

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 875**

51 Int. Cl.:

C07C 31/32 (2006.01) **C07D 295/135** (2006.01)

A61K 31/277 (2006.01) **C07D 295/185** (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

C07C 255/60 (2006.01)

C07C 323/29 (2006.01)

C07D 207/335 (2006.01)

C07D 213/38 (2006.01)

C07D 213/57 (2006.01)

C07D 213/89 (2006.01)

C07D 271/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08853988 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2225196**

54 Título: **Inhibidores de la cisteína proteasa para el tratamiento de enfermedades parasitarias**

30 Prioridad:

29.11.2007 US 4747

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

15.04.2015

73 Titular/es:

**MERCK CANADA INC. (100.0%)
16711 Trans-Canada Highway
Kirkland, QC H9H 3L1, CA**

72 Inventor/es:

**ISABEL, ELISE;
MELLON, CHRISTOPHE y
BEAULIEU, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 533 875 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 la cisteína proteasa para el tratamiento de enfermedades parasitarias

5 **Antecedentes de la invención**

Varios parásitos responsables de enfermedades de mamíferos dependen de la cisteína proteasa para varias funciones del ciclo de vida. La inhibición de estas proteasas puede ser útil en el tratamiento y/o la prevención de estas enfermedades parasitarias, véase Lecaille, F., et al, Chem. Rev., 102, 4459 - 4488, 2002.

10 La cruzipaína es una enzima cisteína proteasa presente en *Trypanosoma cruzi* y se cree que desempeña un papel importante en todos los estadios del ciclo de vida del parásito. La enzima se expresa a niveles muy altos en el estadio de epimastigote, en el que es, principalmente, una enzima lisosomal y puede estar implicada en la digestión de las proteínas durante la diferenciación en el estadio de tripomastigote metacíclico infeccioso. La identificación de cruzipaína en la membrana del tripomastigote implica a esta enzima en la penetración del parásito en la célula huésped. También se encuentra cruzipaína en las membranas de la forma amastigote del parásito, véase Cazzulo, J. J., et al, Current Pharmaceutical Design, 7, 1143 - 1156, 2001. La cruzipaína degrada de forma eficiente la IgG humana, que puede desempeñar un papel protector para el parásito al evitar la presentación del antígeno y, por tanto, reducir la respuesta inmunitaria del huésped. Basándose en estas observaciones se ha propuesto que la cruzipaína es un fármaco diana válido para quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Se ha notificado que la cruzipaína existe en al menos dos secuencias polimórficas, conocidas como cruzipaína 1 y cruzipaína 2, las cuales pueden estar implicadas en la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* (Lima, et al, Molecular & Parasitology 114, 41 - 52, 2001).

25 El uso de inhibidores de la cisteína proteasa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis africana se ha demostrado mediante la observación de que los inhibidores irreversibles de la cruzipaína pueden curar la enfermedad de Chagas en modelos de ratón, véase Engel, J., et al, J. Exp. Chem., 188, 725 - 734.1998.

30 Se ha propuesto un papel similar para la cisteína proteasa tripanopaína-Tb en el ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*, el parásito responsable de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño.

Un parásito similar, *T. congolense*, es responsable de la tripanosomiasis bovina. La congopaína es la cisteína proteasa análoga a la cruzipaína en este parásito.

35 La falcipaína es una importante cisteína proteasa en *Plasmodium falciparum*. Se ha notificado que esta enzima es importante en la degradación de la hemoglobina del huésped en las vacuolas de alimento del parásito. El procesamiento de la hemoglobina es esencial para el crecimiento del parásito, por tanto, un inhibidor de la falcipaína debería ser útil como tratamiento del paludismo.

40 Dos cisteína proteasas, SmCL1 y SmCL2, están presentes en la duela de la sangre humana *Schistosoma mansoni*. SmCL1 puede desempeñar un papel en la degradación de la hemoglobina del huésped, mientras que SmCL2 puede ser importante para el sistema reproductor del parásito (Brady, C. P., et al, Archives of Biochemistry and Biophysics, 380,46 - 55.2000). La inhibición de una o ambas de estas proteasas puede proporcionar un tratamiento eficaz para la esquistosomiasis humana.

45 LmajcatB y CP2,8ΔCTE son importantes cisteína proteasas de los protozoos parasitarios *Leishmania major* y *Leishmania mexicanus* respectivamente, véase Alves, L.C., et al, Eur. J. Biochem, 268, 1206 - 1212, 2001. La inhibición de estas enzimas puede proporcionar un tratamiento útil para leishmaniasis.

50 CP2 es una cisteína proteasa fundamental del flagelado *Giardia lamblia* que puede ser importante para la enquistación y replicación del parásito (DuBois, K. N. et al, J. Biol. Chem., 283, 18024 - 18031, 2008). La inhibición de CP2 o las otras 26 CA proteasas clan conocidas en este parásito puede proporcionar un tratamiento útil de la giardiasis.

55 Se han encontrado dos cisteína proteasas codificadas por AcCP-1 y AcCP-2 en el anquilostoma *Ancylostoma caninum* (Harrop, S. A. et al, Mol Biochem Parasitol. 71, 163 - 171, 1995. La inhibición de estas proteasas puede proporcionar un tratamiento útil de la infección por *Ancylostoma*.

60 También se sabe que las cisteína proteasas están presentes en *Trichomonas vaginalis* (Jane R. Schwebke, J. R. y Burgess D., Clinical Microbiology Reviews, 17, 794 - 803, 2004.). La inhibición de estas proteasas puede proporcionar un tratamiento para la enfermedad venérea tricomoniasis asociada con este parásito.

65 *Entamoeba histolytica* es el agente causante protozoario de la amebiasis humana. Se sabe que contiene la cisteína proteasa EhCP112 (García-Rivera, G. et al, Molecular Microbiology 33, 556 - 568, 1999). El uso de un inhibidor de la proteasa puede ser útil en el tratamiento de la amebiasis.

5 Se ha identificado una cisteína proteasa en el parásito intestinal *Cryptosporidium parvum* (Nesterenko M.W. et al, Microbios 83, 77 - 88 1995, Forney J.R. et al, J Parasitol. 82, 889 - 92, 1996). Un inhibidor de la cisteína proteasa podría ser un tratamiento útil de la criptosporidiosis. De hecho, el tratamiento de ratones con el inhibidor irreversible K-777 da como resultado la eliminación del parásito de ratones inmunocomprometidos (Ndao et al, Parasitology 2008 135.1151 - 6.2008).

Una serie de parásitos *Eimeria* puede producir enfermedad en animales de importancia agrícola, tales como pollos y ganado vacuno (Barta. J. R. et al, J. Parasitol. 83, 262 - 71, 1997).

10 Los inhibidores de la cisteína proteasa pueden proporcionar un tratamiento para mamíferos infectados por *E. bovis*, *E. necatrix*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. brumetti* y *E. acervulina*.

15 Se ha notificado que otros numerosos parásitos dependen de las cisteína proteasas (Sajid, M., y McKerrow, J. H. Molecular and Biochemical Parasitology, 120, 1 - 21, 2002) y, por tanto, se pueden tratar con inhibidores de estas proteasas. Estos parásitos incluyen *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium Berghei*, *Naegleria fowleri*, *Theileria parva*, *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris suum*, *Haemonchus contortus*, *Necator americanus*, *Taenia saginata*, *Gymnorhynchus gigas*, *Spirometra mansonioidese*, *Diplostomum pseudospathaceum*, *Onchocerca volvulus*, *Fasciola hepatica* y *Diofilaria immitis*.

20 La presente invención se refiere a compuestos que son capaces de tratar y/o prevenir enfermedades parasitarias de mamíferos en las que el parásito usa una cisteína proteasa crucial de la familia de la papaína.

El documento WO2007/012180 divulga inhibidores de la cruzipaína para el tratamiento de enfermedades parasitarias.

25

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere a compuestos capaces de tratar y/o prevenir la enfermedad parasitaria. Ejemplos de enfermedades parasitarias incluyen toxoplasmosis, paludismo, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, amebiasis, giardiasis, clonorquiasis, opistorquiasis, paragonimiasis, fasciolopsiasis, filariasis linfática, oncocerciasis, dracunculiasis, ascariasis, tricuriasis, estrostronglioidiasis, tricostrongiliasis, tricomoniasis y cestodiasis.

Descripción detallada de la invención

35

La presente invención se refiere a compuestos que inhiben o disminuyen la actividad de la cruzipaína. Dado que la cruzipaína es necesaria para varias funciones del ciclo vital del parásito *Trypanosoma cruzi*, los compuestos de la invención son útiles para inhibir y/o disminuir el crecimiento y/o la supervivencia de *Trypanosoma cruzi*. Por tanto, la enfermedad parasitaria causada por *Trypanosoma cruzi* se puede tratar y/o prevenir mediante la administración de los compuestos de la invención a pacientes que lo necesiten.

40

Adicionalmente, otras enfermedades parasitarias causadas por parásitos que usan cruzipaína o cisteína proteasas similares para las funciones del ciclo vital también se pueden tratar y/o prevenir mediante la administración de los compuestos de la presente invención.

45

Los compuestos de la presente invención son capaces de tratar y/o prevenir enfermedades parasitarias. Ejemplos de enfermedades parasitarias incluyen, entre otras, toxoplasmosis, paludismo, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, amebiasis, giardiasis, clonorquiasis, opistorquiasis, paragonimiasis, fasciolopsiasis, filariasis linfática, oncocerciasis, dracunculiasis, ascariasis, tricuriasis, estrostronglioidiasis, tricostrongiliasis, tricomoniasis y cestodiasis.

50

Una realización de la presente invención se ilustra mediante un compuesto, que es:

55

(S)-4,4-dicloro-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida;

[(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;

60

[(R)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;

[2-(2-cloro-4-clano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-4-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;

65

- [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
- 5 [1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
- Amida de ácido 1-{4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
- 10 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxietil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida;
- 15 [(R,S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
- [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
- 20 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metilsulfanil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
- [(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
- 25 Amida de ácido 1-[4'-((S)-1-[(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etilcarbamoil]-3-fluoro-3-metil-butilamino)-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
- 30 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-piridin-4-il-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
- [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-(2-hidroxi-2-metil-propil)-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
- 35 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-[1-(morfolin-4-carbonil)-ciclopropil]-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
- [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(4-bromo-fenil)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
- 40 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida;
- 45 Ácido 1-{4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
- (2-hidroxietil)-amida de ácido 1-{4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
- 50 [(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
- (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-ciclopropil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-acetamida;
- 55 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-ciclopropil-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxietil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-acetamida;
- (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida;
- 60 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida;

o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se incluye dentro del alcance de la presente invención una composición farmacéutica que está constituida por un compuesto tal como se ha descrito en lo que antecede y un transportador farmacéuticamente aceptable. También se contempla que la invención abarca una composición farmacéutica que está constituida por un vehículo farmacéutico aceptable y cualquiera de los compuestos divulgados específicamente en la presente solicitud. Éstos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria.

Se ilustra la invención mediante el uso de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de uno o más de toxoplasmosis, paludismo, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, amebiasis, giardiasis, clonorquiasis, opistorquiasis, paragonimiasis, fasciolopsiasis, linfática

(S)-N-[(S)-(4-Bromo-2,6-difluoro-becil)-ciano-metil]-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida

(S)-N-[(S)-(4-Bromo-2,6-difluoro-becil)-ciano-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida

(S)-N-[(S)-Ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-becil)-metil]-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida

(S)-N-[(S)-Ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-becil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida

[(S)-Ciano-(1-oxi-piridin-3-ilmetil)-metil]-amida del ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico

[(S)-Ciano-(1-oxi-piridin-4-ilmetil)-metil]-amida del ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico

[(S)-Ciano-(2,6-difluoro-becil)-metil]-amida del ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico

o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se incluye dentro del alcance de la presente invención una composición farmacéutica que está constituida por un compuesto tal como se ha descrito en lo que antecede y un transportador farmacéuticamente aceptable. También se contempla que la invención abarca una composición farmacéutica que está constituida por un vehículo farmacéutico aceptable y cualquiera de los compuestos divulgados específicamente en la presente solicitud. Éstos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria.

Se ilustra la invención mediante el uso de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de uno o más de toxoplasmosis, paludismo, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, amebiasis, giardiasis, clonorquiasis, opistorquiasis, paragonimiasis, fasciolopsiasis, filariasis linfática, oncocerciasis, dracunculiasis, ascariasis, tricuriasis, stronglioidiasis, tricostrongiliasis, tricomoniasis y cestodiasis en un mamífero que lo necesite.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar a mamíferos, preferentemente seres humanos, bien solos o, preferentemente, en combinación con transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, opcionalmente con adyuvantes conocidos, tales como alúmina, en una composición farmacéutica, de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar. Los compuestos se pueden administrar por una o más de las siguientes, oral o parenteral, incluidas las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz, y normalmente se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Para uso oral de un compuesto terapéutico de acuerdo con la presente invención, el compuesto seleccionado se puede administrar, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, o en forma de una solución o suspensión acuosa. Para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un transportador inerte oral, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato cálcico, manitol, sorbitol y similares; para administración en forma líquida, los componentes del fármaco oral se pueden combinar con cualquier transportador oral, inerte, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Por otro lado, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla ligantes, lubricantes, disgregantes y colorantes adecuados adicionales. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, goma de tragacanto o

alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitaciones, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con
 5 agentes de emulsión y de suspensión. Si se desea se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes. Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, normalmente se preparan soluciones estériles del ingrediente activo y el pH de las soluciones deberá ajustarse y tamponarse de forma adecuada. Para uso intravenoso, se controlará la concentración total de solutos con el fin de convertir en isotónica la
 10 preparación.

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Se pueden formar liposomas a partir de varios fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

15 Los compuestos de la presente invención se pueden acoplar con polímeros solubles como transportadores de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol o polietilenoóxido-polilisina sustituidos con restos palmitoílo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse con una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco,
 20 por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poliepsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles anfipáticos o reticulados.

Los presentes compuestos también son útiles en combinación con agentes conocidos útiles para el tratamiento o
 25 prevención de enfermedades parasitarias, incluyendo toxoplasmosis, paludismo, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, amebiasis, giardiasis, clonorquiasis, opistorquiasis, paragonimiasis, fasciolopsiasis, filarías linfática, oncocerciasis, dracunculiasis, ascariasis, tricuriasis, stronglioidiasis, tricostrongiliasis, tricomoniasis y cestodiasis. Las combinaciones de los compuestos divulgados actualmente con otros agentes útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades parasitarias están dentro del
 30 alcance de la invención. Un experto en la técnica sería capaz de discernir qué combinaciones de agentes serían útiles basados sobre las características concretas de los fármacos y la enfermedad implicada.

Las terapias existentes para la enfermedad de Chagas incluyen, entre otros, nifurtimox, benznidazol, alopurinol. Los
 35 fármacos que pueden tener un efecto sobre el parásito incluyen, entre otros, terbinafina, lovastatina, ketoconazol, itraconazol, posaconazol, miltefosina, ilmofofosina, pamidronato, alendronato y risedronato. Otros mecanismos que se están explorando para el tratamiento de la enfermedad de Chagas incluyen, entre otros, inhibidores de la tripanotona reductasa e inhibidores de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Véase Urbina, Current Pharmaceutical Design, 8.287 - 295.2002).

40 Las terapias existentes para el paludismo incluyen, entre otros, cloroquina, proguanil, mefloquina, quinina, pirimetamina-sulfadoxina, doxociclina, berberina, halofantrina, primaquina, atovacuona, pirimetamina-dapsona, artemisinina y quinhaosu.

Las terapias existentes para la leishmaniasis incluyen, entre otras, meglumina antimonita, estibogluconato sódico y
 45 anfotericina B.

Las terapias existentes para la esquistosomiasis incluyen, entre otros, praziquantel y oxamniquina.

Las terapias existentes para la tripanosomiasis africana incluyen, entre otras, pentamidina, melarsoprol, suramina y
 50 eflornitina.

Si se formulan en forma de una dosis fija, dichos productos de combinación emplean los compuestos de la presente invención dentro del intervalo de dosificación que se describe más adelante y el(los) otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s) dentro de su intervalo de dosificación aprobado. Como alternativa, los compuestos de la
 55 presente invención pueden usarse secuencialmente con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocidos(s) cuando una formulación de combinación es adecuada.

El término "administración" y sus variantes (p. ej., "administrar" un compuesto) en referencia a un compuesto de la invención significa introducir el compuesto o un profármaco del compuesto en el sistema del animal que necesita el
 60 tratamiento. Cuando un compuesto de la invención o profármaco del mismo se proporciona en combinación con uno o más agentes activos distintos (p. ej., un agente citotóxico etc.), "administración" y sus variantes se entiende que cada uno incluye la introducción concurrente y secuencial del compuesto o profármaco del mismo y otros agentes. La presente invención incluye dentro de su alcance profármacos de los compuestos de la presente invención. En general, tales profármacos serán derivados funcionales de los compuestos de la presente invención que se pueden
 65 convertir fácilmente *in vivo* en el compuesto requerido. Por tanto, en los procedimientos de tratamiento de la presente invención, el término "administrar" abarcará el tratamiento de las diversas afecciones descritas con el

compuesto divulgado específicamente o con un compuesto que puede no estar divulgado específicamente, pero que se convierte en el compuesto especificado *in vivo* tras la administración al paciente. Procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados de profármacos adecuados se describen en, por ejemplo, "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. Metabolitos de estos compuestos incluyen especies activas producidas por la introducción de compuestos de la presente invención en el medio biológico.

El término "composición", tal como se usa en el presente documento, se pretende que comprenda un producto que comprende los ingredientes especificados (y en las cantidades especificadas, si se indica), así como cualquier producto que resulte, de forma directa o indirecta, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, es una cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que es eficaz para prevenir o ralentizar el desarrollo de, o aliviar parcial o totalmente los síntomas existentes en, una enfermedad, afección o infección concreta para la cual se está tratando al sujeto (por ejemplo, enfermedad parasitaria causada por parásitos que dependen de la cruzipaina o de una cisteína proteasa similar para una o más funciones del ciclo vital tales como *T. cruzi*). La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz entra bien en de la capacidad de los expertos en la técnica.

Los términos "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad como se usa en el presente documento incluye disminuir, mejorar, reducir y/o inhibir la enfermedad, por ejemplo haciendo que los síntomas clínicos de la enfermedad o el desarrollo de la enfermedad disminuyan, se reduzcan, se detengan o se retiren; o aliviar la enfermedad, por ejemplo causando la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos.

Los términos "prevenir" o "que previene" una enfermedad como se usan en el presente documento incluyen hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un mamífero que pueda estar expuesto o predispuesto a sufrir la enfermedad o que probablemente contraiga la enfermedad (es decir, viajando a una región geográfica afectada o que tiene una predisposición genética), pero que todavía no ha experimentado ni mostrado síntomas de la enfermedad; inhibir la enfermedad.

Las expresiones "una vez a la semana" y "dosificación una vez a la semana", como se usan en el presente documento, significan que una dosificación unitaria, por ejemplo una dosificación unitaria de un compuesto de la presente invención, se administra una vez a la semana, es decir una vez durante un período de siete días, preferentemente el mismo día cada semana. En el régimen de dosificación una vez a la semana, la dosificación unitaria generalmente se administra aproximadamente cada siete días. Un ejemplo no limitante de un régimen de dosificación una vez a la semana abarcaría la administración de una dosificación unitaria del compuesto todos los domingos. Habitualmente se recomienda que no se administre una dosificación unitaria para la administración una vez a la semana en días consecutivos, pero el régimen de dosificación una vez a la semana puede incluir un régimen de dosificación en el que las dosificaciones unitarias se administran dos días consecutivos que entran dentro de dos periodos semanales diferentes.

La presente invención también abarca una composición farmacéutica útil en el tratamiento de enfermedades parasitarias causadas por parásitos que dependen de la cruzipaina o una cisteína proteasa similar para una o más funciones del ciclo vital (por ejemplo, *T. cruzi*), que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención, con o sin vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Composiciones adecuadas de la presente invención incluyen soluciones acuosas que comprenden compuestos de la presente invención y transportadores farmacológicamente aceptables, por ejemplo solución salina, a un nivel de pH de, por ejemplo, 7,4. Las soluciones pueden introducirse en la circulación sanguínea del paciente mediante inyección local en bolo.

Cuando un compuesto de acuerdo con la presente invención se administra a un sujeto humano, el médico encargado de la prescripción determinará la dosificación diaria normalmente y la dosificación variará, en general, de acuerdo con la edad, el peso y la respuesta de cada paciente, así como la gravedad de los síntomas del paciente.

En un ejemplo de aplicación se administra una cantidad adecuada de compuesto a un mamífero en tratamiento para una enfermedad parasitaria. Las dosificaciones orales de la presente invención, cuando se usan para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,01 mg por kg de peso corporal al día (mg/kg/día) hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, preferentemente de 0,01 a 10 mg/kg/día y, más preferentemente, de 0,1 a 5,0 mg/kg/día. Para administración oral, las composiciones se proporcionan, preferentemente, en forma de comprimidos que contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 200, 250, 300, 400 y 500 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación en el paciente que se va a tratar. Normalmente, un medicamento contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Por vía intravenosa, las dosis más preferidas variarán de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg/minuto durante una infusión a velocidad constante. De forma ventajosa, los compuestos de la presente invención se pueden administrar a una única dosis diaria o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Además, los compuestos preferidos de la presente invención se pueden administrar de forma intranasal

mediante uso tópico de vehículos intranasales adecuados o por vías transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidos para los expertos en la técnica. Para administrar en forma de un sistema de liberación transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto continua en lugar de intermitente para todo el régimen de dosificación.

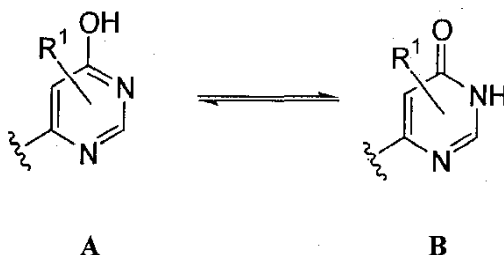
5 En otra aplicación de ejemplo, las dosificaciones orales de la presente invención, cuando se usan para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,01 mg por kg de peso corporal a la semana (mg/kg/semana) a aproximadamente 10 mg/kg/semana, preferentemente de 0,1 a 10 mg/kg/semana y, más preferentemente, de 0,1 a 5,0 mg/kg/semana. Para administración oral, las composiciones se proporcionan, preferentemente, en forma de comprimidos que contienen 2,5 mg, 3,5 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 35 mg, 40 mg, 50 mg, 80 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación en el paciente que se va a tratar. Un medicamento normalmente contiene de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 200 mg del ingrediente activo, específicamente 2,5 mg, 3,5 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 35 mg, 40 mg, 50 mg, 80 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg y 500 mg de ingrediente activo. Como alternativa, los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una dosis dos veces a la semana, dos veces al mes o mensualmente.

Los compuestos de la presente invención se pueden usar en combinación con otros agentes útiles para tratar enfermedades parasitarias. Los componentes individuales de dichas combinaciones se pueden administrar por separado a diferentes momentos durante el curso de la terapia o de forma concurrente en formas de combinación divididas o únicas. Por tanto, se entiende que la presente invención abarca todos estos regímenes de tratamiento simultáneo o alterno y el término "administrar" se ha de interpretar de acuerdo con ello.

Éstos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria.

25 Definiciones

Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales (como se describe en: E.L. Eliel y S.H. Wilen. Stereochemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New York, 1994, páginas 1119-1190), y se producen en forma de racematos, mezclas racémicas y como diaestereómeros individuales, estando todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos, incluidos los isómeros ópticos, incluidos en la presente invención. Además, los compuestos divulgados en el presente documentos pueden existir como tautómeros y se pretende que ambas formas tautoméricas estén incluidas en el alcance de la invención, aunque solo se representa una estructura tautomérica. Por ejemplo, se entiende que cualquier reivindicación del compuesto A siguiente incluye la estructura tautomérica B y al contrario, así como mezclas de los mismos.



40 Cuando una variable (p. ej., R¹, R², R³ etc.) se produce más de una vez en cualquier constituyente, su aparición es independiente de cualquier otra aparición. También se permiten combinaciones de sustituyentes y variables sólo si dichas combinaciones tienen como resultado compuestos estables. Las líneas en los sistemas anulares desde los sustituyentes indican que el enlace indicado puede estar unido a cualquiera de los átomos de carbono del anillo sustituibles. Si el sistema anular es policíclico, se pretende que el enlace esté unido a cualquiera de los átomos de carbono adecuados en cualquier anillo proximal.

45 La presente invención también incluye derivados de N-óxido y derivados protegidos de compuestos de fórmula I. Por ejemplo, cuando los compuestos de Fórmula I contienen un átomo de nitrógeno oxidable que se puede convertir en un N-óxido mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Asimismo, cuando los compuestos de fórmula I contienen grupos tales como hidroxilo, carboxilo, tiol o cualquier grupo que contenga un(os) átomo(s) de nitrógeno, estos grupos pueden estar protegidos con grupos protectores adecuados. Una lista exhaustiva de los grupos protectores adecuados se puede encontrar en T.W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Inc. 1981. Los derivados protegidos de compuestos de fórmula I se pueden preparar mediante métodos bien conocidos en la técnica.

55 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales de los compuestos de la presente invención en forma de ácidos inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares, así como sales preparadas a partir de ácidos

orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, trifluoroacético y similares. En Berg et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977:66:119 se describe más a fondo la preparación de las sales farmacéuticamente aceptables descritas en lo que antecede y otras sales farmacéuticamente aceptables típicas.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar a partir de los compuestos de la presente invención que contienen un resto básico o ácido por procedimientos químicos convencionales. En general, las sales de los compuestos básicos se preparan bien mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante reacción de la base libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido orgánico o inorgánico formador de sales deseado en un disolvente adecuado o varias combinaciones de disolventes. De forma similar, las sales de los compuestos ácidos se forman mediante reacciones con la base orgánica o inorgánica adecuada.

Para los fines de esta especificación, las abreviaturas siguientes tienen los significados indicados:

	AcOH	= ácido acético
	BaSO ₄	= sulfato de bario
	BOC	= t-butiloxicarbonilo
20	CBr ₄	= tetrabromuro de carbono
	CCl ₄	= tetracloruro de carbono
	CH ₂ Cl ₂	= cloruro de metileno
	DCC	= dicitclohexilcarbodiimida
	DCM	= diclorometano
25	DME	= éter dimetilico
	DMF	= N,N-dimetilformamida
	DMSO	= dimetilsulfóxido
	DPPF	1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno
	Et ₃ N	= trietilamina
30	EtOH	= etanol
	HATU	= hexafluorofosfato de O-(7-Azabenzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HBTU	= hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HBr	= bromuro de hidrógeno
	HCl	= ácido clorhídrico
35	K ₂ CO ₃	= carbonato potásico
	MeCN	= acetonitrilo
	MeOH	= metanol
	MeSO ₃ H	= ácido metanosulfónico
	Mg SO ₄	= sulfato magnésico
40	NaBH ₄	= borohidruro sódico
	NaOH	= hidróxido sódico
	Na ₂ SO ₄	= sulfato sódico
	NBS	= N-bromosuccinimida
	NH ₄ OH	= hidróxido amónico
45	PCl ₅	= pentacloruro de fósforo
	PdCl ₂ (dppf)	= [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaldio (II)
	Pd ₂ (dba) ₃	= tris(dibencilidenocetona)dipaldio (0)
	GP	= grupo protector
	PPh ₃	= trifenilfosfina
50	PyBOP	= hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)-fosfonio
	TA	= temperatura ambiente
	ac. sat.	= acuosa saturada
	SOCl ₂	= cloruro de tionilo
	TFAA	= ácido trifluoroacético
55	THF	= tetrahidrofurano
	ZnCN ₂	= cianuro de cinc
	ZN(BH ₄) ₂	= borohidruro de cinc
	TLC	= cromatografía en capa fina
	Me	= metilo
60	Et	= etilo
	n-Pr	= propilo normal
	i-Pr	= isopropilo
	n-Bu	= butilo normal
	i-Bu	= isobutilo
65	s-Bu	= butilo secundario
	t-Bu	= butilo terciario

Los nuevos compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los siguientes procedimientos generales, usando materiales adecuados, y ejemplifican adicionalmente mediante los siguientes ejemplos específicos. No obstante, los compuestos ilustrados en los ejemplos no deben interpretarse como que forman el

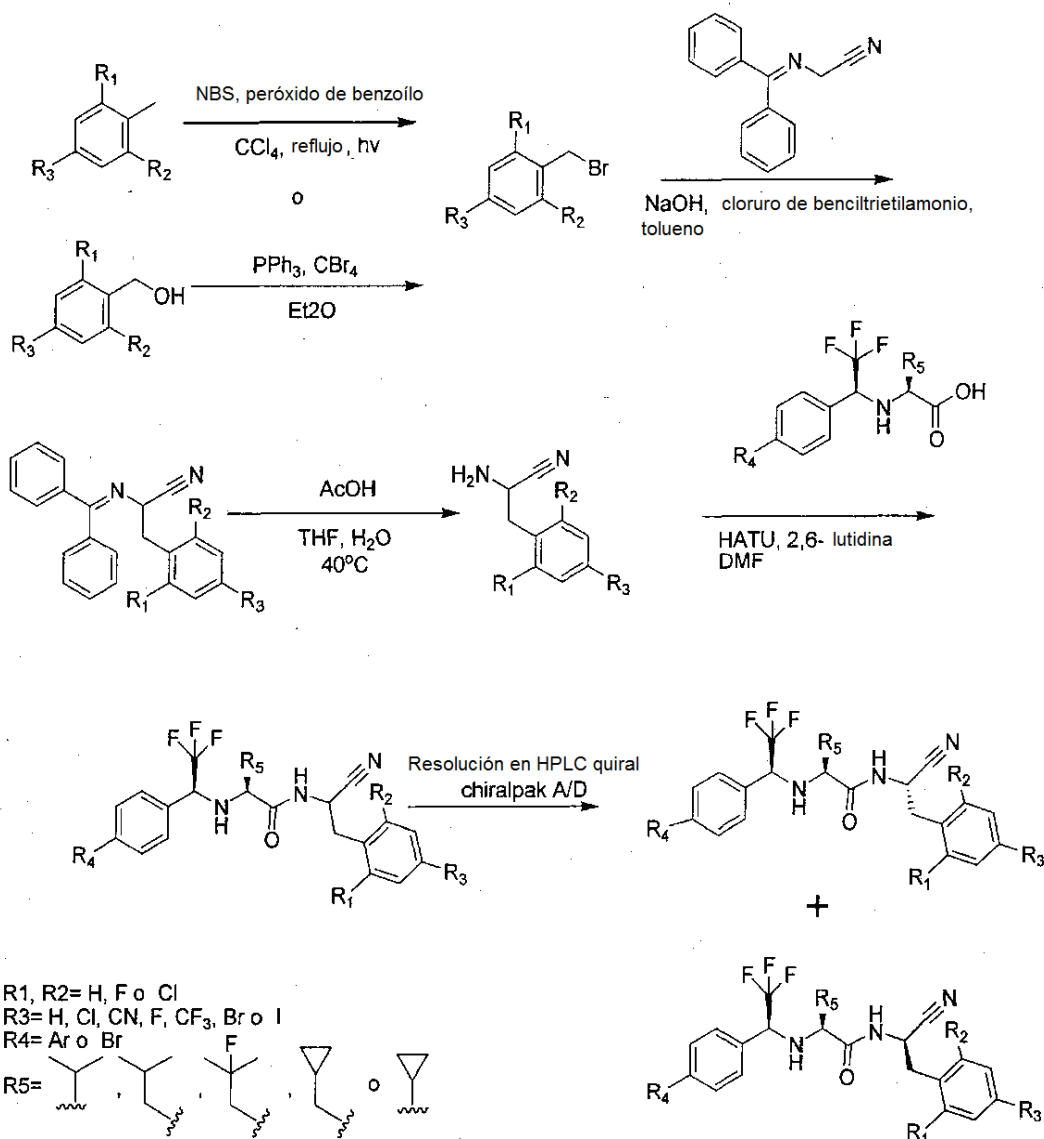
5 único género que se considera como la invención. Los siguientes ejemplos ilustran además detalles para la preparación de los compuestos de la presente invención. Los expertos en la técnica entenderán con facilidad que para preparar estos compuestos se pueden usar variaciones conocidas de las condiciones y procedimientos de los siguientes procedimientos preparativos. Todas las temperaturas están en grados centígrados a menos que se indique lo contrario.

10 **ESQUEMAS**

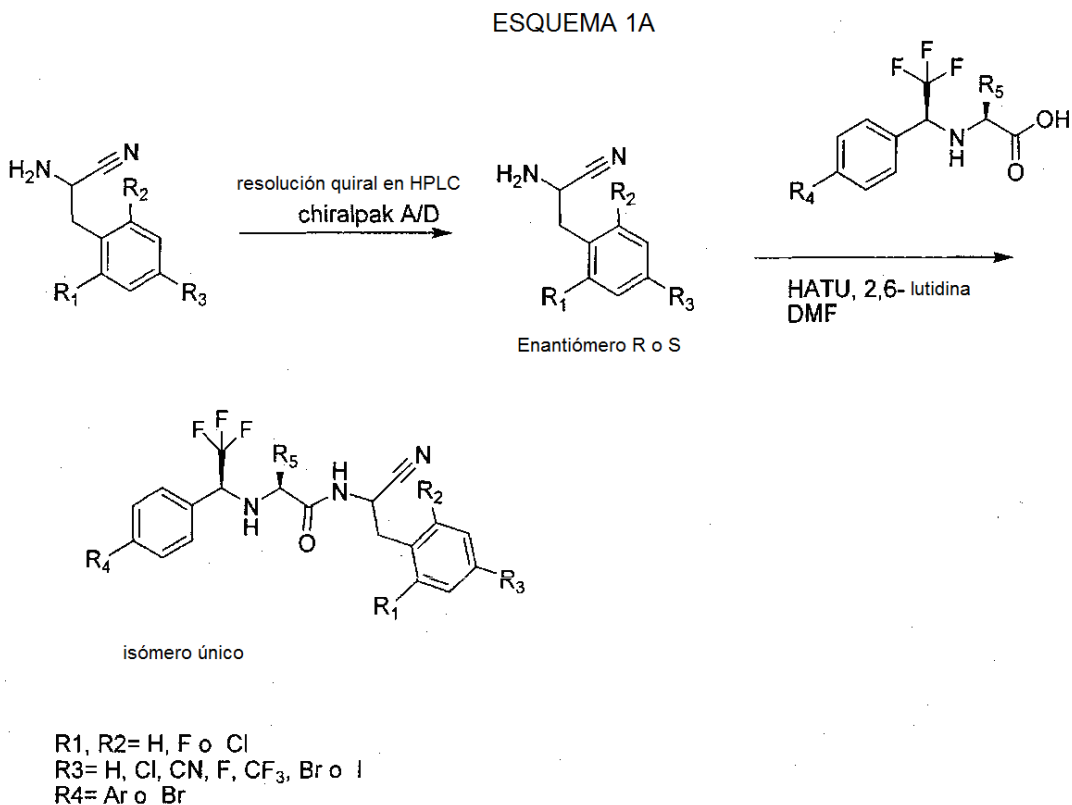
Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 1, como se indica a continuación. Por tanto, el grupo metilo de un tolueno sustituido puede bromarse en condiciones de reacción

15 radicalarias. Como alternativa, un alcohol bencílico se puede bromar usando reactivos tales como PPh₃ y CBr₄, dando bromuro bencílico. El bromuro bencílico resultante se puede usar para alquilar el N-(difenilmetileno)aminoacetonitrilo. La imina se puede hidrolizar usando un ácido tal como AcOH. La amina libre se puede acoplar a un ácido carboxílico usando diferentes agentes de acoplamiento, tales como PyBOP, HBTU o HATU. El material final se puede resolver mediante HPLC quiral en una columna quiral tal como chiralpak A/D.

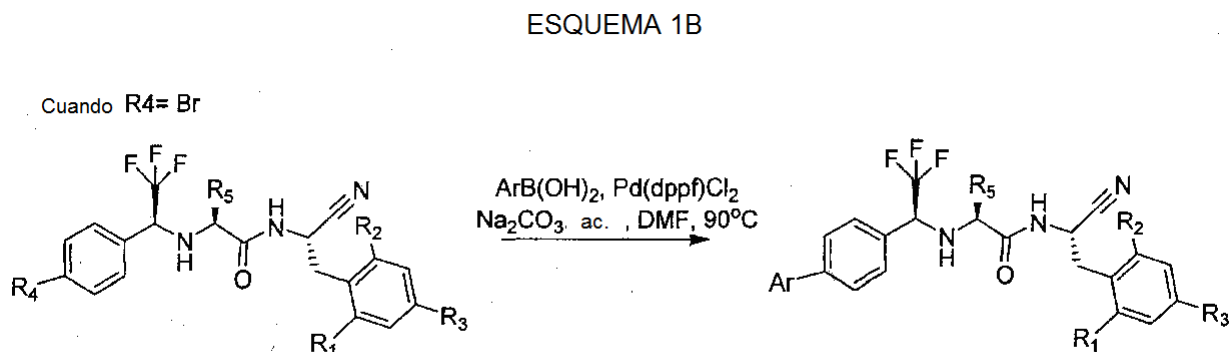
ESQUEMA 1



- Los compuestos de la presente invención también se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 1A, como se indica a continuación. El α -aminonitrilo obtenido en el Esquema 1 puede resolverse directamente mediante HPLC quiral usando una columna quiral tal como chiralpak A/D. Como en el esquema 1, la amina libre se puede acoplar a un ácido carboxílico usando diferentes agentes de acoplamiento tales como PyBOP, HBTU o HATU. Este acoplamiento peptídico proporcionará un único enantiómero de los mismos compuestos como se describe en el Esquema 1.



- 10 Los compuestos de la presente invención también se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 1B, como se indica a continuación. Cuando el anillo fenilo del extremo izquierdo del compuesto descrito en el esquema 1 está sustituido por un átomo de halógeno, tal como un átomo de bromo, el primer compuesto podría funcionalizarse además con un grupo arilo usando las condiciones de acoplamiento de Suzuki.

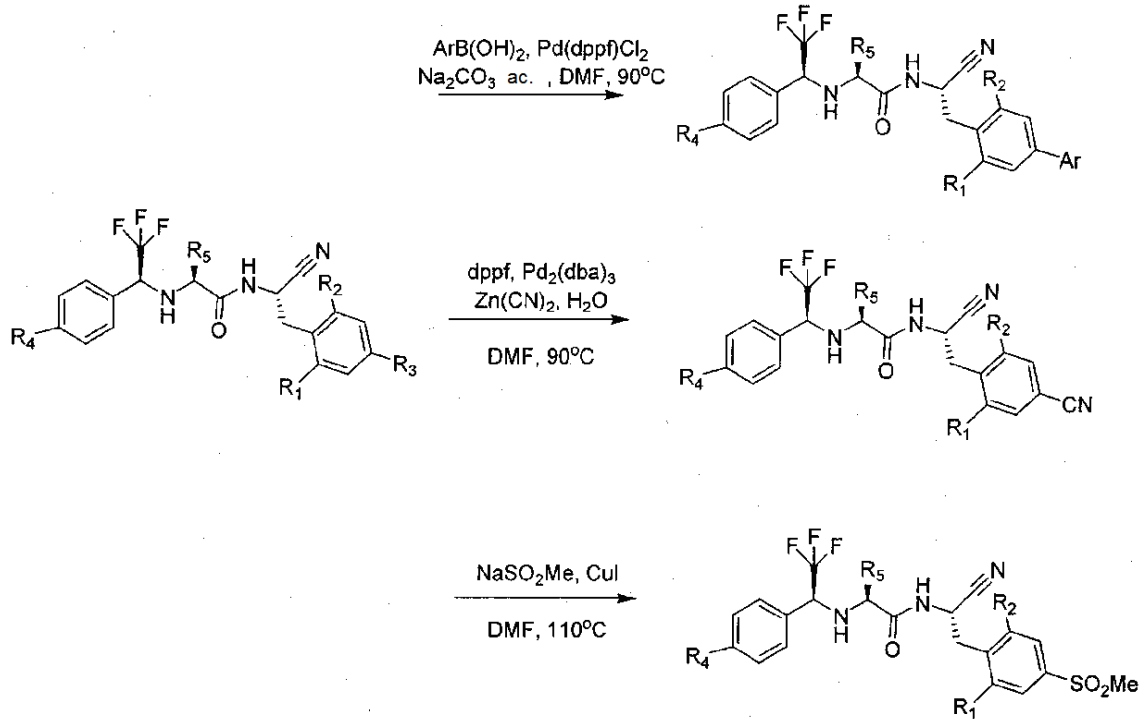


- 15 Los compuestos de la presente invención también se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 1C, como se indica a continuación. Cuando el anillo fenilo del extremo de la derecha del compuesto descrito en el esquema 1 está sustituido por un átomo de halógeno, tal como un átomo de bromo, el primer compuesto podría funcionalizarse además con un grupo arilo usando las condiciones de acoplamiento de Suzuki. El grupo ciano también se podría introducir usando las condiciones de acoplamiento de paladio, así como metilsulfona que podría introducirse
- 20

mediante reacción mediada por cobre.

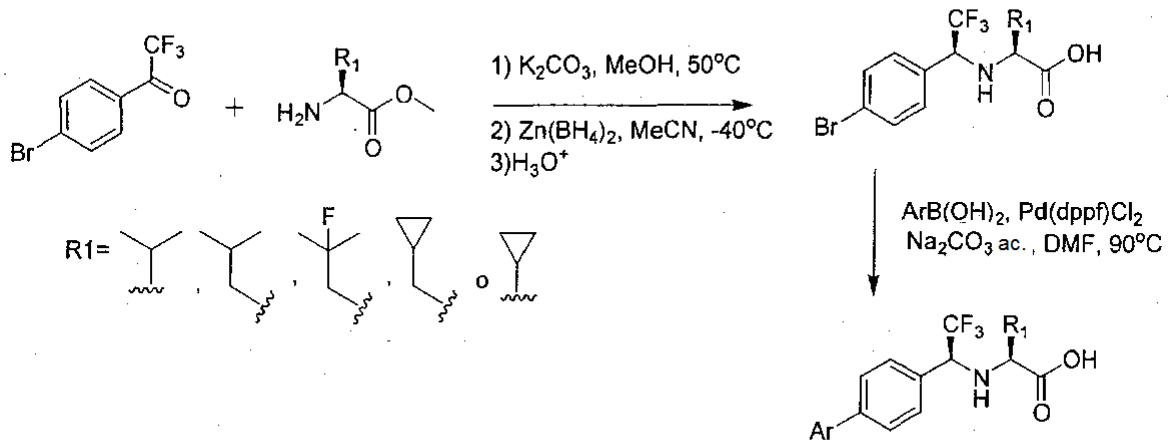
ESQUEMA 1C

Cuando R3= Br o I



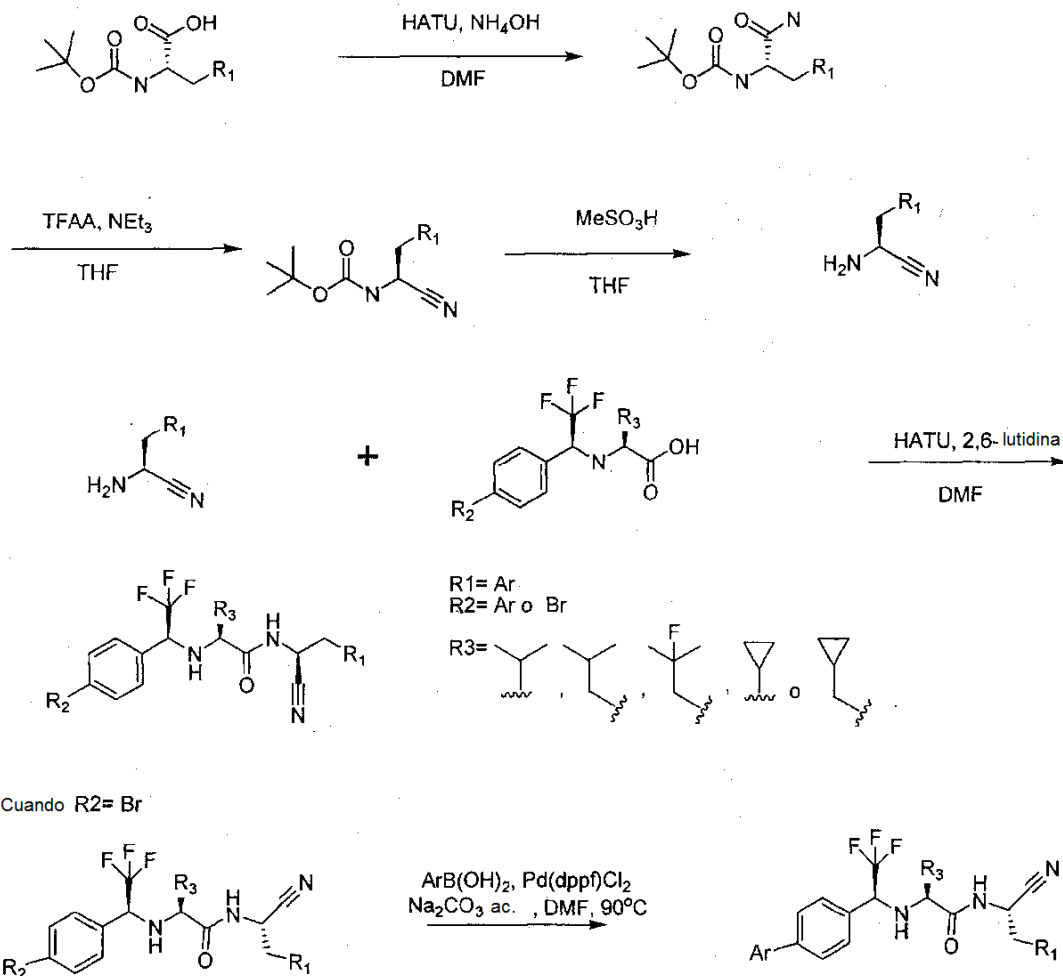
- 5 Los ácidos carboxílicos usados en el esquema 1 y el esquema 1A para dar los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con el esquema 1D, como se indica a continuación. El éster de aminoácido natural o no natural se hizo reaccionar con un grupo carbonilo, como una trifluorocetona, para formar una imina que además se reduce con un agente reductor como NaBH₄ o Zn(BH₄)₂. El ácido carboxílico resultante se puede acoplar directamente a una amina como en el esquema 1 y el esquema 1A u opcionalmente funcionalizarse adicionalmente mediante reacción de acoplamiento tal como una reacción de tipo de acoplamiento de Suzuki.
- 10

ESQUEMA 1D



5 Los compuestos de la presente invención también se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 2, como se indica a continuación. Por tanto, el ácido carboxílico de un aminoácido protegido con BOC quiral podría reaccionar con una fuente de amoníaco tal como NH₄OH con un agente de acoplamiento como DCC o HATU, dando una amida primaria. La amida primaria podría deshidratarse con TFAA para proporcionar un nitrilo. El grupo protector de BOC podría eliminarse en presencia de un ácido fuerte tal como TFA o MeSO₃H. La amina libre se puede acoplar a un ácido carboxílico usando diferentes agentes de acoplamiento, tales como PyBOP, HBTU o HATU, dando el material deseado. Este material podría hacerse reaccionar además en una reacción de acoplamiento de tipo Suzuki, dando más compuestos funcionalizados.

ESQUEMA 2



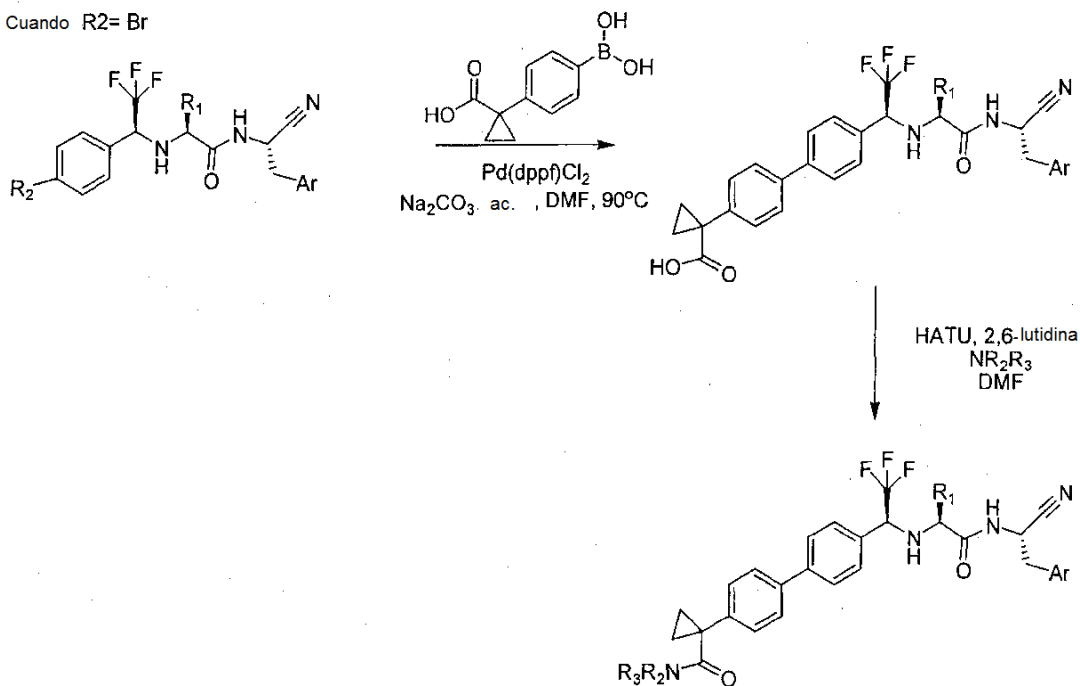
10

15

Los compuestos de la presente invención también se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 3, como se indica a continuación. Por tanto, el ácido ciclopropanocarboxílico intermedio se puede preparar a partir de la reacción de acoplamiento de tipo Suzuki con ácido borónico o éster adecuado. Después, las amidas se pueden preparar a partir del acoplamiento de aminas con el ácido usando un agente de acoplamiento como DCC o HATU.

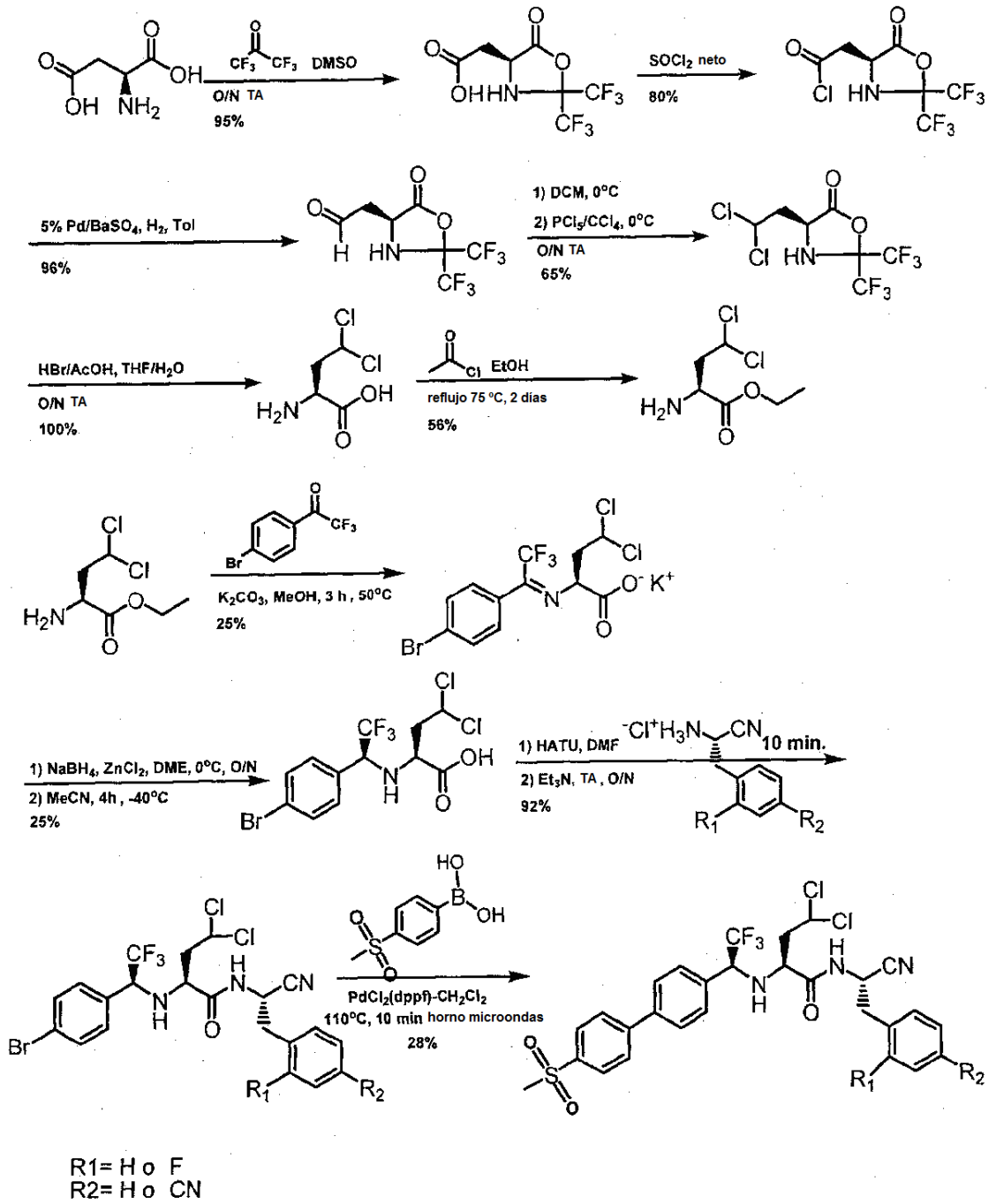
ESQUEMA 3

Cuando R2= Br



- Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con el Esquema 4, como se indica a continuación. El ácido L-aspartico se hizo reaccionar con hexafluoroacetona, para proporcionar el ácido β -carboxílico libre. Este ácido se volvió en cloruro ácido en presencia de una fuente de cloro tal como cloruro de tionilo. El cloruro ácido se redujo en el aldehído en presencia de un catalizador de paladio e hidrógeno. El aldehído se hizo reaccionar con PCl_5 en disolventes clorados para proporcionar el *gem*-dicloroalquilo. El grupo protector se escindió en presencia de un ácido fuerte como HBr para liberar el aminoácido recién formado. El ácido carboxílico se esterifica en un disolvente alcohólico, tal como etanol, en presencia de cloruro de acetilo. El éster de amino se hizo reaccionar con un grupo carbonilo como una cetona o un aldehído para formar una imina que se reduce adicionalmente con un agente reductor como NaBH_4 o $\text{Zn(BH}_4)_2$. El ácido carboxílico se puede acoplar en la amina libre formada en el Esquema 1 o 2 usando diferentes agentes de acoplamiento tales como PyBOP, HBTU o HATU. Después, un acoplamiento de Suzuki proporcionó el compuesto de la invención.

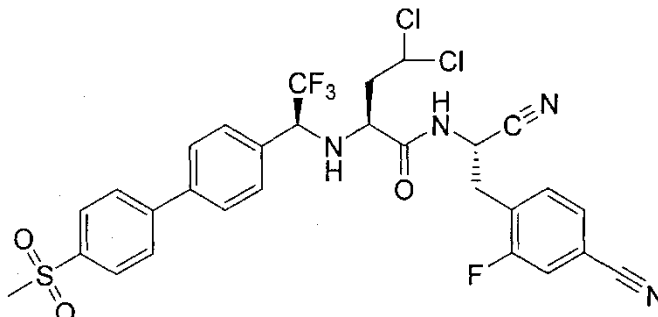
ESQUEMA 4



EJEMPLO 1

Síntesis de (S)-4,4-dicloro-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida

5

Etapa 1: Preparación de ácido [(4S)-5-oxo-2,2-bis(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-4-il]acético

10 A una solución en DMSO (60 ml) a temperatura ambiente de ácido L-aspártico (20 g) en un matraz de fondo redondo de tres cuellos equipado con un condensador de hielo seco (dedo frío) y una entrada de burbujas se introdujeron burbujas de hexafluoroacetona durante 1 hora. La espuma se formó impidiendo que la barra de agitación girara. La reacción se agitó durante 1 hora. Se introdujeron más burbujas de gas en la solución ahora turbia (ya no espumosa). La solución se agitó durante 30 minutos. Se introdujo gas en burbujas en la solución. La solución se dejó durante la noche permitiendo que el hielo seco se fundiera hasta alcanzar la temperatura ambiente con rotación. La solución era en su mayor parte transparente por la mañana, con únicamente unas pocas partículas sólidas. La solución se vertió en 300 ml de agua y 150 ml de DCM. La totalidad de la mezcla se filtró a través de celite para facilitar la separación. Cuando se agitó, la solución transparente se convirtió en blanca. La separación fue lenta, por lo que se añadieron 500 ml de DCM y agua. La solución se convirtió en transparente. Las capas orgánicas combinadas se volvieron a lavar dos veces con agua para eliminar todo resto de DMSO. Después, la capa orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida, dando el compuesto del título, un residuo que se usó como tal en la reacción siguiente.

20 RMN de ¹H δ (ppm) (CDCl₃): 4,36 (1H, dd, J = 9,68, 2,79 Hz), 3,01 (1H, dd, J = 17,59, 2,88 Hz), 2,73 (1H, dd, J = 19,04, 9,44 Hz).

25

Etapa 2: Preparación de cloruro de [(4S)-5-oxo-2,2-bis(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-4-il]acetilo

Lentamente se añadió SOCl₂ (56 ml) al ácido (22 g). La mezcla resultante se agitó durante 2 horas. Después, la solución se calentó en un baño de aceite a 70 °C durante la noche. La reacción se dejó enfriar. El cloruro de tionilo se evaporó. El aceite Amarillo-naranja se purificó mediante destilación. Se recogió entre 70 °C y 92 °C.

30 RMN de ¹H δ (ppm) (CDCl₃): 4,43 (1H, ddd, J = 9,93, 6,98, 2,40 Hz), 3,59 - 3,52 (2H, m), 3,24 (1H, dd, J = 18,60, 9,82 Hz).

Etapa 3: Preparación de [(4S)-5-oxo-2,2-bis(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-4-il]acetaldehído

35 El cloruro ácido (25 g) se disolvió en tolueno (278 ml) y se añadió Pd al 5 %/ BaSO₄ sin reducir (20 g). Se sometió a hidrogenación en un reactor Parr (40 psi) durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró en una almohadilla de celite. El filtrado se concentró y el aldehído se usó sin purificación adicional.

40 RMN de ¹H δ (ppm) (CDCl₃): 9,82 (1H, s), 4,43 (1H, t, J = 8,44 Hz), 3,53 (1H, s), 3,21 (1H, dd, J = 19,13, 2,28 Hz), 2,89 (1H, dd, J = 19,11, 10,06 Hz).

Etapa 4: Preparación de (4S)-4-(2,2-dicloroetil)-2,2-bis(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-5-ona

45 El aldehído se disolvió en diclorometano y se agitó en gas N₂ en un baño de hielo. El PCl₅ se disolvió en CCl₄ y se agitó en un baño de hielo. Tras 30 minutos, la solución de PCl₅ se añadió a la primera. Se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución transparente se añadió sobre NaHCO₃ acuoso saturado. La capa acuosa se extrajo con éter dietílico. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con MgSO₄. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc/ hexanos en una proporción de 5:95 a 10:90).

50 RMN de ¹H δ (ppm) (CDCl₃): 5,97 (1H, t, J = 6,16 Hz), 4,36 - 4,30 (1H, m), 3,37 (1H, d, J = 7,15 Hz), 2,79 - 2,73 (1H, m), 2,56 - 2,50 (1H, m).

Etapa 5: Preparación de ácido (2S)-2-amino-4,4-diclorobutanoico

55 El aminoácido protegido (14,8 g) se disolvió en THF (100 ml) y agua (100 ml). Se añadió una solución al 45 % de HBr/AcOH (8 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El progreso de la reacción se

siguió mediante RMN. Tras 12 horas se añadieron 2 ml adicionales de HBr en ácido acético, tras 24 horas se añadieron 4 ml adicionales de HBr en ácido acético y tras 48 horas se añadieron 3 ml adicionales de HBr en ácido acético. Se introdujeron burbujas de N₂ en la solución durante 30 minutos antes de la evaporación de los disolventes. La mezcla se concentró a presión reducida y se coevaporó tres veces con tolueno. El aminoácido se usó sin purificación adicional.

RMN de ¹H δ (ppm)(DMSO-d₆): 8,37 (3H, s), 6,34 (1H, t, J = 6,63 Hz), 4,01 (1H, d, J = 7,08 Hz), 2,79 - 2,61 (2H, m).

Etapa 6: Preparación de (2S)-2-amino-4,4-diclorobutanoato

Gota a gota se añadió cloruro de acetilo(18,7 ml) a etanol (185 ml). Esta solución se añadió al aminoácido (7,5 g). La mezcla se sometió a reflujo durante la noche (75 °C). La mezcla se concentró a presión reducida y se usó sin purificación adicional.

RMN de ¹H δ (ppm)(DMSO-d₆): 8,68 (3H, s), 6,47 (1H, t, J = 6,60 Hz), 4,23 (2H, q, J = 7,12 Hz), 2,80 - 2,72 (2H, m), 1,26 (3H, t, J = 7,10 Hz).

Etapa 7: Preparación de ácido (2S)-2-[[[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]amino]-4,4-diclorobutanoico

El éster de amino (4,6 g) y el carbonato potásico (7,9 g) se mezclaron en metanol anhidro (13,5 ml). Se añadió 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona (5,8 g) y la mezcla se calentó hasta 50 °C durante 8 horas. La mezcla se filtró sobre una almohadilla de celite y el filtrado se concentró. La imina resultante se usó como tal. Se preparó una solución de Zn(BH₄)₂ añadiendo 790 mg de NaBH₄ a una suspensión a 0 °C de 1,4 g de ZnCl₂ en 10,5 ml de DME. La mezcla se agitó durante la noche. A partir de esta mezcla se transfirieron 4 ml a otro matraz de fondo redondo. La imina se diluyó en MeCN (67,4 ml) y se añadió a la suspensión de Zn(BH₄)₂ que se había enfriado a -40 °C. La mezcla se agitó a -40 °C durante 4 horas. La reacción se inactivó con 10 ml de acetona y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante 1 hora. Lentamente se añadió HCl acuoso 1 M (50 ml). La solución se concentró a presión reducida y la mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó mediante ultrarrápida (EtOAc/ hexanos a 20:80 a 100 % de EtOAc), dando el ácido carboxílico.

RMN de ¹H δ (ppm) (CH₃ OH-d₄): 7,61 - 7,53 (2H, m), 7,41 - 7,35 (2H, m), 6,19 (1H, dd, J = 9,06, 4,09 Hz), 4,31 (1H, d, J = 7,50 Hz), 3,64 (1H, dd, J = 9,87, 4,25 Hz), 2,56 (1H, dd, J = 9,30, 4,41 Hz), 2,47 (1H, dd, J = 10,03, 4,19 Hz).

Etapa 8: Preparación de ácido (2S)-2-[[[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]amino]-4,4-dicloro-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]butanamida

El ácido (2S)-2-[[[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]amino]-4,4-diclorobutanoico (120 mg) y el cloruro de (1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etanaminio (66 mg) se disolvieron en DMF (1,5 ml) y se añadió HATU (223 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añadió base de Hunig (204 µl). La solución se agitó durante 18 horas. La mezcla se vertió con hidrogenocarbonato sódico acuoso (saturado, 20 ml) y agua (20 ml). La mezcla se agitó en un matraz de Erlenmeyer durante 10 minutos. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄. Se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluida con EtOAc/ hexanos en una proporción de 20:80 a 55:45).

RMN de ¹H δ (ppm) (CDCl₃): 7,59 - 7,52 (3H, m), 7,50 - 7,42 (2H, m), 7,26 - 7,20 (2H, m), 5,98 (1H, t, J = 6,36 Hz), 5,13 - 5,06 (1H, m), 4,18 - 4,07 (1H, m), 3,43 (1H, q, J = 7,42 Hz), 3,26 (1H, dd, J = 13,92, 7,03 Hz), 3,16 (1H, dd, J = 13,97, 7,20 Hz), 2,56 - 2,38 (2H, m), 2,38 - 2,36 (1H, m).

Etapa 9: Preparación de (2S)-4,4-dicloro-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-2-((1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonil)fenil-4-il]etil]amino)butanamida

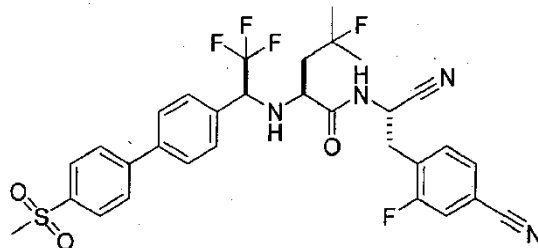
En un tubo de microondas, se disolvieron (2S)-2-[[[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]amino]-4,4-dicloro-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]butanamida, ácido [4-(metilsulfonil)fenil]borónico y Na₂CO₃ (2 M) en DMF (1,35 ml) y se desgasificaron con N₂. Se añadió el aducto PdCl₂(dppf)-CH₂Cl₂. El tubo se selló y se calentó en un microondas a 110 °C durante 600 segundos. La mezcla de reacción se procesó y se añadió hidrogenocarbonato sódico acuoso (saturado, 50 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 50 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc/ hexanos en una proporción de 27:63 a 55:45).

M+1, +IEN= 655

EJEMPLO 2

Síntesis de (2S)-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-4-fluoro-4-metil-2-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino)pentanamida

5

Etapa 1: Preparación de 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo

10 Una mezcla de 3-fluoro-4-metilbenzonitrilo (29,54 g) y NBS (46,7 g) como una suspensión en 1,2-dicloroetano (500 ml) se trató con peróxido de benzoilo (4,24 g) en un matraz montado con un condensador de reflujo abierto al aire. El matraz se sumergió en un baño de aceite a 75 °C y se aplicó luz sobre el mismo con una lámpara solar. De forma súbita se observó un reflujo más enérgico y la reacción se convirtió en homogénea. Se dejó agitar la reacción a esta temperatura durante un total de 2 horas, después se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Se añadieron hexanos (500 ml) y el precipitado se filtró y se desechó. El filtrado se concentró a presión reducida hasta aproximadamente 100 ml y se suspendió en acetato de etilo (200 ml). La reacción se lavó con bicarbonato sódico semisaturado (100 ml), después con salmuera (100 ml). La capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de magnesio. La fase orgánica se concentró a presión reducida, dando el bromuro bencílico como un sólido amarillo que se usó como tal en la etapa siguiente.

20

Etapa 2: Preparación de 4{2-ciano-2-[(difenílmetileno)amino]etil}-3-fluorobenzonitrilo

25 A una suspensión de hidruro sódico (2,62 g) en dimetilformamida (100 ml) a 0 °C lentamente se añadió una solución de [(difenílmetilideno)amino]acetonitrilo (13,20 g) en 40 ml de dimetilformamida. La temperatura de reacción varió entre 2 y 8 °C durante la adición. El color pasó de amarillo a marrón con evolución de gas. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 minutos más, después se añadió 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo de la etapa 1 (12,72 g) muy rápidamente en 60 ml de dimetilformamida. La temperatura se elevó hasta 27 °C y se retiró el baño frío. La reacción se agitó durante 4 horas. El contenido del matraz se vertió en una solución de dihidrogenofosfato sódico (300 ml) y agua helada (1,4 l). La mezcla se volvió amarilla y se formó una masa grande junto con cantidades muy pequeñas de polvo fino. El sólido fino se filtró y la masa se mantuvo en el Erlenmeyer. La masa se disolvió en éter (500 ml) y se introdujo en un embudo de separación junto con agua (200 ml). Las fases se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera (100 ml) y se secaron sobre sulfato magnésico. La fase orgánica se concentra a presión reducida, dando 4{2-ciano-2-[(difenílmetileno)amino]etil}-3-fluorobenzonitrilo como un sólido naranja que se usó como tal en la etapa siguiente.

35

Etapa 3: Preparación de 4-[(2S)-(2-amino-2-cianoetil)]-3-fluorobenzonitrilo

40 Una solución de 4{2-ciano-2-[(difenílmetileno)amino]etil}-3-fluorobenzonitrilo de la etapa 2 (24,5 g) en tetrahidrofurano (190 ml) se trata con agua (45 ml), después con ácido acético (90 ml) y se deja agitar durante 24 horas a 40 °C. A continuación se retira aproximadamente el 75 % de los volátiles a presión reducida. La solución residual se diluye con agua (100 ml) y ácido clorhídrico 1 N (25 ml), se extrae con 2 porciones (cada una de 100 ml) de éter dietílico, después se convirtió en básica con hidróxido potásico 8 N y fosfato potásico acuoso hasta alcanzar un pH 9 – 10. El aminonitrilo se extrajo con tres porciones (cada una de 300 ml) de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron a presión reducida. La goma del producto naranja se disolvió en etanol (20 ml) y se diluyó con hexanos (20 ml). Se inyectaron alícuotas de 500 mg en una columna chiralcel AD usando etanol al 50 %: hexanos al 50 % en condiciones isocráticas. El nitrilo más rápido es el enantiómero erróneo (Tr =19 min), mientras que tras la evaporación y el acoplamiento (etapa 4), el enantiómero más lento (t=24 min) conducirá al potente diaestereómero de la (2S)-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-4-fluoro-4-metil-2-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino)pentanamida que se supone que está en la configuración S.

50

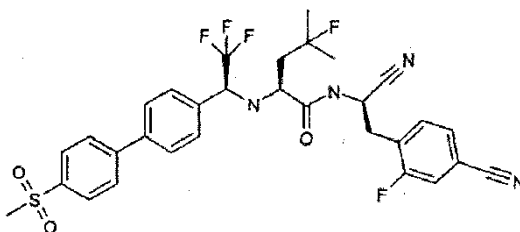
Etapa 4: Preparación de (2S)-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-4-fluoro-4-metil-2-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino)pentanamida

55 A la sal dicitohexilamina del ácido (2S)-4-fluoro-4-metil-2-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino)pentanoico (301 mg) descrito en la patente de EE.UU. N° 7.183.425. en dimetilformamida (5 ml) se añadió HATU (213 mg) y la solución se agitó durante 1 minuto. El aminonitrilo más lento (de la etapa 3) (88 mg) y 2,6-lutidina (0,136 ml) se introducen al mismo tiempo y la reacción se agita durante la noche. Se añade HCl 1 N al

medio de reacción y la capa acuosa se extrae con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y agua, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El compuesto en bruto se purificó mediante un sistema automático de cromatografía ultrarrápida en SiO₂ usando un gradiente de disolventes de 10 % de EtOAc/Hex a 100 % de EtOAc/Hex, dando (2*S*)-*N*-[(1*S*)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-4-fluoro-4-metil-2-((1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino]pentanamida como un sólido blanco. El aminonitrilo más lento da un diaestereómero más potente (diagnóstico en señal de RMN de ¹H a 4,25 ppm para el activo y 4,45 ppm para el inactivo en d₆-acetona). M+1 (+IEN) = 633,2

EJEMPLO 3

Síntesis de (2*S*)-*N*-[(1*R*)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-4-fluoro-4-metil-2-((1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino]pentanamida

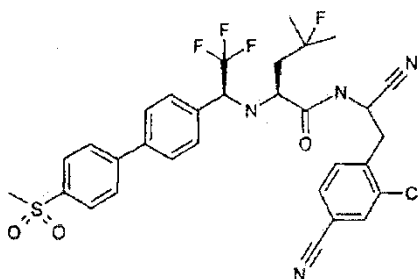


Etapa 1: Preparación de (2*S*)-*N*-[(1*R*)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-4-fluoro-4-metil-2-((1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino]pentanamida

Usando 4-[(2*R*)-(2-amino-2-cianoetil)]-3-fluorobenzonitrilo preparado siguiendo la etapa 3 del Ejemplo 2, se preparó (2*S*)-*N*-[(1*R*)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-4-fluoro-4-metil-2-((1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]etil)amino] pentanamida siguiendo el procedimiento descrito en la etapa 4 del Ejemplo 2. M+1 (+IEN) = 633,3

EJEMPLO 4

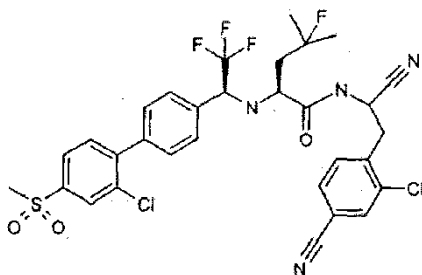
Síntesis de [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-4-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2'-metanosulfonyl-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico



La [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-4-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2'-metanosulfonyl-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico se preparó a partir de 3-cloro-4-metilbenzonitrilo siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 2. M+1 (+IEN) = 648,9

EJEMPLO 5

Síntesis de [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonyl-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico



Etapa 1: Preparación de 2-cloro-1-yodo-4-(metilsulfonyl)benzeno

2-cloro-4-metilsulfonilaniolina en una mezcla 1:1:3 (0,4 M) de ácido acético, ácido clorhídrico, 37 % y agua se enfrió hasta 0 °C y lentamente se trató con una solución 4 M de nitrato sódico en agua. La reacción se agitó a 5 °C durante 30 minutos, después se trató gota a gota con una solución 2 M de yoduro potásico en agua. La reacción desarrolló un gas y se convirtió a color marrón. La reacción se agitó 15 minutos a 0 °C, 40 minutos a temperatura ambiente y 1 hora a 60 °C. El sólido marrón se filtró, se disolvió en acetato de etilo y la solución se lavó con tiosulfato sódico acidificado y después con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico y se concentró a presión reducida. Durante la evaporación apareció un precipitado y se filtró. Los licores madre se evaporaron más y se recolectaron 2 cosechas más. El último licor madre se transfirió con éter dietílico y la evaporación proporciona más productos.

Etapa 2: Preparación de 4-fluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]etil]-L-leucinato de etilo

A una solución del éster etílico de N-[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]-4-fluoro-L-leucina descrita en la patente de EE.UU. N° 7.407.959 se añadió acetato potásico y bis(pinacolato)diboro en DMF (0,2 M). La mezcla se desgasificó con burbujas de nitrógeno durante 5 minutos. Después se añadió Pd(dppf)Cl₂ y la reacción se sumergió en un baño de aceite a 70 °C durante la noche. La reacción se concentró a presión reducida hasta aproximadamente un tercio de su volumen y se filtró sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo. El filtrado se concentró y se usó como tal en la reacción siguiente.

Etapa 3: Preparación de N-[(1S)-1-[2'-cloro-4'-(metilsulfonyl)bifenil]-2,2,2-trifluoroetil]-4-fluoro-L-leucinato de etilo

4-fluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]etil]-L-leucinato de etilo, 2-cloro-1-yodo-4-(metilsulfonyl)benzeno (y carbonato sódico acuoso 2 M en DMF (0,2 M) se desgasificaron con burbujas de nitrógeno durante 3 minutos. Después se añadió el aducto PdCl₂(dppf)-CH₂Cl₂ en una porción y el matraz se sumergió en un baño de aceite a 70 °C durante la noche. El medio de reacción se enfrió y se vertió en agua. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y agua, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron.

Etapa 4: Preparación de N-[(1S)-1-[2'-cloro-4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoroetil]-4-fluoro-L-leucina

A una solución de N-[(1S)-1-[2'-cloro-4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoroetil]-4-fluoro-L-leucinato de etilo en una mezcla de 3:1:1 (0,1 M) de tetrahidrofurano, agua y etanol se añadió hidróxido de litio sólido. La reacción se agitó durante 64 horas a temperatura ambiente y se calentó durante una hora a 38 °C, tras lo cual el análisis TLC indicó la desaparición del material de partida. La reacción se enfrió y se trató con una solución de NaH₂PO₄ acuoso a pH 5 y salmuera y después con HCl 1 N acuoso hasta pH 2. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con una solución de NaH₂PO₄ acuoso a pH 5 y salmuera.

La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se concentró.

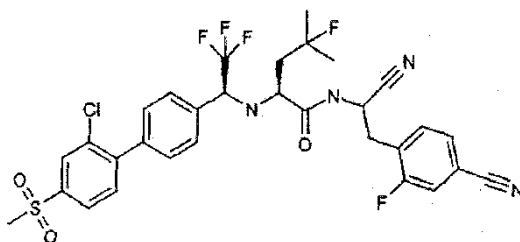
Etapa 5: Preparación de [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonyl-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico

La [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida del ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonyl-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico se preparó a partir de N-[(1S)-1-[2'-cloro-4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoroetil]-4-fluoro-L-leucina y 4-(2-amino-2-cianoetil)-3-clorobenzonitrilo mediante los procedimientos siguientes como en la etapa 4 del ejemplo 2.

M+1 (+IEN) = 683,0

EJEMPLO 6

Síntesis de [1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonyl-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico

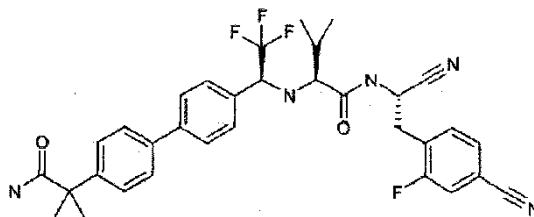


La [1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida del ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonyl-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico se preparó a partir de *N*-[(1S)-1-[4'-cloro-4'-(metilsulfonyl)bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoroetil]-4-fluoro-L-leucina y 4-[(2S)-(2-amino-2-cianoetil)]-3-fluorobenzonitrilo usando el procedimiento descrito en el ejemplo 5.

5 M-1 (-IEN) = 665,7

EJEMPLO 7

10 Síntesis de la amida de ácido 1-{4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico



15 Etapa 1: Preparación de *N*²-[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]-*N*-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-L-valinamida

La *N*²-[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]-*N*-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-L-valinamida se preparó a partir de L-valinato de metilo y cloruro de (1S)-1-ciano-2-(4-yodofenil)etanaminio usando los procedimientos descritos en los ejemplos 1 y 2.

20 Etapa 2: Preparación de ácido 1-[4'-((1S)-1-(((1S)-1-(((1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil)amino)carbonil)-2-metilpropil)amino)-2,2,2-trifluoroetil]bifenil-4-il]ciclopropanocarboxílico

25 A *N*²-[(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]-*N*-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-L-valinamida (1 equiv.) en DMF (0,1 M) se añadió ácido 1-[4-(dihidroxiboril)fenil]ciclopropanocarboxílico (1,2 equiv.), Pd(dppf)Cl₂ (0,05 equiv.) y carbonato sódico acuoso 2 M (3 equiv.). La mezcla se desgasificó mediante burbujas de nitrógeno durante 5 minutos y se calentó hasta 90 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con EtOAc y se añadió HCl 3 N para acidificar la mezcla de reacción hasta un pH 5. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y agua, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El compuesto en bruto se purificó mediante un sistema automático de cromatografía ultrarrápida en SiO₂ usando un gradiente de disolventes del 40 % de EtOAc/Hex a 100 % de EtOAc/Hex.

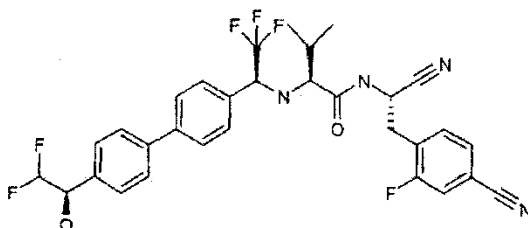
35 Etapa 2: Preparación de la amida de ácido 1-[4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico

Al ácido 1-[4'-((1S)-1-(((1S)-1-(((1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil)amino)carbonil)-2-metilpropil)amino)-2,2,2-trifluoroetil]bifenil-4-il]ciclopropanocarboxílico (1 equiv.) en DMF (0,15 M) a 0 °C se añadió HATU (1,2 equiv.). Después, lentamente se añadió una solución acuosa al 30 % de NH₄OH (3 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó después a 0 °C durante 2 horas. La mezcla se vertió en una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y agua, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El compuesto en bruto se purificó mediante un sistema automático de cromatografía ultrarrápida en SiO₂ usando un gradiente de disolventes del 40 % de EtOAc/Hex a 100 % de EtOAc/Hex.

45 M+1 (+IEN) = 605.641

EJEMPLO 8

50 Síntesis de (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-((S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxietil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino)-3-metil-butamida



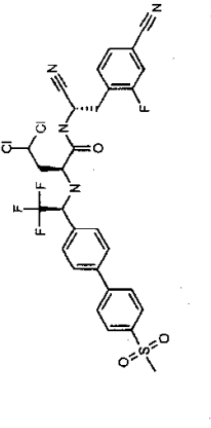
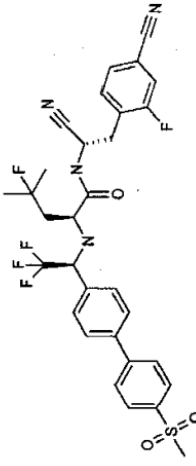
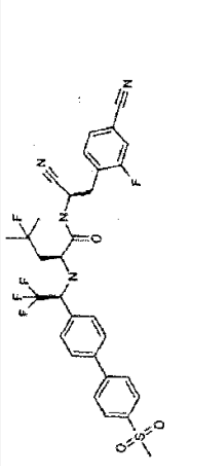
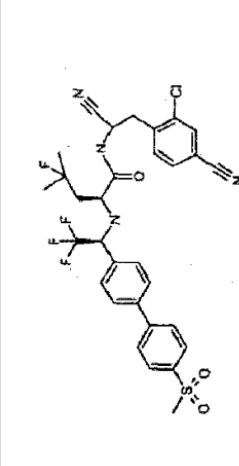
La (S)-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida se preparó a partir de N^2 [(1S)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil]-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-L-valinamida y (1R)-2,2-difluoro-1-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]etanol (descritos en la patente de EE.UU. Nº 7.407.959) usando el procedimiento descrito en la etapa 2 del ejemplo 9.

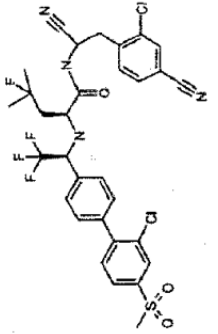
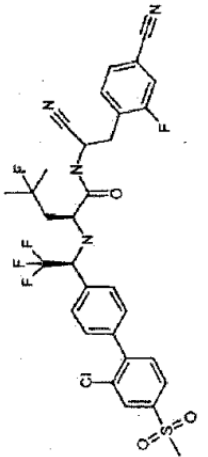
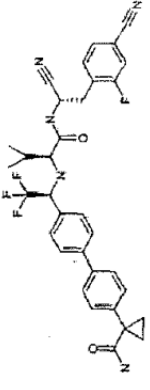
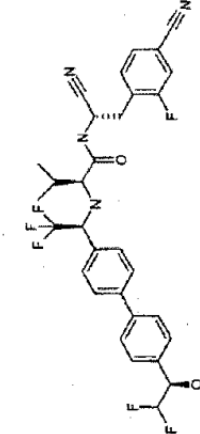
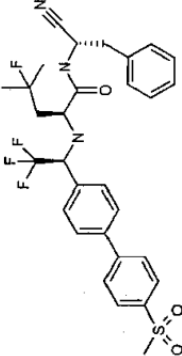
M+1 (+IEN) = 603,2

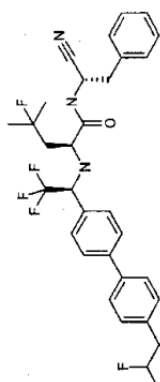
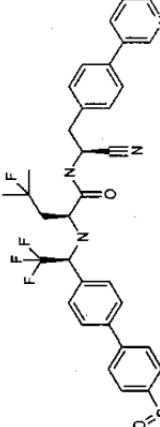
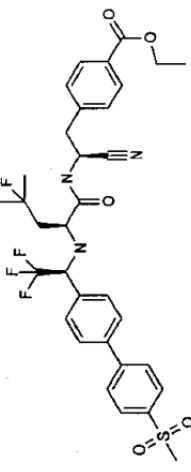
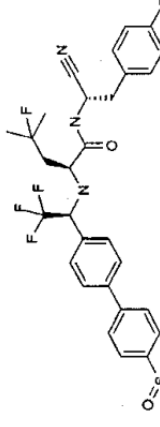
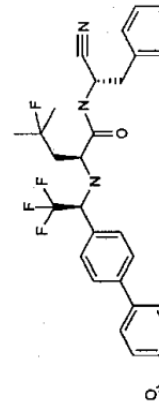
Utilizando los métodos descritos anteriormente se prepararon los compuestos siguientes:

10

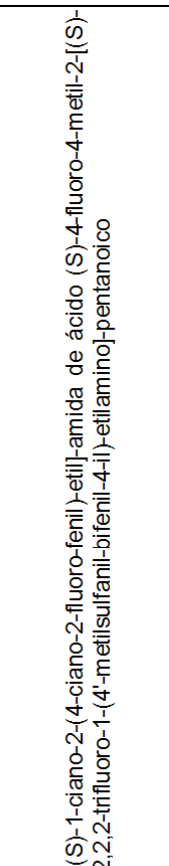
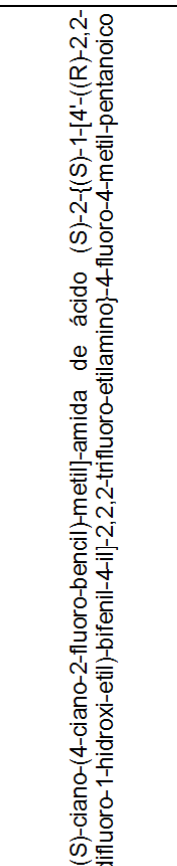
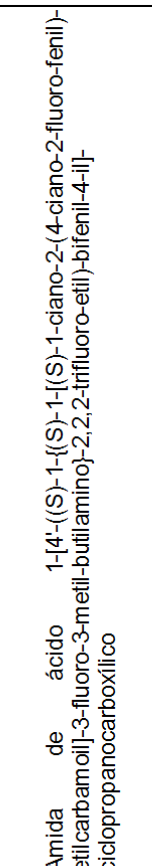
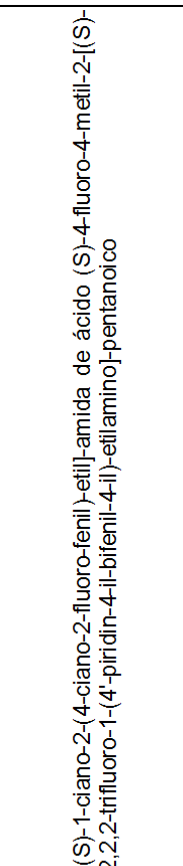
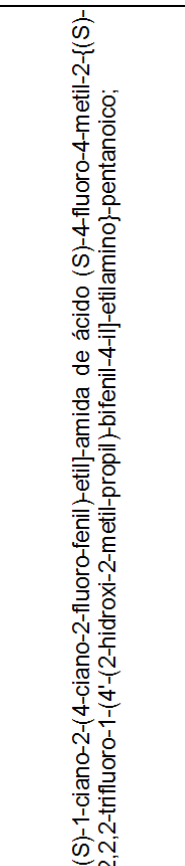
Tabla 1

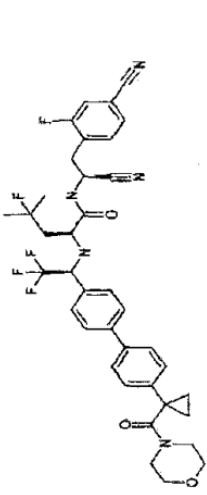
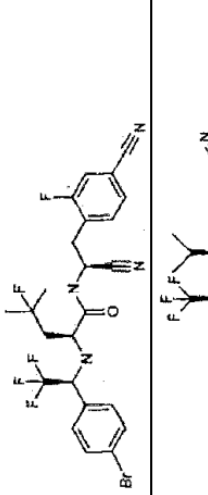
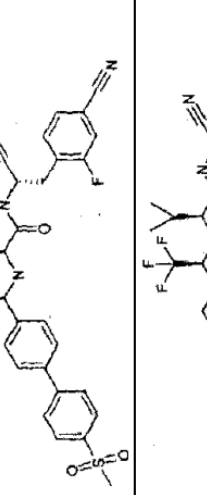
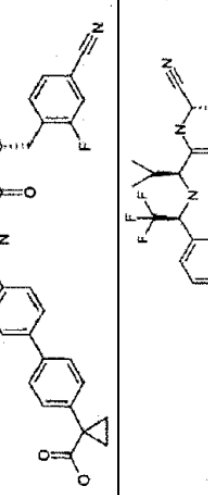
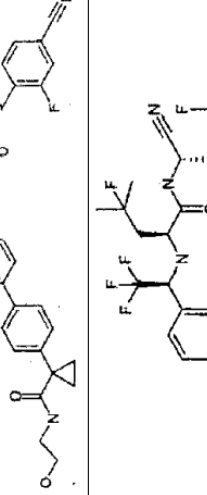
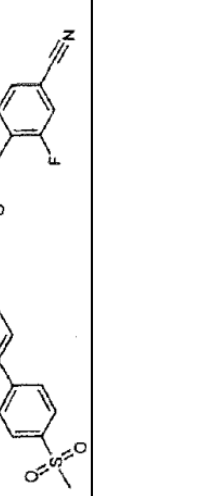
Ei.	Compuesto	Nombre del compuesto	Datos de caracterización	Ensayo C_{150} (nM)
1		(S)-4,4-dicloro-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida	M+1, +IEN= 655 y 657	0,14
2		[(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, +IEN= 633,2	0,95
3		[(R)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, +IEN= 633,3	22,2
4		[2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-4-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, +IEN= 648,9	

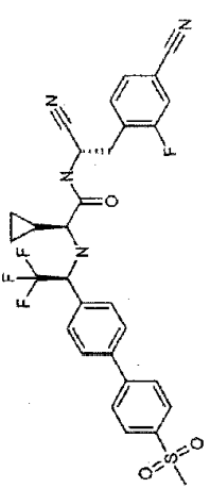
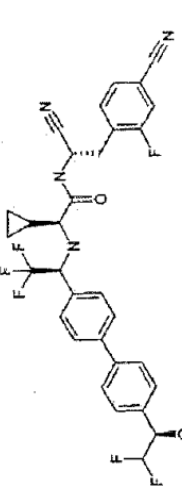
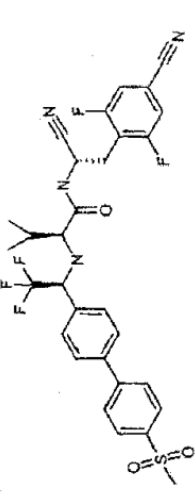
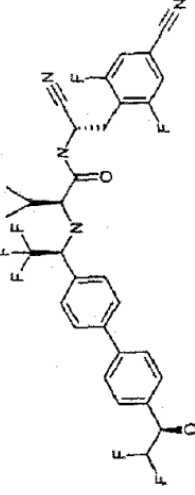
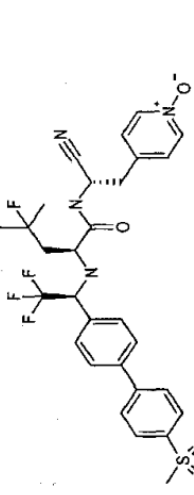
5		<p>[2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico</p>	<p>M+1, +IEN= 683,0</p>	<p>1,2</p>
6		<p>[1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico</p>	<p>M-1, -IEN= 665,7</p>	<p>0,9</p>
7		<p>Amida de ácido 1-{4'-[(S)-1-(S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil]-2-metil-propilamino}-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico</p>	<p>M+1, +IEN= 606,2</p>	<p>0,15</p>
8		<p>(S)-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-(R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil]-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino}-3-metil-butiramida</p>	<p>M+1, + IEN = 603,2</p>	<p>0,33</p>
12		<p>[(S)-bencil-ciano-metil]-amida del ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico</p>	<p>M+1, + IEN = 590,2</p>	<p>8,1</p>

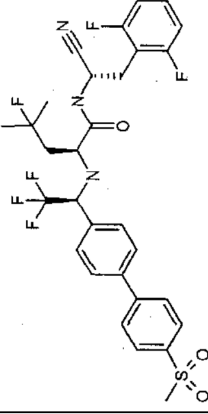
13		[(S)-bencil-ciano-metil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-[4-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico	M+1, + IEN = 592,2	8,1
14		[(S)-1-ciano-2-(4-piridin-3-il-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-3-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, + IEN = 667,0	7
15		Éster etílico del ácido 4-((S)-2-ciano-2-((S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoilamino)-etil)-benzoico	M+1, + IEN = 662,3	4,4
16		[(S)-ciano-(4-fluoro-bencil)-metil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2,6'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, + IEN = 608,2	6,1
17		[(S)-1-ciano-2-(2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M-1, - IEN = 606,2	0,9

18		<p>[(S)-1-ciano-2-(2,4-dicloro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico</p>	<p>M+1,- EN = 658,1 y 661,2</p>	1,3
19		<p>[(S)-1-ciano-2-(4-trifluorometil-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico</p>	<p>M-1,- EN= 656,2</p>	12,4
20		<p>[(S)-1-ciano-2-(4-metanosulfonil-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino}-4-fluoro-4-metil-pentanoico</p>	<p>M-1,- EN= 668,4</p>	8,4
9		<p>[(R,S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico</p>	<p>M-1,- EN= 631,3</p>	1,2
10		<p>[(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico</p>	<p>M-1,- EN= 615,1</p>	0,75

11		M+1,- IEN = 599,2	4,2
12		M+1,+ IEN = 635,2	0,9
13		M+1,+ IEN = 638,2	0,3
14		M+1,+ IEN = 632,2	0,6
15		M+1,+ IEN = 627,3	0,9

16		[(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-((S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-[1-(morfolin-4-carbonil)-ciclopropil]-bifenil-4-il)-etilamino)pentanoico	M+1, + IEN = 708,2	0,35
17		[(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(4-bromo-fenil)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico	M+1, + IEN = 557,1 y 558,1	9,4
18		(S)-N-((S)-ciano-(4-ciano-2-fluorobencil)-metil)-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida	M-1, - IEN = 599,1	0,3
19		Ácido 1-(4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il)-ciclopropanocarboxílico	M+1, + IEN = 607,2	0,3
20		(2-hidroxi-etil)-amida de ácido 1-(4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il)-ciclopropanocarboxílico	M+1, + IEN = 650,2	0,1
21		[(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, + IEN = 651,1	0,9

22		(S)-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-ciclopropil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-acetamida	M+1, + IEN = 599,1	4,4
23		(S)-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-ciclopropil-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-eti)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-acetamida	M+1, + IEN = 601,2	4,3
24		(S)-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida	M+1, + IEN = 619,2	0,5
25		(S)-N-[(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-eti)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida	M+1, + IEN = 621,2	0,7
75		[(S)-ciano-(1-oxi-piridin-4-ilmetil)-metil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(1'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, + IEN = 607,2	120

76		[(S)-ciano-(2,6-difluoro-bencil)-metil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(2,6'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico	M+1, + IEN = 626,2	7,1
----	---	---	--------------------	-----

Composición farmacéutica

Como forma de realización específica de la presente invención, 100 mg de (2S)-4,4-dicloro-N-[(1S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluorofenil)etil]-2-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-[4'-(metilsulfonil)bifenil-4-il]etil)amino)butanamida se formulan con suficiente lactosa finamente dividida para proporcionar una cantidad total de 580 a 590 mg para rellenar una cápsula de gelatina 0 de tamaño 0.

Los compuestos divulgados en la presente solicitud exhibieron actividad en los ensayos siguientes. Además, los compuestos divulgados en la presente solicitud tienen un perfil farmacológico potenciado respecto a los compuestos divulgados en lo que antecede.

Ensayo de cruzipaína

Se prepararon diluciones en serie (1/3) desde 500 μM a 0,0025 μM de los compuestos de ensayo en dimetilsulfóxido (DMSO). Después se añadió un alícuota del compuesto en DMSO de cada dilución en una placa de poliestireno de 384 pocillos de color negro (Corning nº de cat. 3573) que contiene cruzipaína 50 pM en solución tampón de ensayo (NaOAc, 50 mM (pH 5,5); DTT, 5 mM; Tween-20, 0,002 % v/v y DMSO 10 % v/v). Las soluciones de ensayo se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición 2 μM de sustrato de Z-Phe-Arg-AMC. A la hidrólisis del grupo saliente coumarina (AMC) le siguió 10 minutos usando el espectrofluorómetro Pherastar (BMG Labtech) con los filtros siguientes: Ex λ = 360 nm; Em λ = 460 nm; Dicroico a 435 nm). El porcentaje de inhibición se calculó ajustando valores experimentales a un modelo matemático estándar para la curva de respuesta a la dosis. Los resultados del ensayo (CI_{50}) se muestran en la Tabla 1.

Ensayos adicionales que se pueden usar para evaluar la actividad de los compuestos de la invención incluyen:

Ensayo de epimastigotes de *T. cruzi*

La forma epimastigote de *T. cruzi* (cepa brasileña) se inicia en un matraz de 25 cm^2 con una densidad celular de 2×10^6 epimastigotes por ml y se cultivan en medio caldo de triptosa con infusión de hígado (LIT) suplementado con 10 % de suero bovino de neonato (Gibco) y antibióticos a 28 °C con agitación (80 rpm) hasta una densidad celular de $0,5 \times 10^7$ a 1×10^7 , medida con un contador de partículas electrónico (modelo ZBI; Coulter Electronics Inc., Hialeah, Fla.) y mediante recuento directo con un hemocitómetro. Los compuestos de ensayo en DMSO se añadieron a los matraces cuando la densidad celular de los epimastigotes alcanza $0,5 \times 10^7$ a 1×10^7 por ml, después se incubaron durante de 24 a 48 horas y los epimastigotes se recolectaron durante la fase de crecimiento logarítmico. Los epimastigotes recolectados se lavan tres veces con solución salina tamponada con fosfato 1 M (PBS; pH 7,4) mediante centrifugación a 850 g durante 15 minutos a 4 °C. Los epimastigotes recolectados se vuelven a incubar en caldo LIT fresco suplementado con 10 % de suero bovino de neonato y antibióticos a 28 °C con agitación (80 rpm) y la viabilidad de los epimastigotes se evaluó durante hasta una semana usando exclusión con azul tripán (microscopía óptica) y ensayo de incorporación de timidina [^3H] (véase más adelante).

Ensayo de tripomastigotes de *T. cruzi*

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* se cultivan como se ha descrito anteriormente y se recolectan el día 14 (fase estacionaria), se lavan tres veces en medio para insectos de Grace a pH 6,5 (Invitrogen o Wisent) y se induce la forma tripomastigote mediante metaciclo génesis mediante la adición de medio de Grace fresco suplementado con 10 % de suero bovino de neonato (FCS) y haemina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se cultivan durante hasta cinco días a 28 °C. Para producir más tripomastigotes, el cultivo se puede usar para infectar una monocapa de células de mamífero tales como U937 (macrófago humano), J774 (macrófago de ratón) o Vero (riñón de mono verde africano) hasta 4 días. Los tripomastigotes liberados al sobrenadante se recolectan mediante una centrifugación de 3.000 g durante 15 minutos y se lavan dos veces en solución salina de sal equilibrada de Hank suplementada con glucosa 1 mM (HBSS). Los compuestos de ensayo en DMSO se añaden al cultivo de tripomastigotes con una densidad celular de 10^6 por ml, después se incuban en RPMI-10 % a 37 °C durante de 24 a 48 horas. Los tripomastigotes se recolectan y se determina la reducción del número (lisis de parásitos) usando una cámara de Neubauer y se estima el valor de DL_{50} (concentración del fármaco que produjo una reducción del 50 % de los tripomastigotes en comparación con un control sin tratar) representando el porcentaje de reducción frente al logaritmo de la concentración de fármaco. La viabilidad de los tripomastigotes recolectados se evalúa mediante su capacidad para infectar macrófagos y cultivar en medio fresco, como se determina mediante un ensayo de incorporación de timidina- ^3H (véase más adelante).

Ensayo de la actividad de los amastigotes de *T. cruzi* (intracelular)

La forma de epimastigotes de *T. cruzi* se cultiva en medio para insectos de Grace suplementado con 10 % de FCS y haemina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante hasta catorce días a 28 °C para inducir la formación de la forma metacíclica, de modo que aproximadamente el 30 % de las células parásitos está en forma metacíclica. Estas células parásitos se recolectan y se usan para infectar las células de mamífero confluentes, tales como cultivos celulares U937 (macrófago humano), J774 (macrófago de ratón) o Vero (riñón de mono verde africano) cultivados en microplacas de

- 24 pocillos en MEM a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de dejar que las células parásitos infecten los macrófagos, el medio de cultivo se retira y los compuestos de ensayo en medio de cultivo MEM se añaden a los pocillos y las microplacas se incuban durante 48 horas. Al final del periodo de incubación se retiran los medios y los macrófagos se fijan y se tiñen con tinción de May Grünwald Giemsa. El número de amastigotes/100 macrófagos (Nº A/100 Mø) se determina y la actividad anti-amastigote se expresa como (% de AA):

$$\%AA = [1 - (N^{\circ} A/100 M^{\circ})_p / (N^{\circ} A/100 M^{\circ})_c] \times 100$$

Ensayo de incorporación de timidina-³H

- 10 A cada pocillo en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos se añade una suspensión de 200 µl de MEM que contiene una línea celular de mamífero tal como células U937 (macrófago humano), J774 (macrófago de ratón) o Vero (riñón de mono verde africano) y se incuban durante de 24 a 48 horas a 37 °C en 5 % de CO₂. El medio se retira y las células se lavan tres veces en PBS. Una mezcla de 200 µl de MEM que contiene 1 x 10⁷/ml de tripomastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria se añade a cada pocillo, después se incuba durante 24 o 48 horas en las mismas condiciones. Después del periodo de incubación se retira el medio y las células se lavan tres veces en PBS. Los compuestos de ensayo en MEM se añaden a los pocillos adecuados y se incuban durante hasta tres días. Al final del periodo de incubación se retira el medio y las células se lavan tres veces en PBS y los macrófagos se lisan con 0,01 % de dodecilsulfato sódico (SDS) y se recolectan las células parasitarias. Las células parasitarias recolectadas se suspenden en medio para insectos de Grace y se incuban a 28 °C durante 48 horas. Al final del periodo de incubación se añade a cada pocillo 1 µCi de timidina-³H en medio para insectos de Grace y se incuba durante 20 horas adicionales; esto se recoge y se mide la incorporación de timidina-³H.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de:

- 5 (S)-4,4-dicloro-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida;
 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 [(R)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 10 [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-4-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 [2-(2-cloro-4-ciano-fenil)-1-ciano-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
 15 [1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(2'-cloro-4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
 Amida de ácido 1-{4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil}-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxietil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida;
 20 [(R,S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 25 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metilsulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 [(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
 Amida de ácido 1-[4'-((S)-1-[(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etilcarbamoil]-3-fluoro-3-metil-butilamino)-2,2,2-trifluoro-etil]-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
 30 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-piridin-4-il)-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-(2-hidroxi-2-metil-propil)-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 35 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-[1-(morfolin-4-carbonil)-ciclopropil]-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 [(S)-1-ciano-2-(4-ciano-2-fluoro-fenil)-etil]-amida de ácido (S)-2-[(S)-1-(4-bromo-fenil)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-4-fluoro-4-metil-pentanoico;
 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida;
 40 Ácido 1-{4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil}-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
 (2-hidroxietil)-amida de ácido 1-{4'-[(S)-1-((S)-1-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-carbamoil)-2-metil-propilamino]-2,2,2-trifluoro-etil}-bifenil-4-il}-ciclopropanocarboxílico;
 45 [(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-amida de ácido (S)-4-fluoro-4-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-pentanoico;
 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-ciclopropil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-acetamida;
 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2-fluoro-bencil)-metil]-2-ciclopropil-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxietil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-acetamida;
 50 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-3-metil-2-[(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4'-metanosulfonil-bifenil-4-il)-etilamino]-butiramida;
 (S)-*N*-[(S)-ciano-(4-ciano-2,6-difluoro-bencil)-metil]-2-[(S)-1-[4'-((R)-2,2-difluoro-1-hidroxi-etil)-bifenil-4-il]-2,2,2-trifluoro-etilamino]-3-metil-butiramida;

55 o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal o un estereoisómero del mismo farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 3. El uso de un compuesto de la reivindicación 1 o una sal o un estereoisómero del mismo farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad parasitaria toxoplasmosis, paludismo, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, amebiasis, giardiasis, clonorquiasis, opistorquiasis, paragonimiasis, fasciolopsiasis, filariasis linfática, oncocerciasis, dracunculiasis, ascariasis, tricuriasis, strongiloidiasis, tricostrongiliasis, tricomoniasis y cestodiasis.

65

4. Una combinación de un compuesto de la reivindicación 1 o una sal o un estereoisómero del mismo farmacéuticamente aceptables y otro agente seleccionado de: nifurtimox, benznidazol, alopurinol, terbinafina, lovastatina, cetoconazol, itraconazol, posaconazol, miltefosina, ilmofofosina, pamidronato, alendronato, risedronato, cloroquina, proguanil, mefloquina, quinina, pirimetamina-sulfadoxina, doxociclina, berberina, halofantrina,
- 5 primaquina, atovacuona, pirimetamina-dapsona, artemisinina, quinhaosu, meglumina antimonita, estibogluconato sódico, anfotericina B, praziquantel, oxamniquina, pentamidina, melarsoprol, suramina y eflornitina, y las sales y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos.
5. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo,
- 10 para su uso en un método de tratamiento mediante terapia.
6. Un compuesto para su uso de la reivindicación 5, en el que la terapia es el tratamiento de una enfermedad parasitaria seleccionada de toxoplasmosis, paludismo, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, amebiasis, giardiasis, clonorquiasis, opistorquiasis, paragonimiasis, fasciolopsiasis,
- 15 filariasis linfática, oncocerciasis, dracunculiasis, ascariasis, tricuriasis, estrongiloidiasis, tricostrongiliasis, tricomoniasis y cestodiasis.