

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 803**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 487/10 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61K 31/499 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2004 E 04782733 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 1664050**

54 Título: **Compuestos neuroprotectores bicíclicos y composiciones farmacéuticas que los contienen**

30 Prioridad:

03.09.2003 US 499956 P

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

29.03.2016

73 Titular/es:

**NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED (100.0%)
Lowndes Jordan, Level 15 PWC Tower, 188 Quay
Street
Auckland 1141, NZ**

72 Inventor/es:

**BRIMBLE, MARGARET ANNE;
GUAN, JIAN y
SIEG, FRANK**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 564 803 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

Compuestos neuroprotectores bicíclicos y composiciones farmacéuticas que los contienen

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a nuevos compuestos bicíclicos estructuralmente relacionados con dicetopiperazinas. Más particularmente, la presente invención se refiere a estos compuestos y composiciones farmacéuticas de los mismos para usar en el tratamiento de enfermedades y afecciones caracterizadas por la degeneración y/o muerte neuronal.

ANTECEDENTES

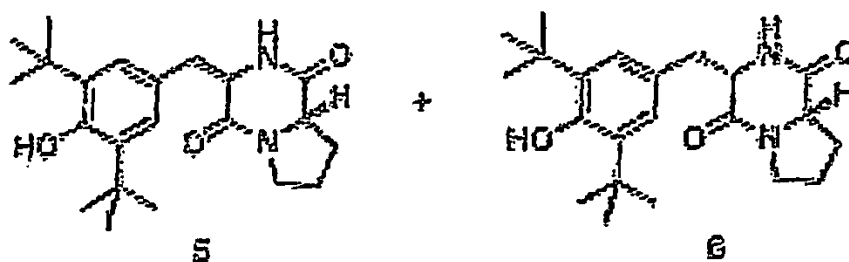
[0002] La degeneración y/o muerte de las células del sistema nervioso son factores importantes en muchas enfermedades y afecciones médicas. Tales enfermedades y afecciones incluyen lesiones traumáticas cerebrales y de la médula espinal, apoplejía, perfusión neuronal secundaria a la cirugía cardíaca de injerto de bypass arterial (CABG), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades neurodegenerativas. Es de interés prevenir o disminuir dicha muerte y degeneración celular.

[0003] Ciertos compuestos son útiles como agentes neuroprotectores. Uno de tales compuestos es el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) (Scheepens et al, WO00/13650). IGF-1 es un péptido de origen natural que puede disminuir la unión del glutamato a los receptores de glutamato de las neuronas (Bourguignon, Patente de Estados Unidos No. 5804550). IGF-1 también puede disminuir la degradación neuronal causada por el daño y la enfermedad. IGF-1 se escinde mediante proteólisis in vivo para dar des₁₋₃ IGF-1 y el tripéptido N-terminal Gly-Pro-Glu (GPE). Se ha observado que GPE y análogos son neuroprotectores (Gluckman et al, Patente de Estados Unidos No. 6187906 incorporada aquí por referencia).

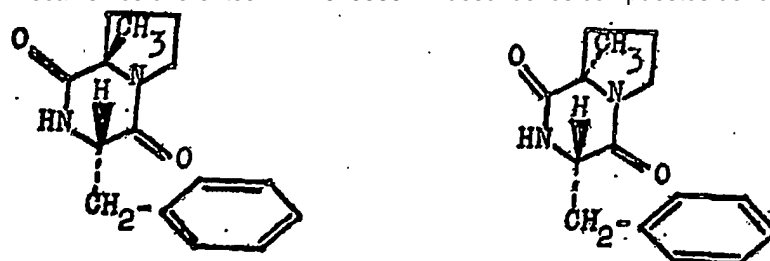
[0004] Sin embargo, dichos péptidos están lejos de ser ideales para el tratamiento de la muerte y degeneración neuronal, especialmente porque se metabolizan rápidamente in vivo. Hay una necesidad de compuestos que proporcionen propiedades neuroprotectoras y neuroregenerativas y son metabólicamente más estables especialmente en cuanto a la resistencia a las proteasas.

[0005] Se ha observado que un derivado del GPE; Pro-Gly cíclico ("cPG"), una dicetopiperazina, es neuroprotector y neuroregenerador. Se observó que cPG prevenía la degeneración neural tóxica y la muerte celular y promovía el crecimiento de neuritas en las neuronas (Guan et al, PCT/US02/36235). Los análogos de dicetopiperazina de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) son conocidos por ser neuroprotectores (Kozikowski et al documento WO99/40931).

K.R.C. Prakash et al. „Synthesis and Biological Activity of Novel Neuroprotective Diketopiperazines“, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Volumen 10, Fascículo 9, Septiembre 2002, páginas 3043-3048, describen dicetopiperazinas de las fórmulas



Para prevenir la muerte neuronal en un modelo in vitro de lesión traumática. El perfil neuroprotector de estos compuestos sugiere que pueden ser útiles como tratamientos para la degeneración neuronal in vivo, potencialmente a través de varios mecanismos diferentes. DE 1620386 A1 describe los compuestos de fórmulas:

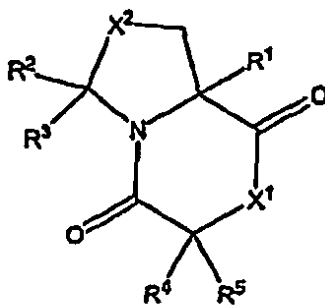


como intermedios para preparar alcaloides útiles en el tratamiento de la migraña.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

5 **[0006]** Las realizaciones de la presente invención incluyen nuevas dicetopiperazinas que están estructuralmente relacionadas con cPG.

10 **[0007]** Un aspecto de la presente invención proporciona compuestos cíclicos novedosos que tienen las fórmulas estructurales y sustituyentes descritos a continuación.



25 Fórmula 1

30 **[0008]** En algunos aspectos, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes donde:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en NR' , O y S;

X^2 se selecciona del grupo que consiste en CH_2 , NR' , O y S;

R^1 se selecciona del grupo que consiste en $-OR'$, $-SR'$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-CN$, $-C(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NR'R'$, $-C(NR')NR'R'$, trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

35 R^2 , R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H , $-OR'$, $-SR'$, $-NR'R'$, $-NO_2$, $-CN$, $-C(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NR'R'$, $-C(NR')NR'R'$, trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o R^4 y R^5 tomados juntos son $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$, donde n es un número entero de 0 a 6;

o R^2 y R^3 tomados juntos son $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$, donde n es un número entero de 0 a 6;

45 con la condición de que cuando $R^1 = \text{metilo}$ y $R^2 = R^3 = R^4 = H$, entonces $R^5 \neq \text{bencilo}$,

en los que alquilo sustituido, heteroalquilo sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido o arilalquilo sustituido son un radical alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o arilalquilo, en los que uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos independientemente por otro sustituyente que incluye $-R'$, $-OR'$, $-SR'$, $-NR'R'$, $-NO_2$, $-CN$, $-C(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NR'R'$, $-C(NR')NR'R'$, $-NR'-C(NR')-OR'$, $-NR'-C(NR')-SR'$, $NR'-C(NR')-NR'R'$, trihalometilo y halógeno, en los que R' es independientemente $-H$, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

50 **[0009]** Otros aspectos de la invención proporcionan sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la Fórmulas 1.

55 **[0010]** En todavía otros aspectos, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de la presente invención. Estas composiciones son útiles como agentes antiapoptóticos y anti-necróticos y para otras afecciones que implican la degeneración o lesión neural.

60 **[0011]** En otros aspectos, la presente invención proporciona compuestos para usar en métodos de tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o lesión capaz de tratamiento mediante la administración de un compuesto adecuado de Fórmula 1, que comprende la administración a ese animal de al menos un compuesto de la presente invención para disminuir la neurodegeneración causada por una lesión o enfermedad. En otros aspectos, el presente documento incluye métodos para tratar un animal con una dicetopiperazina de cualquiera de la Fórmulas 1 en combinación con al menos otro agente terapéutico convencional para la enfermedad a tratar.

[0012] En todavía aspectos adicionales, el animal a ser tratado es un humano.

[0013] El presente documento proporciona métodos para sintetizar, formular y preparar preparaciones farmacéuticas que comprenden compuestos de Fórmula 1 de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] La presente invención se describe con referencia a realizaciones específicas de la misma. Otros aspectos de la presente invención se pueden apreciar con referencia a los dibujos, en los que:

La Figura 1 es un gráfico que muestra los efectos de G-2alilP cíclico sobre la supervivencia neuronal en animales después de estrés oxidativo excitotóxico.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los efectos de ciclopentilG-2MeP cíclico sobre la supervivencia neuronal en animales después de estrés oxidativo excitotóxico.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los efectos neuroprotectores de G-2alilP cíclico en animales sometidos a isquemia cerebral global.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los efectos de diferentes dosis de G-2alilP cíclico sobre la neuroprotección en animales sometidos a isquemia cerebral global.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0015] "Alquenilo" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal, ramificada, o cíclico, insaturado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El radical puede estar en conformación cis o trans sobre el doble o dobles enlaces. Los grupos alquenilo de ejemplo incluyen alilo, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, ciclopentenilo y similares. En algunas realizaciones, los grupos alquenilo son alquenilo (C₂-C₆), y en otras realizaciones, el alilo puede ser particularmente útil.

[0016] "Alquilo" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal, ramificado, o cíclico, saturado. Los grupos alquilo de ejemplo incluyen metilo, etilo, isopropilo, ciclopropilo, terc-butilo, ciclopropilmetilo, hexilo y similares. En algunas realizaciones, los grupos alquilo son alquilo (C₁-C₆).

[0017] "Alquinilo" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal, ramificada, o cíclico, insaturado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinilo de ejemplo incluyen etinilo, propinilo, butinilo, isobutinilo y similares. En algunas realizaciones, el grupo alquinilo es alquinilo (C₂-C₆).

[0018] "Ariilo" se refiere a un radical hidrocarburo cíclico insaturado con un sistema de electrones π conjugado. Los grupos ariilo de ejemplo incluyen fenilo, naftilo y similares. En algunas realizaciones, el grupo ariilo es ariilo (C₅-C₂₀).

[0019] "Ariilalquilo" se refiere a un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo de cadena lineal en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos al carbono terminal está sustituido por un grupo ariilo. Los grupos ariilalquilo de ejemplo incluyen bencilo, naftilmetilo, bencilideno y similares.

[0020] "Factor de crecimiento" se refiere a un polipéptido extracelular activo que estimula una célula para crecer o proliferar mediante la interacción con un receptor en la célula.

[0021] "Heteroalquilo" se refiere a un resto alquilo en el que uno o más átomos de carbono se reemplazan por otro átomo, tal como N, P, O, S etc. Los grupos heteroalquilo de ejemplo incluyen pirrolidina, morfolina, piperidina, piperazina, imidazolidina, pirazolidina, tetrahidrofurano, aminas sustituidas (C₁-C₁₀), tioéteres (C₂-C₆) y similares.

[0022] "Heteroarilo" se refiere a un resto ariilo en el que uno o más átomos de carbono se reemplazan por otro átomo, tal como N, P, O, S etc. Los grupos heteroarilo de ejemplo incluyen carbazol, furano, imidazol, indazol, indol, isoquinolina, purina, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirrol, tiazol, tiofeno, triazol y similares.

[0023] "Lesión" incluye cualquier daño agudo o crónico de un animal que da lugar a la degeneración o muerte de las células en el sistema nervioso. Tales células incluyen células neuronales y células no neuronales. La lesión incluye accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular no hemorrágico, lesión cerebral traumática, asfixia perinatal asociada con sufrimiento fetal, tal como después de desprendimiento de placenta, oclusión del cordón o asociado a retraso del crecimiento intrauterino, asfixia perinatal asociada con la insuficiencia de la reanimación o respiración adecuada, lesiones graves del SNC asociadas con casi ahogamiento, casi muerte súbita, inhalación de monóxido de carbono, amoníaco u otra intoxicación gaseosa, paro cardíaco, coma, meningitis, hipoglucemia y estado epiléptico, episodios de asfixia cerebral asociados con la cirugía coronaria con bypass, episodios de hipotensión y crisis hipertensivas, y traumatismo cerebral. Debe entenderse que los ejemplos anteriores son a modo de ilustración solamente.

[0024] Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica, y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos, o, en el caso de una composición en aerosol, gaseoso.

[0025] Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que es farmacéuticamente aceptable y tiene las propiedades farmacológicas deseadas. Tales sales incluyen sales que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes en los compuestos son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo sodio y potasio, magnesio, calcio, y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas, tales como las bases de amina, por ejemplo etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Tales sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, y los ácidos alcanosulfónicos y arenosulfónicos, tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal farmacéuticamente aceptable puede ser una mono-sal mono-ácida o una sal de diácido; y de manera similar, cuando hay más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos de dichos grupos pueden estar presentes en forma de sales.

[0026] Un "grupo protector" tiene el significado convencionalmente asociado con él en la síntesis orgánica, es decir, un grupo que bloquea selectivamente uno o más sitios reactivos en un compuesto multifuncional, de manera que puede llevarse a cabo una reacción química selectivamente en otro sitio reactivo no protegido y de manera que el grupo se puede eliminar fácilmente después de completar la reacción selectiva.

[0027] "Sustituido" se refiere a cuando uno o más de los átomos de hidrógeno en un radical alquilo, heteroalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo o arilalquilo están sustituidos independientemente por otro sustituyente. Los sustituyentes incluyen -R', -OR', -SR', -NR'R', -NO₂, -CN, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(NR')NR'R', -NR'-C(NR')-OR', -NR'-C(NR')-SR', NR'-C(NR')-NR'R', trihalometilo y halógeno, en los que cada R' es independientemente H, alquilo, heteroalquilo, alqueno, alquino, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

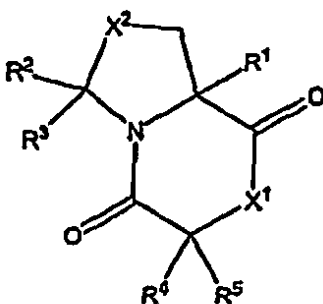
[0028] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento para una enfermedad o lesión. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que disminuye los síntomas o resultados adversos, promueve síntomas o resultados deseables, y/o trata un trastorno subyacente, y/o es curativa.

[0029] "Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye prevenir que aparezca la enfermedad en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta ni muestra síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (ralentizar o detener su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o los efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo), y mitigar la enfermedad (que causa la regresión de la enfermedad).

[0030] Los átomos de hidrógeno implícitos (tales como los hidrógenos sobre el anillo de pirrol, etc.) se omiten de las fórmulas para mayor claridad, pero debe entenderse que están presentes.

Compuestos de la invención

[0031] Ciertas realizaciones de la presente invención incluyen nuevos derivados de cPG que tienen estructuras como se describe a continuación para las fórmulas 1-7.



Fórmula 1

[0032] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en NR' , O y S;

X^2 se selecciona del grupo que consiste en CH_2 , NR' , O y S;

R^1 se selecciona del grupo que consiste en $-OR'$, $-SR'$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-CN$, $-C(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NR'R'$, $-C(NR')NR'R'$, trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H , $-OR'$, $-SR'$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-CN$, $-C(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NR'R'$, $-C(NR')NR'R'$, trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-H$, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o R_4 y R_5 tomados juntos son $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$, donde n es un número entero de 0 a 6;

o R_2 y R_3 tomados juntos son $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$, donde n es un número entero de 0 a 6;

con la condición de que cuando $R_1 = \text{metilo}$ y $R_2 = R_3 = R_4 = H$, entonces $R_s \neq \text{bencilo}$,

en los que alquilo sustituido, heteroalquilo sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido o arilalquilo sustituido son un radical alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o arilalquilo, en los que uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos independientemente por otro sustituyente que incluye $-R'$, $-OR'$, $-SR'$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-CN$, $-C(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NR'R'$, $-C(NR')NR'R'$, $-NR'-C(NR')-OR'$, $-NR'-C(NR')-SR'$, $NR'-C(NR')-NR'R'$, trihalometilo y halógeno, en los que R' es independientemente $-H$, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

[0033] En realizaciones adicionales, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

$R^1 = \text{metilo}$, $R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = H$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = \text{alilo}$, $R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = H$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = R^2 = R^3 = H$, $R^4 = R^5 = \text{metilo}$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = R^4 = R^5 = H$, $R^2 = R^3 = \text{metilo}$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$.

[0034] En otras realizaciones de la invención, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

R^4 y R^5 tomados juntos son $-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-$ y:

$R^1 = \text{metilo}$, $R^2 = R^3 = H$, $n = 0$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = \text{metilo}$, $R^2 = R^3 = H$, $n = 2$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = \text{alilo}$, $R^2 = R^3 = H$, $n = 0$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = \text{alilo}$, $R^2 = R^3 = H$, $n = 2$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = \text{metilo}$, $R^2 = R^3 = H$, $n = 3$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$;

$R^1 = \text{alilo}$, $R^2 = R^3 = H$, $n = 3$, $X^1 = NH$, $X^2 = CH_2$.

[0035] En todavía otras realizaciones de la invención, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que $R^1 = \text{metilo}$ o alilo , $R^2 = R^3 = R^4 = H$ y R^5 se selecciona del grupo que consiste en las cadenas laterales de los aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, norvalina, norleucina, citrulina, ornitina, homocisteína, homoserina, aloisoleucina, isovalina, sarcosina y similares.

[0036] En aún otras realizaciones de la invención, los compuestos de Fórmula 1 incluyen sustituyentes en los que:

$R^1 = \text{metilo}$, $R^2 = R^3 = \text{metilo}$, $R^4 = R^5 = H$, $X^1 = NH$ y $X^2 = S$;

$R^1 = \text{alilo}$, $R^2 = R^3 = \text{metilo}$, $R^4 = R^5 = H$, $X^1 = NH$ y $X^2 = S$.

[0037] Los expertos en la técnica entenderán que las representaciones estructurales anteriores pueden contener centros quirales, el número de los cuales dependerá de los diferentes sustituyentes. La quiralidad puede ser R o S en cada centro. Los dibujos estructurales pueden representar solamente una de las posibles formas tautómeras, isoméricas conformacionales o enantioméricas, y se debe entender que la invención abarca cualquier forma tautómera, isomérica conformacional o enantiomérica que muestre actividad biológica o farmacológica tal como se describe en el presente documento.

Farmacología y Utilidad

[0038] Ciertos aspectos de la presente invención incluyen el uso de compuestos de la invención para usar en el tratamiento o la prevención del daño, degeneración y/o muerte celular en mamíferos en respuesta a una lesión o enfermedad. Algunas realizaciones de la descripción comprenden la liberación de una composición que contiene un compuesto de la invención a un animal que sufre de degeneración neural, y en algunos casos, las afecciones que implican muerte celular apoptótica y necrótica. En algunas realizaciones, las composiciones son deseables para tratar una lesión o enfermedad del SNC que afectan o pueden afectar a las células del cerebro. Se proporcionan composiciones que también pueden incluir uno o más de otros agentes que promueven la regeneración neuronal, disminuyen la degeneración o muerte celular, o son neuroprotectores.

[0039] Dichos otros agentes pueden seleccionarse del grupo que consiste en, por ejemplo, factores de crecimiento y derivados asociados, por ejemplo, factor de crecimiento tipo insulina I [IGF-I], factor de crecimiento tipo insulina II [IGF-II], el tripéptido GPE, factor de crecimiento transformante β 1, activina, hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso, proteína de unión a la hormona de crecimiento, y/o proteínas de unión a IGF.

[0040] Otros aspectos de la descripción incluyen composiciones y métodos de inducción de fasciculación de axones. Al promover la formación de haces de nervios, los compuestos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de afecciones en las que los procesos nerviosos (axones y/o dendritas) se han intensificado, tales como en heridas por fuerzas afiladas, áreas locales de necrosis o de la enfermedad, u otras lesiones localizadas para los procesos nerviosos.

[0041] En aún otros aspectos, las composiciones y métodos para tratar o prevenir el daño y la muerte celular en respuesta a la lesión y la enfermedad, incluyendo la lesión y enfermedad del SNC, comprenden la administración de una cantidad terapéutica de un compuesto de la invención solo o en combinación con otros agentes, después de la lesión. Estos aspectos pueden ser particularmente deseables en situaciones de lesión inesperada, tal como en paro cardíaco, traumas, tales como lesiones en la cabeza causadas por accidentes de automóvil, heridas en la cabeza y similares.

[0042] En todavía otras realizaciones de la descripción, los compuestos de la invención se pueden utilizar solos o en combinación con otros agentes para prevenir los efectos adversos de la lesión cerebral prevista. Dichas afecciones incluyen CABG u otras cirugías programadas, tales como cirugía cerebral, cirugía vascular u otras intervenciones que pueden conducir a una disminución de la perfusión del sistema nervioso. Al tratar a un animal, tal como un ser humano, por adelantado y/o simultáneamente y/o después de la cirugía, se pueden mejorar los efectos neurológicos adversos.

[0043] Tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención se basa en términos generales en el descubrimiento del solicitante de que los compuestos de la invención pueden proteger a las células, en particular células nerviosas, contra el daño, la pérdida de las neuritas, y/o apoptosis o muerte celular necrótica.

[0044] Es en este documento se demuestra que los compuestos de la invención muestran neuroprotección tanto en cultivo celular como en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas y, por tanto, pueden ser una adición o alternativa eficaz a las terapias convencionales para la degeneración neural.

[0045] Aunque el mecanismo de los efectos protectores no se conoce, un posible mecanismo implica la protección de células de la muerte celular apoptótica y necrótica. Sin embargo, independientemente del mecanismo de acción, los compuestos de la invención se pueden utilizar como una terapia eficaz para una variedad de enfermedades neurológicas, incluyendo la hipoxia, isquemia y daño nervioso inducido por neurotoxina. Además, los compuestos de la invención se pueden utilizar en ausencia de cualquier déficit neurológico particular para promover el crecimiento de neuritas y fasciculación de nervios. Por lo tanto, en situaciones en las que la muerte celular no está necesariamente asociada con el trastorno neurológico (por ejemplo, daño axonal, tal como el causado por lesión de la médula espinal), la administración de compuestos de la invención puede ser una manera eficaz de promover la regeneración de neuritas.

Aplicaciones terapéuticas

[0046] Las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de animales, tales como pacientes humanos, que sufren de la lesión o enfermedad neural. Aún más en general, las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de mamíferos, tales como pacientes humanos, que sufren de daño nervioso o potencial muerte celular apoptótica y/o necrótica, debido a las lesiones y enfermedades.

[0047] Las afecciones y enfermedades específicas caracterizadas por degeneración neuronal, apoptosis y/o necrosis incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, neuropatía periférica, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia por SIDA, parálisis supranuclear progresiva, mielinopatía centralis diffusa (enfermedad de la desaparición de la materia blanca), enfermedad neurodegenerativa crónica, enfermedad de Huntington, apoplejía, lesión isquémica, lesión hipóxica, lesión por reperfusión, lesión en la cabeza, traumatismo del SNC, epilepsia, isquemia cerebral, glaucoma, trastornos de la retina, neuropatía óptica, neuritis óptica, síndrome de Down, encefalomiелitis, meningitis, panencefalitis, neuroblastoma, esquizofrenia y depresión. Cada una de las afecciones anteriores muestra hallazgos y síntomas fisiopatológicos que son mimetizados por la neurotoxicidad asociada con la toxicidad del glutamato.

[0048] Aún más en general, los compuestos de la invención tienen aplicación en la inducción de la formación de haces de nervios después de una lesión en forma de traumatismo, exposición a toxinas, asfixia o hipoxia-isquemia. Además, los compuestos de la invención tienen aplicación en el tratamiento o la prevención de la apoptosis en respuesta a una lesión o enfermedad en forma cánceres, infecciones virales, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurológicas y lesiones y enfermedades cardiovasculares.

[0049] El tratamiento puede administrarse antes de una lesión, por ejemplo, antes de la cirugía electiva. Los ejemplos de procedimientos electivos relevantes incluyen la cirugía neural, en la que la retracción de los lóbulos del cerebro puede conducir a un edema cerebral, o las operaciones del corazón, tal como el reemplazo de válvulas, en las que se dice que pequeñas embolias inevitables conducen a un deterioro detectable de la función cerebral en un 75 % de los casos.

Determinación de eficacia

[0050] La actividad antiapoptótica y antinecrótica de los compuestos de la invención sobre la muerte celular se puede medir *in vivo* utilizando el recuento de células mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo los métodos de Klempt et al (Klempt et al, 1992, Molecular Brain Research: 13: 93-101), exámenes microscópicos de la morfología, recuentos celulares de neuronas supervivientes y neuronas muertas teñidas con tionina/fucsina y similares. Los compuestos de la invención también se pueden medir *in vitro* utilizando espectroscopia de masas, métodos inmunológicos o cromatográficos conocidos en la técnica.

[0051] El daño en el SNC puede medirse, por ejemplo, clínicamente por el grado de la función cognitiva del déficit neurológico permanente, y/o la propensión a los trastornos convulsivos. En este documento se dan a conocer técnicas histológicas adecuadas para medir los efectos *in vivo*.

[0052] La relación terapéutica de un compuesto se entiende que es la relación de (1) la dosis media que causa efectos secundarios adversos sobre (2) la dosis media que causa un efecto terapéutico deseable. De este modo, para compuestos para los que tienen efectos terapéuticos en dosis relativamente bajas y efectos secundarios indeseables a dosis altas, la relación terapéutica es > 1 . La relación terapéutica se puede determinar, por ejemplo, comparando la dosis que produce la pérdida de peso significativa (u otro efecto secundario observable) dividida por la dosis que produce actividad antiapoptótica y actividad antinecrótica en una especie animal *in vivo* adecuada, tal como la rata o el ratón. Los sistemas animales adecuados útiles para la determinación de los efectos terapéuticos de los compuestos de la presente invención incluyen lesión hipóxico-isquémica (Sirimanne et al, 1994 Journal of Neuroscience Methods: 55: 7-14), encefalomiелitis inmune experimental (Mendel et al, 1995 Eur. J. Immunol: 25: 1951-1959) y la toxicidad del glutamato.

Composiciones farmacéuticas y administración

[0053] Los compuestos de la invención se pueden administrar como parte de un medicamento o preparación farmacéutica. Esto puede implicar la combinación de un compuesto de la invención con cualquier vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente adecuado. La selección del vehículo, adyuvante o excipiente, por supuesto, dependerá, habitualmente, de la vía de administración que se emplee.

[0054] En general, los compuestos de la presente invención se pueden administrar en cantidades terapéuticamente eficaces mediante cualquiera de los modos habituales conocidos en la técnica, ya sea solos o en combinación con otros agentes terapéuticos convencionales para la enfermedad que está siendo tratada. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la enfermedad o lesión, su gravedad, la edad y la salud relativa del animal a tratar, la potencia del compuesto o compuestos, y otros factores. Como agentes anti-apoptóticos y anti-necróticos, las cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos de la presente invención pueden variar de 0,001 a 100 miligramos por kilogramo de masa del animal, siendo dosis más bajas, tales como de 0,001 a 0,1 mg/kg, apropiadas para la administración a través de el líquido cefalorraquídeo, tal como mediante la administración intracerebroventricular, y siendo dosis mayores, tales como de 1 a 100 mg/kg, apropiadas para la administración mediante métodos, tales como administración oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica), o (por ejemplo, intravenosa). Una persona de experiencia ordinaria en la técnica será capaz sin gran experimentación, teniendo en cuenta esa capacidad y este documento, de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención para una enfermedad o lesión determinada.

[0055] Los compuestos de la presente invención se pueden administrar periféricamente a través de cualquier vía periférica conocida en la técnica. Éstas pueden incluir vías parenterales, por ejemplo, inyección en la circulación periférica, subcutánea, intraorbitaria, oftálmica, intraespinal, intracisternal, tópica, infusión (utilizando, por ejemplo, dispositivos de liberación lenta o minibombas, tales como bombas osmóticas o parches para la piel), implantes, aerosoles, inhalaciones, escarificación, intraperitoneal, intracapsular, intramuscular, intranasal, oral, bucal, transdérmica, pulmonar, rectal o vaginal. Las composiciones se pueden formular para administración parenteral a seres humanos u otros mamíferos en cantidades terapéuticamente eficaces (por ejemplo, cantidades que eliminan o reducen la afección patológica del paciente) para proporcionar terapia para las enfermedades neurológicas descritas anteriormente.

[0056] De manera deseable, si es posible, cuando se administran como agentes anti-apoptóticos y anti-necróticos, los compuestos de la presente invención se administrarán por vía oral. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la composición puede variar ampliamente dependiendo del tipo de composición, tamaño de una dosis unitaria, tipo de excipientes y otros factores bien conocidos por los expertos en la técnica. En general, la composición final puede comprender de 0,0001 por ciento en peso (% p) a 10% p del compuesto de la presente

invención, preferiblemente de 0,001% p a 1% p, siendo el resto el excipiente o excipientes.

[0057] Otras vías de administración convenientes incluyen la inyección subcutánea (por ejemplo, disuelta en un vehículo fisiológicamente compatible, tal como cloruro de sodio al 0,9%) o la administración directa al sistema nervioso central. Utilizando dispositivos estereotácticos y mapas precisos del SNC de un animal, un compuesto se puede inyectar directamente en un sitio de daño neural. Dichas vías de administración pueden ser especialmente deseables en situaciones en las que la perfusión de ese sitio se ve comprometida ya sea por disminución de la perfusión vascular o por la disminución del flujo del líquido cefalorraquídeo (CSF) a esa zona. Los ejemplos incluyen la administración por inyección cerebroventricular lateral o a través de una derivación insertada por vía quirúrgica en el cerebroventrículo lateral del cerebro del paciente, por vía intravenosa, inyección directa en el lugar deseado o por otras vías.

[0058] La cantidad eficaz de compuesto en el SNC se puede aumentar mediante la administración de una forma profármaco de un compuesto que comprende un compuesto de la invención y un vehículo, donde el vehículo está unido a un compuesto de la invención por un enlace que es susceptible a la escisión o la digestión en el paciente. Se puede emplear cualquier unión adecuada que se escindirán o digerirá después de la administración.

[0059] Sin embargo, no hay intención por parte de los solicitantes de excluir otras formas de administración.

[0060] En realizaciones adicionales de la descripción, la restauración de la función nerviosa en un animal puede comprender la administración de una cantidad terapéutica de un compuesto de la invención en combinación con otro agente neuroprotector, seleccionado entre, por ejemplo, factores de crecimiento y derivados asociados (factor de crecimiento de tipo insulina I [IGF-I], factor de crecimiento de tipo insulina II [IGF-II], factor de crecimiento transformante β 1, activina, hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso, proteína de unión a la hormona de crecimiento, proteínas de unión a IGF [especialmente IGFBP-3], factor de crecimiento para fibroblastos básico, factor de crecimiento para fibroblastos ácido, el producto génico hst/Kfkg, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento inducido por andrógenos. Otros miembros de la familia de FGF incluyen, por ejemplo, int-2, factor homólogo I del factor crecimiento para fibroblastos (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor de crecimiento de queratinocitos 2, factor de activación glial, FGF-10 y FGF-16, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado del cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, proteína morfogenética ósea 2 [BMP-2], factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, factor neurotrófico dependiente de la actividad, factor inhibidor de citoquinas de la leucemia, oncostatina M, interleucina), interferón α , β , γ , o consenso, y TNF- α . Otras formas de agentes terapéuticos neuroprotectores incluyen, por ejemplo, clometiazol; ácido quinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol, análogo de andrenocorticotropina (4-9) [ORG 2766] y dizolcipina [MK-801], selegilina; antagonistas del glutamato, tales como NPS1506, GV1505260, MK-801, GV150526; antagonistas de AMPA, tales como 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164; agentes antiinflamatorios dirigidos contra la adhesina MADCAM-1 y/o sus receptores de integrina α 4 (α 4 β 1 y α 4 β 7), tales como anti-MADCAM-1mAb MECA-367 (ATCC no. HB-9478).

[0061] Un compuesto se administra convenientemente mediante un sistema de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliláctidos (patente de Estados Unidos No. 3.773.919 EP 58481); copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al, 1983, Biopolymers: 22: 547-56), poli (metacrilato de 2-hidroxi-etilo) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res.: 15: 267), acetato de etileno-vinilo (Langer et al, 1981, J. Biomed Mater Res: 15: 267), o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto atrapado en liposomas. Los liposomas que contienen el compuesto se preparan mediante procedimientos conocidos per se: DE 3218121, EP 52322, EP 36676, EP 88046, EP 143949, EP 142641, solicitud de patente japonesa 83-118008, patente de los Estados Unidos. Nos. 4.485.045 y 4.544.545, y EP 102.324. Ordinariamente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (desde o aproximadamente 200 a 800 Angstroms) en los que el contenido lipídico es mayor de aproximadamente el 30 por ciento de colesterol, ajustando la proporción seleccionada para la terapia más eficaz.

[0062] Para la administración parenteral, en una realización, el compuesto se formula generalmente mezclando cada uno en el grado de pureza deseado, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente o parenteralmente aceptable, es decir, uno que no es tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y que es compatible con otros ingredientes de la formulación.

[0063] En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto el compuesto de manera uniforme e íntima con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. A continuación, si es necesario, el producto se conforma en la formulación deseada. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferiblemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de tales vehículos portadores incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, una solución tamponada y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos, tales como aceites fijos y oleato de etilo, son también útiles en el presente documento.

[0064] Un vehículo contiene adecuadamente cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que aumentan

la isotonicidad y la estabilidad química. Dichos materiales no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes, tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina de suero, 5 gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; glicina; aminoácidos, tales como ácido glutámico, ácido aspártico, histidina o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, trehalosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones, tales como sodio; tensioactivos no iónicos, tales como polisorbatos, poloxámeros o polietilenglicol (PEG); y/o sales neutras, por ejemplo, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, etc.

10 **[0065]** Un compuesto se formula típicamente en dichos vehículos a un pH de o aproximadamente 4,5 a 8. Se entenderá que el uso de ciertos de los excipientes, vehículos o estabilizadores anteriores tendrá como resultado la formación de sales del compuesto. La preparación final puede ser un líquido estable o un sólido liofilizado.

15 **[0066]** Las formulaciones del compuesto en composiciones farmacéuticas también pueden incluir adyuvantes. Los adyuvantes típicos que pueden incorporarse en comprimidos, cápsulas, y similares, son un aglutinante, tal como acacia, almidón de maíz, o gelatina; un excipiente, tal como celulosa microcristalina; un agente disgregante, tal como almidón de maíz o ácido algínico; un lubricante, tal como estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como sacarosa o lactosa; un agente aromatizante, tal como menta, gaulteria, o cereza. Cuando la forma de dosificación es 20 una cápsula, además de los materiales anteriores, puede también contener un vehículo líquido, tal como un aceite graso. Se pueden utilizar otros materiales de diversos tipos como recubrimientos o como modificadores de la forma física de la unidad de dosificación. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, un edulcorante, tal como sacarosa, conservantes, tales como propil parabeno, un agente colorante, y un agente aromatizante, tal como cereza. Las composiciones estériles para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica 25 convencional. Por ejemplo, Puede desearse una disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo, tal como agua o un aceite vegetal natural, tal como aceite de sésamo, cacahuete, o algodón o un vehículo graso sintético, tal como oleato de etilo o similares. Se pueden incorporar tampones, conservantes, antioxidantes, y similares de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

30 **[0067]** Para la administración por inyección intraventricular y otras rutas invasivas de administración, los compuestos utilizados deben ser estériles. La esterilidad se puede conseguir mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). Las composiciones terapéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por 35 ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón capaz de ser perforado por una aguja de inyección hipodérmica.

[0068] Una formulación farmacéutica ordinariamente se almacenará en recipientes unitarios o de múltiples dosis, por ejemplo, en ampollas o viales sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para la 40 reconstitución. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se llenan viales de 10 ml con 5 ml de solución acuosa al 1% (p/v) filtrada estéril de solución acuosa del compuesto, y la mezcla resultante se liofiliza. La solución de infusión se prepara reconstituyendo el compuesto liofilizado usando agua para inyección bacteriostática. Se puede entender fácilmente que se pueden utilizar otras formas de dosificación y tipos de las preparaciones, y todos se consideran parte de la presente memoria.

45 **Preparación de los compuestos**

[0069] Los materiales y reactivos de partida usados en la preparación de estos compuestos están disponibles de 50 proveedores comerciales, tales como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Bachem (Torrance, Calif.), Sigma (St. Louis, MO), o se preparan por métodos bien conocidos por el experto en la técnica siguiendo los procedimientos descritos en referencias, tales como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vols 1 a 17, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; Rodd's chemistry of carbón compounds, vols. 1-5 y suplementos, Elsevier Science Publishers, 1989; Organic reactions, vols. 1-40, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; March J; Advanced Organic Chemistry, 4^a ed. John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1992; y Larock: Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, 1989. En la mayoría de los casos, los aminoácidos y sus 55 ésteres o amidas, y los aminoácidos protegidos, están ampliamente disponibles comercialmente; y la preparación de aminoácidos modificados y sus amidas o ésteres se describen extensamente en la bibliografía química y bioquímica y, por tanto, es bien conocida por los expertos en la técnica.

[0070] Los materiales de partida, intermedios y compuestos de la presente invención pueden aislarse y purificarse 60 utilizando técnicas convencionales, incluyendo filtración, destilación, cristalización, cromatografía, y similares. Se pueden caracterizar usando métodos convencionales, incluyendo constantes físicas y datos espectrales.

[0071] Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante los métodos descritos a continuación y como se indican en los ejemplos.

65 **[0072]** Los compuestos de la presente invención son generalmente dipéptidos cíclicos (2,5-dicetopiperazinas

bicíclicas) o análogos de los mismos. En general, se pueden preparar mediante métodos, tales como los ya conocidos por las personas expertas en la técnica de síntesis de péptidos y péptidos modificados, siguiendo los esquemas de reacción expuestos en las figuras después de memoria, o siguiendo otros métodos conocidos por los expertos en la materia de la síntesis de péptidos y análogos. Véase, por ejemplo, Bodanzsky: Principles of Peptide Synthesis, Berlín, Nueva York: Springer-Verlag 1993.

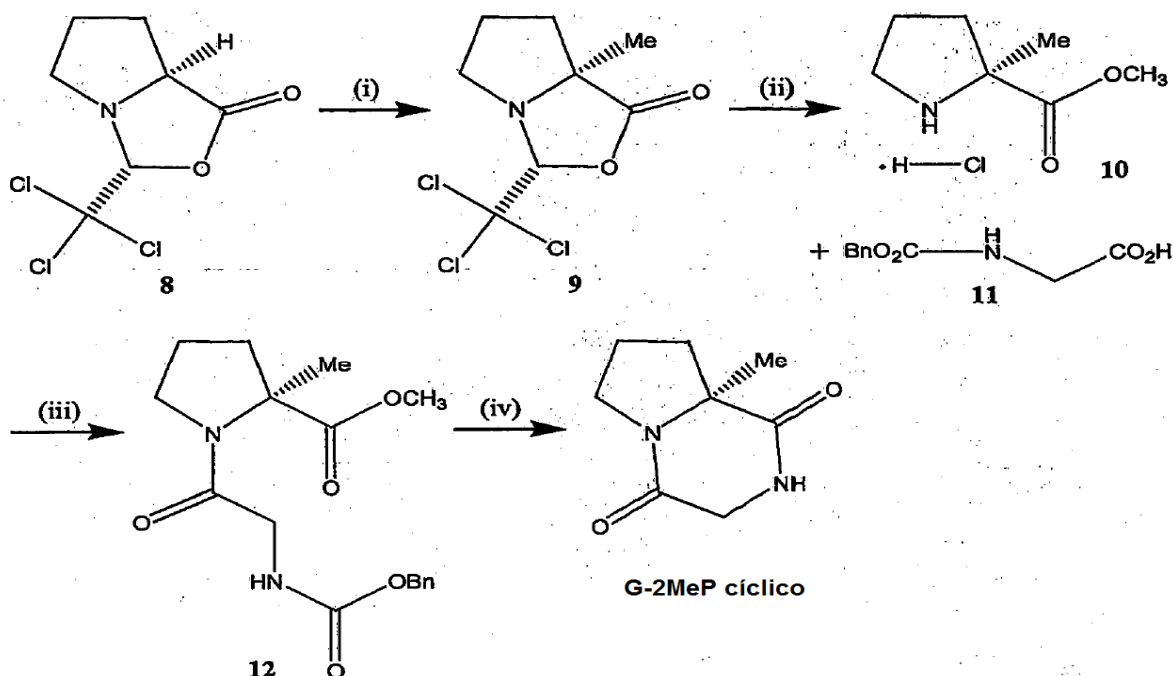
[0073] La síntesis de los compuestos de dicetopiperazina de la presente invención puede ser mediante síntesis en fase de solución tal como se describe en los ejemplos o mediante el método de síntesis en fase sólida ejemplificado por Merrifield et al. 1963 J. Amer. Chem. Soc. : 85, 2149-2156. La síntesis en fase sólida se puede realizar utilizando sintetizadores de péptidos comerciales, tales como el Applied Biosystems Modelo 430A, utilizando los protocolos establecidos para el instrumento.

[0074] Los ejemplos específicos de la síntesis de dicetopiperazina se pueden encontrar en los ejemplos siguientes y en, por ejemplo, Fischer, 2003, J. Peptide Science: 9: 9-35 y las referencias en el mismo. Una persona experta en la técnica no tendrá dificultad, teniendo en cuenta esa capacidad y el conocimiento disponible, y de esta descripción, en el desarrollo de uno o más métodos de síntesis adecuados para los compuestos de la presente invención.

[0075] La elección de grupos protectores apropiados para el método elegido (en fase sólida o en fase de solución), y de sustratos adecuados si se utiliza la síntesis en fase sólida, estará dentro de la habilidad de una persona experta en la técnica. Los grupos protectores adecuados para la síntesis de péptidos incluyen t-butiloxicarbonilo (Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), bencilo (Bzl), t-amiloxicarbonilo (Aoc), tosilo (Tos), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), o-bromo-benciloxicarbonilo (BrZ) y similares. Grupos protectores adicionales se identifican en Merrifield, citado anteriormente, así como en McOmie JFW: Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, 1973.

[0076] La elección del agente de acoplamiento para el método elegido estará también dentro de la habilidad de una persona experta en la técnica. Los agentes de acoplamiento adecuados incluyen DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio), PyBop (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio), BopCl (cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico), hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (CIP) y similares.

[0077] Por ejemplo, los compuestos se pueden sintetizar mediante los siguientes métodos.



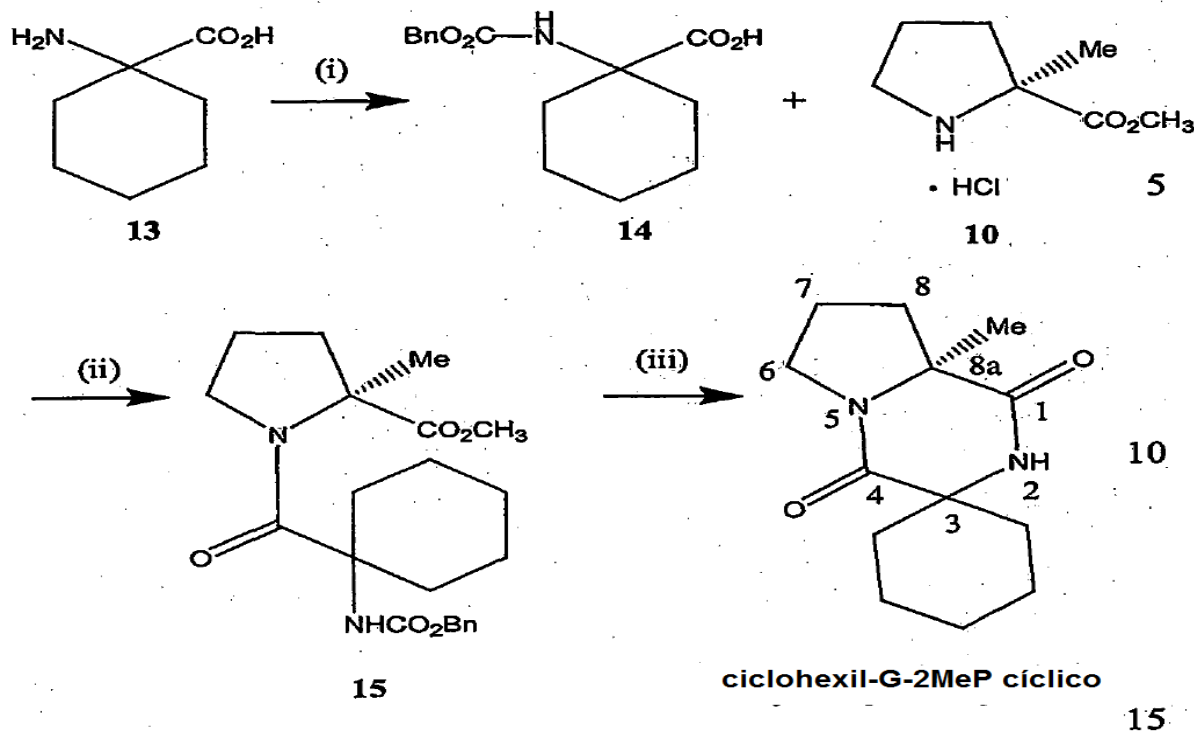
Esquema 1: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) LDA, THF, -78°C, yodometano, -78 → -50°C, 2 h (63%); (ii) SOCl₂, CH₃OH, reflujo, N₂, 2,5 h (98%); (iii) Et₃N, BOPCl, CH₂Cl₂, ta, 20,5 h (78%); (iv) 10% Pd/C, CH₃OH, ta, 15 h (98%).

La oxazolidinona 8 puede sintetizarse por reacción de cloral con prolina. Esta oxazolidinona puede entonces reducirse utilizando diisopropilamida de litio (LDA), seguido de la adición de un grupo metilo utilizando yodometano para producir oxazolidinona 9. El cloruro de acetilo o cloruro de tionilo pueden usarse para producir el éster metílico

de 2-metil prolina como en el Esquema 1 anterior. Será evidente para los expertos en la técnica que el yodometano se puede sustituir por un compuesto halógeno adecuado para producir varios análogos modificados en la posición de carbono 2. Por ejemplo, el uso de yodoetano producirá 2-etil prolina; el uso de bromuro de alilo producirá 2-alil prolina y el uso de bromuro de bencilo producirá 2-bencil prolina.

[0078] La prolina protegida en el extremo C-terminal puede acoplarse a continuación a un aminoácido protegido en el extremo N-terminal con un grupo protector adecuado, tal como Cbz, Boc o Fmoc. Los reactivos de acoplamiento adecuados para este procedimiento serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen reactivos, tales como cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCI), diciclohexilcarbodiimida (DCC), hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (CIP) (Babu y Ananda, 2001, J. Indian J. Chem. Sect. B.,: 40B (1): 70; Akaji y Aimoto 2001 Tetrahedron, 57 (9), 1749). El dipéptido así formado puede entonces desprotegerse selectivamente en el extremo N-terminal, usando por ejemplo, la hidrogenación para eliminar los grupos Cbz y ácido trifluoroacético (TFA) para eliminar los grupos Boc. La molécula a continuación se cicla con eliminación del grupo metoxi del éster metílico para dar al dicetopiperazina.

[0079] El aminoácido usado en el esquema 1 es la glicina que produce los compuestos de fórmula 1, en la que $R^4 = R^5 = H$. La sustitución de la glicina por otros aminoácidos dará lugar a compuestos de fórmula 1 en la que $R^4 = H$ y R^5 es equivalente a la cadena lateral del aminoácido respectivo.



Esquema 2: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) BnO_2CCl , Na_2CO_3 , H_2O -dioxano (3:1), 19 h, 96%; (ii) Et_3N , HOAt, CIP, 1,2-dicloroetano, reflujo, N_2 , 19 h (23%); (iii) 10% Pd/C, CH_3OH , ta, 17 h (65%).

[0080] El ácido 1-aminociclohexanocarboxílico 13 (Fluka) se puede proteger en el extremo N-terminal usando un grupo protector, tal como Cbz. Este compuesto puede entonces acoplarse a un derivado de prolina convenientemente protegido en el extremo C-terminal utilizando un agente de acoplamiento adecuado, tal como hexafluorofosfato 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (CIP) como en el Esquema 2. El dipéptido así formado puede a continuación desprotegerse selectivamente en el extremo N-terminal mediante hidrogenación, por ejemplo, y la eliminación resultante del grupo metoxi del éster metílico produce la dicetopiperazina. Será evidente para los expertos en la técnica que será posible la sustitución del ácido 1-aminociclohexanocarboxílico por compuestos análogos, tales como el ácido 1-aminociclopropanocarboxílico o ácido 1-aminociclopropanocarboxílico. También será evidente que el grupo metilo en la posición C-2 (centro de carbono 8a en el Esquema 2) de la prolina se puede sustituir por otros sustituyentes, tales como etilo, alilo y bencilo, como se discutió anteriormente.

EJEMPLOS

[0081] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen a modo de ilustración solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Métodos generales

[0082] La cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice Scharlau 60 (malla de 40-60 μm). La cromatografía de capa fina analítica se llevó a cabo sobre placas de gel de sílice recubiertas previamente de 0,20 mm (ALUGRAMX® SIL G/UV₂₅₄) y los compuestos se visualizaron usando fluorescencia UV, o calentando las placas sumergidas en permanganato potásico en solución alcalina.

[0083] Los puntos de fusión en grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$) se determinaron en un aparato de punto de fusión Electrothermal® y están sin corregir.

[0084] Las rotaciones ópticas se midieron a 20°C en un polarímetro Perkin Elmer 341 usando células de longitud de paso de 10 cm y se indican en unidades de $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$. Las muestras se prepararon en el disolvente indicado a la concentración especificada (medida en $\text{g}/100 \text{ cm}^3$). Los espectros IR se registraron en un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer Spectrum One. Las muestras se prepararon como películas delgadas sobre discos de cloruro de sodio o como sólidos en discos de bromuro de potasio. Una señal ancha se indica mediante br. Las frecuencias (ν) como máximos de absorción se indican en números de onda (cm^{-1}).

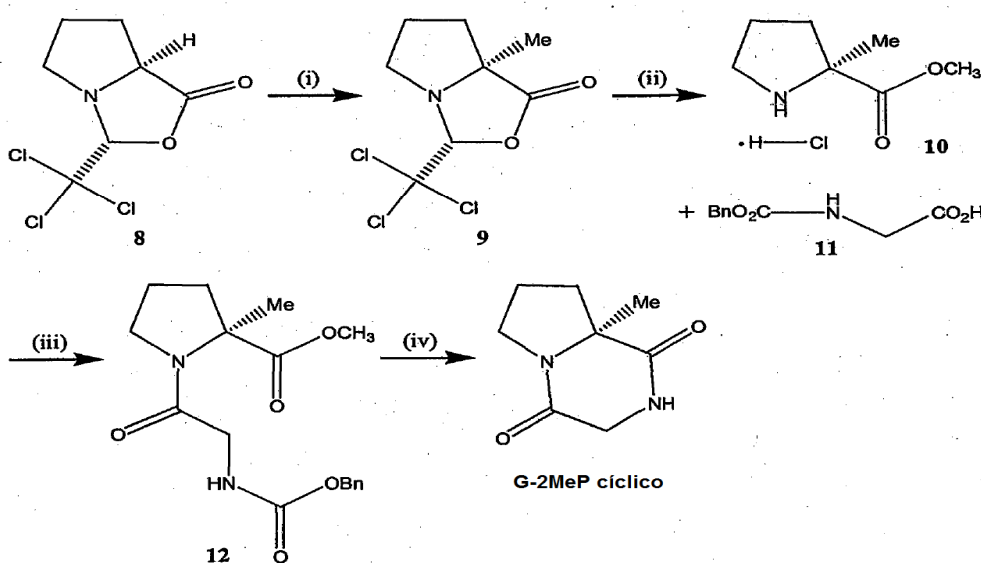
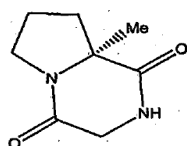
[0085] Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AVANCE DRX400 (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz) o un espectrómetro Bruker AVANCE 300 (^1H , 300 MHz; ^{13}C , 75 MHz) a temperatura ambiente. Para los datos en ^1H RMN los desplazamientos químicos se describen en partes por millón campo abajo de SiMe_4 y se presentan consecutivamente como posición (δ_{H}), integral relativa, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, dd = doblete de dobletes, m = multiplete, a = ancho), constante de acoplamiento (J/Hz) y asignación. Para los datos de ^{13}C RMN, los desplazamientos químicos se describen en partes por millón con relación a CDCl_3 y se presentan consecutivamente como posición (δ_{C}), grado de hibridación como se determina por experimentos DEPT, y asignación. Los espectros de ^1H RMN se referenciaron internamente usando SiMe_4 (δ 0,00) o CDCl_3 (δ 7,26). Los espectros de ^{13}C RMN se referenciaron internamente usando CDCl_3 (δ 77,0). Cuando aparecen dos conjuntos de picos en los espectros de RMN debido a las diferentes conformaciones alrededor del enlace amida de glicina-prolina, el desplazamiento químico para el conformero *cis* menor está marcado con un asterisco (*).

[0086] Las mediciones precisas de masa se registraron en un espectrómetro de masas VG-70SE.

[0087] El Hexano y diclorometano se destilaron antes de su uso. El metanol se secó usando virutas de magnesio y yodo, y se destiló bajo nitrógeno. La trietilamina se secó sobre hidruro de calcio y se destiló en atmósfera de nitrógeno.

Ejemplo 1: Síntesis de (8a*S*)-metil-hexahidropirroló [1,2-*a*] pirazina-1,4-diona (G-2MeP cíclico)

[0088]



Esquema 1: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) LDA, THF, -78°C, yodometano, -78 → -50°C, 2 h (63%); (ii) SOCl₂, CH₃OH, reflujo, N₂, 2,5 h (98%); (iii) Et₃N, BoPCI, CH₂Cl₂, ta, 20,5 h (78%); (iv) 10% Pd/C, CH₃OH, ta, 15 h (98%).

5 **(2R, 5S)-4-metil-2-triclorometil-1-aza-3-oxabicyclo[3.3.0]octan-4-ona 9**

10 **[0089]** Se añadió n-BuLi (1,31 M, 4,68 cm³, 6,14 mmol) gota a gota a una solución agitada de diisopropilamina (0,86 cm³, 6,14 mmol) en tetrahidrofurano seco (10 cm³) a -78°C bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó durante 5 min, se calentó hasta 0°C y se agitó durante 15 min. A continuación, la solución se añadió gota a gota a una solución de oxazolidinona 8 (1,00 g, 4,09 mmol) en tetrahidrofurano seco (20 cm³) a -78°C durante 20 min (se volvió a un color marrón oscuro), se agitó durante 30 min, a continuación se añadió yodometano (0,76 cm³, 12,3 mmol) gota a gota durante 5 min. La solución se calentó hasta -50°C durante 2 h. Se añadió agua (15 cm³) y la solución se calentó hasta temperatura ambiente y se extrajo con cloroformo (3 x 40 cm³). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron hasta la sequedad al vacío para dar un semisólido marrón oscuro. La purificación del residuo por cromatografía en columna flash (15% acetato de etilo-hexano) proporcionó oxazolidinona **9** (0,67 g, 63%) como un sólido de color amarillo pálido: punto de fusión 55-57°C (lit., 57-60°C); (300 MHz, CDCl₃) 1,53 (3H, s, CH₃), 1,72-2,02 (3H, m, Proβ-H y Proγ-H₂), 2,18-2,26 (1H, m, Proβ-H), 3,15-3,22 (1H, m, Proδ-H), 3,35-3,44 (1H, m, Proδ-H) y 4,99 (1H, s, NCH).

20 **Clorhidrato de L-2-metilprolinato de metilo 10**

a) Usando cloruro de acetilo

25 **[0090]** Se disolvió oxazolidinona 9 (0,60 g, 2,33 mmol) en metanol seco (15 cm³) bajo una atmósfera de nitrógeno y se añadió cloruro de acetilo (0,33 cm³, 4,66 mmol) gota a gota a la solución enfriada con hielo. La solución se calentó a reflujo durante 4,5 h, a continuación el disolvente se eliminó a presión reducida para dar un aceite marrón que se purificó por cromatografía en columna flash (10% CH₃OH-CH₂Cl₂) proporcionando el clorhidrato **10** (0,2 g, 48%) como un sólido blanco escamoso: punto de fusión 107-109°C (lit., 106-108°C); δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1,81 (3H, s, CH₃), 1,93-2,14 (3H, m, Proβ-H_AH_B y Proγ-H₂), 2,33-2,39 (1H, m, Proβ-H_AH_B), 3,52-3,56 (2H, m, Proδ-H₂) y 3,82 (3H, s, CO₂CH₃).

b) Usando cloruro de tionilo

35 **[0091]** Se trató una solución enfriada con hielo de oxazolidinona 9 (53 mg, 0,21 mmol) en metanol seco (1 cm³) gota a gota con cloruro de tionilo (0,045 cm³, 0,62 mmol). La solución se calentó a reflujo durante 2,5 h, se enfrió y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar un aceite marrón. El aceite se disolvió en tolueno (5 cm³), se concentró a sequedad para eliminar el cloruro de tionilo residual y a continuación el metanol se purificó mediante cromatografía en columna flash (10% CH₃OH-CH₂Cl₂) para proporcionar el clorhidrato **10** (16 mg, 43%) como un sólido blanco escamoso. Las asignaciones de ¹H RMN estaban de acuerdo con lo señalado anteriormente.

40 **Metil-N-benciloxicarbonil-glicil-L-2-metilprolinato 12**

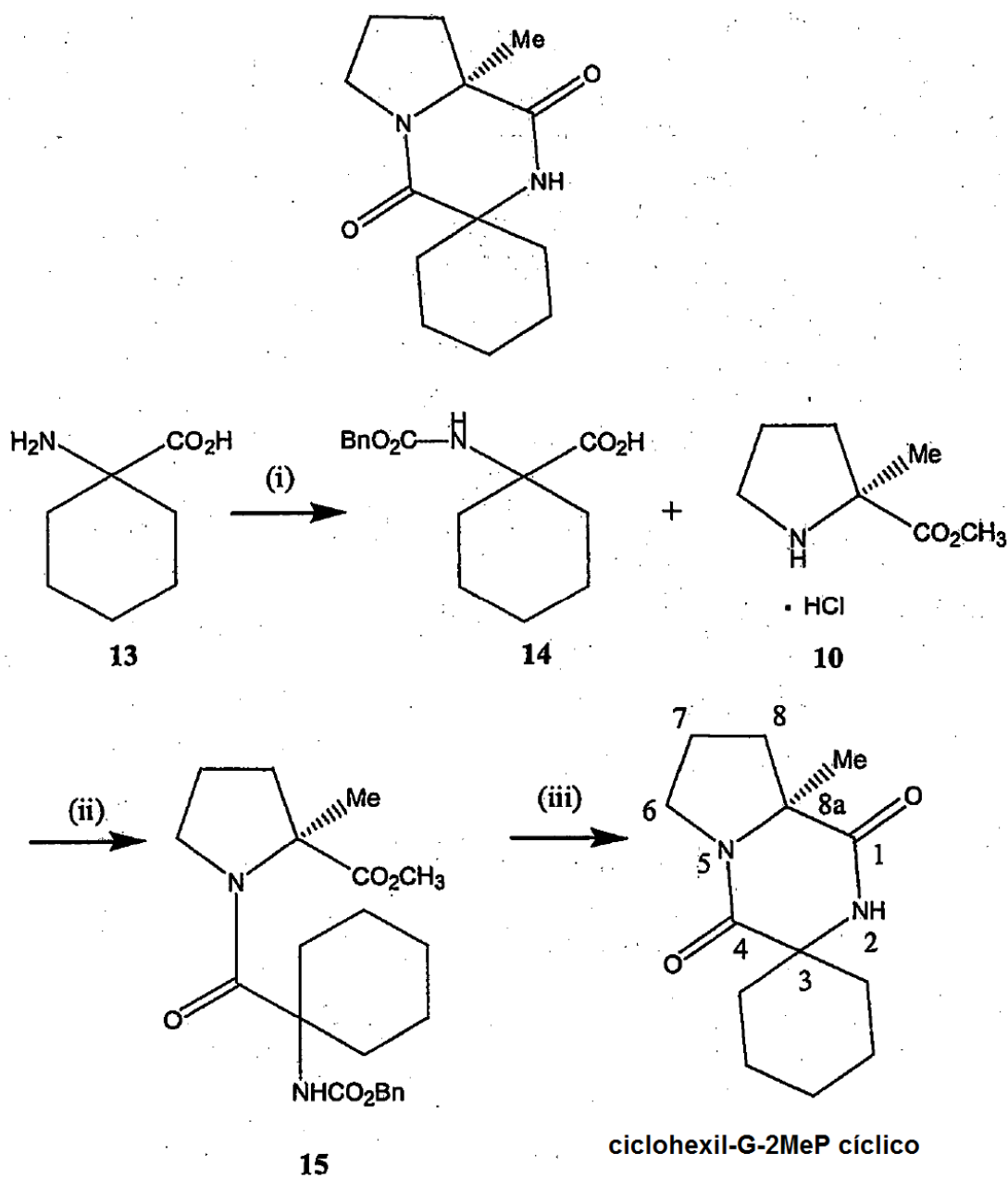
45 **[0092]** Se añadió trietilamina seca (0,27 cm³, 1,96 mmol) gota a gota a una solución de clorhidrato **10** (0,11 g, 0,61 mmol) y N-benciloxicarbonil-glicina **11** (98,5%) (0,17 g, 0,79 mmol) en diclorometano seco (35 cm³) bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl, 97%) (0,196 g, 0,77 mmol) y la solución incolora resultante se agitó durante 20,5 h. La solución se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (30 cm³) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (30 cm³), se secó (MgSO₄), se filtró y evaporó a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante mediante cromatografía en columna flash (50 a 80% de acetato de etilo-hexano; elución de gradiente) produjo el dipéptido **12** (0,18 g, 92%) como un aceite incoloro. Se observó que la amida **12** existía como una mezcla 98:2 *trans:cis* de conforméres mediante análisis con ¹³C (la proporción se estimó a partir de las intensidades relativas de las resonancias a δ 20,8 y 23,5 asignado a los átomos de Proγ-C de los conforméres menor y mayoritario, respectivamente): [α]_D-33,0 (c 1,0 en MeOH); ν_{máx} (película)/cm⁻¹ 3406, 2952, 1732, 1651, 1521, 1434, 1373, 1329, 1310, 1284, 1257, 1220, 1195, 1172, 1135, 1107, 1082, 1052, 1029, 986, 965, 907, 876, 829, 775, 738 y 699; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1,49 (3H, s, CH₃), 1,77-2,11 (4H, m, Proβ-H₂ y Proγ-H₂), 3,43-3,48 (2H, m, Proδ-H₂), 3,61 (3H, s, OCH₃), 3,85-3,89 (2H, m, Glyα-H₂), 5,04 (2H, s, PhCH₂), 5,76 (1H, s ancho, N-H) y 7,21-7,28 (5H, s, ArH); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 13,8* (CH₃, Proα-CH₃), 21,1 (CH₃, Proα-CH₃), 20,8* (CH₂, Proγ-C), 23,5 (CH₂, Proγ-C), 38,0 (CH₂, Proβ-C), 40,8* (CH₂, Proβ-C), 43,3 (CH₂, Glyα-C), 45,5* (CH₂, Glyα-C), 46,6 (CH₂, Proδ-C), 48,7* (CH₂, Proδ-C), 51,9* (CH₃, OCH₃), 52,1 (CH₃, OCH₃), 60,0* (quat., Proα-C), 66,0 (quat., Proα-C), 66,3 (CH₂, PhCH₂), 68,6* (CH₂, PhCH₂), 127,5 (CH, Ph), 127,6 (CH, Ph), 127,9* (CH, Ph), 128,1 (CH, Ph), 128,3* (CH, Ph), 136,2 (quat., Ph), 155,9 (quat., NCO₂), 166,0 (quat., Gly-CON.), 169,4* (quat., Gly-CON) y 173,6 (quat, CO₂CH₃); m/z (EI+) 334, 1535 (M⁺ C₁₇H₂₂N₂O₅ requiere 334, 1529).

65 **(8aS)-Metil-hexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (G-2MeP cíclico)**

[0093] A una solución del dipéptido **12** (0,167 g, 0,51 mmol) en metanol (8,0 cm³) se añadió 10% de Pd sobre carbón activado (8,1 mg, 0,076 mmol) y el recipiente se purgó con gas hidrógeno. La suspensión resultante se agitó vigorosamente bajo una atmósfera de hidrógeno durante 15 h. La mezcla se filtró a continuación a través de una almohadilla de Celite y a continuación un tapón pequeño de gel de sílice con metanol, y el disolvente se eliminó a presión reducida para producir **G-2MeP cíclico** (**83** mg, 98%) como un sólido amarillo: punto de fusión 133-135°C; [α]_D²⁰ -128,1 (c 0,52 en MeOR); (300 MHz, CDCl₃) 1,36 (3H, s, CH₃), 1,87-2,01 (3H, m, Proβ-H_AH_B y Proγ-H₂), 2,07-2,21 (1H, m, Proβ-H_AH_B), 3,45-3,64 (2H, m, Proδ-H₂), 3,82 (1H, dd, J 17,1 y 4,1, CH_AH_BNH), 3,99 (1H, d, J 17,1, CH_AH_BNH) y 7,66 (1H, br s, NH); δ_c (75 MHz, CDCl₃) 20,2 (CH₂, Proγ-C), 23,2 (CH₃, Proα-CH₃), 35,0 (CH₂, Proβ-C), 44,7 (CH₂, Proδ-C), 45,9 (CH₂, CH₂NH), 63,8 (quat, Proα-C), 163,3 (quat., NCO) y 173,3 (quat, CONH); m/z (EI+) 168,08986 (M⁺.C₈H₁₂N₂O₂ requiere 168,08988).

Ejemplo 2: Síntesis de (8aS)-metil-espiro[ciclohexano-1,3(4H)-tetrahidropirrol[1,2-a]pirazina]-1,4(2H)-diona (ciclohexil-G-2MeP cíclico)

[0094]



Esquema 2: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) BnO_2CCl , Na_2CO_3 , H_2O -dioxano (3:1), 19 h, 96%; (ii) Et_3N , HOAt, CIP, 1,2-dicloroetano, reflujo, N_2 , 19 h (23%); (iii) 10% Pd/C, CH_3OH , ta, 17 h (65%).

Ácido N-benciloxicarbonil-1-aminociclohexano-1-carboxílico (14)

5
10
15
[0095] A una suspensión de ácido 1-aminociclohexanocarboxílico 13 (0,72 g, 5,02 mmol) y carbonato de sodio (1,6 g, 15,1 mmol) disueltos en agua-dioxano (21 cm^3 , 3:1) se añadió cloroformiato de bencilo (0,79 cm^3 , 5,52 mmol) gota a gota y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 19,5 h. La capa acuosa se lavó con éter dietílico (60 cm^3), se acidificó con HCl 2 M y se extrajo con acetato de etilo (2 x 60 cm^3). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO_4), se filtró y se evaporó a presión reducida para producir un aceite incoloro, que solidificó en reposo a carbamato bruto **14** (1,23 g, 88%) como un sólido blanco: punto de fusión 152-154°C (lit., 148-150°C); δ_{H} (400 MHz, CDCl_3) 1,27-1,56 (3H, m, 3 x ciclohexil-H), 1,59-1,73 (3H, m, 3 x ciclohexil-H), 1,85-1,91 (2H, m, 2 x ciclopentil-H), 2,05-2,09 (2H, m, 2 x ciclopentil-H), 5,02 (1H, br s, N-H), 5,12 (2H, s, OCH_2Ph) y 7,27-7,36 (5H, s, Ph); δ_{C} (100 MHz, CDCl_3) 21,1 (CH_2 , 2 x ciclohexil-C), 25,1 (CH_2 , 2 x ciclohexil-C), 32,3 (CH_2 , ciclohexil-C), 59,0 (quat., 1-C), 67,1 (CH_2 , OCH_2Ph), 128,1 (CH, Ph), 128,2 (CH, Ph), 128,5 (CH, Ph), 136,1 (quat., Ph), 155,7 (quat., NCO_2) y 178,7 (quat., CO_2H).

Metil-N-benciloxicarbonil-ciclohexil-glicil-L-2-metilprolinato (15)

20
25
30
35
40
[0096] Se añadió trietilamina seca (0,21 cm^3 , 1,5 mmol) gota a gota a una solución de clorhidrato **10** (84,0 mg, 0,47 mmol), ácido carboxílico **14** (0,17 g, 0,61 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (16 mg, 0,12 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (26 cm^3) bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (0,13 g, 0,47 mmol) y la solución resultante se calentó a reflujo durante 21 h, a continuación se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (30 cm^3) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (30 cm^3), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante mediante cromatografía en columna flash (40 a 50% de acetato de etilo-hexano; elución de gradiente) produjo la amida **15** (16 mg, 9%) como un sólido blanco. Se observó que la amida **15** existía como una mezcla 11:1 *trans:cis* de conformeros mediante análisis con ^{13}C (la proporción se estimó a partir de las intensidades relativas de las resonancias a δ 41,3 y 48,2 asignado a los átomos de $\text{Pro}\delta\text{-C}$ de los conformeros menor y mayoritario, respectivamente): punto de fusión 219-222°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -44,9 (c 1,31 en CH_2Cl_2); ν_{max} (película)/ cm^{-1} 3239, 2927, 1736, 1707, 1617, 1530, 1450, 1403, 1371, 1281, 1241, 1208, 1194, 1165, 1150, 1132, 1089, 1071, 1028, 984, 912, 796, 749, 739 y 699; δ_{H} (400 MHz, CDCl_3) 1,24-2,10 (17H, m, $\text{Pro}\alpha\text{-CH}_3$, $\text{Pro}\beta\text{-H}_2$, $\text{Pro}\gamma\text{-H}_2$ y 5 x ciclohexil- H_2), 3,25-3,48 (1H, m, $\text{Pro}\delta\text{-H}_A\text{H}_B$), 3,61-3,87 (4H, m, OCH_3 y $\text{Pro}\delta\text{-H}_A\text{H}_B$), 4,92-5,19 (3H, m, N-H y OCH_2Ph) y 7,35-7,37 (5H, s, Ph); δ_{C} (100 MHz, CDCl_3) 21,26 (CH_2 , ciclohexil-C), 21,33 (CH_2 , ciclohexil-C), 21,7 (CH_3 , $\text{Pro}\alpha\text{-CH}_3$), 24,8 (CH_2 , ciclohexil-C), 25,0 (CH_2 , $\text{Pro}\gamma\text{-C}$), 29,4* (CH_2 , ciclohexil-C), 29,7* (CH_2 , ciclohexil-C), 31,1 (CH_2 , ciclohexil-C), 31,6 (CH_2 , ciclohexil-C), 31,9* (CH_2 , ciclohexil-C), 32,2* (CH_2 , ciclohexil-C), 32,8* (CH_2 , ciclohexil-C), 37,3 (CH_2 , $\text{Pro}\beta\text{-C}$), 41,4* (CH_2 , $\text{Pro}\delta\text{-C}$), 48,2 (CH_2 , $\text{Pro}\delta\text{-C}$), 52,1 (CH_3 , OCH_3), 59,1 (quat., $\text{Gly}\alpha\text{-C}$), 66,7 (CH_2 , OCH_2Ph), 67,3* (CH_2 , OCH_2Ph), 67,4 (quat., $\text{Pro}\alpha\text{-C}$), 128,0* (CH, Ph), 128,1* (CH, Ph), 128,3 (CH, Ph), 128,5 (CH, Ph), 128,7 (CH, Ph), 136,6 (quat., Ph), 153,7 (quat., NCO_2), 171,0 (quat., Gly-CO) y 174,8 (quat., CO_2CH_3); m/z (EI+) 402,2151 (M^+ . $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ requiere 402,2155).

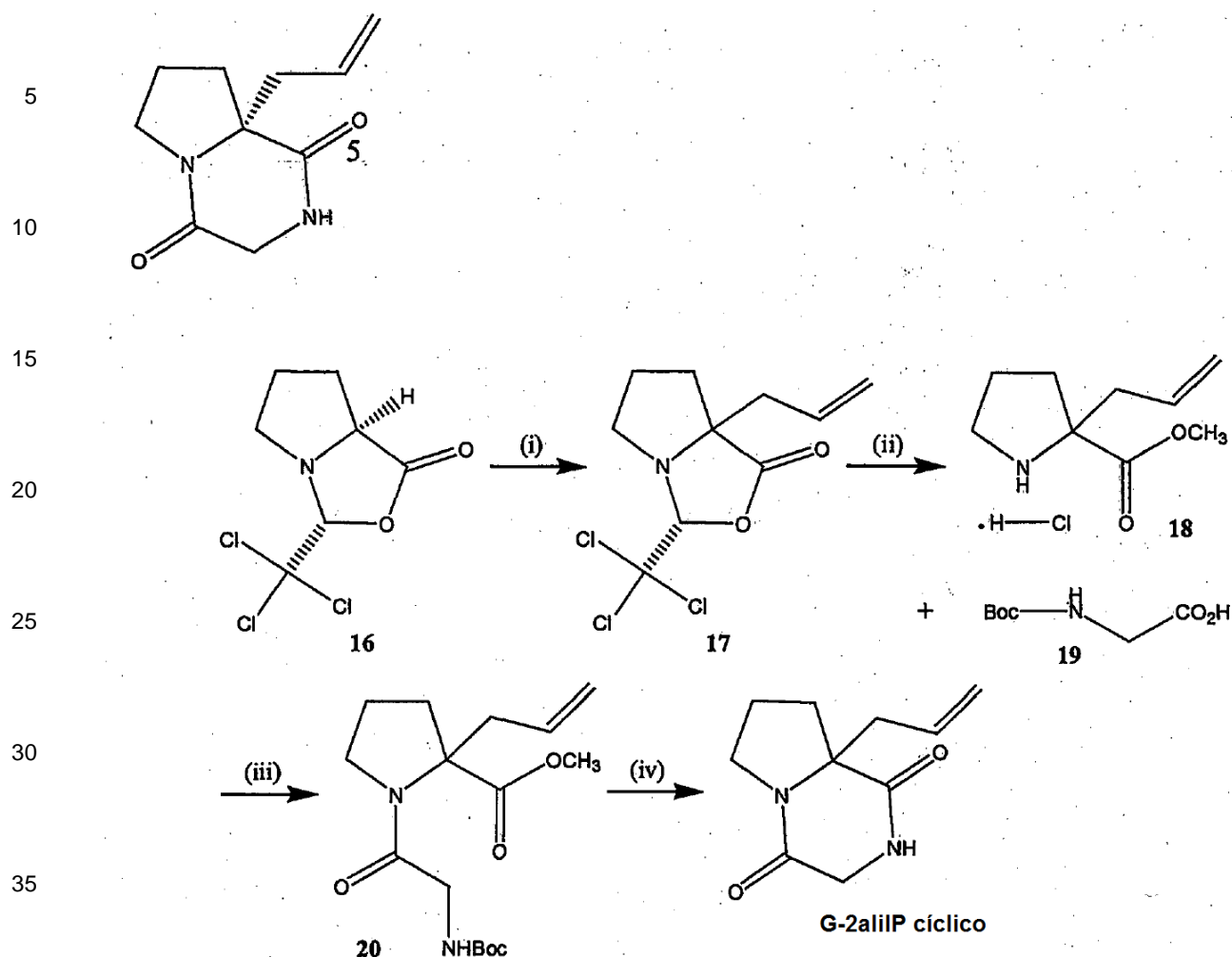
(8aS)-metil-espiro[ciclohexano-1,3(4H)-tetrahidropirrol[1,2-a]pirazina]-1,4 (2H)-diona (ciclohexil-G-2MeP cíclico)

45
50
55
[0097] A una solución de amida **15** (40 mg, 0,01 mmol) en metanol (3,3 cm^3) se añadió 10% de Pd sobre carbón activado (1,6 mg, 0,015 mmol) y el recipiente se purgó con gas hidrógeno. La suspensión resultante se agitó vigorosamente bajo una atmósfera de hidrógeno durante 61,5 h, a continuación se filtró a través de una almohadilla de Celite™ con metanol (15 cm^3) El filtrado se concentró a sequedad bajo presión reducida para producir un semisólido amarillo que se purificó mediante cromatografía en columna flash C18 de fase inversa (0-10% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$; gradiente elución) para producir **ciclohexil-G-2MeP cíclico** (19 mg, 81%) como un sólido blanco: punto de fusión 174-177°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -63,8 (c 1,13 en CH_2Cl_2); ν_{max} (película)/ cm^{-1} 3215, 2925, 2854, 1667, 1646, 1463, 1427, 1276, 1232, 1171, 1085, 1014, 900, 868, 818, 783, 726 y 715; (400 MHz, CDCl_3) 1,31-1,89 (12H, m, 9 x ciclohexil-H y 8a- CH_3), 1,94-2,15 (4H, m, 7- H_2 y 8- H_2), 2,26 (1H, td, J 13,7 y 4,5, 1 x ciclohexil-H), 3,44-3,51 (1H, m, 6- H_AH_B), 3,79-3,86 (1H, m, 6- H_AH_B) y 6,40 (1H, br s, NH); δ_{C} (100 MHz, CDCl_3) 19,5 (CH_2 , 7-C), 20,6 (CH_2 , ciclohexil-C), 20,8 (CH_2 , ciclohexil-C), 24,5 (CH_2 , ciclohexil-C), 25,0 (CH_3 , 8a- CH_3), 33,7 (CH_2 , ciclohexil-C), 36,3 (CH_2 , 8-C), 36,5 (CH_2 , ciclohexil-C), 44,7 (CH_2 , 6-C), 59,5 (quat., 8a-C), 64,0 (quat., 3-C), 168,1 (quat., 4-C) y 171,6 (quat., 1-C); m/z (EI+) 236,15246 (M^+ . $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ requiere 236,15248).

Ejemplo 3: Síntesis de (8aS)-alil-hexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (G2alilP cíclico)

60 [0098]

65



Esquema 3: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) LDA, THF, -78°C , bromuro de alilo, $-78 \rightarrow -30^{\circ}\text{C}$, N_2 , 4 h (60%); (ii) cloruro de acetilo, CH_3OH , reflujo, N_2 , 24 h (63%); (iii) Et_3N , BoPCI, CH_2Cl_2 , ta, N_2 , 19,5 h (45%); (iv) TFA, CH_2Cl_2 , 1 h, a continuación, Et_3N , CH_2Cl_2 , 23 h (37%).

(2R, 5S)-4-alil-2-triclorometil-1-aza-3-oxabicyclo[3.3.0]octan-4-ona 17

[0099] Se añadió n-BuLi (1,31 M, $9,93 \text{ cm}^3$, 13,0 mmol) gota a gota a una solución agitada de diisopropilamina ($1,82 \text{ cm}^3$, 13,0 mmol) en tetrahydrofurano seco (20 cm^3) a -78°C bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó durante 5 min, se calentó hasta 0°C , se agitó durante 15 min, a continuación se añadió gota a gota a una solución de pro-oxazolidinona 16 (2,12 g, 8,68 mmol) en tetrahydrofurano seco (40 cm^3) a -78°C durante 20 min y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min adicionales, a continuación se añadió bromuro de alilo ($2,25 \text{ cm}^3$, 26,0 mmol) gota a gota durante 5 min. La solución se calentó lentamente hasta -30°C durante 4 h, se inactivó con H_2O (30 cm^3) y la mezcla se calentó hasta temperatura ambiente y se extrajo con cloroformo ($3 \times 80 \text{ cm}^3$). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO_4), se filtraron y se evaporaron a sequedad al vacío para producir un semisólido de color marrón oscuro que se purificó mediante cromatografía en columna flash (10 a 20% de acetato de etilo-hexano; gradiente de elución) para producir oxazolidinona 17 (1,48 g, 60%) como un aceite naranja que solidificó a 0°C , para el que los datos de RMN estaban de acuerdo con los indicados en la literatura: δ_{H} , (400 MHz, CDCl_3) 1,58-1,92 (2H, m, $\text{Pro}\gamma\text{-H}_2$), 1,96-2,14 (2H, m, $\text{Pro}\beta\text{-H}_2$), 2,50-2,63 (2H, m, $\text{Pro}\delta\text{-H}_2$), 3,12-3,23 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 4,97 (1H, s, NCH), 5,13-5,18 (2H, m, CH=CH_2) y 5,85-5,92 (1H, m, CH=CH_2); δ_{C} (100 MHz, CDCl_3) 25,1 (CH_2 , $\text{Pro}\gamma\text{-C}$), 35,1 (CH_2 , $\text{Pro}\beta\text{-C}$), 41,5 (CH_2 , $\text{Pro}\delta\text{-C}$), 58,3 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH=CH}_2$), 71,2 (quat., $\text{Pro}\alpha\text{-C}$), 100,4 (quat., CCl_3), 102,3 (CH, NCH), 119,8 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH=CH}_2$), 131,9 (CH, $\text{CH}_2\text{CH=CH}_2$) y 176,1 (quat., C=O); m/z (CI+) 284,0009 [(M+H)⁺. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}^{35}\text{Cl}_3\text{NO}_2$ requiere 284,0012], 285,9980 [(M+H)⁺. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{ClNO}_2$ requiere 285,9982], 287,9951 [(M+H)⁺. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}_2\text{NO}_2$ requiere 287,9953] y 289,9932 [(M+H)⁺. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}^{37}\text{Cl}_3\text{NO}_2$ requiere 289,9923].

Clorhidrato de L-2-alilprolinato de metilo 18

[0100] Se trató una solución enfriada con hielo de oxazolidinona **17** (0,64 g, 2,24 mmol) en metanol seco (15 cm³), gota a gota con una solución de cloruro de acetilo (0,36 cm³, 5,0 mmol) en metanol (5 cm³). La solución se calentó a reflujo durante 24 h, a continuación se enfrió y el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite marrón resultante se disolvió en tolueno (40 cm³) y se concentró a sequedad para eliminar el cloruro de tionilo y metanol residual, a continuación se purificó mediante cromatografía flash en columna (5-10% CH₃OH-CH₂Cl₂; elución en gradiente) para dar el clorhidrato **18** (0,29 g, 63%) como un sólido verde para el cual los datos de RMN estaban de acuerdo con lo indicado en la literatura: δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 1,72-2,25 (3H, m, Pro β -H_AH_B y Pro γ -H₂), 2,32-2,52 (1H, m, Pro β -H_AH_B), 2,72-3,10 (2H, m, Pro δ -H₂), 3,31-3,78 (2H, m, CH₂CH=CH₂), 3,84 (3H, s, CO₂CH₃), 5,20-5,33 (2H, m, CH=CH₂), 5,75-5,98 (1H, m, CH=CH₂) y 8,06 (1H, br s, N-H); m/z (Cl⁺) 170,1183 [(M+H)⁺]. C₉H₁₆NO₂ requiere 170,1181].

Metil-N-terc-butiloxicarbonil-glicil-L-2-alilprolinato 20

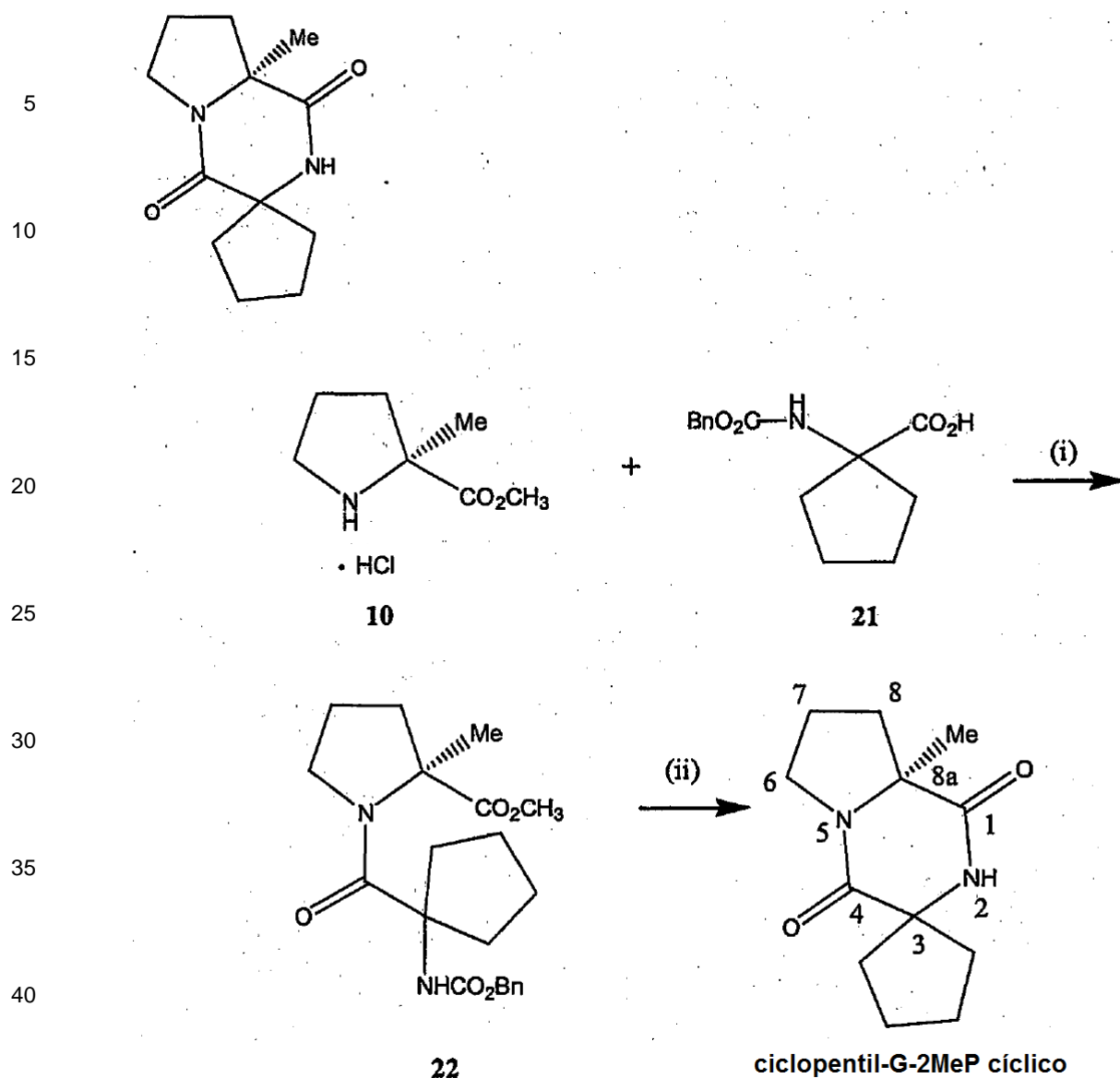
[0101] Se añadió trietilamina seca (0,28 cm³, 2,02 mmol) gota a gota a una solución de clorhidrato **18** (0,13 g, 0,63 mmol) y N-terc-butiloxicarbonil-glicina **19** (0,14 g, 0,82 mmol) en diclorometano seco (35 cm³) bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BoPCI, 97%) (0,20 g, 0,80 mmol) y la solución se agitó durante 19,5 h, a continuación se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (35 cm³) y solución acuosa saturada de hidrógenocarbonato de sodio (35 cm³), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a sequedad a vacío. La purificación del residuo resultante por cromatografía en columna flash (40% acetato de etilo-hexano) produjo el dipéptido **20** (0,09 g, 45%) como un aceite amarillo claro: $[\alpha]_{\text{D}}$ +33,8 (c 0,83 en CH₂Cl₂); ν_{max} (película)/cm⁻¹ 3419, 3075, 2977, 2930, 2874, 1739, 1715, 1656, 1499, 1434, 1392, 1366, 1332, 1268, 1248, 1212, 1168, 1122, 1051, 1026, 1003, 943, 919, 867, 830, 779, 739, 699 y 679; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 1,42 [9H, s, C(CH₃)₃], 1,93-2,08 (4H, m, Pro β -H₂ y Pro γ -H₂), 2,59-2,67 (1H, m, CH_AH_BCH=CH₂), 3,09-3,16 (1H, m, CH_AH_BCH=CH₂), 3,35-3,44 (1H, m, Pro δ -H_AH_B), 3,56-3,62 (1H, m, Pro δ -H_AH_B), 3,70 (3H, s, OCH₃), 3,89 (2H, d, J 4,2, Gly α -H₂), 5,06-5,11 (2H, m, CH=CH₂), 5,42 (1H, br s, Gly-NH) y 5,58-5,72 (1H, m, CH=CH₂); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 23,7 (CH₂, Pro γ -C), 28,3 [CH₃, C(CH₃)₃], 35,0 (CH₂, Pro β -C), 37,6 (CH₂, CH₂CH=CH₂), 43,3 (CH₂, Gly α -C), 47,5 (CH₂, Pro δ -C), 52,5 (CH₃, OCH₃), 68,8 (quat., Pro α -C), 79,5 [quat., C(CH₃)₃], 119,4 (CH₂, CH=CH₂), 132,9 (CH, CH=CH₂), 155,7 (quat., NCO₂), 166,9 (quat., Gly-CON) y 173,8 (quat., CO₂CH₃); m/z (EI⁺) 326,1845 (M⁺). C₁₆H₂₆N₂O₅ requiere 326,1842).

(8aS)-alil-hexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (G-2AlilP cíclico)

[0102] A una solución del dipéptido **20** (0,09 g, 0,28 mmol) en diclorometano (9 cm³) a temperatura ambiente se añadió ácido trifluoroacético (1 cm³, 0,013 mmol) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución se evaporó a presión reducida para dar un aceite incoloro que se disolvió en diclorometano (10 cm³), se añadió trietilamina seca (0,096 cm³, 0,69 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 4,5 h, después de lo cual se añadió más trietilamina (0,096 cm³, 0,69 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche, se concentró a sequedad para dar un aceite verde que se purificó por cromatografía en columna flash (10% CH₃OH-CH₂Cl₂) para producir **G-2AlilP cíclico** (20 mg, 37%) en forma de un sólido blanco: punto de fusión 106-109°C; $[\alpha]_{\text{D}}$ -102,7 (c 0,95 en CH₂Cl₂); ν_{max} (CH₂Cl₂)/cm⁻¹ 3456, 3226, 2920, 1666, 1454, 1325, 1306, 1299, 1210, 1133, 1109, 1028, 1010, 949, 928, 882, 793, 761 y 733; δ_{H} (400 MHz, CDCl₃) 1,92-2,01 (2H, m, Pro γ -H₂), 2,09-2,16 (2H, m, Prop-H₃), 2,39-2,56 (2H, m, CH₂CH₂=CH₂), 3,46-3,53 (1H, m, Pro δ -H_AH_B), 3,78-3,87 (2H, m, Pro δ -H_AH_B y Gly α -H_AH_B), 4,09 (1H, d, J 17,2, Gly α -H_AH_B), 5,16-5,20 (2H, m, CH=CH₂), 5,73-5,84 (1H, m, CH=CH₂) y 7,17 (1H, br s, NH); δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) 20,1 (CH₂, Pro γ -C), 34,1 (CH₂, Pro β -C), 41,7 (CH₂, CH₂CH₂=CH₂), 44,9 (CH₂, Pro δ -C), 46,4 (CH₂, Gly α -C), 67,2 (quat, Pro α -C), 120,9 (CH₂, CH=CH₂), 131,0 (CH, CH=CH₂), 163,4 (quat., NCO) y 171,7 (quat., CONH); m/z (EI⁺) 195,1132 (M⁺). C₁₀H₁₅N₂O₂ requiere 195,1134).

Ejemplo 4: Síntesis de (8aS)-metil-espiro[ciclopentano-1,3(4H)-tetrahidropirrol[1,2-a]pirazina]-1,4 (2H)-diona (ciclopentil-G-2MeP cíclico)

[0103]



Esquema 4: Reactivos, condiciones y rendimientos: (i) Et₃N, HOAt, CIP, 1,2-dicloroetano, 83°C, N₂, 19 h (23%); (ii) 10% Pd/C, CH₃OH, ta, 17 h (65%).

50 *Ácido N-benciloxycarbonil-1-aminociclopentano-1-carboxílico 21*

[0104] Se añadió una solución de clorofornato de bencilo (0,290 g, 1,1 mmol) en dioxano (2,5 cm³) gota a gota a una solución de ácido 1-aminociclopentanocarboxílico (Fluka) (0,2 g, 1,54 mmol) y carbonato de sodio (0,490 g, 4,64 mmol) en agua (5 cm³) a 0°C. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche y la mezcla de reacción se lavó con éter. La capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico 2 M, se extrajo con acetato de etilo, se secó (Na₂SO₄), se filtró y el disolvente se extrajo para producir el carbamato **21** (0,253 g, 62%) como un aceite que solidificó en reposo. Se observó que el carbamato **21** era una mezcla 70:30 de conformémeros mediante análisis con ¹H RMN (la proporción se estimó a partir de la integración de las resonancias a δ 5,31 y 7,29-7,40, asignadas a los protones de N-H de los conformémeros mayoritario y minoritario, respectivamente): punto de fusión 70-80°C (lit. ¹ 82-86°C, acetato de etilo, éter de petróleo); δ_H (400 MHz; CDCl₃; Me4Si) 1,83 (4H, br s, 2 x ciclopentil-H₂), 2,04 (2H, br s, ciclopentil-H₂), 2,20-2,40 (2H, m, ciclopentil-H₂), 5,13 (2H, br s, OCH₂Ph), 5,31 (0,7H, br s, N-H) y 7,29-7,40 (5,3 H, m, Ph y N-H*); δ_C (100 MHz; CDCl₃) 24,6 (CH₂, ciclopentil-C), 37,5 (CH₂, ciclopentil-C), 66,0 (quat., ciclopentil-C), 66,8 (CH₂, OCH₂Ph), 128,0 (CH, Ph), 128,1 (CH, Ph), 128,4 (CH, Ph), 136,1 (quat, Ph), 155,8 (quat., NCO₂) y 179,5 (quat., CO₂H).

65 *N-benciloxycarbonil ciclopentil-glicil-L-2-metilprolinato de metilo 22*

5 [0105] Se añadió trietilamina seca (0,19 cm³, 1,4 mmol) gota a gota a una solución de clorhidrato **10** (78 mg, 0,43 mmol), ácido carboxílico **21** (0,15 g, 0,56 mmol) y 1- hidroxí-7-azabenzotriazol (Acros) (15 mg, 0,11 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (24 cm³) bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se añadió hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio (CIP) (Aldrich) (0,12 g, 0,43 mmol) y la solución resultante se calentó a reflujo durante 19 h, a continuación se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 10% (30 cm³) y una solución acuosa saturada de hidrógenocarbonato de sodio (30 cm³), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a sequedad al vacío. La purificación del residuo resultante mediante cromatografía en columna flash (60% acetato de etilo-hexano) proporcionó la amida **22** (39 mg, 23%) como un sólido blanco. Se observó que la amida **22** existía como una mezcla 3:1 *trans:cis* de conformeros de carbamato mediante análisis ¹³C RMN (la proporción se estimó a partir de las intensidades relativas de las resonancias a δ 154,1 y 155,7 asignadas a los átomos C de carbonilo de carbamato de los conformeros mayoritario y minoritario, respectivamente): punto de fusión 200-203°C; [α]_D -54,5 (c 1,52 en CH₂Cl₂); ν_{max} (película)/cm⁻¹ 3432, 3239, 3042, 2953, 1736, 1712, 1627, 1540, 1455, 1417, 1439, 1374, 1282, 1256, 1216, 1194, 1171, 1156, 1136, 1100, 1081, 1042, 1020, 107, 953 15 917, 876 756 y 701; δ_H (400 MHz, CDCl₃) 1,33-1,53 (3H, m, Proα-CH₃), 1,62-2,20 (11H, m, Proβ-H₂, Proγ-H₂ y 7 x ciclopentil-H), 2,59-2,71 (1H, br m, 1 x ciclopentil-H), 3,31-3,42 (1H, br m, Proδ-H_AH_B), 3,58-3,79 (4H, br m, OCH₃ y Proδ-H_AH_B), 4,92-5,17 (3H, m, N-H y OCH₂Ph) y 7,27-7,42 (5H, s, Ph); δ_C (100 MHz, CDCl₃) 21,7 (CH₃, Proα-CH₃), 24,1* (CH₂, ciclopentil-C), 24,2 (CH₂, ciclopentil-C), 24,4 (CH₂, Proγ-C), 24,5 (CH₂, ciclopentil-C), 36,4 (CH₂, ciclopentil-C), 37,1 (CH₂, ciclopentil-C), 37,2* (CH₂, ciclopentil-C), 37,7 (CH₂, Proβ-C), 38,2* (CH₂, ciclopentil-C), 48,5 20 (CH₂, Proδ-C), 52,1 (CH₃, OCH₃), 66,6 (CH₂, OCH₂Ph), 66,9 (quat., Proα-C), 67,2 (quat., Glyα-C), 127,8 (CH, Ph), 128,2 (CH, Ph), 128,4 (CH, Ph), 136,6 (quat., Ph), 154,1 (quat., NCO₂), 155,7* (quat., NCO₂), 170,5 (quat., Gly-CO) y 174,7 (quat., CO₂CH₃); m/z (EI+) 388,1991 (M⁺. C₂₁H₂₈N₂O₅ requiere 388,1998).
* indica la resonancia asignada al conformero menor

25 (8a*S*)-metil-espiro[ciclopentano-1,3(4*H*)-tetrahidropirrol[1,2-*a*]pirazina]-1,4(2*H*)-diona (**ciclopentil-G-2MeP cíclico**)

[0106] A una solución de la amida **22** (54 mg, 0,14 mmol) en metanol (4,6 cm³) se añadió 10% de Pd sobre carbón activado (2,2 mg, 0,021 mmol) y el recipiente purgó con gas hidrógeno. La suspensión resultante se agitó vigorosamente en una atmósfera de hidrógeno durante 17 h, a continuación se filtró a través de una almohadilla de CeliteTM con metanol (15 cm³). El filtrado se concentró a sequedad a presión reducida para dar un semisólido amarillo que se purificó por cromatografía en columna flash C18 de fase inversa (0-10% CH₃CN/H₂O; elución en gradiente) para proporcionar **ciclopentil G-2MeP cíclico** (20 mg, 65%) como un sólido de color amarillo: punto de fusión 160-163°C; [α]_D -97,9 (c 1,61 en CH₂Cl₂); ν_{max} (película)/cm⁻¹ 3429, 2956, 2928, 2856, 1667, 1643, 1463, 1432, 1373, 1339, 1254, 1224, 1175, 1086, 1048, 976, 835, 774 y 730; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1,47 (3H, s br, 8a-CH₃), 1,56-2,19 (11H, m, 8-H₂, 7-H₂ y 7 x ciclopentilo), 2,58-2,67 (1H, br m, 1 x ciclopentilo), 3,48-3,56 (1H, m, 6-H_AH_B), 3,72-3,82 (1H, m, 6-H_AH_B) y 6,56 (1H, br s, N-H); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 19,9 (CH₂,7-C), 24,6 (CH₂, ciclopentilo), 24,92 (CH₃, 8a-CH₃), 24,93 (CH₂, ciclopentilo), 36,0 (CH₂, 8-C), 38,7 (CH₂, ciclopentilo), 41,9 (CH₂, ciclopentilo), 44,8 (CH₂,6-C), 64,3 (quat., 8a-C), 66,8 (quat., 3-C), 168,3 (quat., 4-C) y 172,2 (quat., 1-C); m/z (EI+) 222,1369 (M⁺. C₁₂H₁₈N₂O₂ requiere 222,1368).

Prueba *in vitro* e *in vivo*

[0107] Los siguientes estudios farmacológicos demuestran características neuroprotectores de los compuestos de la presente invención. Todos los siguientes experimentos se llevaron a cabo utilizando protocolos desarrollados bajo las directrices aprobadas por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland.

Ejemplo 5: Efectos de la G-2AlilP cíclico y ciclopentil-G-2MeP cíclico en explantes de células del cerebelo

[0108] Para determinar los efectos de cG-2AlilP y ciclopentil-G-2MeP cíclico sobre células neuronales *in vitro*, se llevaron a cabo una serie de estudios utilizando explantes de cerebelo de ratas adultas. Los sistemas *in vitro* son adecuados para el estudio de la proliferación neuronal, el crecimiento de neuritas, la formación de haces de nervios y los efectos de las toxinas en las células neuronales, los efectos de los efectos paralelos observados *in vivo*. Por lo tanto, los resultados de los estudios que utilizaron explantes de cerebelo *in vitro* son predictivos de los efectos de las intervenciones *in vivo*.

[0109] En una primera serie de estudios, se determinaron los efectos de glutamato en explantes cerebelares. A concentraciones fisiológicas, el glutamato es un neurotransmisor en el SNC de los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Sin embargo, a concentraciones suficientemente altas, el glutamato es neurotóxico, lo que da lugar a la muerte celular neuronal. Dado que el glutamato es un neurotransmisor natural en el SNC de los mamíferos, incluidos los seres humanos, y dado que la neurotoxicidad del glutamato se reconoce en la técnica como un reflejo de la neurotoxicidad en general, y que incluye la muerte y degeneración celular, es una valiosa herramienta útil para la identificación y caracterización de agentes eficaces en el tratamiento de la neurodegeneración y la muerte celular neural.

65 Materiales y Métodos

[0110] Se colocaron portabojetos en una gran placa de Petri y se lavaron en alcohol al 70% durante 5 minutos, a continuación se lavó con H₂O Millipore. Los portaobjetos se secaron al aire y se recubrieron con poli-D-lisina (solución madre 1 mg/ml en PBS, 90-100 µl) durante 2 horas a 34°C.

5

Extracción de tejido cerebeloso

[0111] Se utilizaron 8 ratas Wistar el día después del nacimiento para el estudio. Las ratas se sacrificaron y se colocaron en hielo durante 1 minuto, se decapitaron y se extrajo el cerebelo y se colocó en hielo. El tejido del cerebelo se colocó en 1 ml de glucosa al 0,65% complementada con PBS (10 µl de solución madre de D(+)glucosa al 65%/1 ml PBS) en una placa de Petri grande, se cortó en secciones más pequeñas y se trituró con una jeringa de 1 ml de insulina a través de una aguja 23 G (0,4 mm), y a continuación se roció de nuevo en la solución de glucosa en la placa de Petri grande. El tejido se tamizó (gasa con un tamaño de poro de 125 µm) y se centrifugó (2 minutos a 60 g) dos veces para intercambiar el medio en medio START V complementado con BSA libre de suero (Biochrom, Alemania). La segunda etapa de centrifugación se realizó con 1 ml de medio START V. Los microexplantes se reconstituyeron en 500 µl del medio START V y se colocaron en hielo.

10

15

Cultivo de células del cerebelo

[0112] Dos horas después del recubrimiento con PDL, los portaobjetos se lavaron con H₂O Millipore y se secaron al aire. Cada portaobjetos se colocó en una pequeña placa de Petri (diámetro: 35 mm) y se añadieron 40 µl de una suspensión de START V/célula. El tejido se incubó durante 2 horas a 34°C (período de reposo). A continuación, se añadió medio START V (1 ml) a la placa de Petri y se cultivó a 34°C en presencia de CO₂ al 5% en aire al 100% de humedad durante 48 horas.

20

25

Aplicación de fármacos

[0113] Para el estudio, se expusieron ciertos cultivos de explantes al vehículo (PBS) solo. En el primer estudio (estudio 1) se aplicaron simultáneamente 10 µl de la toxina 1 (L-glutamato 100 mM en agua Millipore; concentración final: 1 mM) y 10 µl de la toxina 2 (ácido 3-nitropropiónico 50 mM a pH 7 en agua Millipore, concentración final: 0,5 mM) con el fármaco a ensayar (solución madre 10 mM preparada en PBS y diluida hasta concentraciones finales entre 1 y 100 nM). En cada caso, los fármacos se dejaron en contacto con los explantes durante la duración del estudio.

30

35

Métodos para determinar los efectos de los fármacos

[0114] Después de exponer los explantes a los fármacos durante el período de estudio, las células se aclararon en PBS y después se fijaron en concentraciones crecientes de paraformaldehído (se aplicaron 500 µl de PFA al 0,4%, a continuación, PFA al 1,2%; a continuación PFA al 3% y finalmente PFA al 4% (cada etapa de fijación: 2-3 minutos). Finalmente, los microexplantes se enjuagaron en PBS.

40

[0115] Las neuronas en los explantes se evaluaron a continuación en su morfología (presencia de neuritas) y se contaron como células vivas por campo microscópico. Se contaron cuatro campos que mostraban la densidad más alta por portaobjetos y los datos se presentaron como la media ± error estándar de la media (SEM); n = 4 cada uno. La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student no apareado.

45

Resultados

G-2-AlilP cíclico

[0116] Los resultados del estudio se muestran en la figura 1. El tratamiento con glutamato (1 mM; barra sólida) dio lugar a aproximadamente una pérdida del 85% de las neuronas cerebelares que tenían neuritas en comparación con los controles tratados con vehículo (barra no sólida). Por el contrario, cG-2AlilP aumentó significativamente el número de células que tenían neuritas de una manera dependiente de la dosis cuando se administró simultáneamente con glutamato (barras sombreadas). El tratamiento con dosis bajas de cG-2AlilP (100 pm a 10 nm) mostró una disminución significativa en la neurotoxicidad inducida por glutamato.

50

55

Ciclopentil-G-2MeP cíclico

[0117] Los resultados del estudio se muestran en la figura. 2. El ciclopentil-G-2MeP cíclico aumentó significativamente el número de células que tenían neuritas cuando se administró simultáneamente con glutamato (barras sombreadas claras). El tratamiento con dosis bajas de ciclopentil-G-2MeP cíclico mostró una disminución significativa en la neurotoxicidad inducida por glutamato.

60

65

Conclusiones

[0118] Tanto cG-2AlilP como el ciclopentil-G-2MeP cíclico disminuyeron o previnieron de forma independiente la neurotoxicidad inducida por glutamato, lo que indica que ambos fármacos son neuroprotectores y se pueden utilizar para inhibir la degeneración o muerte celular neuronal

5

Ejemplo 6: Efectos de cG-2AlilP sobre la lesión hipóxico-isquémica I

Materiales y métodos

[0119] Para determinar si cG-2AlilP podría prevenir la lesión neuronal en respuesta a un accidente cerebrovascular, cirugía de injerto de bypass en arteria cardíaca (CABG) u otras lesiones hipóxicas, se llevaron a cabo una serie de estudios en ratas que habían sido expuestas a una lesión hipóxico-isquémica (HI). Se usaron ratas adultas (Wistar, 280-310g, macho). Se utilizaron procedimientos de preparación y experimentales del modelo Levine modificado (Rice et al, 1981, Ann. Neurol. 9: 131-141; Guan et al J., 1993, Cereb. Blood Flow Metab. 13 (4): 609-16). Estos procedimientos, brevemente, consisten en una lesión HI inducida por la ligadura unilateral de la arteria carótida seguida por asfixia por inhalación en los animales con una cánula ventricular lateral implantada. Se colocó una cánula guía estereotáxicamente en la parte superior de la duramadre 1,5 mm a la derecha de la línea media y 7,5 mm anterior al plano interaural cero bajo anestesia con halotano. La arteria carótida derecha se ligó doble dos días después de la canulación. Después de 1 hora de recuperación de la anestesia, cada una de las ratas se colocó en una incubadora donde la humedad ($90 \pm 5\%$) y temperatura ($31 \pm 0,5^\circ\text{C}$) se controlaron durante otra hora, a continuación se expusieron a hipoxia (6% de oxígeno) durante 10 min. Los animales se mantuvieron en la incubadora durante 2 horas más antes del tratamiento.

[0120] Se trataron nueve pares de ratas ventricularmente intracerebral (icv) con cG-2AlilP (2 ng) o su vehículo (solución salina normal) 2 horas después de la lesión hipóxico-isquémica. Las ratas de cada grupo fueron perfundidas simultáneamente con cG-2AlilP o su vehículo bajo anestesia ligera (halotano al 1,5%) 2 horas después de la lesión. Se perfundió un volumen total de 20 μl (icv) durante 20 minutos mediante una bomba de microperfusión.

[0121] El examen histológico se realizó en ratas 5 días después de la lesión hipóxico-isquémica. Las ratas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron transcardialmente con solución salina normal seguida de formalina al 10%. Los cerebros se mantuvieron en el mismo fijador durante un mínimo de 2 días antes de ser procesados mediante un procedimiento de baño en parafina estándar.

[0122] Se cortaron secciones coronales de 8 μm de grosor de cuerpo estriado, corteza cerebral e hipocampo y se tiñeron con tionina y fucsina ácida. El resultado histológico se evaluó en tres niveles: (1) nivel medio de cuerpo estriado, (2) cuando el hipocampo completado apareció primero y (3) el nivel donde acaba de aparecer el asta ventral del hipocampo. La gravedad del daño de tejido se evaluó en el cuerpo estriado, la corteza y en CA1-2, CA3, CA4 y giro dentado del hipocampo. El daño tisular se identificó como la pérdida neuronal (citoplasma acidófilo (rojo) y núcleos contraídos), pannecrosis y reacciones celulares. El daño tisular se evaluó usando el siguiente sistema de puntuación: 0: El tejido no mostró daño tisular, 1: <5% tejido está dañado, 2: <50% de tejido está dañado, 3: > 50% tejido está dañado y 4: >95% tejido está dañado.

Resultados y Conclusiones

[0123] Los resultados de este estudio se muestran en la figura. 3. La figura 3 muestra que la lesión hipóxico-isquémica (barras de la izquierda de cada grupo) daba lugar a puntuaciones de daños significativos en cada una de las áreas del cerebro estudiadas. La figura 3 muestra también que la administración central de una dosis relativamente baja de cG-2AlilP (barras de la derecha de cada grupo; 2 ng) redujo significativamente el daño tisular en cada región del cerebro examinada en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$).

[0124] Se puede observar que cG-2AlilP puede ser neuroprotector contra el daño neuronal causado por una lesión hipóxico-isquémica, incluso cuando se administra después de una lesión hipóxico-isquémica. Este hallazgo sorprendente indica que cG-2AlilP es un agente útil para tratar una variedad de afecciones caracterizadas por la degeneración o muerte celular neuronal.

55

Ejemplo 7: Efectos de la cG-2AlilP sobre la lesión hipóxico-isquémica II

Materiales y Métodos

[0125] Se utilizaron los materiales y métodos descritos en el Ejemplo 6 y se aumentó el número de grupos de tratamiento. Las ratas se dividieron en grupos de 5 tratamientos tratados ventricularmente intracerebral (icv) con una de 4 dosis de cG-2AlilP o con su vehículo (solución salina normal) 2 horas después de la lesión hipóxico-isquémica (1: n = 10, 2 ng; 2: n = 9, 4 ng; 3: n = 9, 20 ng; 4: n = 10, 100 ng, y 5: n = 9, vehículo).

[0126] La figura 4 muestra que la hipoxia sola (vehículo) produce puntuaciones de daño neuronal en todas las áreas del cerebro estudiadas. En los animales tratados con cG-2AlilP, la hipoxia tuvo menos efecto, a pesar de que el

agente se administró después de la lesión hipóxico/isquémica. Se observó el efecto neuroprotector para todas las dosis de cG-2alilP, a excepción de la dosis más alta (100 ng) administrada al cuerpo estriado. Sin embargo, en todos los otros sitios y con todas las otras dosis, cG-2alilP disminuyó los efectos de daño neural de la hipoxia/isquemia. Además, cG-2alilP presentó un aumento de la eficacia en regiones del cerebro que experimentaron una lesión progresiva asociada con la muerte celular retardada, tal como la asociada con la apoptosis. En las regiones del cerebro, tales como el giro dentado y la corteza cerebral, que son más resistentes a la lesión HI, se sabe que la progresión de la lesión es más lenta y más grave que en las regiones del cerebro que son más sensibles a la lesión HI, tal como el cuerpo estriado y las subregiones CA1-2, CA3 y CA4 del hipocampo. Este resultado muestra que cG-2alilP puede ser beneficioso en el tratamiento de trastornos neurológicos crónicos.

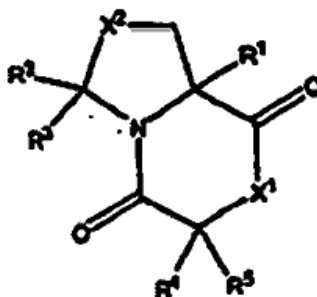
5

10

[0127] Las descripciones y ejemplos proporcionados en este documento son únicamente para propósitos de ilustración.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo, en el que

X^1 se selecciona del grupo que consiste en NR' , O y S;

X^2 se selecciona del grupo que consiste en CH_2 , NR' , O y S;

R^1 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{OR}'$, $-\text{SR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{C}(\text{NR}')\text{NR}'\text{R}'$, trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-\text{H}$, alquilo, heteroalquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

R^2 , R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, $-\text{OR}'$, $-\text{SR}'$, $-\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{C}(\text{NR}')\text{NR}'\text{R}'$, trihalometilo, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo y heteroarilalquilo sustituido; cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-\text{H}$, alquilo, heteroalquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo;

o R^4 y R^5 tomados juntos son $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-$, donde n es un número entero de 0 a 6;

o R^2 y R^3 tomados juntos son $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-$, donde n es un número entero de 0 a 6;

con la condición de que cuando $R^1 = \text{metilo}$ y $R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$, entonces $R^5 \neq \text{bencilo}$; en los que alquilo sustituido, heteroalquilo sustituido, alquenoilo sustituido, alquinoilo sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido o arilalquilo sustituido son un radical alquilo, heteroalquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, heteroarilo o arilalquilo, en los que uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos independientemente por otro sustituyente que incluye $-\text{R}'$, $-\text{OR}'$, $-\text{SR}'$, $-\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{C}(\text{NR}')\text{NR}'\text{R}'$, $-\text{NR}'-\text{C}(\text{NR}')-\text{OR}'$, $-\text{NR}'-\text{C}(\text{NR}')-\text{SR}'$, $\text{NR}'-\text{C}(\text{NR}')-\text{NR}'\text{R}'$, trihalometilo y halógeno, en los que R^1 es independientemente $-\text{H}$, alquilo, heteroalquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo.

2. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que $R^1 = \text{metilo}$ o alilo.

3. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que $R^2 = R^3 = \text{metilo}$ y $X^2 = \text{S}$.

4. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que $R^1 = \text{alilo}$, $R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{H}$, $X^1 = \text{NH}$ y $X^2 = \text{CH}_2$ (G-2alilP cíclico) o en el que $R^1 = \text{metilo}$, $R^2 = R^3 = \text{H}$, R^4 y R^5 tomados juntos son $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-$, $X^1 = \text{NH}$ y $X^2 = \text{CH}_2$ (ciclohexil G2MeP cíclico); o

en el que $R^1 = \text{metilo}$, $R^2 = R^3 = \text{H}$, R^4 y R^5 tomados juntos son $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-$, $X^1 = \text{NH}$ y $X^2 = \text{CH}_2$ (ciclopentil G2MeP cíclico).

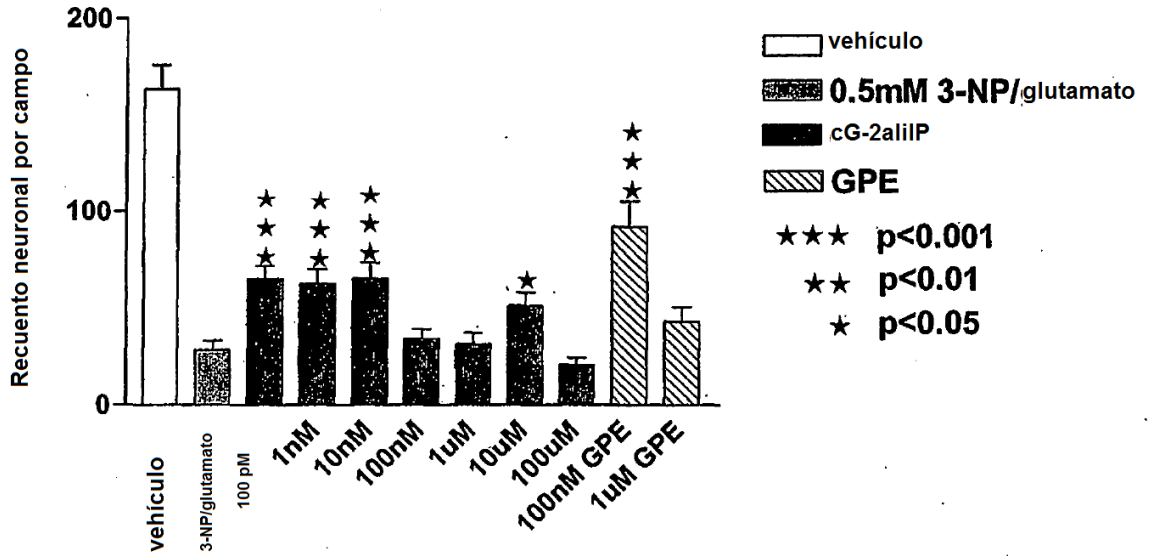
5. Composición farmacéutica que comprende un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Uno o más compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en la protección de neuronas que de otro modo están destinadas a degenerar o morir como resultado de una lesión o enfermedad.

7. Uno o más compuestos, según la reivindicación 6, en los que la enfermedad se **caracteriza por** muerte neuronal apoptótica, muerte de células neuronales necrótica, degeneración de células neuronales, o en el que la lesión da lugar a la muerte de células neuronales necrótica, muerte de células neuronales apoptótica o degeneración de células neuronales.

8. Uno o más compuestos para usar, según la reivindicación 6, en los que dicho compuesto se selecciona entre G-2alilP cíclico, ciclohexil-G-2MeP cíclico y ciclopentil-G-2MeP cíclico.

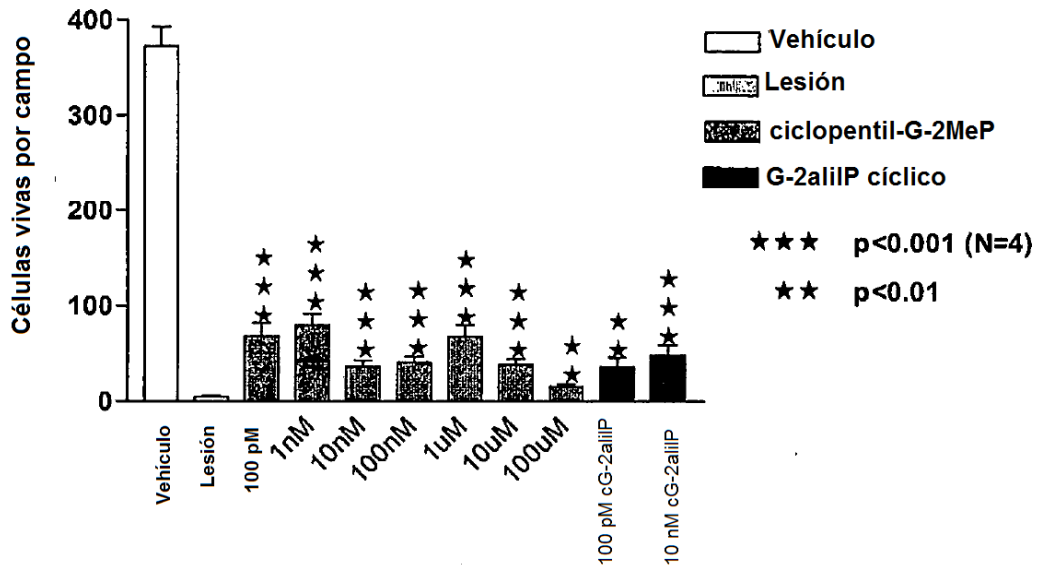
Microexplantes cerebelares P8 dañados por 3-NP/glutamato y recuperados por cG-2alilP



Número de células analizadas después de 48 horas. Entre 100 pM y 10 nM de cG-alilP (N = 4) la recuperación de la lesión está entre el 25,5% y el 27,3%. 100 nM de GPE muestra un 47,1% de recuperación

Figura 1

Recuperación de células después de lesión con 0,5 mM de 3NP/glutamato y tratadas con ciclopentil-G-2MeP y G-2alilP cíclico



Las células se fijan después de 48 horas

Figura 2

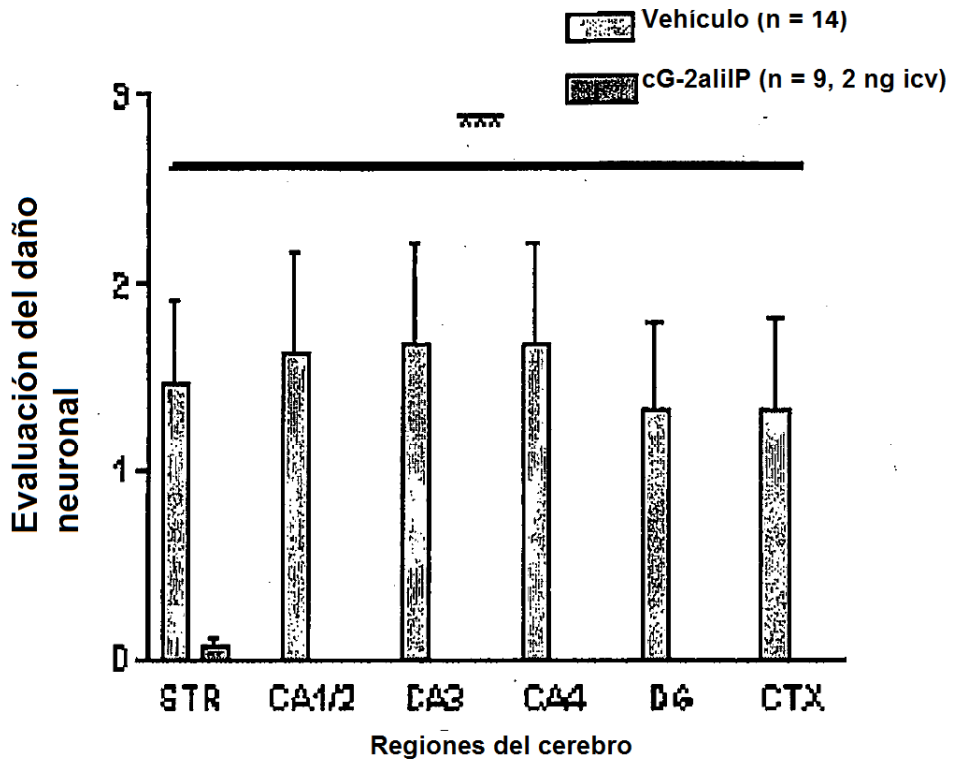


Figura 3

Efectos de cG-2alIP después de administración icv

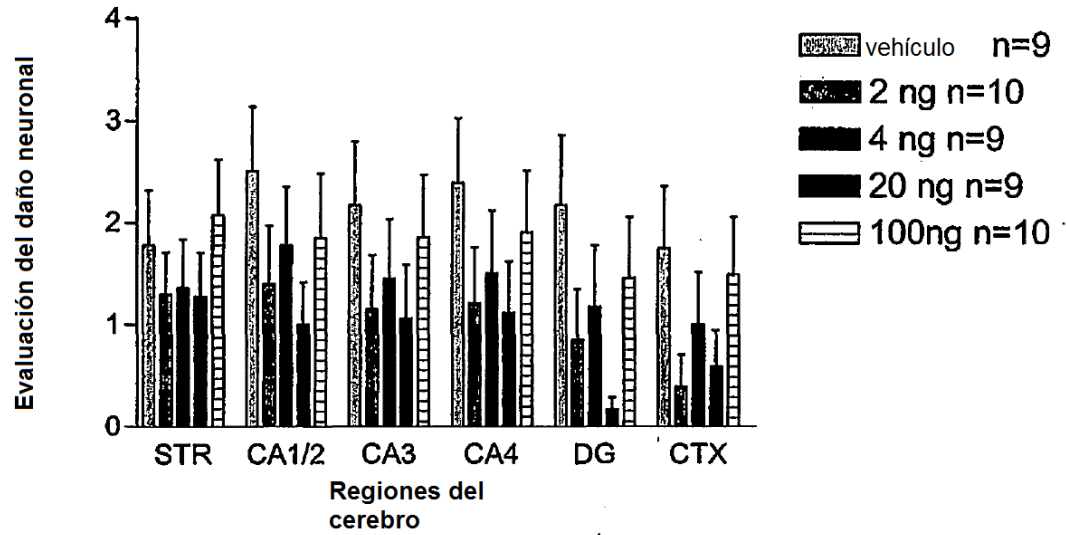


Figura 4