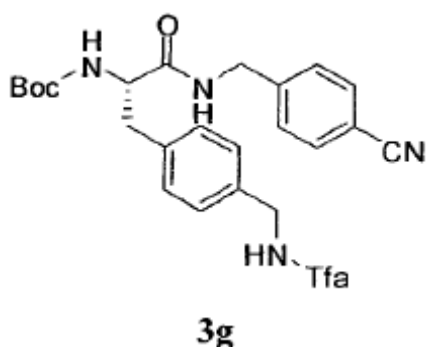
Boc-Phe(4-Tfa-AMe)-OH

- 20



El intermedio 3d (2.5 g) se convierte al compuesto 3f por el procedimiento descrito para la preparación del intermedio 3e. Rendimiento: 3.0 g de sólido amorfo amarillo (HPLC: 38.8 min, inicia a 10% de B).

Boc-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida

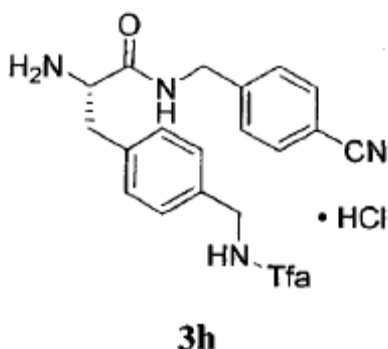


5

el Boc-Phe(4-Tfa-AMe)-OH (3f), (3.0 g, 7.81 mmol) se disuelve en 35 ml de THF at 15° C. y se trata con 1.02 ml (7.81 mmol) cloroformato de isobutilo y 859 µl (7.81 mmol) de NMM. La mezcla se agita durante 10 min a -15 ° C, seguido por el tratamiento con 1.38 g (8.20 mmol) de 4-cianobencilamina·HCl y 902 µl (8.20 mmol) de NMM. La mezcla se agita a -15 ° C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 6 h. El solvente se elimina en vacío y el residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO₄ y acetato de etilo, y se lava 3x con 5% de solución de KHSO₄, 1x con solución salina, 3x con solución saturada de NaHCO₃ y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 3.7 g de 3g como un sólido amorfo blanco (HPLC: 46.7 min, inicia a 10% de B).

10

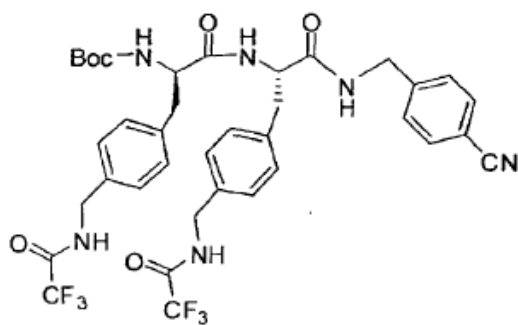
H-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida·HCl



15

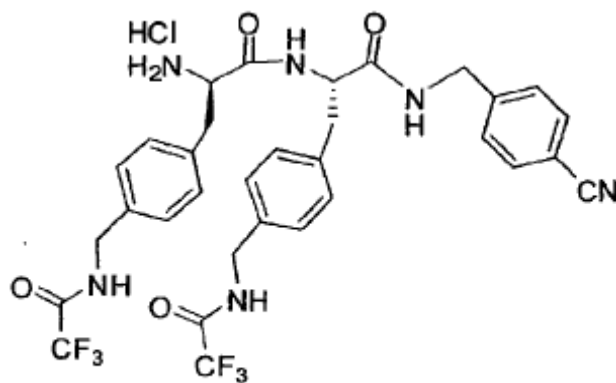
La Boc-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida (3g), (3.7 g, 7.3 mmol) se trata con 42 ml de HCl 1 N en ácido acético. El producto se precipita mediante adición de éter de dietilo después de 1 h. Se obtiene el producto mediante filtración, se lava con éter de dietilo y se seca en vacío. Rendimiento: 3.0 g de 3h como un sólido blanco (HPLC: 24.9 min, inicia a 10% de B).

20 Boc-D-Phe(4-Tfa-AMe)-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida

**3i**

5 El Boc-D-Phe(4-Tfa-AMe)-OH (3e), (2.2 g, 5.6 mmol) y H-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida-HCl (3h), (2.5 g, 5.6 mmol) se disuelven en 50 ml de DMF. La mezcla se trata a 0 ° C con 2.93 g (5.6 mmol) de PyBOP y 2.94 ml (16.9 mmol) de DIPEA y se agita durante 2 h a 0 ° C y a temperatura ambiente durante la noche. El DMF se elimina en vacío, el residuo se trata con acetato de etilo, y la fase orgánica se lava 3x con 5% de solución de KHSO₄, 1x con solución salina, 3x con solución saturada de NaHCO₃ y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 5.6 g de 3i como un sólido amarillo claro (HPLC: 52.2 min, inicia a 10% de B).

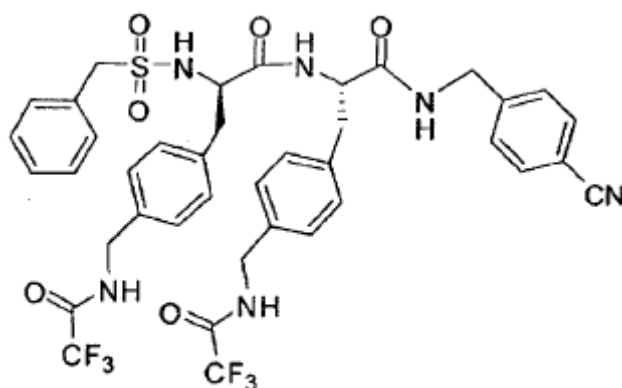
H-D-Phe(4-Tfa-AMe)-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida-HCl

**3j**

10

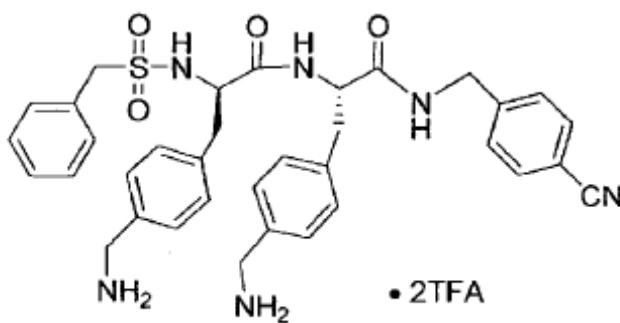
La Boc-D-Phe(4-Tfa-AMe)-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida (3i), (5.5 g, 5.63 mmol) se disuelve en 30 ml de ácido acético y se trata con 12 ml HCl 1 N en ácido acético. La mezcla se agita de forma intermitente, y después de 1.5 h el solvente se elimina parcialmente y el producto se precipita mediante adición de éter de dietilo y se seca en vacío. Rendimiento: 4.46 g de 3j como un sólido blanco (HPLC: 35.2 min, inicia a 10% de B).

15 BzIs-D-Phe(4-Tfa-AMe)-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida

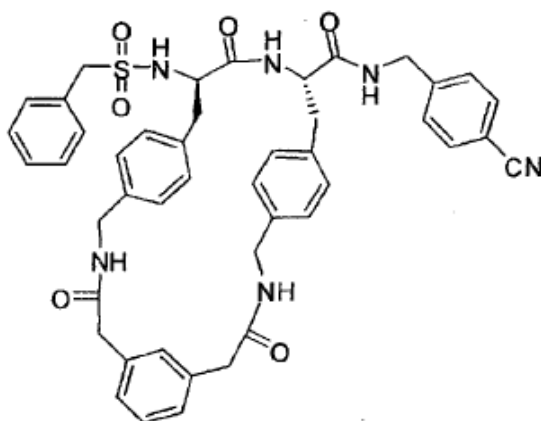
**3k**

La H-D-Phe(4-Tfa-AMe)-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida·HCl (4.46 g, 6.25 mmol) se disuelve en 50 ml de THF a 0 ° C y se trata con 1.33 g (6.9 mmol) de cloruro de bencil sulfonilo y 1.375 ml (12.5 mmol) de NMM. La mezcla se agita durante dos horas en el baño de hielo y a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla todavía contiene algo del material de partida (HPLC), por lo tanto, se agregan 2.62 g adicionales (13.7 mmol) de cloruro de bencil sulfonilo a 0 ° C (pH ajustado a 8-9 por NMM), y la mezcla se agita durante 2.5 h a 0° C, seguido por evaporación del solvente en vacío. El residuo se trata con una mezcla de acetato de etilo y 5% de solución de KHSO₄ y se lava 3x con 5% de solución de KHSO₄, 1x solución salina, 3x con solución saturada de NaHCO₃ y 3x con solución salina. El producto que se ha precipitado entre las fases se elimina mediante filtración. Rendimiento: 1.7 g de 3k como un sólido gris claro, que se utiliza como es para reacciones adicionales. (HPLC: 51.5 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 830.23 encontrado: 853.14 (M+Na)+.) La fase orgánica restante se seca con Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío para llevar 2.9 g adicionales de 3k como un sólido ligeramente amarillo que tiene algunas impurezas (HPLC: 51.5 min, inicia a 10% de B).

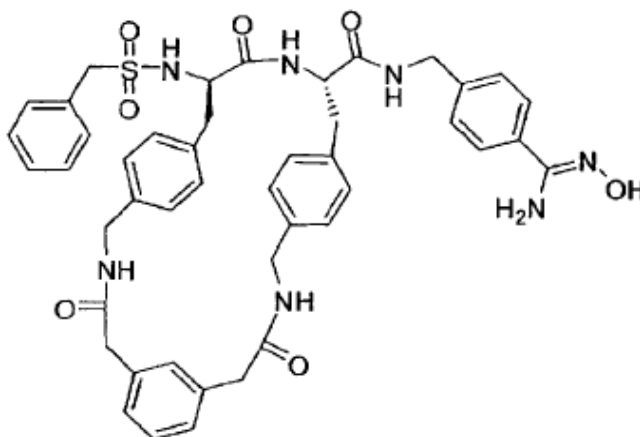
Bzls-D-Phe(4-AMe)-Phe(4-AMe)-4-cianobencilamida-2TFA

**3l**

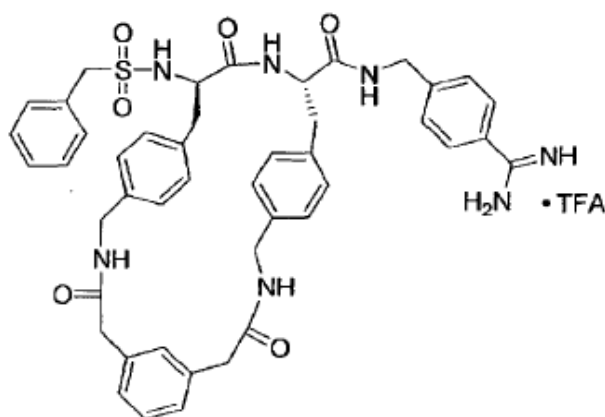
Bzls-D-Phe(4-Tfa-AMe)-Phe(4-Tfa-AMe)-4-cianobencilamida (3k), (1.6 g, 1.93 mmol) se disuelve en 12 ml de dioxano y 12 ml (12 mmol) de solución de NaOH 1N y se agita durante 3 h a 45 ° C. La mezcla se neutraliza mediante adición de HCl 1 N. El solvente se elimina en vacío, el residuo se disuelve en 30% de solvente B y el producto se purifica mediante HPLC preparativo: (inicio de gradiente a 15% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan, el solvente se elimina parcialmente en vacío, y el producto se liofiliza. Rendimiento: 865.2 mg 3l como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 23.6 min, pureza 95.2% a 220 nm, inicia a 10% de B, MS: calc.: 638.27 encontrado: 639.38 (M+H)*).

**3m**

5 Ácido m-Fenilenodiacético (34 mg, 0.173 mmol) se disuelve en 60 ml de DMF y se trata con 131.5 mg (0.346 mmol) de HBTU y 60.2 μ l (0.346 mmol) de DIPEA y se agita en el baño de hielo durante 15 min. La mezcla se trata con 150 mg (0.173 mmol) de Bzls-D-Phe(4-AMe)-Phe(4-AMe)-4-cianobencilamida-2TFA y 60.2 μ l (0.346 mmol) de DIPEA y se agita en el baño de hielo durante 3 h y a temperatura ambiente durante 48 h. El solvente se elimina en vacío, y el producto crudo 3m (504 mg) se utilice directamente para la siguiente etapa. HPLC: 41.1 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 796.30 encontrado: 797.3 (M+H)⁺.

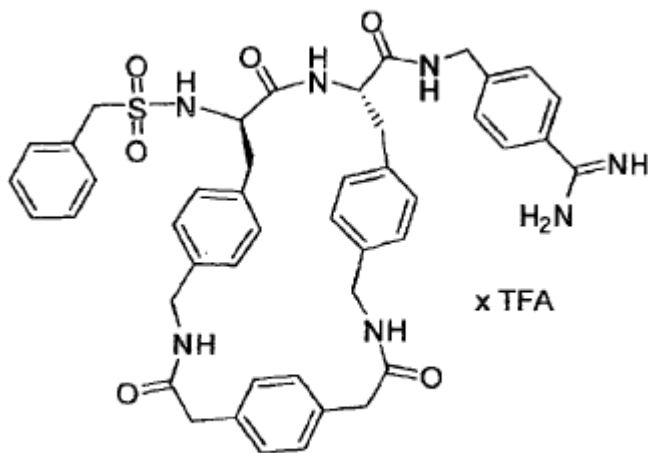
**3n**

10 El intermedio crudo 3m (504 mg) se suspende en 5 ml etanol absoluto, y se trata con 36.3 mg (0.519 mmol) hidroxilaminade -HCl y 90.3 μ l (0.519 mmol) de DIPEA. La mezcla se somete a reflujo 4 h y se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla todavía contiene aproximadamente 60% de material de partida 3m con base en análisis HPLC. Por lo tanto, la mezcla se trata con 36.3 adicionales (0.519 mmol) de hidroxilamina-HCl y 90.3 μ l (0.519 mmol) de DIPEA., la suspensión se somete a reflujo durante 6 h y se agita a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío y el residuo se disuelve en una mezcla de solución saturada de NaHCO₃ y acetato de etilo. La fase orgánica se lava 3x con solución saturada de NaHCO₃ y 3x con solución salina: Durante el
15 procedimiento de lavado algo del producto 3n se precipita entre las fases, y se recupera mediante filtración. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío para proporcionar producto adicional. Rendimiento: 214 mg de crudo 3n como un sólido blanco (HPLC: 28.7 min, inicia a 10% de B). Los materiales combinados se utilizan directamente para la siguiente etapa.



3

5 El intermedio crudo 3n (183 mg) se suspende en 5 ml de ácido acético, y se trata con 65.7 μ l (0.692 mmol) de anhídrido acético y se agita a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se elimina en vacío, se redisuelve en 60 ml de ácido acético (90 %), y se hidrogena a 40 ° C durante la noche utilizando Pd/C como catalizador. El catalizador se elimina mediante filtración, el solvente se evapora y el residuo se disuelve en 30% de solvente B y el producto se purifica mediante HPLC preparativo (inicia a 20% de B). Las fracciones que contienen producto se combina y se liofiliza para proporcionar 3 como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 28.7 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 813.3 encontrado: 814.3 (M+H)⁺, TLC: R_f= 0.73).

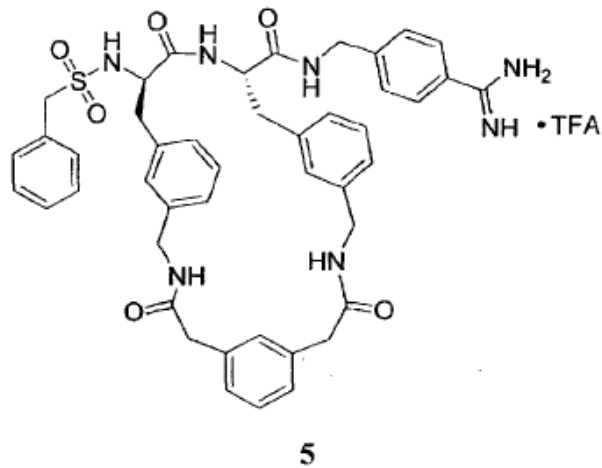
Ejemplo 4:

4

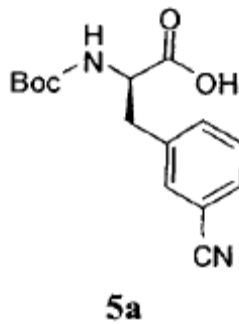
10

El inhibidor 4 se sintetiza como se describió anteriormente para el ejemplo 3, y se obtiene como un sólido liofilizado blanco. HPLC: 18.0 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 813.3 encontrado: 814.3 (M+H)⁺, TLC: R_f=0.69.

Ejemplo 5:

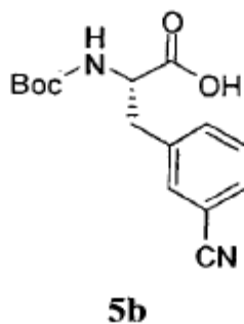


El Boc-D-Phe(3-CN)-OH



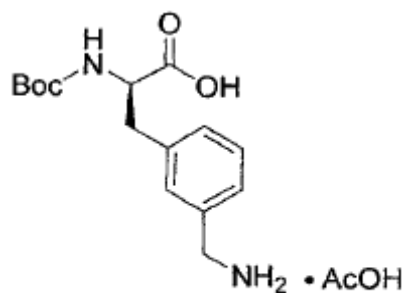
5 H-D-Phe(3-CN)-OH (3.0 g, 13.2 mmol) se disuelve en 66 ml de dioxano y 33 ml de agua y se agita a 0 ° C. La mezcla se trata con 3.18 g (14.6 mmol) de Boc_2O y 14.6 ml (14.6 mmol) de solución de NaOH 1 N, el pH se ajusta con solución adicional de NaOH 1 N a 8-9, y la mezcla se agita a temperatura ambiente unas 6 h adicionales. El solvente se elimina en vacío, y el residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO_4 y acetato de etilo. La fase de agua se extrae dos veces con acetato de etilo, y las fases orgánicas combinadas se lavan 3x con solución salina y se seca con Na_2SO_4 . El solvente se filtra y se evapora en vacío. Rendimiento: 3.8 g de 5a como un sólido blanco (HPLC: 31.5 min, inicia a 10% de B).

Boc-Phe(3-CN)-OH



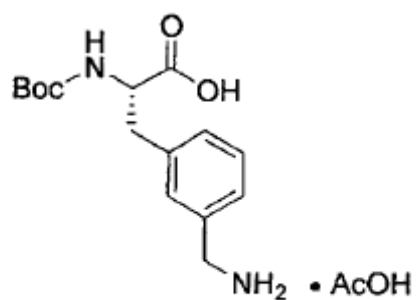
La síntesis del intermedio 5b se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito para el intermedio 5a. Rendimiento: 3.2 g de sólido blanco (HPLC: 31.5 min, inicia a 10%B).

15 Boc-D-Phe(3-AMe)-OH· CH_3COOH

**5c**

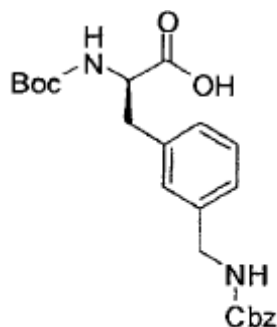
- 5 El Boc-D-Phe(3-CN)-OH (5a), (3.7 g, 12.9 mmol) se disuelve en 750 ml de ácido acético (90 %), se agrega 10% de Pd/C (374 mg), y la mezcla se hidrogena a 40 ° C durante la noche. El catalizador se filtra y el solvente se evapora en vacío. El residuo se disuelve en una pequeña cantidad de metanol y el producto se precipita mediante adición de éter de dietilo. Rendimiento: 2.7 g de 5c como un sólido blanco (HPLC: 17.8 min, inicia a 10% de B).

Boc-Phe(3-AMe)-OH·CH₃COOH

**5d**

La síntesis de 5d se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito para el intermedio 5c, utilizando 3.1 g (10.9 mmol) de Boc-Phe(3-CN)-OH. Rendimiento: 2.1 g de sólido blanco (HPLC: 17.8 min, inicia a 10% de B).

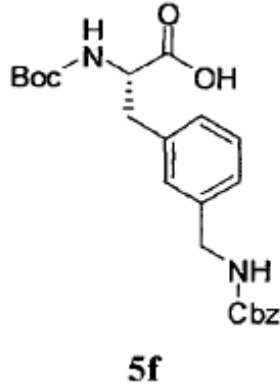
- 10 Boc-D-Phe(3-AMe-Cbz)-OH

**5e**

- 15 El Boc-D-Phe(3-AMe)-OH·AcOH (5c), (2.7 g, 7.52 mmol) se disuelve en MeCN y se agita en el baño de hielo. La mezcla se trata con 1.87 g (7.52 mmol) de Cbz-OSu y 827 μl (7.52 mmol) de NMM y se agita durante la noche. El solvente se elimina en vacío y el residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO₄ y acetato de etilo. La fase de agua se extrae 2x con acetato de etilo, las fases orgánicas combinadas se lavan con 5% de KHSO₄ y 3x

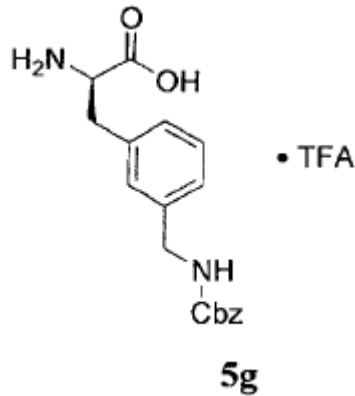
con solución salina, se seca con Na₂SO₄, y se filtra. El solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 3.1 g de 5e como un sólido amarillo claro (HPLC: 38.6 min, inicia a 10% de B).

Boc-Phe(3-AMe-Cbz)-OH



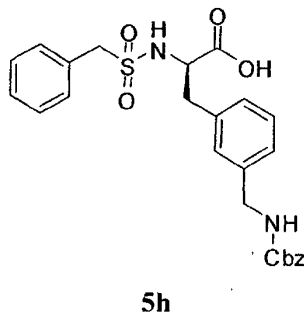
- 5 La síntesis se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito para el intermedio 5e, utilizando 2.05 g (5.78 mmol) de Boc-Phe(3-AMe)-OH·CH₃COOH. Rendimiento: 2.45 g de sólido amorfo amarillo claro (HPLC: 38.6 min, inicia a 10% de B).

H-D-Phe(3-AMe-Cbz)-OH·TFA



- 10 El Boc-D-Phe(3-AMe-Cbz)-OH (5e) (3.1 g) se trata con 40 ml de TFA/CH₂Cl₂ al 50%. El solvente se elimina después de 1 h, el residuo se disuelve en agua, y el solvente se evapora. El residuo se liofiliza de 40% t-butanol. Rendimiento: 3.0 g de 5g como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 15.3 min, inicia a 20% de B).

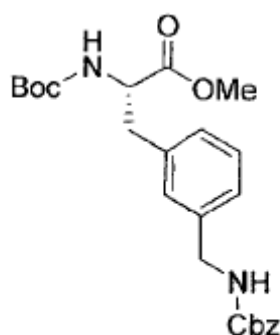
Bzls-D-Phe(3-AMe-Cbz)-OH



5 H-D-Phe(3-AMe-Cbz)-OH·TFA (5g), (3.0 g, 6.78 mmol) se suspende en 30 ml de DCM seco y se trata con 1850 μ l (14.9 mmol) de TMS-Cl y 3.8 ml (21.7 mmol) de DIPEA. La mezcla se somete a reflujo durante 1 h y se enfría a 0 ° C, seguida por adición, de 1.42 g (7.46 mmol) de cloruro de bencilsulfonilo en diversas porciones durante un periodo de 35 min. El pH se mantiene a 8-9 mediante adición de DIPEA (1275 ml, 7.33 mmol). La mezcla se agita en el baño de hielo durante 1 h y a temperatura ambiente durante la noche.

10 El solvente se elimina en vacío, y el residuo marrón restante se disuelve en agua con solución de NaOH 1 N (pH 8-9) y se extrae 2x con acetato de etilo. El pH de la fase de agua se ajusta a 1-2 con 5% de solución de KHSO₄ y se extrae 2x con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan 2x con 5% de solución de KHSO₄ y 3x con solución salina, se secan con Na₂SO₄, se filtran y el solvente se elimina en vacío. El residuo se disuelve en 150 ml de acetato de etilo y se trata con 1170 μ l (10.2 mmol) de ciclohexilamina. La sal de ciclohexilamina del producto cristalizado a 4 ° C y se obtiene mediante filtración y se lava con acetato de etilo y éter de dietilo y se seca en vacío. El residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO₄ y acetato de etilo, la fase de agua se extrae dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan 2x con 5% de solución de KHSO₄ y 3x con solución salina, se seca con Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío. El residuo aceitoso se cristaliza lentamente a 4 ° C. Rendimiento: 2.57 g de 5h como un sólido marrón claro (HPLC: 28.7 min, inicia a 20% de B).

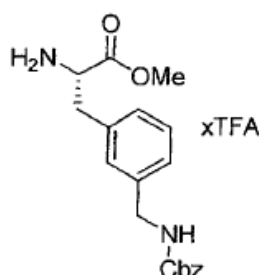
Boc-Phe(3-AMe-Cbz)-OMe



5i

20 N-metil-N-nitroso-p-toluenosulfonamida (Diazald™) (4.28 g, 20 mmol) se suspende en 25 ml éter de dietilo, 6.3 ml (80 mmol) de 2-metoxietanol y algunas gotas de agua. La mezcla se agita en el baño de hielo y se trata en forma de gotas con una mezcla de 3.3 ml de etanol y 70% de solución de KOH. La solución se calienta a 35 a 40 ° C, y diazometano y éter se destilan en una solución que contiene 5.6 mmol de Boc-Phe(3-AMe-Cbz)-OH (5f), (2.4 g en 30 ml de etanol). El exceso diazometano se degrada mediante adición de ácido acético, y el solvente se elimina en vacío para llevar el crudo 3.0 g de 5i como un sólido amarillo oscuro (HPLC: 43.7 min, inicia a 10% de B).

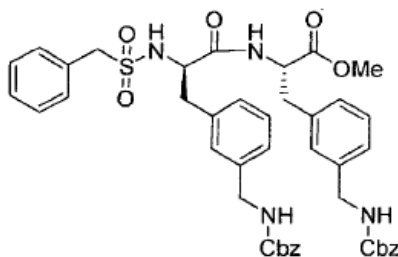
H-Phe(3-AMe-Cbz)-OMe·TFA



5j

25 El intermedio crudo 5i (3.0 g) se disuelve en 30 ml de TFA/CH₂Cl₂ al 50% con agitación ocasional, y después de 1 h el solvente se elimina en vacío. El ácido residual se elimina al disolver de forma repetida en agua y evaporar. El residuo se disuelve en 40% de t-butanol/H₂O y se liofiliza. Rendimiento: 2.46 g de 5j como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 26.3 min, inicia a 10% de B).

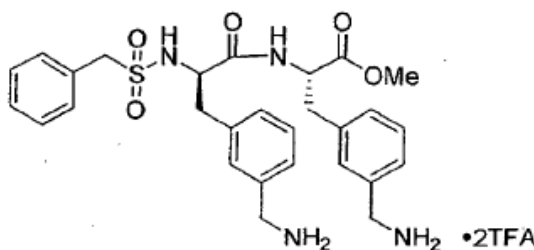
Bzls-D-Phe(3-AMe-Cbz)-Phe(3-AMe-Cbz)-OMe



5k

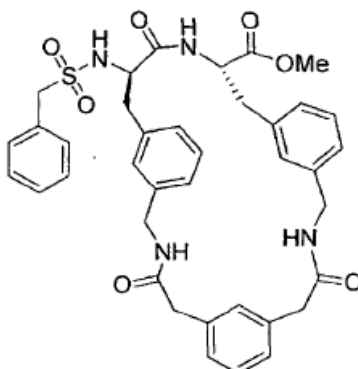
- 5 Bzls-D-Phe(3-AMe-Cbz)-OH (1.3 g, 2.69 mmol) y H-Phe(3-AMe-Cbz)-OMe (1.23 g, 2.69 mmol) se disuelven en 30 ml de DMF y se agita en el baño de hielo. La solución se trata con 1.41 g (2.69 mmol) de PyBOP y 469 μ l (8.08 mmol) de DIPEA (pH 7-8), y la mezcla se agita durante la noche. El solvente se elimina en vacío y el sólido amarillo oscuro residual se disuelve en acetato de etilo. La fase orgánica se lava 3x con 5% de solución de KHSO_4 , 1x con solución salina, 3x con solución saturada de NaHCO_3 y 3x con solución salina, se seca con Na_2SO_4 , se filtra y el solvente se elimina en vacío. Proporción de crudo 5k: 2.7 g de sólido amorfo amarillo claro (contiene algunas impurezas; HPLC: 52.0 min, inicia a 20% de B).

- 10 Bzls-D-Phe(3-AMe)-Phe(3-AMe)-OMe-2TFA



5l

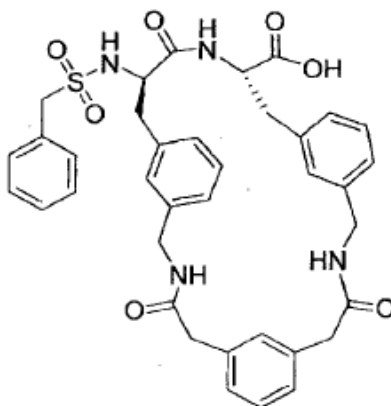
- 15 El Bzls-D-Phe(3-AMe-Cbz)-Phe(3-AMe-Cbz)-OMe crudo (5k) (2.7 g) se trata con 30 ml de HBr al 32% en ácido acético con agitación ocasional. Después de 1.5 h a temperatura ambiente el producto se precipita mediante adición de éter de dietilo, se filtra y se seca en vacío. El sólido amarillo claro se disuelve en 30% de solvente B y el producto se purifica mediante HPLC preparativo (inicia en 15% de B). Las fracciones que contienen producto se combina, el solvente se elimina parcialmente en vacío, y el producto se liofiliza. Rendimiento: 1.33 g 5l como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 14.7 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 538.22 encontrado: 539.34 (M+H)⁺).



5m

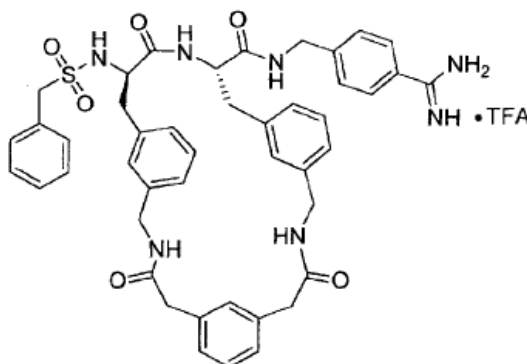
- 20 Bzls-D-Phe(3-AMe)-Phe(3-AMe)-OMe-2TFA (5l), (50 mg, 0.0652 mmol) y ácido m-fenilenodiácético (12.7 mg, 0.0652 mmol) se disuelven en 30 ml de DMF. La mezcla se agita en el baño de hielo y se trata con 68 mg (0.130 mmol) de

PyBOP y 68.1 μ l (0.391 mmol) de DIPEA. El solvente se elimina en vacío, y el residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO_4 y acetato de etilo. La fase orgánica se lava 3x con 5% de solución de KHSO_4 , 1x con solución salina, 3x con solución saturada de NaHCO_3 y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y el solvente se elimina en vacío. Proporción de producto crudo 5m: 66 mg de sólido amorfo blanco (contiene impurezas, HPLC: 36.2 min, inicia a 10% de B).



5n

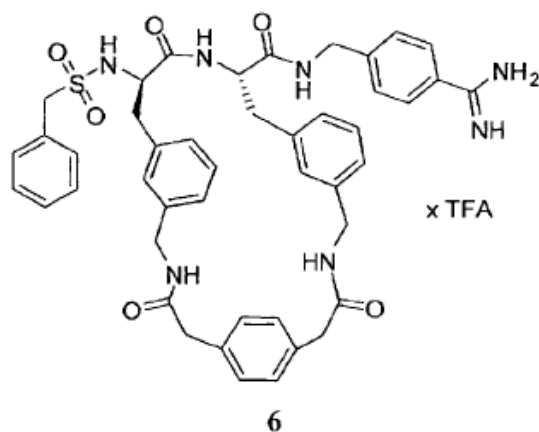
El producto crudo 5m (61 mg) se suspende en 4 ml de etanol y 4 ml de agua, se trata con 283 μ l de NaOH 1N, y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. El solvente se elimina en vacío, y el residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO_4 y acetato de etilo. La fase de agua se extrae 2x con acetato de etilo, la fase orgánica combinada se lava 1x con 5% de solución de KHSO_4 , y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y el solvente se evapora en vacío. Proporción de producto 5n: 57.7 mg de sólido amorfo blanco (contiene algunas impurezas, HPLC: 33.5 min, inicia a 10% de B).



5

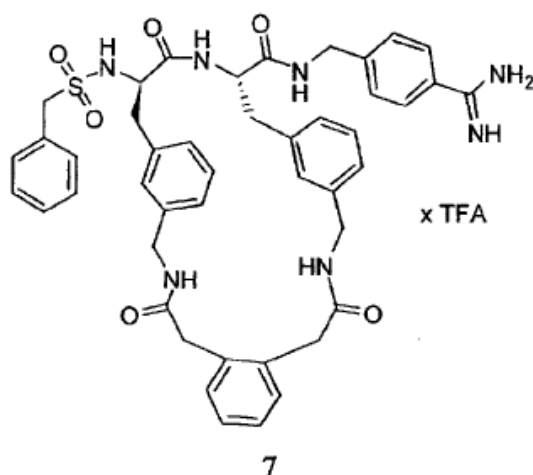
El producto crudo 5n (53 mg, ca. 0.0652 mmol) y 4-Amba-2HCl (14.5 mg, 0.0652 mmol) se suspenden en 20 ml de DMF. La mezcla se agita en un baño de hielo, se trata con 34 mg (0.0652 mmol) de PyBOP y 22.7 ml (0.130 mmol) de DIPEA, y se agita durante la noche. El solvente se elimina en vacío, el residuo sólido amarillento permanece se disuelve en 40% de solvente B, y el producto se purifica mediante HPLC preparativo (inicia a 25% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan, el solvente se elimina parcialmente en vacío y el producto se liofiliza. Rendimiento: 15.3 mg de sólido liofilizado blanco (HPLC: 20.8 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 813.33 encontrado: 814.6 (M+H)⁺, TLC: R_f=0,70).

Ejemplo 6:



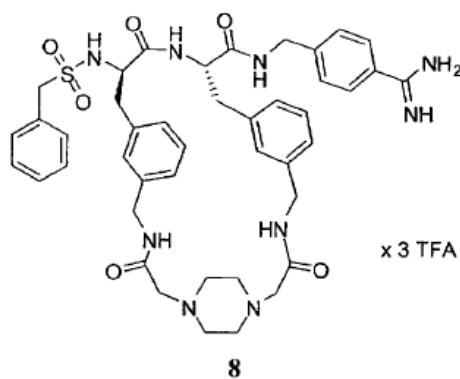
El inhibidor 6 se sintetiza de acuerdo con la estrategia utilizada para el inhibidor 5, con el intermedio 51 que se cicliza con ácido p-fenilenodiacético. Rendimiento: 13.2 mg de sólido liofilizado blanco (HPLC: 19.8 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 813.33 encontrado: 814.2 (M+H)⁺, TLC: Rf = 0.68).

5 Ejemplo 7:

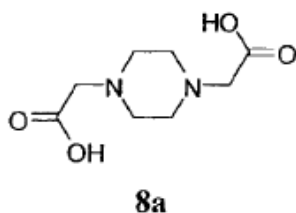


El inhibidor 7 se sintetiza de acuerdo con la estrategia utilizada para el inhibidor 5, con el intermedio 51 que se cicliza con ácido o-fenilenodiacético. Rendimiento: 8.9 mg de sólido liofilizado blanco (HPLC: 23.2 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 813.3 encontrado: 814.1 (M+H)⁺, TLC: Rf = 0.65).

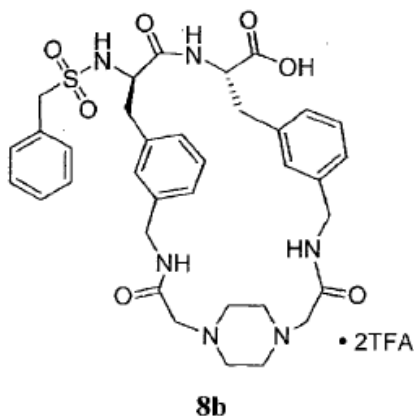
10 Ejemplo 8:



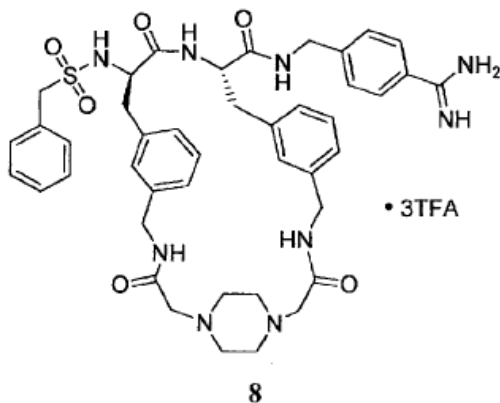
Ácido N,N'-piperazinadiacético



- 5 La piperazina (1 g, 11.6 mmol) se disuelve en 10 ml de solución de NaOH al 10%, se trata con 3.32 g (23.8 mmol) de ácido bromoacético y se agita a temperatura ambiente. Después de 3 h, la mezcla se acidifica con 37% de solución de HCl, y el producto se empieza a cristalizar. El matraz se mantiene a 4° C durante la noche, se obtiene el producto mediante filtración, se lava con una pequeña cantidad de agua y se seca en vacío. Rendimiento: 2.28 g de cristales blancos (MS: calc.: 202.2, encontrado: 203.0 (M+H)⁺; RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ [ppm] 3.85 4H, s, 2x CH₂; 3.59 8H, s, 4x CH₂).

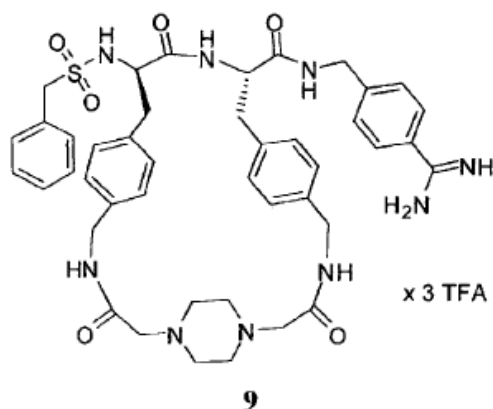


- 10 Bzls-D-Phe(3-AMe)-Phe(3-AMe)-OMe-2TFA (5l) (50 mg, 0.0652 mmol) y ácido N,N'-piperazinadiacético (13.2 mg, 0.0652 mmol) se suspenden en 35 ml de DMF a 0 ° C. La suspensión se trata con 68 mg (0.130 mmol) de PyBOP y 68.1 μl (0.391 mmol) de DIPEA y se agita a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío, y el residuo se disuelve en 5 ml de etanol/agua (1/1, v/v)) y se trata con 210 μl de NaOH 1 N. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h y luego se neutraliza mediante adición de TFA. El solvente se elimina en vacío, el residuo blanco se disuelve en 35% de solvente B y el producto se purifica mediante HPLC preparativo (inicia a 15% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan, el solvente se evapora parcialmente, el residuo se disuelve en 80% de t-butanol/agua, y el producto se liofiliza. Rendimiento: 22.4 mg 8b como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 27.4 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 690.28 encontrado: 691.31 (M+H)⁺).
- 15



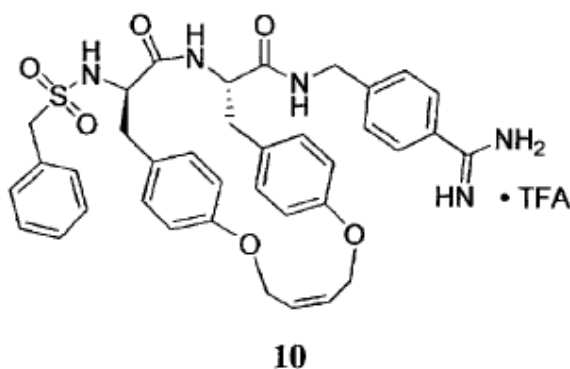
- 5 El intermedio 8b (20 mg, 0.0290 mmol) y 4-Amba-2HCl (6.8 mg, 0.0306 mmol) se suspenden en 10 ml de DMF y se agita en el baño de hielo. La mezcla se trata con 15.1 mg (0.0290 mmol) de PyBOP y 10.1 μ l (0.0579 mmol) de DIPEA y se agita a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío, y el producto se purifica mediante HPLC preparativo (inicia a 20% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan y se obtiene el producto mediante liofilización de 40% de t-butanol/agua. Rendimiento: 15.9 mg 8 como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 12.9 min, inicia a 20% de B; MS: calc.: 821.37, encontrado: 822.6 (M+H)⁺; TLC: R_f= 0.20).

Ejemplo 9:

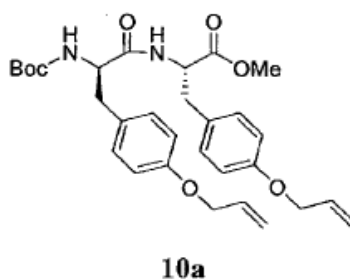


- 10 El inhibidor 9 se prepara utilizando la estrategia descrita para el inhibidor 8. El Bzls-D-Phe(4-AMe)-Phe(4- AMe)-OMe-2TFA se prepara por el método descrito en el Ejemplo 3, y se cicliza con ácido N,N'-piperazinadiacético. Rendimiento: 18.3 mg de sólido liofilizado blanco (HPLC: 11.2 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 821.37 encontrado: 822.60 (M+H)⁺, TLC: R_f = 0.12).

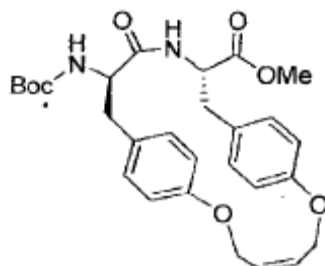
Ejemplo 10:



- 15 Boc-D-Tyr(All)-Tyr(All)-OMe

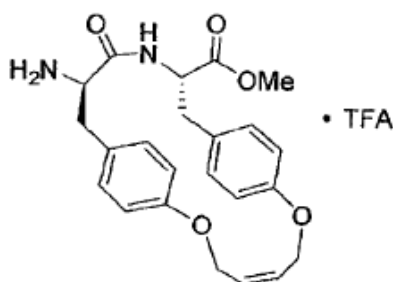


5 Boc-D-Tyr(All)-OH (2 g, 6.22 mmol) y H-Tyr(All)-OMe (1.7 g, 6.22 mmol) se disuelven en 50 ml de DMF y se agita en el baño de hielo. La mezcla se trata con 2.36 g (6.22 mmol) de HBTU y 3.25 ml de DIPEA y se agita durante 2 h. El solvente se elimina en vacío y el residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO₄ y acetato de etilo. La fase orgánica se lava 3x con 5% de solución de KHSO₄, 1x con solución salina, 3x con solución saturada de NaHCO₃ y 3x con solución salina, se seca con Na₂SO₄, se filtra, y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 3.32 g 10a como un sólido amorfo amarillo (HPLC: 52.1 min, inicia a 10% de B).



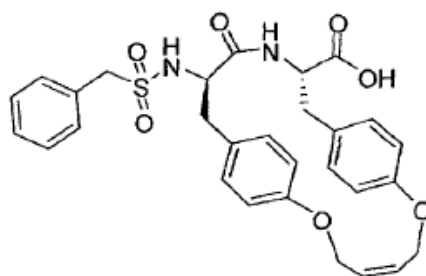
10b

10 Boc-D-Tyr(All)-Tyr(All)-OMe (10a), (500 mg, 0.93 mmol) se disuelve en 250 ml de DCM seco bajo una atmósfera de argón, y se desgasifica durante 30 min mediante sonicación. La mezcla se purga a 40° C (baño de agua) con argón durante unos 30 min adicionales. A la mezcla se agrega 38 mg (0.0464 mmol) de catalizador de Grubbs I se disuelve en 10 ml de DCM desgasificado. La mezcla se somete a reflujo bajo una atmósfera de argón durante 6 h y se agita a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío, el residuo rojo oscuro se disuelve en 40 ml de acetona y se trata con una pequeña cantidad de gel de sílice 60 y se evapora. El producto se purifica sobre gel de sílice 60 (columna 3x 40 cm) utilizando n-hexano/MTBE (1/1, v/v) como eluyente. Las fracciones que contienen producto se combinan y el solvente se evapora. Rendimiento: 310 mg de 10b como un sólido blanco (HPLC: 45.7 min, inicia a 10% de B).



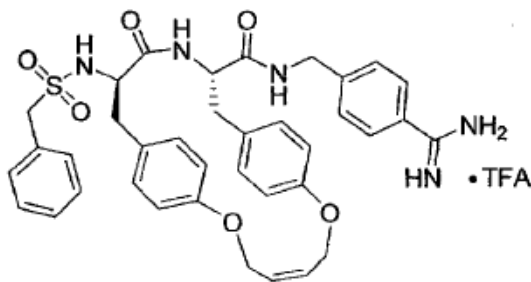
10c

20 El producto 10b (294 mg, 0.575 mmol) se agita con 575 µl de ácido acético y 2.9 ml de HCl 1 N en AcOH. El solvente se elimina en vacío después de 1 h, y el residuo amarillo claro se disuelve en 40% de solvente B y se purifica mediante HPLC preparativo (inicia a 25% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan y se liofilizan. Rendimiento: 265.3 mg de 10c como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 30.7 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 410.18 encontrado: 411.04 (M+H)⁺).



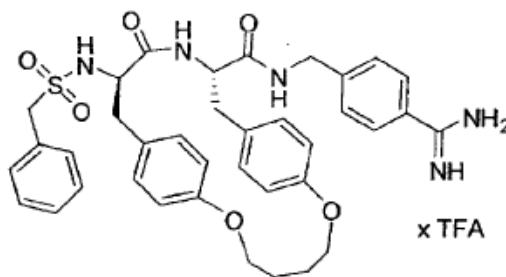
10d

- 5 El intermedio 10c (136 mg, 0.259 mmol) se disuelve en 10 ml de MeCN y 3 ml de agua y se trata con 148.3 mg de Bzls-Cl en diversas porciones, el pH se mantiene a 7 a 8 con solución de NaOH 1 N. El solvente se elimina en vacío después de 4.5 h, el residuo se disuelve en 10 ml de dioxano y 5 ml de agua y se trata con 5 ml de solución de NaOH 1 N. La mezcla se agita at 40° C sobre el baño de agua durante 1 h, se neutraliza mediante adición de TFA, y el solvente se elimina en vacío. El residuo se disuelve en una mezcla de 5% de solución de KHSO₄ y acetato de etilo y la fase de agua se extrae 3x con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan 2x con 5% de solución de KHSO₄ y 3x con solución salina, se seca con Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 138 mg de 10d como un sólido amorfo blanco (HPLC: 46.5 min, inicia a 10% de B).



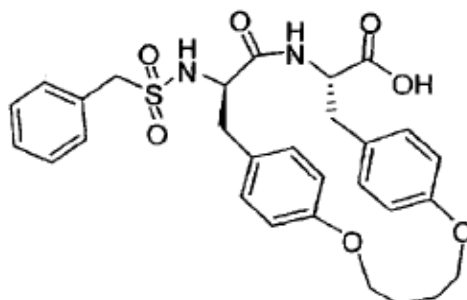
10

- 10 El intermedio 10d (60 mg, 0.109 mmol) y 4-Amba-2HCl (36.5 mg, 0.164 mmol) se suspenden en 25 ml de DMF y se agita en el baño de hielo. La mezcla se trata con 113.5 mg (0.218 mmol) PyBOP y 95 μ l (0.545 mmol) de DIPEA y se agita a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío, el residuo amarillo se disuelve en 50% de solvente B y el producto se purifica mediante HPLC preparativo (inicia a 30% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan, el solvente se elimina en vacío, se reemplazan con 80% de t-butanol/agua y el producto se liofiliza. Rendimiento: 80.4 mg de 10 como un sólido liofilizado blanco (E/Z-mixture, HPLC: 38.2/38.5 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 681.26 encontrado: 682.13 (M+H)⁺, TLC: R_f= 0.78).
- 15

Ejemplo 11:

11

- 20 El intermedio 10d (55 mg, 0.10 mmol) se disuelve en 110 ml de acetato de etilo, se trata con 5.8 mg de 10% de Pd/C y la mezcla se hidrogena a temperatura ambiente durante 3 h. El catalizador se elimina mediante filtración y el solvente se evapora para proporcionar 11a

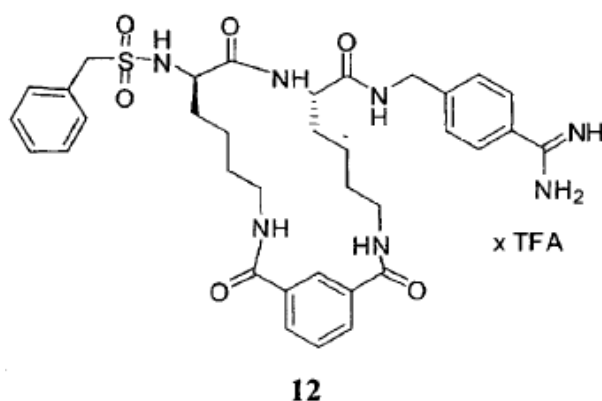


11a

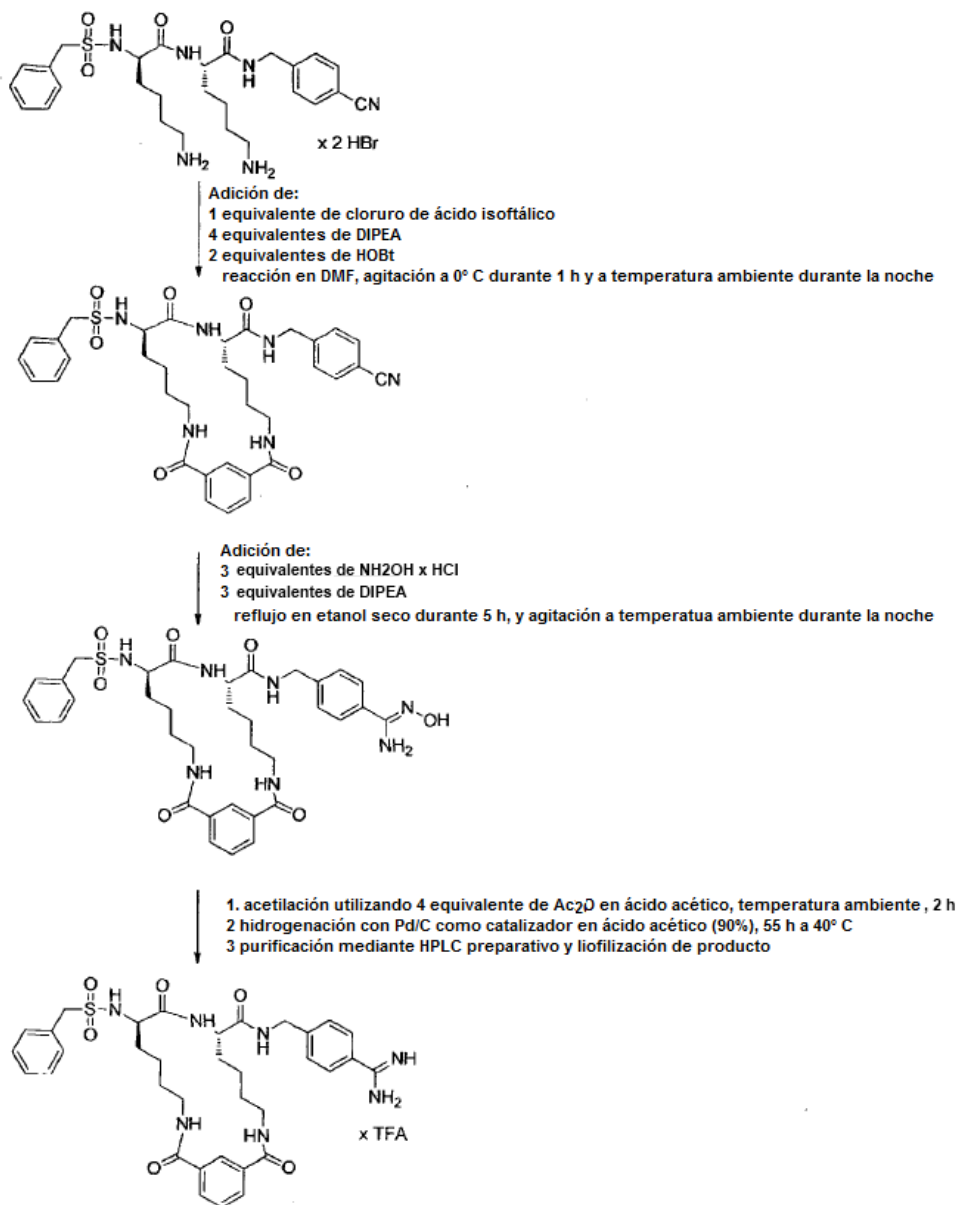
(40 mg) como un sólido amorfo gris claro (HPLC: 48.7 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 552.19, encontrado: 553.06 (M+H)⁺, 575.04 (M+Na)⁺).

- 5 El producto 11a (30 mg, 0.0543 mmol) y 4-Amba-2HCl (14.5 mg, 0.0653 mmol) se suspenden en 10 ml de DMF y se agita en el baño de hielo. La mezcla se trata con 33.8 mg (0.0653 mmol) de PyBOP y 18.8 μ l (0.108 mmol) de DIPEA y se agita a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío, el residuo se disuelve en 50% de solvente B y se filtra a través de un filtro de membrana de a 0.2 μ m. El filtrado que contiene el producto se purifica mediante HPLC preparativo (inicia a 35% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan y se liofiliza para proporcionar 11. Rendimiento: 30.1 mg de sólido liofilizado blanco (HPLC: 21.5 min, inicia a 30% de B, MS: calc.: 683.82, encontrado: 684.43 (M+H)⁺, TLC: R_f = 0.79).
- 10 Se preparan inhibidores adicionales utilizando los métodos descritos anteriores, junto con procedimientos estándares comunes en la química de péptido, de acuerdo con las estrategias descritas adelante.

Ejemplo 12:

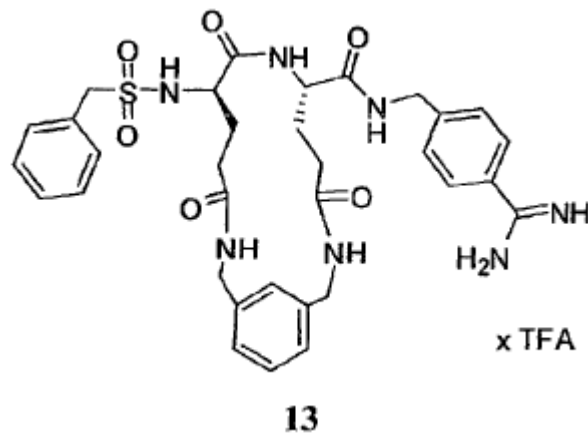


- 15 Bencilsulfonil-D-Lys-Lys-4-cianobencilamida se prepara mediante procedimientos estándares. Mediante los procedimientos establecidos en el Esquema 4 adelante, el inhibidor 12 se obtiene como un sólido liofilizado blanco (HPLC: 22.8 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 689.3, encontrado: 690 (M+H)⁺, TLC: R_f= 0.54).

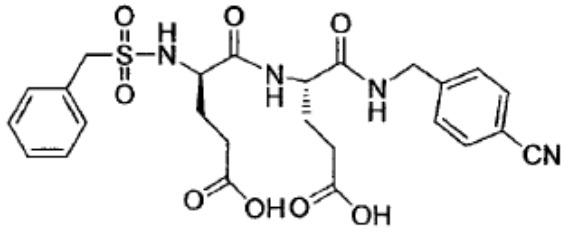


Esquema 4

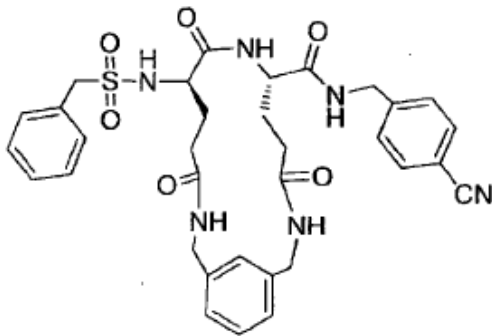
Ejemplo 13:



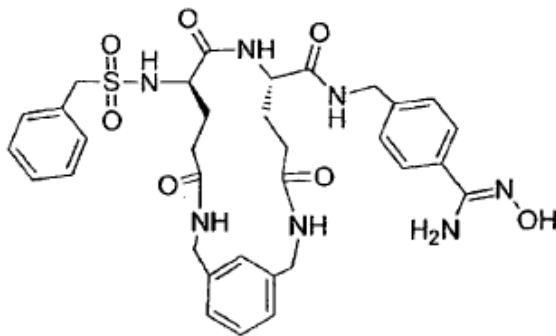
El intermedio bencilsulfonil-D-Glu-Glu-4-cianobencilamida se sintetiza mediante procedimientos estándares. El Inhibidor 13 se obtiene como un sólido liofilizado blanco, (HPLC: 23.2 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 661.3, encontrado: 662 (M+H)⁺, TLC: R_f= 0.46) de acuerdo con el Esquema 5 adelante:



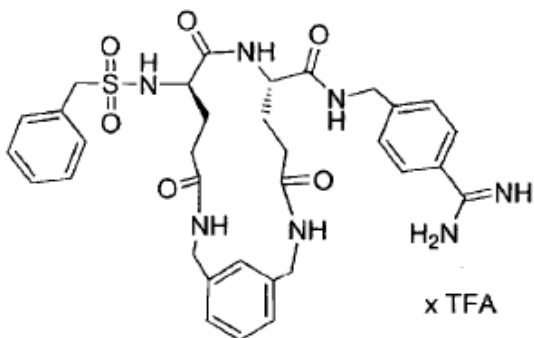
Adición de:
 1.5 equivalentes de m-xilenodiamina
 3 equivalentes de DIPEA
 3 equivalentes de PyBOP
 en DMD, agitación de baño de hielo 1 h y a temperatura ambiente durante la noche



Adición de:
 9 equivalentes de NH2OH x HCl y 9 equivalentes de DIPEA en varias porciones
 reflujo en etanol seco 6 h, agitación a temperatura ambiente durante la noche

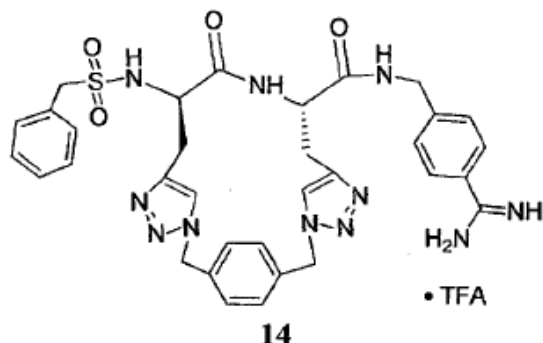


1. acetilación con 4 equivalentes de Ac2O en ácido acético, 2 h a temperatura ambiente
 2. hidrogenación con catalizador de Pd/C en ácido acético (90%), 55 h a 40° C
 3. purificación mediante HPLC preparativo y liofilización de producto



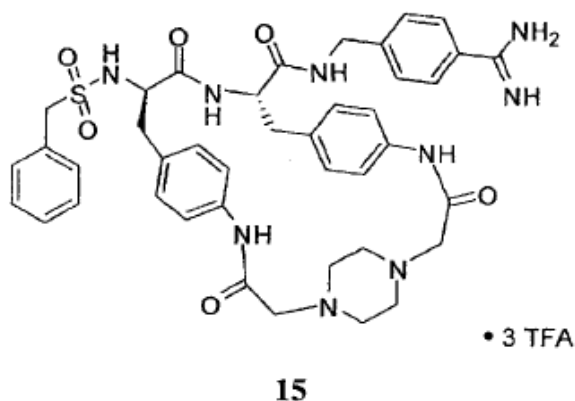
Esquema 5

Ejemplo 14:

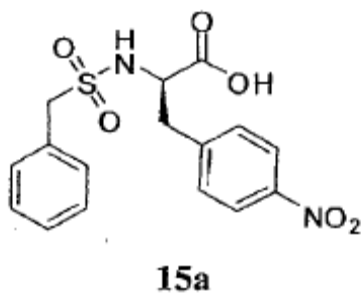


5 El inhibidor 14 se sintetiza de acuerdo con el procedimiento descrito para el inhibidor 1 al utilizar 1,4-bis(azidometil) benceno para la etapa de ciclización. Se obtiene el inhibidor 14 como un sólido liofilizado blanco después de HPLC preparativo (HPLC: 34.06 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 681.3, encontrado: 682.4 (M+H)⁺).

Ejemplo 15:



Bzls-D-Phe(4-NO₂)-OH



10

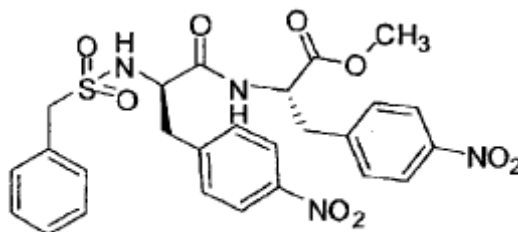
15

H-D-Phe(4-NO₂)-OH (Peptech) (5.0 g, 23.8 mmol) se suspende en 50 ml de DCM seco y se trata con 6.5 ml (52.4 mmol) de TMS-Cl y 9.1 ml (52.4 mmol) de DIPEA. La mezcla se somete a reflujo durante una hora y luego se enfría a 0° C. La mezcla se trata con 5.02 g (26.3 mmol) de cloruro de benzilsulfonilo en diversas porciones dentro de 60 minutos, mientras que el pH se mantiene a 8 a 9 mediante adición de DIPEA (4.6 ml, 26.4 mmol). La mezcla se agita durante 1 h a 0° C y a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío y el residuo restante se disuelve en una mezcla de KHSO₄ 5% ac. y acetato de etilo. La fase de agua se extrae dos veces con acetato de etilo, y las fases orgánicas combinadas se lavan 3x con 5% de KHSO₄ y 3 x con solución salina. La mezcla se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío.

El residuo aceitoso restante se disuelve en 250 ml de acetato de etilo y se trata con 7.1 ml (35.5 mmol) de dicitohexil amina. La mezcla se mantiene a 4° C durante varios días. Los cristales marrones que se forman se aíslan mediante filtración, se lavan con acetato de etilo y éter de dietilo, y se secan en vacío. Rendimiento: 8.2 g de cristales marrón claro como sal de DCHA, HPLC: 38.7 min, inicia a 10% de B.

- 5 2.695 g de esta sal de DCHA se disuelven en 5% de KHSO₄ ac. y acetato de etilo. La fase de agua ácida se extrae 3x con acetato de etilo, las fases orgánicas combinadas se lavan 3x con solución salina, se secan con MgSO₄ y se filtran. El solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 1.80 g aceite marrón claro, HPLC: 38.7 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 364.07, encontrado: 363.1 (M-H)⁻.

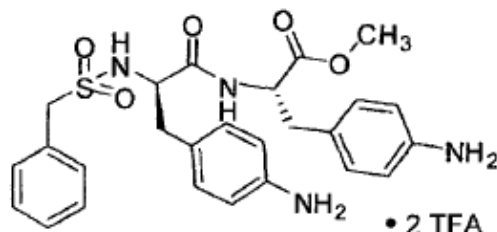
15b) Bzls-D-Phe(4-NO₂)-Phe(4-NO₂)-OMe



15b

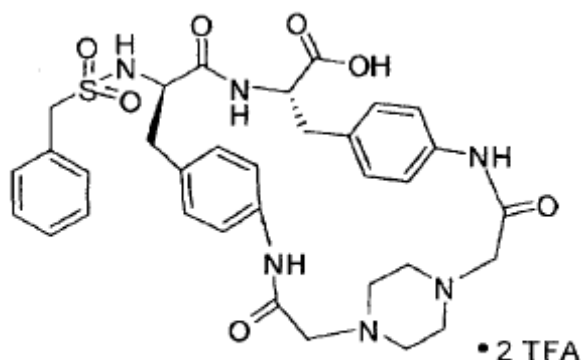
- 10 Bzls-D-Phe(4-NO₂)-OH (15a) (1.80 g, 4.94 mmol) y 1.288 g (4.94 mmol) H-Phe(4-NO₂)-OMe (Aldrich) se disuelven en 30 ml de DMF y se agitan en el baño de hielo. La mezcla se trata con 2.571 g (4.94 mmol) de PyBOP y 1.72 ml (9.88 mmol) de DIPEA (pH 7-8). La mezcla se agita durante 15 min en el baño de hielo y 3 h a temperatura ambiente. El solvente se elimina en vacío y el sólido amarillo oscuro restante se trata con 5% de solución de KHSO₄ y acetato de etilo. La fase orgánica se lava 3x con 5% de KHSO₄, 1x con solución salina, 3x con NaHCO₃ saturado y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra, y el solvente se elimina en vacío. Rendimiento: 3.55 g de sólido amorfo marrón, que contiene algunas impurezas, HPLC: 48.40 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 570.57, encontrado: 571.23 (M+H)⁺.

Bzls-D-Phe(4-NH₂)-Phe(4-NH₂)-OMe-2 TFA

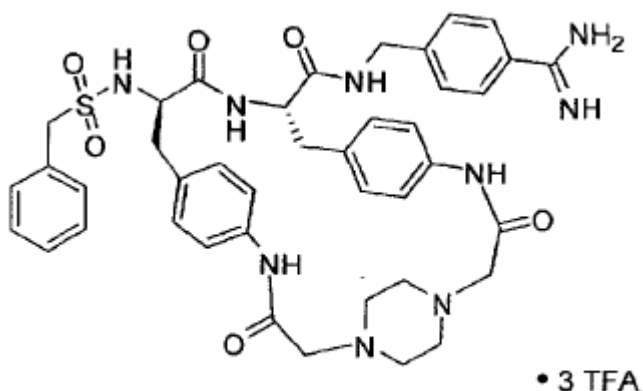


15c

- 20 Bzls-D-Phe(4-NO₂)-Phe(4-NO₂)-OMe (15b) (2.819 g) se disuelve en 500 ml 90% ácido acético y se trata con polvo de zinc. La mezcla se agita durante 4 horas a temperatura ambiente y el solvente se elimina en vacío. El residuo amarillo se trata con acetonitrilo/agua (9/1, v/v), se eliminan las sales insolubles mediante centrifugación, y el solvente se elimina en vacío. El producto se purifica mediante HPLC de fase inversa preprativa (columna B, inicia a 5% de solvente B) y las fracciones que contienen producto se combinan y se liofilizan. Rendimiento: 2.018 g de un sólido liofilizado ligeramente amarillo, HPLC: 25.01 min, inicia a 1% de B, MS: calc.: 510.61, encontrado: 511.27 (M+H)⁺.

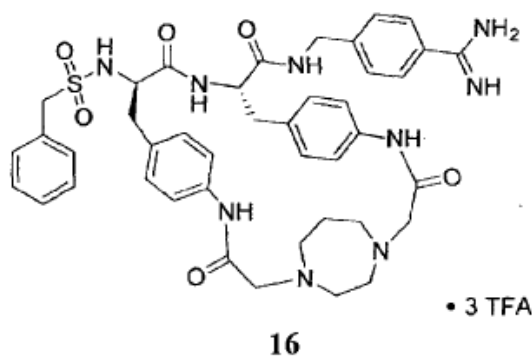
**15d**

- 5 Bzls-D-Phe(4-NH₂)-Phe(4-NH₂)-OMe (15e), (150 mg, 0.294 mmol) y 59.4 mg (0.294 mmol) ácido piperazina-N,N-diacético se disuelven en 150 ml de DMF. La mezcla se agita en el baño de hielo y se trata con 306.7 μ l (1.76 mmol) de DIPEA (pH 8), 308.3 mg de PyBOP (0.588 mmol) y se agita durante la noche a temperatura ambiente. El solvente se elimina en vacío, el residuo restante se disuelve en acetato de etilo y se lava 2x con pequeñas cantidades de NaHCO₃ saturado y 3x con solución salina. La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y el solvente se elimina en vacío. El residuo restante se disuelve en una mezcla de 5 ml de agua y 5 ml de etanol. La mezcla se trata con 360 μ l de NaOH 1N y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. La solución se neutraliza mediante adición de TFA y el solvente se elimina en vacío.
- 10 El producto se purifica mediante HPLC preparativo (columna B, inicia a 15% de solvente B) y las fracciones que contienen producto se combinan y se liofilizan. Rendimiento: 63 mg de sólido liofilizado, HPLC: 11.3 min, inicia a 20% de B, MS: calc.: 662.25 encontrado: 663.4 (M+H)⁺.

**15**

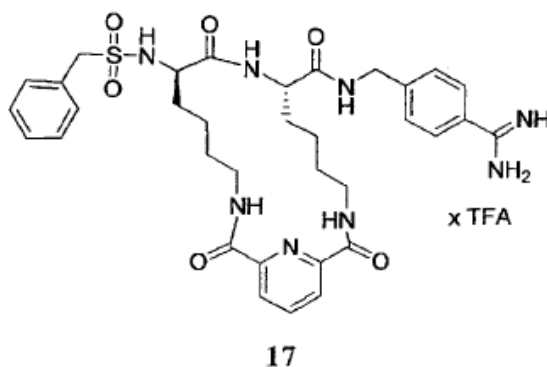
- 15 El intermedio 15d (54 mg, 0.048 mmol) se disuelve en 1.5 ml de DMF, se enfría a -15° C y se trata con 5.28 ml de NMM (0.048 mmol) y 6.24 μ l clorofornato de isobutilo (0.048 mmol). La mezcla se agita durante 10 min, seguido por el tratamiento con 6.0 mg (0.072 mmol) 4-amidinobencilamina-2HCl y 5.28 μ l (0.048 mmol) NMM. La mezcla se agita 1 h a -15° C y a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se elimina en vacío y el residuo se purifica mediante HPLC preparativo (columna B, inicia a 10% de B). Las fracciones que contienen producto se combinan y se liofiliza. Rendimiento: 30.8 mg de sólido liofilizado blanco, HPLC: 18.66 min, inicia a 10% de B, MS: calc.: 793.93, encontrado: 794.51 (M+H)⁺, TLC: R_f = 0.66.
- 20

Ejemplo 16:



El compuesto 16 se prepara por el método descrito anteriormente para el compuesto 15, pero utilizando ácido N,N'-homopiperazinadiacético (preparado de homopiperazina por el método utilizado para preparar ácido N,N'-piperazinadiacético, compuesto 8a.)

5 **Ejemplo 17:**



Mediante los procedimientos establecidos en el Esquema 4, pero utilizando cloruro de ácido piridina-2,6-dicarboxílico, bencilsulfonil-DLys- Lys-4-cianobencilamida se convierte al compuesto 17.

Ensayos de Enzimas

- 10 Las constantes de inhibición para la plasmina humana (h plasmina), calicreína en plasma humana (h PK), trombina y factor Xa se determinan en analogía a un método descrito previamente (Sturzebecher et al., J Med. Chem., 40, 3091-3099 (1997)), utilizando un lector de microplacas (Multiscan Ascent™, Thermo Scientific) a 405 nm. Las reacciones para determinar la inhibición de la plasmina humana y calicreína en plasma humana se llevan a cabo a 25 ° C en 200 µl de Tris 50 mM x regulador de HCl de pH 8.0 (que contiene NaCl 0.154 M, 2% de etanol y el inhibidor en concentraciones apropiadas) y 25 ml de solución de sustrato. Las reacciones se inician mediante la adición de 50 µml de solución de enzima.

Las mediciones se detienen mediante adición de 25 ml de ácido acético al 50% y los valores de K_i se calculan de acuerdo con el método de Dixon. Los valores de K_i son la media de por lo menos dos mediciones. Se utilizan las enzimas y sustratos expuestos en la Tabla 1 adelante:

20

Tabla 1

Enzima	Sustrato
plasmina (humana), Chromogenix, actividad específica 11 CU/mg	Tos-Gly-Pro-Lys-pNA (Chromozym PL) 4 mM (364 μ M en la medición) 2 mM (182 μ M en la medición) 1 mM (91 μ M en la medición)
calicreína en plasma (humana), Enzyme Research, South Bend IN	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA (Haemochrom PK) 2 mM (182 μ M en la medición) 1 mM (91 μ M en la medición) 0.5 mM (45.5 μ M en la medición)
Trombina (Rind), 1425 IE/mg	CH ₃ SO ₂ -D-Cha-Gly-Arg-pNA 2 mM (182 μ M en la medición) 1 mM (91 μ M en la medición) 0.5 mM (45.5 μ M en la medición)
Factor Xa (humana), 200.35 IE/mg, Enzyme Research, South Bend IN	CH ₃ OCO-D-Cha-Gly-Arg-pNA (Pefachrome FXa) 2 mM (182 μ M en la medición) 1 mM (91 μ M en la medición) 0.5 mM (45.5 μ M en la medición)

Resultados para compuestos ejemplares de la invención se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Inhibidor	Valores Ki (en nM) de inhibidores			
	K _i (nM)			
	Plasmina h	PK	Trombina	FXa
1	0.77	2.4	4300	206
2	2.2	10.1	4560	1860
3	0.55	550	3000	5700
4	9.4	868	6520	9370
5	1.1	17.4	26.8	42.1
6	6.9	136	45.4	152
7	20.3	8.9	575	103
8	4.9	31.6	9.1	26.3
9	9.0	493	2119	3472
10	2.5	9.4	100	220
11	1.9	34.2	510	2011
12	38	18	187	376
13	431	25	2020	3430
14	5.4	12	219	600
15	0.68	320	8400	>10000

5

Referencias Adicionales

Las siguientes referencias proporcionan información de antecedentes, que pueden ser útiles en el entendimiento del estado de la técnica anterior a la presente invención.

Ashgar et al., *Biochim. Biophys. Acta* 438, 250-264, 1976

10 Collen et al., *J. Lab. Clin. Med.* 99, 76-83, 1982

Dixon, *Biochem. J.* 55, 170-171, 1953

- Eriksson et al., *J. Thromb. Haemostasis* 1, 2490-2496, 2003
- Fareed et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 370, 765-784, 1981
- Francis et al., *New Engl. J. Med.* 349, 1703-1712, 2003
- Garrett et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 301-306, 1999
- 5 Garrett et al., *J. Pept. Res.* 52, 60-71, 1998
- Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1998-2002, 1978
- Gustafsson et al., *Nature Reviews* 3, 649-659, 2004
- Isobe, *Blood & Vessel* 12, 135-138, 1981
- Kaplan, *Prog. Hemostasis Thromb.* 4, 127-175, 1978
- 10 Kettner et al., *J. Biol. Chem.* 265, 18289-18297, 1990
- Kettner and Shaw, *Biochemistry* 17, 4778-4784, 1978
- Künzel et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 645-648, 2002
- Lawson et al., *Folia Haematol. (Leipzig)* 109, 52-60, 1982
- Muramatu et al. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363, 203-211, 1982
- 15 Muramatu and Fuji, *Biochim. Biophys. Acta* 242, 203 -208, 1971
- Muramatu and Fuji, *Biochim. Biophys. Acta* 268, 221-224, 1972
- Ohno et al., *Thromb. Res.* 19, 579-588, 1980
- Okada et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2217-2221, 2000
- Okada et al., *Biopolymers* 51, 41-50, 1999
- 20 Ratnoff, *Blood* 57, 55-58, 1981
- Robinson and Saiah, *Ann. Rep. Med. Chem.* 37, 85-94, 2002
- Satoh et al., *Chem. Pharm. Bull.* 33, 647-654, 1985
- Schechter and Berger, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27, 157-162, 1967
- Silverberg and Kaplan, *Blood* 60, 64-70, 1982
- 25 Stürzebecher et al., *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 27, 1929-1934, 1994
- Stürzebecher et al., *J. Med. Chem.* 40, 3091-3099, 1997
- Stürzebecher et al., *Zbl. Pharm. Pharmakother. Lab. Diagn.* 122, 240-241, 1983
- Sucker H. et al., *Pharmazeutische Technologie, 2nd circulation (1991)*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Tada et al., *Biol. Pharm. Bull.* 24, 520-524, 2001

Teno et al. Chem. Pharm. Bull. 39, 2930-2936, 1991

Thromb. Res., Suppl. VIII, 131-141, 1988

Tsuda et al., Chem. Pharm. Bull. 49,1457-1463, 2001

Weitz, Circulation, 110, I-19 - 1-26, 2008

5 WO 1994/29336

WO 2000/041531

WO 2000/058346

WO 2001/096286

WO 2001/096366

10 WO 2002/062829

WO 2002/014349

WO 2003/076391

WO 2003/076457

DE 10212555

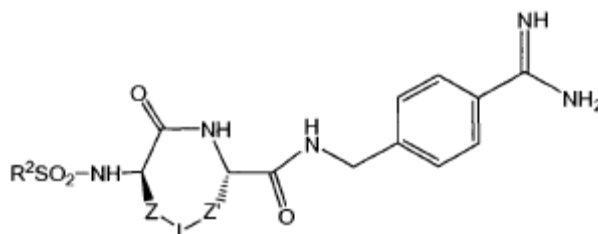
15 EP 1364960

US 6,586,405

US 5786328

REIVINDICACIONES

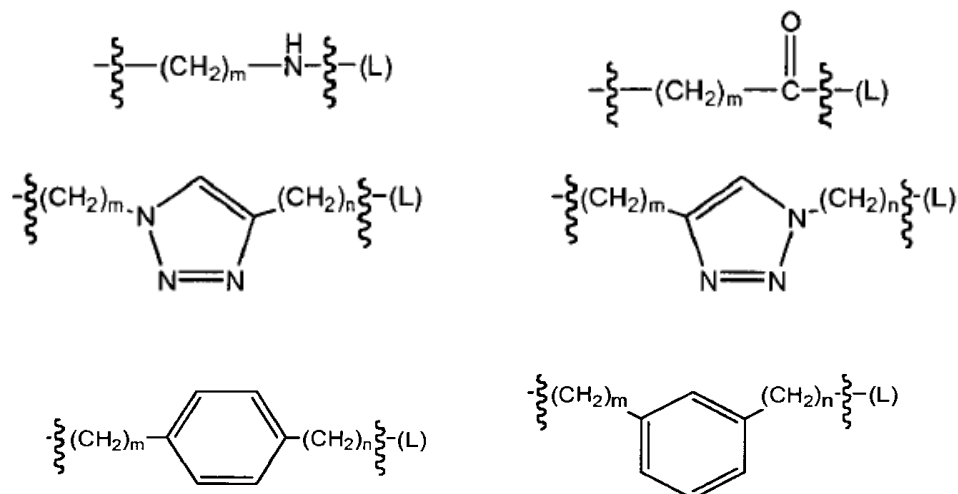
1. Un compuesto que tiene la siguiente fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

- 5 en donde R² se selecciona del grupo que consiste de: un grupo alquilo ramificado, no ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de C; un anillo heteroaromático de 5 o 6 miembros que tiene 1 a 3 heteroátomos independientemente seleccionados de N, S y O; un grupo arilo; un grupo CH₂ que lleva un anillo heteroaromático de 5 o 6 miembros que tiene 1 a 3 heteroátomos independientemente seleccionados de N, S y O; y un grupo CH₂ que lleva un grupo arilo; en donde dicho grupo arilo puede tener 6 o 10 átomos de C, y en donde dichos grupos heteroaromático o arilo pueden ser no sustituidos o sustituidos con 1 a 3 residuos independientemente seleccionados del grupo que
- 10 consiste de -CH₂NH₂, -CN, -CF₃, tetrazol-5-ilo, F, Cl, Br, -CO₂H, -CO₂Me, -CO₂Et, metilo, etilo, propilo, y isopropilo;

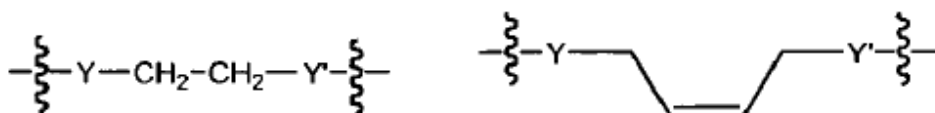
en donde Z y Z' se seleccionan independientemente del grupo que consiste de:

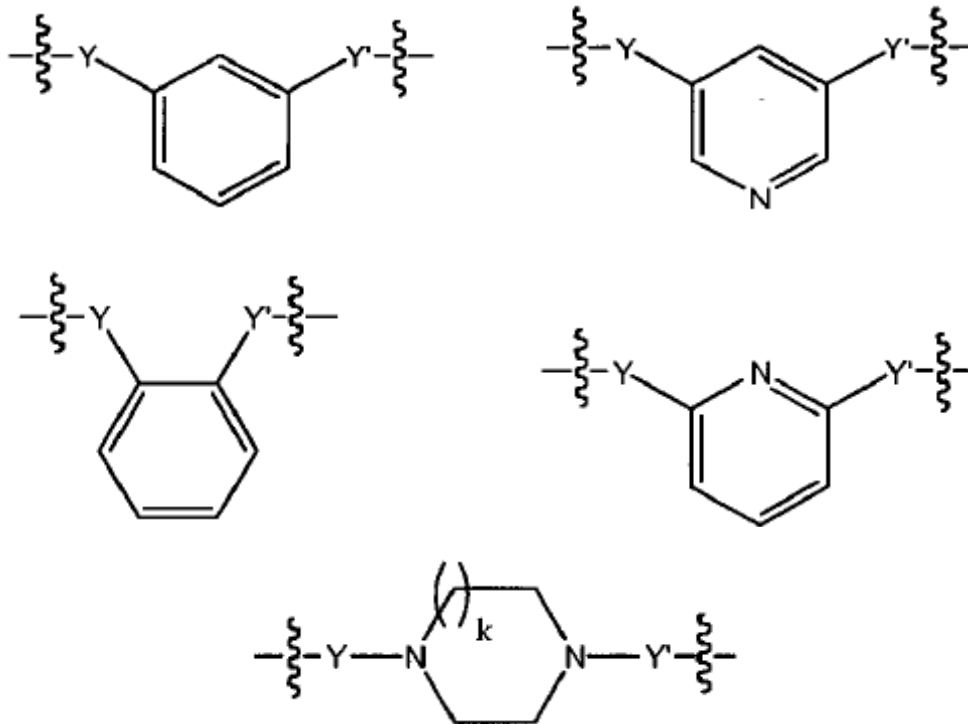


15

en donde los valores de m y n están independientemente en el rango 0 a 3; y

en donde L se selecciona del grupo que consiste de:

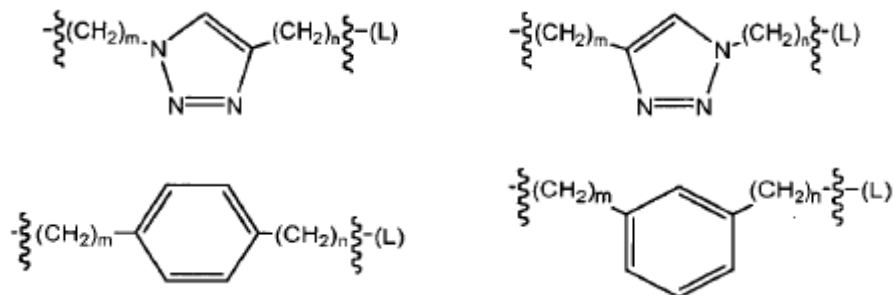




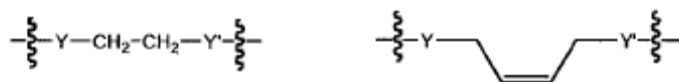
5 en donde k es 1 o 2, Y y Y' se seleccionan independientemente del grupo que consiste de un enlace covalente, $-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_pO(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pS(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pSS(CH_2)_q-$, $(CH_2)_pC(=O)(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=O)(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pC(=O)NH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pOC(=O)(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pOC(=O)NH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=O)-O-(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=O)NH(CH_2)_q-$, $-(CH_2)_pNHC(=NH)NH(CH_2)_q-$, y $-(CH_2)_pNHC(=O)(CH_2)_qS-$; y p y q varían independientemente desde 0 hasta 3.

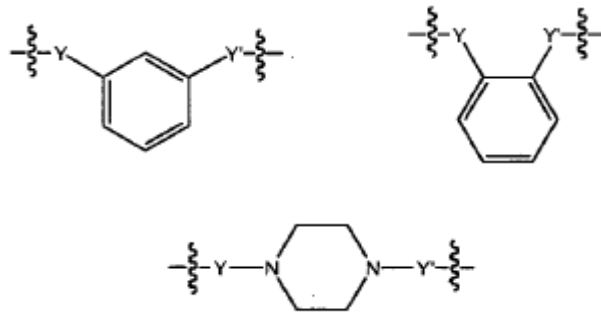
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R^2 es un grupo CH_2 que lleva un grupo arilo.

10 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde en donde Z y Z' se seleccionan independientemente del grupo que consiste de:



15 4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde L se selecciona del grupo que consiste de:





5. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método para modulación terapéutica de la cascada de coagulación sanguínea o fibrinólisis, para tratar una afección hiperfibrinolítica en un paciente, o para controlar la pérdida de sangre en un paciente, dicho método comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de uno o más compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso de la reivindicación 6, en donde dicho método es para controlar la pérdida de sangre en un paciente y dicho paciente está experimentando un trasplante de órgano o procedimiento quirúrgico cardíaco o dicho paciente está experimentando un procedimiento quirúrgico con circulación extracorpórea.

8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método para inhibir solo plasmina, o plasmina y calicreína en plasma, en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de uno o más compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

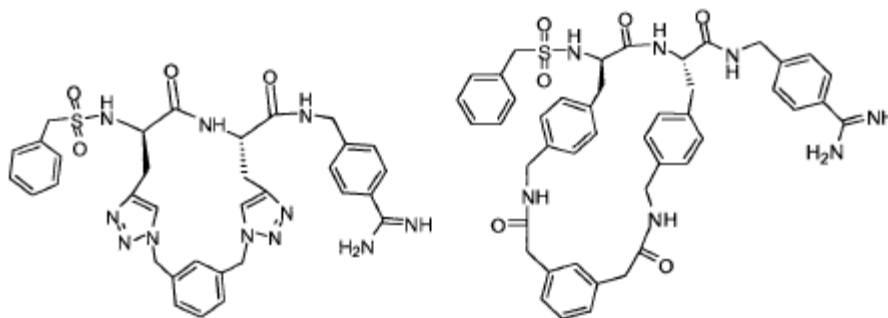
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como un medicamento para: la modulación terapéutica de la cascada de coagulación sanguínea o fibrinólisis, la prevención de pérdida de sangre, el tratamiento de una afección hiperfibrinolítica, la prevención de pérdida de sangre durante trasplante de órganos o procedimientos quirúrgicos cardíacos, o la prevención de pérdida de sangre durante los procedimientos quirúrgicos con circulación extracorpórea.

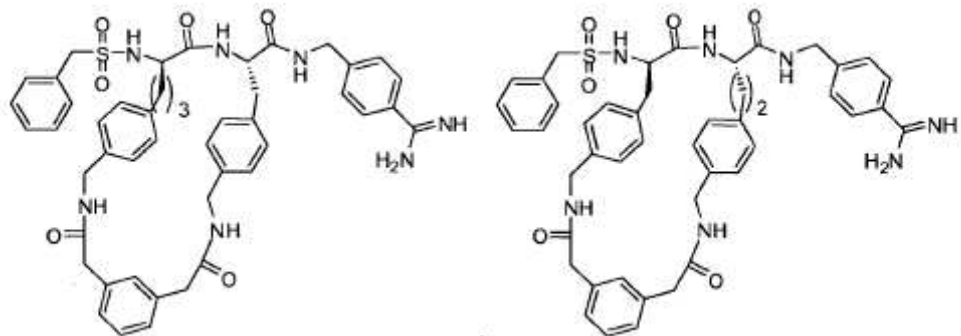
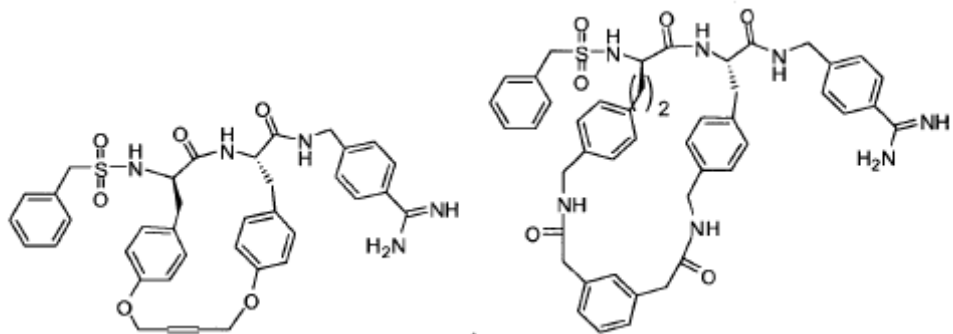
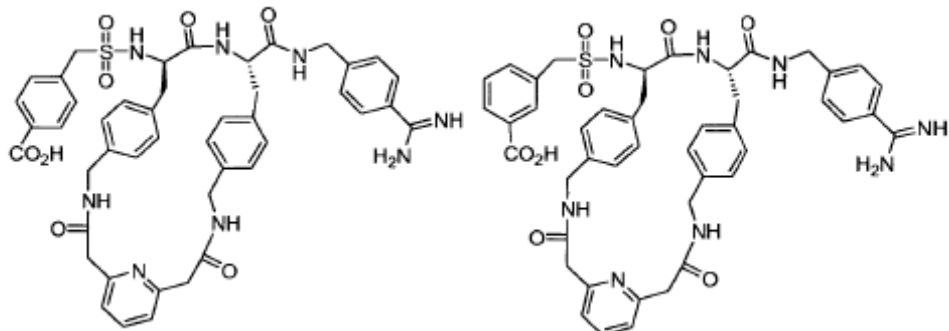
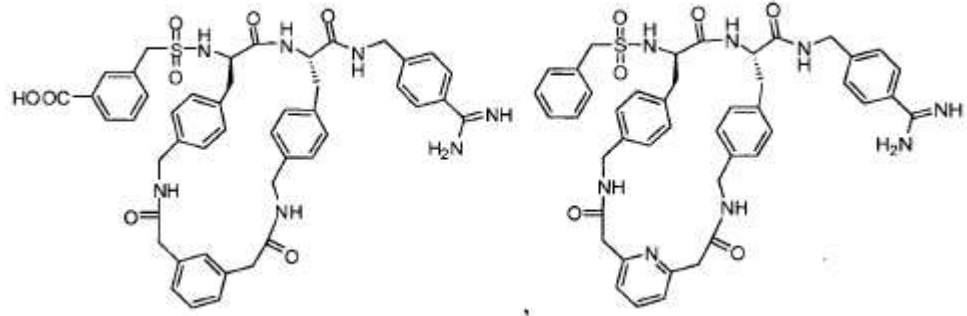
10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como un medicamento para la inhibición de solo plasmina, o para la inhibición de plasmina y calicreína en plasma.

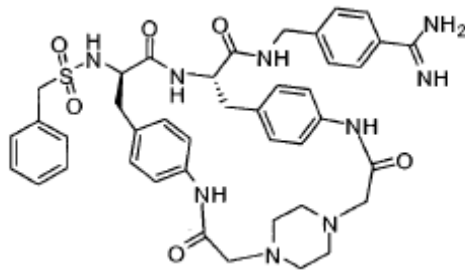
11. Un adhesivo de fibrina que comprende por lo menos un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como un componente de un adhesivo de fibrina.

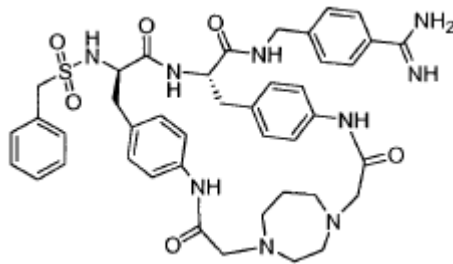
13. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste de:





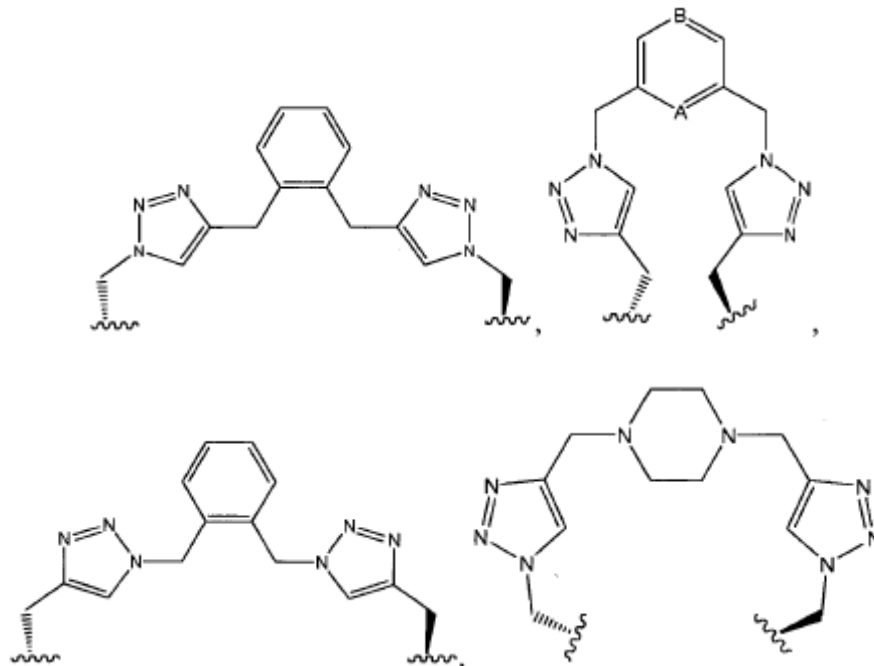


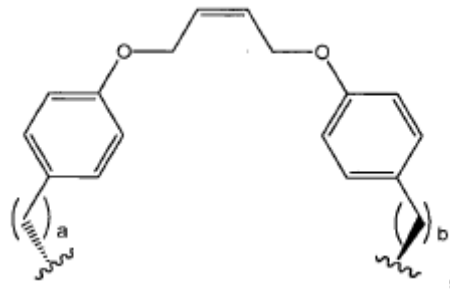
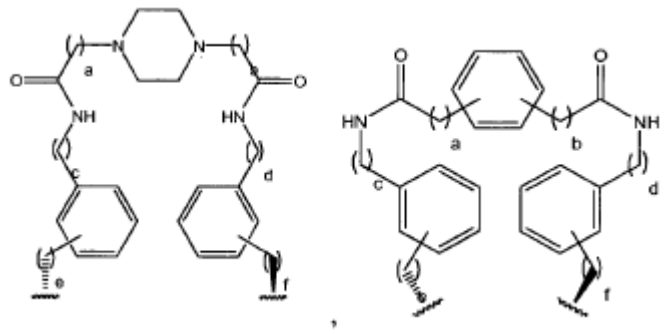
y



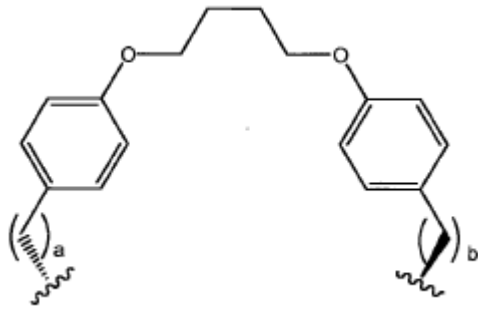
y o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 14. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z-L-Z' tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste de:





y



- 5 en donde A y B son independientemente CH o N; y
a, b, c, d, e, y f son, independientemente, 0, 1, 2 o 3.