(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 577 433**

(51) Int. CI.:

A61K 47/48 (2006.01)
C07D 213/73 (2006.01)
C07D 215/233 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 277/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2006 E 08075300 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1964577**

(54) Título: **Conjugados éster de alfa aminoácido-fármaco hidrolizables por la carboxilesterasa**

(30) Prioridad:

05.05.2005 GB 0509226
13.05.2005 US 680542 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2016

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)
980 Great West Road, Brentford
Middlesex TW8 9GS, GB

(72) Inventor/es:

DAVIDSON, ALAN HORNSBY,C/O CHROMA THERAPEUTICS LTD.;
DRUMMOND, ALAN HASTINGS,C/O CHROMA THERAPEUTICS LTD. y
NEEDHAM, LINDSEY ANNC/O CHROMA THERAPEUTICS LTD.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Conjugados éster de alfa aminoácido-fármaco hidrolizables por la carboxilesterasa

La presente invención se refiere a aumentar o prolongar la actividad de un compuesto que inhibe la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa mediante la conjugación covalente de un motivo de éster de alfa aminoácido al inhibidor, más específicamente a un inhibidor de la p38 cinasa. La invención también se refiere a inhibidores a los que un motivo de éster de alfa aminoácido se ha conjugado covalentemente, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. La invención también se refiere a un procedimiento para la identificación de dichos conjugados que tienen propiedades superiores en relación con el inhibidor no conjugado parental. La invención se refiere adicionalmente al uso de inhibidores que contienen motivos de éster de aminoácido que permiten la acumulación selectiva de conjugados de aminoácido dentro de las células del linaje de monocitos-macrófagos.

Antecedentes de la invención

Muchas enzimas y receptores intracelulares son objetivos para los fármacos farmacéuticamente útiles que modulan sus actividades mediante la unión a sus sitios activos. Aparecen ejemplos en la Tabla 1 a continuación. Para alcanzar las enzimas y receptores objetivo, los compuestos moduladores deben, por supuesto, atravesar la membrana celular desde el plasma/líquido extracelular. En general, los moduladores de carga neutra atraviesan la membrana celular más fácilmente que las especies cargadas. Después, se establece un equilibrio dinámico por el cual el modulador se equilibra entre el plasma y el interior celular. Como resultado del equilibrio, los tiempos de residencia intracelular y las concentraciones de muchos moduladores de enzimas y receptores intracelulares son con frecuencia muy bajos, especialmente en los casos en los que el modulador se elimina rápidamente del plasma. Las potencias de los moduladores son, por tanto, pobres a pesar de sus altas afinidades de unión para la enzima o receptor objetivo.

Por tanto, sería deseable si un procedimiento estuviera disponible para aumentar la concentración intracelular de un modulador dado de una enzima o receptor intracelular. Esto daría como resultado una potencia aumentada y, mediante la prolongación de la residencia del modulador dentro de la célula, daría como resultado unas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas. Se conseguirían una exposición más uniforme y unas frecuencias de dosificación reducidas. Se podría obtener un beneficio adicional si el fármaco pudiera dirigirse a las células objetivo específicas responsables de su acción terapéutica, reduciendo la exposición sistémica y por tanto los efectos secundarios.

Breve descripción de la invención

La presente invención describe un procedimiento de este tipo y describe moduladores mejorados que incorporan los principios estructurales en los que se basa el procedimiento. Saca partido del hecho de que las moléculas lipófilas (de baja polaridad o de carga neutra) pasan a través de la membrana celular y entran en las células de forma relativamente fácil y las moléculas hidrófilas (de mayor polaridad, cargadas) no lo hacen. Por tanto, si un motivo lipófilo está unido a un modulador dado, permitiendo que el modulador entre en la célula y, si ese motivo se convierte en la célula en uno de mayor polaridad, es de esperar que el modulador con el motivo de mayor polaridad unido se acumule dentro de la célula. A condición de que un motivo de este tipo se una al modulador de una manera que no altere su modo de unión con la enzima o receptor objetivo, la acumulación de modulador con el motivo de mayor polaridad unido, por tanto, se espera que dé como resultado una actividad prolongada y/o aumentada. La presente invención está relacionada con moduladores que son inhibidores de la p38 MAP cinasa.

La presente invención hace uso del hecho de que existen enzimas carboxilesterasas dentro de las células, que pueden utilizarse para hidrolizar un motivo de éster de alfa aminoácido unido a un modulador dado, al ácido parental. Por tanto, un modulador puede administrarse como un conjugado covalente con un éster de alfa aminoácido, en cuya forma entra fácilmente en la célula donde se hidroliza eficientemente por una o más carboxilesterasas intracelulares, y el conjugado alfa aminoácido-modulador resultante se acumula dentro de la célula, aumentando de la potencia global y/o el tiempo de residencia activa. También se ha descubierto que mediante la modificación del motivo de alfa aminoácido o de la manera en la que se conjuga, los moduladores pueden dirigirse a los monocitos y los macrófagos. En el presente documento, a menos que se especifique "monocito" o "monocitos", el término macrófago o macrófagos se usará para indicar macrófagos (incluyendo los macrófagos asociados a tumores) y/o monocitos.

Descripción detallada de la invención

Por tanto, en un aspecto amplio, la presente invención proporciona un conjugado covalente de un éster de alfa aminoácido y un inhibidor de la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal para terapia, en el que: el grupo éster del conjugado es hidrolizable por una o más enzimas carboxilesterasas intracelulares al ácido correspondiente; el nitrógeno del grupo amino del éster de aminoácido está sustituido con, pero no directamente unido a, un resto carbonilo, o se deja sin sustituir; y el éster de alfa aminoácido está unido covalentemente al inhibidor en una posición distante de la interfaz de unión entre el inhibidor y la enzima cinasa p38 MAP, y/o está conjugado con el inhibidor de manera que el modo

de unión del inhibidor conjugado y dicho ácido correspondiente a la enzima p38 MAP cinasa es el mismo que el del inhibidor sin conjugar, en el que la posición de la conjugación está distante y el modo de unión es el mismo cuando la inhibición de la producción de TNFα en sangre humana completa mostrada por el conjugado es al menos tan alta como la del inhibidor sin conjugar.

Como se ha indicado, la invención se refiere a la modificación de inhibidores de la p38 MAP cinasa. Aunque el principio de la invención es de aplicación general, no restringido por la identidad química del inhibidor, se prefiere fuertemente que el inhibidor sea uno que ejerza su efecto mediante la unión reversible a la p38 MAP cinasa objetivo, a diferencia de aquellos cuyo efecto se debe a la unión covalente a la p38 MAP cinasa objetivo.

Dado que por utilidad práctica se requiere que el conjugado carboxilesterasa-hidrolizado retenga la actividad de unión intracelular del inhibidor parental con su p38 MAP cinasa objetivo, la unión del motivo de éster debe tener en cuenta ese requisito, que se cumplirá si el motivo de éster de alfa aminoácido carboxilesterasa se une al inhibidor de manera que el modo de unión del producto de hidrólisis de la carboxilesterasa correspondiente (es decir, el ácido correspondiente) al objetivo es esencialmente el mismo que el del inhibidor sin conjugar. En general esto se consigue mediante la unión covalente del motivo de éster de carboxilesterasa al inhibidor en una posición distante de la interfaz de unión entre el inhibidor y la enzima p38 MAP cinasa objetivo. De esta manera, el motivo se dispone para extenderse en el disolvente, en lugar de interferir potencialmente con el modo de unión.

Además, el motivo de aminoácido carboxilesterasa obviamente debe ser un sustrato para la carboxilesterasa si el primero debe ser hidrolizado por el último dentro de la célula. Las carboxilesterasas intracelulares son bastante promiscuas en general, en cuanto a que su capacidad para hidrolizar no depende de requisitos estructurales muy estrictos del sustrato éster de aminoácido. Por tanto, la mayoría de los modos de conjugación covalente del motivo de aminoácido carboxilesterasa con un modulador permitirá la hidrólisis. La unión mediante una cadena enlazadora flexible será como por lo general se consigue esto.

Se apreciará que cualquier modificación química de un fármaco puede alterar sutilmente su geometría de unión, y la estrategia química para la unión del motivo de éster de carboxilesterasa puede introducir interacciones de unión adicionales con el objetivo o puede sustituir una o más de estas interacciones. Por tanto, el requisito de que el modo de unión del conjugado hidrolizado al objetivo sea el mismo que el del modulador sin conjugar debe interpretarse como que requiere que no exista ninguna perturbación significativa del modo de unión, en otras palabras que el modo de unión sea esencialmente el mismo que el del modulador sin conjugar. Cuando se cumple el requisito, las principales características de la unión del modulador parental se conservan y los moduladores modificados y sin modificar tienen un conjunto común global de características de unión. Los puntos de vista del "mismo modo de unión" y la "unión distante" son similares porque, como se ha indicado anteriormente, la manera habitual de lograr el requisito del "mismo modo de unión" es unir el motivo de la carboxilesterasa en un punto en la molécula de inhibidor que esté distante de la interfaz de unión entre el inhibidor y la enzima p38 MAP cinasa objetivo. Sin embargo, se ha de observar que estos requisitos no implican que el conjugado y/o su ácido correspondiente deban tener la misma potencia moduladora *in vitro* o *in vivo* que el modulador parental. Como se usan en el presente documento, sin embargo, las características del "mismo modo de unión" y la "unión distante" se consideran satisfechas cuando la inhibición de la producción de TNFα en sangre humana completa mostrada por el conjugado es al menos tan alta como la del modulador parental en el mismo ensayo. En general, se prefiere que el ácido carboxílico hidrolizado por la esterasa tenga una potencia en un ensayo inhibidor de la p38 MAP cinasa *in vitro* no inferior a un décimo de la potencia del inhibidor parental en ese ensayo.

Aunque los procedimientos de química medicinal tradicional de cartografía de las relaciones estructura-actividad son perfectamente capaces de identificar una estrategia de unión para satisfacer los requisitos de "mismo modo de unión" y "unión distante" anteriores, las técnicas modernas como la RMN y la cristalografía de rayos X han avanzado hasta el punto en el que es muy frecuente que el modo de unión de un modulador conocido de una enzima, tal como un inhibidor conocido de la p38 MAP cinasa, se conozca o se determine. Dicha información es, en la gran mayoría de los casos, de dominio público, o puede modelarse usando procedimientos de modelado por ordenador, tal como el anclaje de ligando y el modelado de homología, sobre la base de los modos de unión conocidos de moduladores estructuralmente similares, o la estructura conocida del sitio activo de la enzima objetivo tal como la p38 MAP cinasa. Con conocimientos del modo de unión del modulador obtenido mediante estas técnicas puede identificarse una localización adecuada para la unión del motivo de éster de carboxilesterasa, por lo general (como se ha indicado anteriormente) en un punto en el modulador que está distante de la interfaz de unión entre el inhibidor y la enzima objetivo, en el caso de la presente invención, la p38 MAP cinasa.

Las enzimas carboxilesterasas intracelulares capaces de hidrolizar el grupo éster del alfa-aminoácido conjugado al correspondiente ácido incluyen los tres isótopos conocidos de la enzima carboxilesterasa humana (("hCE") hCE-1 (también conocida como CES-1), hCE-2 (también conocida como CES-2) y hCE-3 (*Drug Disc. Today* 2005, 10, 313-325). Aunque se considera que éstas son las enzimas principales, otras enzimas de carboxiléster como la bifenilhidrolasa (BPH) también pueden desempeñar un papel en la hidrólisis de los conjugados.

El ensayo de células rotas que se describe a continuación es un procedimiento simple para confirmar que un conjugado dado de modulador y éster de alfa aminoácido, o un éster de alfa aminoácido dado, que se evalúa como un posible motivo de éster de carboxilesterasa, se hidrolice según se requiera. Estas enzimas también pueden

expresarse fácilmente usando técnicas recombinantes y las enzimas recombinantes pueden usarse para determinar o confirmar que se produce la hidrólisis.

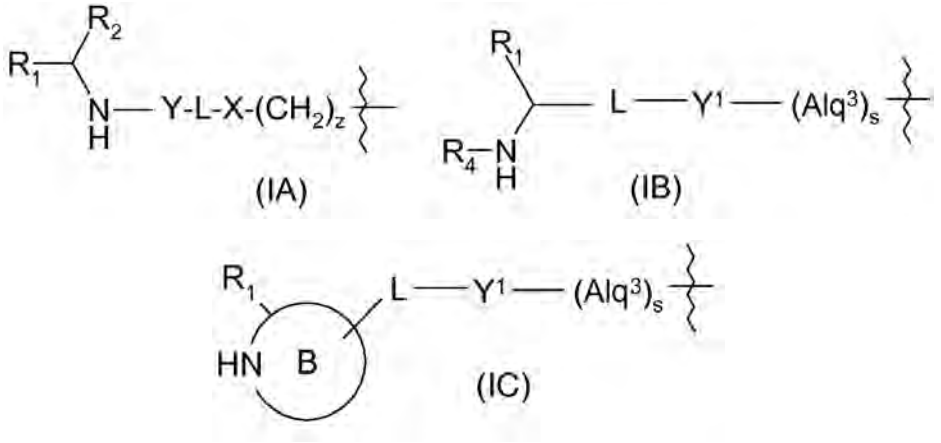
Es una característica de la invención que el conjugado deseado conserve el motivo de alfa aminoácido unido covalentemente cuando se hidroliza mediante la o las carboxilesterasas dentro de la célula, ya que es el grupo carboxilo polar de ese motivo el que impide o reduce la eliminación del conjugado hidrolizado de la célula y, de este modo, contribuye a su acumulación dentro de la célula. De hecho, la potencia celular del modulador modificado se debe predominantemente a la acumulación del ácido y su modulación de la actividad del objetivo (aunque el éster sin hidrolizar también ejerce su actividad sobre el objetivo siempre que permanezca sin hidrolizar). Dado que las células en general contienen varios tipos de enzimas peptidasas, es de preferencia que el conjugado o, más especialmente, el conjugado hidrolizado (el ácido correspondiente), no sea un sustrato para dichas peptidasas. En particular, se prefiere fuertemente que el grupo éster del alfa aminoácido no sea el elemento C-terminal de un motivo dipeptídico en el conjugado. Sin embargo, aparte de esa limitación en el modo de unión covalente, el grupo éster del alfa aminoácido puede estar unido covalentemente al modulador a través de su grupo amino o a través de su carbono en alfa. En algunos casos, el modulador tendrá un punto de unión conveniente para el motivo de éster de carboxilesterasa y, en otros casos, tendrá que idearse una estrategia de síntesis para su unión.

Se ha descubierto que las células que solo expresan las carboxilesterasas hCE-2 y/o hCE-3 y las formas recombinantes de estas enzimas solo hidrolizarán los conjugados de éster de aminoácido a sus ácidos resultantes si el nitrógeno del grupo alfa aminoácido está sin sustituir o está directamente unido a un grupo carbonilo, mientras que las células que contienen hCE-1, o hCE-1 recombinante, pueden hidrolizar conjugados de aminoácidos con un amplio intervalo de grupos en el nitrógeno. Este requisito de selectividad de hCE-2 y hCE-3 puede convertirse en una ventaja cuando sea necesario que el modulador se dirija a enzimas o receptores solo en ciertos tipos celulares. Se ha descubierto que las cantidades relativas de estas tres enzimas carboxilesterasas varían entre los tipos celulares (véase la Figura 1 y la base de datos en http:/symatlas.gnf.org/SymAtlas (obsérvese que en esta base de datos hCE3/CES3 se indica con el símbolo FLJ21736)). Si se pretende que el modulador actúe solamente en los tipos celulares en los que se encuentra hCE-1, la unión de un motivo de éster de carboxilesterasa en el que el grupo amino está unido directamente a un grupo distinto del carbonilo da como resultado la acumulación del conjugado de modulador hidrolizado preferentemente en las células con concentraciones eficaces de hCE-1. Dicho de otro modo, la acumulación específica del ácido derivado del conjugado de inhibidor en células que expresan hCE-1 se consigue mediante la unión del motivo de éster de aminoácido al modulador de manera que el átomo de nitrógeno del éster de aminoácido no esté unido directamente a un carbonilo o se deje sin sustituir.

Se sabe que los macrófagos desempeñan un papel principal en los trastornos inflamatorios a través de la liberación de citocinas, en particular TNFα e IL-1 (van Roon y col. *Arthritis and Rheumatism*, 2003, 1229-1238). En la artritis reumatoide son contribuyentes principales a la inflamación articular y a la destrucción articular ((Conell en *N. Eng J. Med.* 2004, 350, 2591-2602). Los macrófagos también están involucrados en el crecimiento y el desarrollo tumorales (Naldini y Carraro en *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 3-8). Por tanto, los agentes que se dirigen selectivamente a las células de macrófagos podrían ser valiosos en el tratamiento del cáncer, la inflamación y la enfermedad autoinmune. Cabría esperar que dirigirse a tipos celulares específicos conduzca a efectos secundarios reducidos. La presente invención permite un procedimiento de dirección de moduladores a macrófagos, que se basa en la observación anterior de que la manera en la que el motivo de éster de carboxilesterasa se une al modulador determina si es hidrolizado por carboxilesterasas específicas y, por tanto, si el ácido resultante se acumula o no en diferentes tipos celulares. Específicamente, se ha descubierto que los macrófagos contienen la carboxilesterasa hCE-1 humana, mientras que otros tipos celulares no. En los conjugados de la invención, el nitrógeno del motivo de éster está sustituido pero no unido directamente a un resto de grupo carbonilo, el éster solo será hidrolizado por hCE-1 y, por tanto, los conjugados esterasa-inhibidor hidrolizado solo se acumularán en los macrófagos.

Existen, por supuesto, muchos grupos éster posibles que pueden en principio estar presentes en el motivo de éster de carboxilesterasa para la unión al inhibidor. Análogamente, existen muchos alfa aminoácidos, tanto naturales como no naturales, que difieren en la cadena lateral en el carbono alfa, que pueden usarse como ésteres en el motivo de éster de carboxilesterasa. Algunos ésteres de alfa aminoácido se hidrolizan rápidamente mediante uno o más de los isotipos hCE-1, -2 y -3, o células que contienen estas enzimas, mientras que otros se hidrolizan más lentamente o solo se hidrolizan en muy pequeña medida. En general, si la carboxilesterasa hidroliza el éster de aminoácido libre al ácido parenteral, sujeto a la dependencia del N-carbonilo de hCE-2 y hCE-3 analizada anteriormente, también hidrolizará el motivo de éster cuando se conjuga covalentemente al modulador. Por tanto, el ensayo en células rotas y/o el ensayo de carboxilesterasa aislada que se describen en el presente documento proporcionan una primera exploración simple, rápida y sencilla para detectar ésteres que tengan el perfil de hidrólisis requerido. Después, los motivos de éster seleccionados de esa manera pueden volverse a ensayar en el mismo ensayo de carboxilesterasa cuando están conjugados con el inhibidor a través de la química de conjugación elegida, para confirmar que todavía es un sustrato de carboxilesterasa en ese entorno. Los tipos de éster adecuados se analizarán a continuación, pero en este punto puede mencionarse que se ha descubierto que los ésteres t-butílicos de alfa aminoácidos son sustratos relativamente malos de hCE-1, -2 y -3, mientras que los ésteres ciclopentílicos se hidrolizan eficazmente. Los alfa aminoácidos adecuados también se analizarán con más detalle a continuación, pero en este punto puede mencionarse que la fenilalanina, la homofenilalanina, la fenilglicina y la leucina son adecuadas en general, y se prefieren los ésteres de alcoholes secundarios.

Como se ha indicado anteriormente, el éster de alfa aminoácido puede estar conjugado con el inhibidor a través del grupo amino del éster de aminoácido o a través del carbono alfa (por ejemplo por medio de su cadena lateral) del éster de aminoácido. Puede estar presente un radical enlazador entre el motivo de éster de carboxilesterasa y el inhibidor. Por ejemplo, el éster de alfa aminoácido puede estar conjugado con el modulador como un radical de fórmula (IA), (IB) o (IC):
en la que



R_1 es un grupo éster que es hidrolizable por una o más enzimas carboxilesterasas intracelulares a un grupo ácido carboxílico;

R_2 es la cadena lateral de un alfa aminoácido natural o no natural;

R_4 es hidrógeno; o alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos;

B es un anillo heterocíclico monocíclico de 5 o 6 átomos de anillo en el que R_1 está unido a un carbono del anillo adyacente al nitrógeno del anillo mostrado, y el anillo B está condensado opcionalmente con un segundo anillo carbocíclico o heterocíclico de 5 o 6 átomos de anillo en cuyo caso el enlace a L puede ser desde un átomo de anillo en dicho segundo anillo;

Y es un enlace, -$S(=O)_2$-, -C(=S)-NR_3-, -C(=NH)NR_3- o -$S(=O)_2NR_3$- en los que R_3 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido;

Y^1 es un enlace, -(C=O)-, -$S(O_2)$-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -(C=O)NR_3-, -NR_3(C=O)-, -$S(O_2)NR_3$-, -$NR_3S(O_2)$- o -NR_3(C=O)NR_5-, en los que R_3 y R_5 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido;

L es un radical divalente de fórmula -$(Alq^1)_m(Q)_n(Alq^2)_p$- en la que

m, **n** y **p** son independientemente 0 o 1,

Q es (i) un radical heterocíclico o carbocíclico mono o bicíclico divalente opcionalmente sustituido que tiene 5-13 miembros de anillo, o (ii), en el caso en el que tanto m como p sean 0, un radical divalente de fórmula -X^2-Q^1- o –Q^1-X^2- en la que X es -O-, -S- o NR^A- -en la que R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido y Q^1 es un radical heterocíclico o carbocíclico mono o bicíclico divalente opcionalmente sustituido que tiene 5-13 miembros de anillo,

Alq^1 y **Alq^2** representan independientemente radicales cicloalquilo C_3-C_7 divalentes opcionalmente sustituidos, o radicales alquileno C_1-C_6, alquenileno C_2-C_6 o alquinileno C_2-C_6 lineales o ramificados opcionalmente sustituidos que pueden contener opcionalmente o terminar en un enlace éter (-O-), tioéter (-S-) o amino (-NR^A-) en el que R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido;

X representa un enlace, -C(=O)-; -$S(=O)_2$-; -NR_3C(=O)-, -C(=O)NR_3-, -NR_3C(=O)NR_5-, -$NR_3S(=O)_2$- o -$S(=O)_2NR_3$- en los que R_3 y R_5 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido;

z es 0 o 1;

s es 0 o 1; y

Alc^3 representa un radical cicloalquilo C_3-C_7 divalente opcionalmente sustituido o un radical alquileno C_1-C_6, alquenileno C_2-C_6 o alquinileno C_2-C_6, lineal o ramificado opcionalmente sustituido, que puede contener opcionalmente o terminar en un enlace éter (-O-), tioéter (-S-) o amino (-NR^A-) en el que R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido;

en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino del éster de aminoácido está sustituido pero no unido directamente a un resto carbonilo o se deja sin sustituir.

La expresión "éster" o "grupo carboxilo esterificado" significa un grupo $R_9O(C=O)$- en el que R_9 es el grupo que caracteriza el éster, teóricamente derivado del alcohol R_9OH.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquilo (C_a-C_b)" en la que a y b son números enteros se refiere a un radical alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de a a b átomos de carbono. Por tanto, cuando a es 1 y b es 6, por ejemplo, la expresión incluye metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo y n-hexilo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquileno (C_a-C_b) divalente" en la que a y b son números enteros se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada que tiene de a a b átomos de carbono y dos valencias sin satisfacer.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquenilo (C_a-C_b)" en la que a y b son números enteros se refiere a un resto alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene de a a b átomos de carbono que tienen al menos un doble enlace de estereoquímica E o Z, cuando sea aplicable. La expresión incluye, por ejemplo, vinilo, alilo, 1 y 2-butenilo y 2-metil-2-propenilo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquenileno (C_a-C_b) divalente" significa una cadena hidrocarbonada que tiene de a a b átomos de carbono, al menos un doble enlace y dos valencias sin satisfacer.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquinilo (C_a-C_b)" en la que a y b son números enteros se refiere a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o cadena ramificada que tienen de dos a seis átomos de carbono y que tienen además un triple enlace. Esta expresión incluiría, por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, 1- y 2-butinilo, 2-metilo-2-propinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo y 5-hexinilo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "radical alquinileno (C_a-C_b) divalente" en la que a y b son números enteros se refiere a una cadena hidrocarbonada divalente que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y al menos un triple enlace.

Como se usa en el presente documento, el término "carbocíclico" se refiere a un radical mono, bi o tricíclico que tiene hasta 16 átomos de anillo, todos los cuales son carbono, e incluye arilo y cicloalquilo.

Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un radical carbocíclico saturado monocíclico que tiene 3-8 átomos de carbono e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

Como se usa en el presente documento, el término sin restricciones "arilo" se refiere a un radical aromático carbocíclico mono, bi o tricíclico e incluye radicales que tienen dos anillos aromáticos carbocíclicos monocíclicos que están unidos directamente mediante un enlace covalente. Son ilustrativos de radicales de este tipo fenilo, bifenilo y naftilo.

Como se usa en el presente documento, el término sin restricciones "heteroarilo" se refiere a un radical aromático mono, bi o tricíclico que contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre S, N y O, e incluye radicales que tienen dos anillos monocíclicos de este tipo, o un anillo monocíclico de este tipo y un anillo de arilo monocíclico, que están unidos directamente mediante un enlace covalente. Son ilustrativos de radicales de este tipo tienilo, benzotienilo, furilo, benzofurilo, pirrolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isotiazolilo, bencisotiazolilo, pirazolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, bencisoxazolilo, isotiazolilo, triazolilo, benzotriazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, indolilo e indazolilo.

Como se usa en el presente documento, el término sin restricciones "heterociclilo" o "heterocíclico" incluye "heteroarilo" como se ha definido anteriormente y en su significado no aromático se refiere a un radical no aromático mono, bi o tricíclico que contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre S, N y O, y a grupos que consisten en un radical no aromático monocíclico que contiene uno o más heteroátomos de este tipo que está unido covalentemente a otro radical de este tipo o a un radical carbocíclico monocíclico. Son ilustrativos de radicales de este tipo los grupos pirrolilo, furanilo, tienilo, piperidinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirrolidinilo, pirimidinilo, morfolinilo, piperazinilo, indolilo, morfolinilo, benzofuranilo, piranilo, isoxazolilo, bencimidazolilo, metilendioxifenilo, etilendioxifenilo, maleimido y succinimido.

A menos que se especifique otra cosa en el contexto en el que se produce, el término "sustituido" como se aplica a cualquier resto en el presente documento significa sustituido con hasta cuatro sustituyentes compatibles, cada uno de los cuales puede ser independientemente, por ejemplo, alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6), hidroxi, hidroxi-alquilo (C_1-C_6), mercapto, mercapto-alquilo (C_1-C_6), alquiltio (C_1-C_6), fenilo, halo (incluyendo fluoro, bromo y cloro), trifluorometilo, trifluorometoxi, nitro, nitrilo (-CN), oxo, -COOH, $-COOR^A$, $-COR^a$, $-SO_2R^a$, $-CONH_2$, $-SO_2NH_2$, $-CONHR^a$, $-SO_2NHR^A$, $-CONR^AR^B$, $-SO_2NR^AR^B$, $-NH_2$, $-NHR^A$, $-NR^AR^B$, $-OCONH_2$, $-OCONHR^A$, $-OCONR^AR^A$, $-NHCOR^A$, $-NHCOOR^A$, $-NR^BCOOR^A$, $-NHSO_2OR^A$, $-NR^BSO_2OH$, $-NR^BSO_2OR^A$, $-NHCONH_2$, $-NR^ACONH_2$, -

$NHCONHR^B$, $-NR^ACONHR^B$, $-NHCONR^AR^B$ o $-NR^ACONR^AR^B$ en los que R^A y R^B son independientemente un alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_6), fenilo o heteroarilo monocíclico que tiene 5 o 6 átomos de anillo. Un "sustituyente opcional" puede ser uno de los grupos sustituyentes anteriores.

La expresión "cadena lateral de un alfa aminoácido natural o no natural" se refiere al grupo R^1 en un aminoácido natural o no natural de fórmula NH_2-CH(R^1)-COOH.

Los ejemplos de cadenas laterales de alfa aminoácidos naturales incluyen las de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, ácido glutámico, histidina, 5-hidroxilisina, 4-hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, ácido α-aminoadípico, ácido α-amino-n-butírico, 3,4-dihidroxifenilalanina, homoserina, α-metilserina, ornitina, ácido pipecólico y tiroxina.

Los alfa aminoácidos naturales que contienen sustituyentes funcionales, por ejemplo grupos amino, carboxilo, hidroxi, mercapto, guanidilo, imidazolilo o indolilo, en sus cadenas laterales características incluyen arginina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, triptófano, histidina, serina, treonina, tirosina y cisteína. Cuando R_2 en los compuestos de la invención es una de aquellas cadenas laterales, el sustituyente funcional puede estar opcionalmente protegido.

El término "protegido", cuando se usa en relación con un sustituyente funcional en una cadena lateral de un alfa aminoácido natural, significa un derivado de un sustituyente de este tipo que es sustancialmente no funcional. Por ejemplo, los grupos carboxilo pueden estar esterificados (por ejemplo como un éster de alquilo C_1-C_6), los grupos amino pueden convertirse en amidas (por ejemplo como una NHCO-alquil C_1-C_6 amida) o carbamatos (por ejemplo como un NHC(=O)O-alquil C_1-C_6 o NHC(=O)OCH_2Ph carbamato), los grupos hidroxilo pueden convertirse en éteres (por ejemplo un éter de O-alquilo C_1-C_6 o O(alquil C_1-C_6)fenilo) o ésteres (por ejemplo un éster de OC(=O)-alquilo C_1-C_6) y los grupos tiol pueden convertirse en tioéteres (por ejemplo un terc-butil o bencil tioéter) o tioésteres (por ejemplo un SC(=O)-alquil C_1-C_6 tioéster).

Los ejemplos de cadenas laterales de alfa aminoácidos no naturales incluyen los que se indican a continuación en el análisis de grupos R_2 adecuados para su uso en compuestos de la presente invención.

El grupo éster R_1

Además del requisito de que el grupo éster debe ser hidrolizable por una o más enzimas intracelulares, puede ser de preferencia, para algunas aplicaciones (por ejemplo, para la administración sistémica del conjugado) que sea resistente a la hidrólisis por enzimas que hidrolizan carboxiléster en el plasma, ya que esto asegura que el inhibidor conjugado sobrevivirá después de la administración sistémica durante un tiempo suficiente como para penetrar en las células en forma del éster. Es simple hacer un ensayo de cualquier conjugado dado para medir su semivida en plasma en forma del éster mediante incubación en plasma. Sin embargo, se ha descubierto que los ésteres teóricamente derivados de alcoholes secundarios son más estables a las enzimas que hidrolizan carboxiléster en plasma que los derivados de alcoholes primarios. Además, también se ha descubierto que aunque los ésteres teóricamente derivados de alcoholes terciarios son en general estables a las enzimas que hidrolizan carboxiléster en plasma, con frecuencia son también relativamente estables a las carboxilesterasas intracelulares. Teniendo en cuenta estos hallazgos, en el presente documento se prefiere que R_1 en las fórmulas (IA), (IB) y (IC) anteriores sea un grupo éster de fórmula -(C=O)OR_9 en la que R_9 es (i) R_7R_8CH- en la que R_7 es alquil (C_1-C_3)-(Z^1)$_a$-alquilo (C_1-C_3)- o alquenil (C_2-C_3)-(Z^1)$_a$-alquilo (C_1-C_3)- opcionalmente sustituido, en las que a es 0 o 1 y Z^1 es -O-, -S- o -NH- y R_8 es hidrógeno o alquilo (C_1-C_3) o R_7 y R_8 tomados junto con el carbono al que están unidos forman un anillo cicloalquilo C_3-C_7 opcionalmente sustituido o un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 átomos de anillo; o (ii) un fenilo o un anillo heterocíclico monocíclico que tiene 5 o 6 átomos de anillo opcionalmente sustituidos. Dentro de estas clases, R_9 puede ser, por ejemplo, metilo, etilo, n- o iso-propilo, n- o sec-butilo, ciclohexilo, alilo, fenilo, bencilo, 2-, 3- o 4-piridilmetilo, N-metilpiperidin-4-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo o metoxietilo. Actualmente se prefiere cuando R_9 es ciclopentilo.

La cadena lateral R_2 del aminoácido

Sujeto al requisito de que el grupo éster R_1 sea hidrolizable por enzimas carboxilesterasas intracelulares, la selección del grupo cadena lateral R_2 puede determinar la velocidad de la hidrólisis. Por ejemplo, cuando el carbono en R_2 adyacente al carbono del alfa aminoácido no contiene una ramificación, por ejemplo, cuando R_2 es etilo, isobutilo o bencilo, el éster se hidroliza más fácilmente que cuando R_2 está ramificado, por ejemplo, isopropilo o t-butilo.

Los ejemplos de cadenas laterales de aminoácidos incluyen
grupos alquilo C_1-C_6, fenilo, 2,- 3- o 4-hidroxifenilo, 2,- 3- o 4-metoxifenilo, 2,-3- o 4-piridilometilo, bencilo, feniletilo, 2-, 3- o 4-hidroxibencilo, 2,- 3- o 4-benciloxibencilo, 2,- 3- o 4- alcoxibencilo C_1-C_6 y benciloxi(alquilo C_1-C_6);
el grupo caracterizador de un α aminoácido natural, en el que cualquier grupo funcional puede estar protegido;
grupos $-[Alq]_nR_6$ en los que Alq es un grupo alquilo (C_1-C_6) o alquenilo (C_2-C_6) opcionalmente interrumpido por uno o más átomos de -O- o -S- o grupos $-N(R_7)$- [en los que R_7 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_6)], n es 0 o 1 y R_6 es un grupo cicloalquilo o cicloalquenilo opcionalmente sustituido;

un grupo bencilo sustituido en el anillo fenilo con un grupo de fórmula $-OCH_2COR_8$ en la que R_8 es hidroxilo, amino, alcoxi (C_1-C_6), fenil-alcoxi (C_1-C_6), alquilamino (C_1-C_6), di(alquil (C_1-C_6))amino, fenil-alquilamino (C_1-C_6), el resto de un aminoácido o un derivado haluro de ácido, éster o amida del mismo, estando dicho resto unido a través de un enlace amida, seleccionándose dicho aminoácido entre glicina, α o β alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina, glutamina, lisina, histidina, arginina, ácido glutámico y ácido aspártico;
un grupo heterocíclico-alquilo (C_1-C_6), estando ya sea sin sustituir o mono o disustituido en el anillo heterocíclico con halo, nitro, carboxi, alcoxi (C_1-C_6), ciano, alcanoílo (C_1-C_6), trifluorometilo-alquilo (C_1-C_6), hidroxi, formilo, amino, alquilamino (C_1-C_6), di-alquilamino (C_1-C_6), mercapto, alquiltio (C_1-C_6), hidroxi-alquilo (C_1-C_6), mercapto-alquilo (C_1-C_6) o alquilfenilmetilo (C_1-C_6); y
un grupo $-CR_aR_bR_c$ en el que:

cada uno de R_a, R_b y R_c es independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alquenilo (C_2-C_6), alquinilo (C_2-C_6), fenil-alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8); o

R_c es hidrógeno y R_a y R_b son independientemente fenilo o heteroarilo, tal como piridilo; o

R_c es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alquenilo (C_2-C_6), alquinilo (C_2-C_6), fenil-alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8); y R_a y R_b junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un cicloalquilo de 3 a 8 miembros o un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros; o

R_a, R_b y R_c junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo tricíclico (por ejemplo adamantilo); o

R_a y R_b son cada uno independientemente alquilo (C_1-C_6), alquenilo (C_2-C_6), alquinilo (C_2-C_6), fenil-alquilo (C_1-C_6) o un grupo como se define para R_c a continuación distinto de hidrógeno, o R_a y R_b junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un anillo cicloalquilo o heterocíclico y R_c es hidrógeno, -OH, -SH, halógeno, -CN, $-CO_2H$, perfluoroalquilo (C_1-C_4), $-CH_2OH$, $-CO_2$-alquilo (C_1-C_6), -O-alquilo (C_1-C_6), -O-alquenilo (C_2-C_6), -S-alquilo (C_1-C_6), -SO-alquilo (C_1-C_6), $-SO_2$-alquilo (C_1-C_6), -S-alquenilo (C_2-C_6), -SO-alquenilo (C_2-C_6), $-SO_2$-alquenilo (C_2-C_6) o un grupo -Q-W en el que Q representa un enlace o -O-, -S-, -SO- o $-SO_2$- y W representa un grupo fenilo, fenilalquilo, cicloalquilo (C_3-C_8), cicloalquilalquilo (C_3-C_8), cicloalquenilo (C_4-C_8), cicloalquenilalquilo (C_4-C_8), heteroarilo o heteroarilalquilo, donde el grupo W puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo, halógeno, -CN, $-CO_2H$, $-CO_2$-alquilo (C_1-C_6), $-CONH_2$, -CONH-alquilo (C_1-C_6), -CONH-(alquilo C_1-C_6)$_2$, -CHO, $-CH_2OH$, perfluoroalquilo (C_1-C_4), -O-alquilo (C_1-C_6), -S-alquilo (C_1-C_6), -SO-alquilo (C_1-C_6), $-SO_2$-alquilo (C_1-C_6), $-NO_2$, $-NH_2$, -NH-alquilo (C_1-C_6), -N(alquilo (C_1-C_6))$_2$, -NHCO-alquilo (C_1-C_6), alquilo (C_1-C_6), alquenilo (C_2-C_6), alquinilo (C_2-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8), cicloalquenilo (C_4-C_8), fenilo o bencilo.

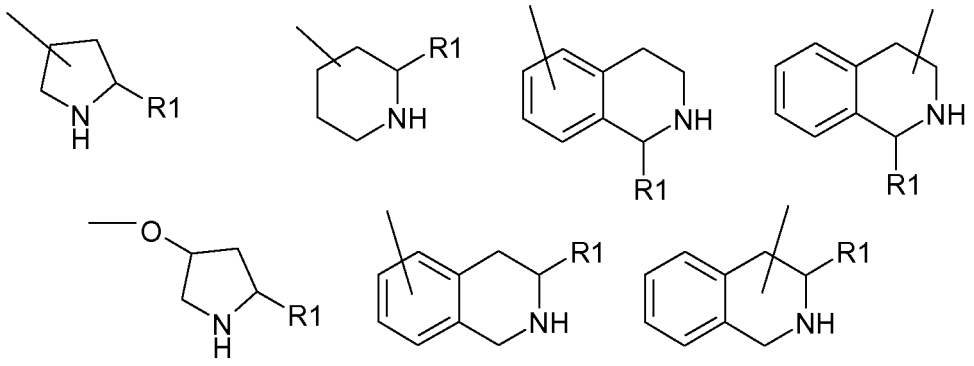
Los ejemplos de grupos R_2 particulares incluyen bencilo, fenilo, ciclohexilmetilo, piridin-3-ilmetilo, terc-butoximetilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, 1-benciltio-1-metiletilo, 1-metiltio-1-metiletilo y 1-mercapto-1-metiletilo, feniletilo. Los grupos R_2 preferidos en el presente documento incluyen bencilo, fenilo, terc-butoximetilo, feniletilo e iso-butilo.

El grupo R4

Como se ha mencionado anteriormente, el grupo amino del motivo de éster de carboxilesterasa puede estar sustituido de manera que esté directamente unido a un grupo distinto de carbonilo. En casos de este tipo R_4 puede ser alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, por ejemplo metilo, etilo, n- o iso-propilo, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, fenilo o piridilo.

El anillo o sistema de anillo B

El anillo o sistema de anillo B puede ser uno elegido entre, por ejemplo, los siguientes:



El radical -Y-L-X-$[CH_2]_Z$-

Cuando el éster de alfa aminoácido se conjuga con el inhibidor como un radical de fórmula (IA), este radical (o enlace) surge de la estrategia química particular elegida para unir el motivo de éster de aminoácido $R_1CH(R_2)NH$- al modulador. Claramente, la estrategia química para ese acoplamiento puede variar ampliamente y, por tanto, son posibles muchas combinaciones de las variables Y, L, X y z.

También se ha de observar que los beneficios del motivo de carboxilesterasa de éster de aminoácido descrito anteriormente (fácil entrada en la célula, hidrólisis por la carboxilesterasa dentro de la célula y acumulación dentro de la célula del producto de hidrólisis del ácido carboxílico activo) se consiguen mejor cuando el enlace entre el motivo de éster de aminoácido y el modulador no es un sustrato para la actividad peptidasa dentro de la célula, que podría dar como resultado la escisión del aminoácido de la molécula. Por supuesto, la estabilidad a las peptidasas intracelulares se ensaya fácilmente incubando el compuesto con el contenido de células rotas y analizando para determinar cualquier escisión de este tipo.

Con las observaciones generales anteriores en mente, tomando las variables que constituyen el radical -Y-L-X-$[CH_2]_Z$- a su vez:

z puede ser 0 o 1, de modo que un radical metileno unido al modulador es opcional.

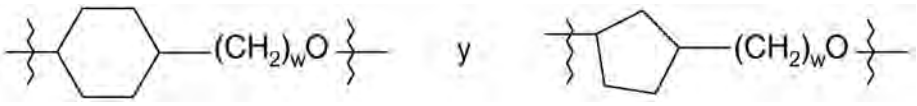
los ejemplos preferidos específicos de Y incluyen un enlace.

En el radical L, los ejemplos de radicales Alq^1 y Alq^2, cuando están presentes, incluyen -CH_2-, -CH_2CH_2-, -$CH_2CH_2CH_2$-, -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -CH=CH-, -CH=$CHCH_2$-, -CH_2CH=CH-, CH_2CH=$CHCH_2$-, -C=C-, -C≡CCH_2-, CH_2C≡C- y CH_2C≡CCH_2. Los ejemplos adicionales de Alq^1 y Alq^2 incluyen -CH_2W-, -CH_2CH_2W-, -$CH_2CH_2WCH_2$-, -$CH_2CH_2WCH(CH_3)$-, -$CH_2WCH_2CH_2$-, -$CH_2WCH_2CH_2WCH_2$- y -WCH_2CH_2- en los que W es -O-, -S-, -NH-, -$N(CH_3)$- o -$CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)CH_2$-. Los ejemplos adicionales de Alq^1 y Alq^2 incluyen radicales ciclopropilo, ciclopentilo y ciclohexilo divalentes.

En L, cuando n es 0, el radical es una cadena hidrocarbonada (opcionalmente sustituida y que quizá tiene un enlace éter, tioéter o amino). En el presente documento se prefiere que no haya sustituyentes opcionales en L. Cuando tanto m como p son 0, L es un radical carbocíclico o heterocíclico mono o bicíclico divalente con 5-13 átomos de anillo (opcionalmente sustituido). Cuando n es 1 y al menos uno de m y p es 1, L es un radical divalente que incluye una cadena o cadenas hidrocarbonadas y un radical carbocíclico o heterocíclico mono o bicíclico con 5-13 átomos de anillo (opcionalmente sustituido). Cuando está presente, Q puede ser, por ejemplo, un radical fenilo, naftilo, ciclopropilo, ciclopentilo o ciclohexilo divalente o un radical heterocíclico mono o bicíclico que tiene de 5 a 13 miembros de anillo, tal como piperidinilo, piperazinilo, indolilo, piridilo, tienilo o pirrolilo, pero en el presente documento se prefiere 1,4-fenileno.

Específicamente, en algunas realizaciones de la invención, m y p pueden ser 0, n siendo 1. En otras realizaciones, n y p pueden ser 0, m siendo 1. En realizaciones adicionales, m, n y p pueden ser todos 0. En más realizaciones adicionales, m puede ser 0, n puede ser 1, siendo Q un radical heterocíclico monocíclico, y p puede ser 0 o 1. Alq^1 y Alq^2, cuando están presentes, pueden seleccionarse entre -CH_2-, -CH_2CH_2- y -$CH_2CH_2CH_2$- y Q puede ser 1,4-fenileno.

Los ejemplos específicos del radical -Y-L-X-$[CH_2]_Z$- incluyen -$(CH_2)_V$-, -$(CH_2)_V$O-,



en los que v es 1, 2, 3 o 4 y w es 1, 2 o 3, tales como -CH_2- y -CH_2O-.

El radical -L-Y^1-

Cuando el éster de alfa aminoácido se conjuga con el inhibidor como un radical de fórmula (IB), este radical (o enlace) surge de la estrategia química particular elegida para unir el carbono alfa del motivo de éster de aminoácido en la fórmula (IB) o (IC) al inhibidor. (En el último caso, el radical -L-Y^1- está unido indirectamente al carbono alfa por medio de los átomos de anillo intervinientes del anillo del sistema B). Claramente, la estrategia química para ese acoplamiento puede variar ampliamente y, por tanto, son posibles muchas combinaciones de las variables L y Y^1.

Por ejemplo, L puede ser como se ha analizado anteriormente en el contexto del radical -Y-L-X-$[CH_2]_Z$-. Por ejemplo, en algunas realizaciones m y n son 1 y p es 0; Q es -O-; y Alq^1 es un radical alquileno C_1-C_6, alquenileno C_2-C_6 o alquinileno C_2-C_6, de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, que pueden contener o terminar opcionalmente en un enlace éter (-O-), tioéter (-S-) o amino (-NR^A-) en el que R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido. En otras realizaciones, m, n y p pueden ser cada uno 1 y, en casos de este tipo, Q puede ser, por ejemplo, un radical 1,4-fenileno o un radical ciclopentilo, ciclohexilo, piperidinilo o piperazinilo. En todas las realizaciones, Y^1 puede ser, por ejemplo, un enlace.

Para los compuestos de la invención que se van a administrar sistémicamente, se prefieren ésteres con una velocidad lenta de escisión por la carboxilesterasa, ya que son menos susceptibles de metabolismo presistémico. Su capacidad para alcanzar su tejido objetivo intacto por tanto aumenta, y el éster puede convertirse dentro de las células del tejido objetivo en el producto ácido. Sin embargo, para la administración local, cuando el éster se aplica ya sea directamente al tejido objetivo o se dirige allí mediante, por ejemplo, inhalación, con frecuencia será deseable que el éster tenga una velocidad rápida de escisión por la esterasa, para minimizar la exposición sistémica y los consiguientes efectos secundarios no deseados. Cuando el motivo de esterasa se une al modulador a través de su grupo amino, como en la fórmula (IA) anterior, si el carbono adyacente al carbono alfa del éster de alfa aminoácido está monosustitiuido, es decir, R_2 es CH_2R^z (siendo R^z el monosustituyente), entonces los ésteres tienden a ser escindidos más rápidamente que si ese carbono está di o trisustituido, como en el caso en el que R_2 es, por ejemplo, fenilo o ciclohexilo. De forma similar, cuando el motivo de esterasa se une al modulador a través de un átomo de carbono como en las fórmulas (IB) y (IC) anteriores, si un átomo de carbono al que están unidos los motivos de esterasa de $R_4NHCH(R_1)$- o R_1-(anillo B)- está sin sustituir, es decir $R_4NHCH(R_1)$- o R_1-(anillo B)- está unido a un radical metileno (-CH_2)-, entonces los ésteres tienden a ser escindidos con más rapidez que si el carbono está sustituido o es parte de un sistema de anillo tal como un anillo de fenilo o ciclohexilo.

Moduladores de enzimas y receptores intracelulares

Los principios de la presente invención pueden aplicarse a moduladores de una amplia gama de objetivos intracelulares que están implicados en una amplia gama de enfermedades. Como se ha analizado, los modos de unión de moduladores conocidos a sus objetivos generalmente se conocen poco después de que se conozcan los propios moduladores. Además, las técnicas modernas, tales como la cristalografía de rayos X y la RMN son capaces de revelar dichas topologías y geometrías de unión, como lo son los procedimientos de química médica tradicional de caracterización de las relaciones estructura-actividad. Con dichos conocimientos, es sencillo identificar dónde en la estructura de un modulador dado puede unirse un motivo de éster de carboxilesterasa sin alterar la unión del modulador a la enzima o receptor mediante el uso de datos estructurales. Por ejemplo, la Tabla 1 enumera algunos objetivos de enzimas o receptores intracelulares para los que existen datos estructurales del cristal publicados. La presente invención se refiere a inhibidores de la p38 MAP cinasa. El resto de los moduladores se proporcionan por referencia.

Tabla 1

Objetivo	Referencia de la estructura cristalina	Enfermedad objetivo
CD45	Nam y col., *J Exp Med* 201, 441 (2005)	Enfermedad autoinmune
Lck	Zhu y col., *Structure* 7, 651 (1999)	Inflamación
ZAP-70	Jin y col., *J Biol Chem* 279, 42818 (2004)	Enfermedad autoinmune
PDE4	Huai y col., *Biochemistry* 42, 13220 (2003)	Inflamación
PDE3	Scapin y col., *Biochemistry* 43, 6091 (2004)	Asma
IMPDH	Intchak y col., *Cell* 85, 921 (1996)	Psoriasis
p38 MAPK	Wang y col., *Structure* 6, 1117 (1998)	Inflamación
COX2	Kiefer y col., *J Biol Chem* 278, 45763, (2003)	Inflamación
Adenosina cinasa	Schumacher y col., *J Mol Biol* 298, 875 (2000)	Inflamación
PLA2	Chandra y col., *Biochemistry* B 10914 (2002)	Psoriasis
PLC	Essen y col., *Biochemistry* 36, 1704, (1997)	Artritis reumatoide
PLD	Leiros y col., *J Mol Biol* 339, 805 (2004)	Inflamación
iNOS	Rosenfeld y col., *Biochemistry* 41, 13915 (2002)	Inflamación
LTA4 hidrolasa	Rudberg y col., *J Biol Chem* 279, 27376 (2004)	Inflamación
ICE	Okamato y col., *Chem Pharm Bull* 47, 11 (1999)	Artritis reumatoide
GSK3β	Bertrand y col., *J Mol Biol* 333, 393 (2003)	Artritis reumatoide
PKC	Xu y col., *JBC* 279, 50401 (2004)	Inflamación
PARP	Ruf y col., *PNAS* (USA) 93, 7481 (1996)	Trastornos proliferativos

(continuación)

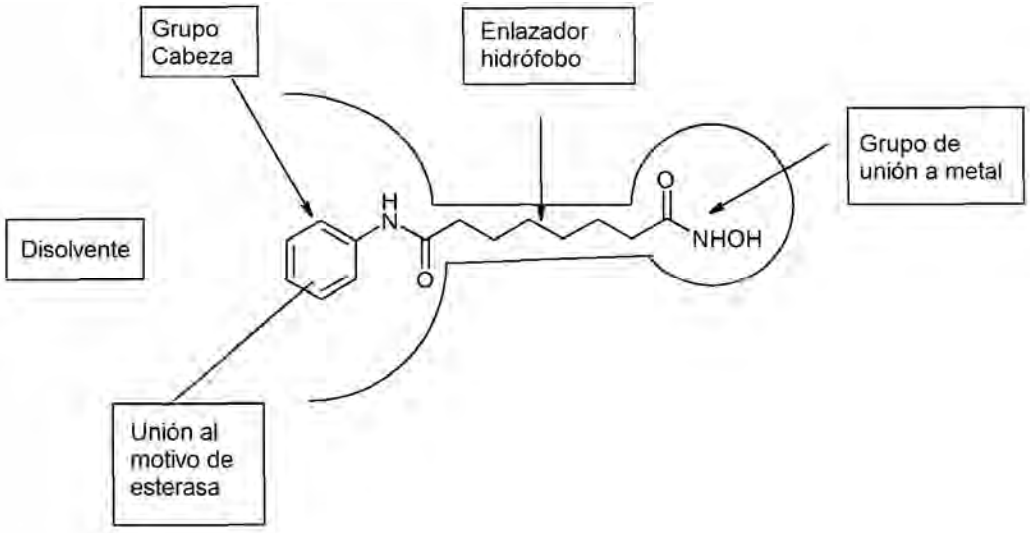
Objetivo	Referencia de la estructura cristalina	Enfermedad objetivo
MetAP2	Sheppard y col. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 865 (2004)	Artritis reumatoide
Receptor de corticoesteroides	Bledsoe y col., *Cell* 110, 93 (2002)	Inflamación
PI3K	Walker y col., *Mol Cell Biol* 6, 909 (2000)	Trastornos proliferativos
Raf	Wan y col., *Cell* 116, 855 (2004)	Trastornos proliferativos
AKT/PKB	Yang y col., *Nat Struct Biol* 9, 940 (2002)	Trastornos proliferativos
HDAC	Finnin y col., *Nature* 401, 188 (1999)	Trastornos proliferativos
c-Abl	Nagar y col., *Cancer Res* 62, 4236 (2002)	Trastornos proliferativos
IGF-1R	Munshi y col., *Acta Crystallogr Sect* D 59, 1725 (2003)	Trastornos proliferativos
Timidilato Sintetasa	Stout y col., *Structure* 6, 839 (1998)	Trastornos proliferativos
Glicinamida Ribonucleótido Formiltransferasa	Klein y col., *J Mol Biol* 249, 153 (1995)	Trastornos proliferativos
Nucleósido de purina fosforilasa	Koelner y col., *J Mol Biol* 280, 153 (1998)	Trastornos proliferativos
Estrona sulfatasa	Hernández-Guzmán y col., *J Biol Chem* 278, 22989 (2003)	Trastornos proliferativos
EGF-RTK	Stamos y col., *J Biol Chem* 277, 46265 (2002)	Trastornos proliferativos
Src cinasa	Lamers y col., *J Mol Biol* 285, 713 (1999)	Trastornos proliferativos
VEGFR2	McTigue y col., *Structure* 7, 319 (1999)	Trastornos proliferativos
Superóxido Dismutasa	Hough y col., *J Mol Biol* 287, 579 (1999)	Trastornos proliferativos
Ornitina Descarboxilasa	Almrud y col., *J Mol Biol* 295, 7 (2000)	Trastornos proliferativos
Topoisomerasa II	Classen y col., *PNAS* (USA) 100, 10629 (2003)	Trastornos proliferativos
Topoisomerasa I	Staker y col., *PNAS* (USA), 99, 15387 (2002)	Trastornos proliferativos
Receptor de andrógenos	Matias y col., *J Biol Chem* 275, 26164 (2000)	Trastornos proliferativos
JNK	Heo y col., *EMBO J* 23, 2185 (2004)	Trastornos proliferativos
Farnesil Transferasa	Curtin y col., *Bioorg Med Chem Lett* 13, 1367 (2003)	Trastornos proliferativos
CDK	Davis y col., *Science* 291, 134 (2001)	Trastornos proliferativos
Dihidrofolato Reductasa	Gargaro y col., *J Mol Biol* 277, 119 (1998)	Trastornos proliferativos
Flt3	Griffith y col., *Mol Cell* 13, 169 (2004)	Trastornos proliferativos
Anhidrasa carbónica	Stams y col., *Protein Sci* 7, 556 (1998)	Trastornos proliferativos
Timidina Fosforilasa	Norman y col., *Structure* 12, 75 (2004)	Trastornos proliferativos
Dihidroporimidina Deshidrogenasa	Dobritzsch y col., *JBC* 277, 13155, (2002)	Trastornos proliferativos
Manosidasa α	Van den Elsen y col., *EMBO J* 20, 3008 (2001)	Trastornos proliferativos
Peptidil-prolil isomerasa (Pin1)	Ranganathan y col., *Cell* 89, 875 (1997)	Trastornos proliferativos
Receptor de retinoide X	Egea y col., *EMBO J* 19, 2592 (2000)	Trastornos proliferativos
β-Glucuronidasa	Jain y col., *Nat Struct Biol* 3, 375 (1996)	Trastornos proliferativos
Glutatión Transferasa	Oakley y col., *J Mol Biol* 291, 913 (1999)	Trastornos proliferativos
hsp90	Jez y col., *Chem Biol* 10, 361 (2003)	Trastornos proliferativos
IMPDH	intchak y col., *Cell* 85, 921 (1996)	Trastornos proliferativos
Fosfolipasa A2	Chandra y col., *Biochemistry* 41, 10914 (2002)	Trastornos proliferativos
Fosfolipasa C	Essen y col., *Biochemistry* 36, 1704, (1997)	Trastornos proliferativos
Fosfolipasa D	Leiros y col., *J Mol Biol* 339, 805 (2004)	Trastornos proliferativos
MetAP2	Sheppard y col., *Bioorg Med Chem Lett* 14, 865 (2004)	Trastornos proliferativos
PTP-1 B	Andersen y col., *J Biol Chem* 275, 7101 (2000)	Trastornos proliferativos
Cinasa aurora	Fancelli y col., en imprenta	Trastornos proliferativos

(continuación)

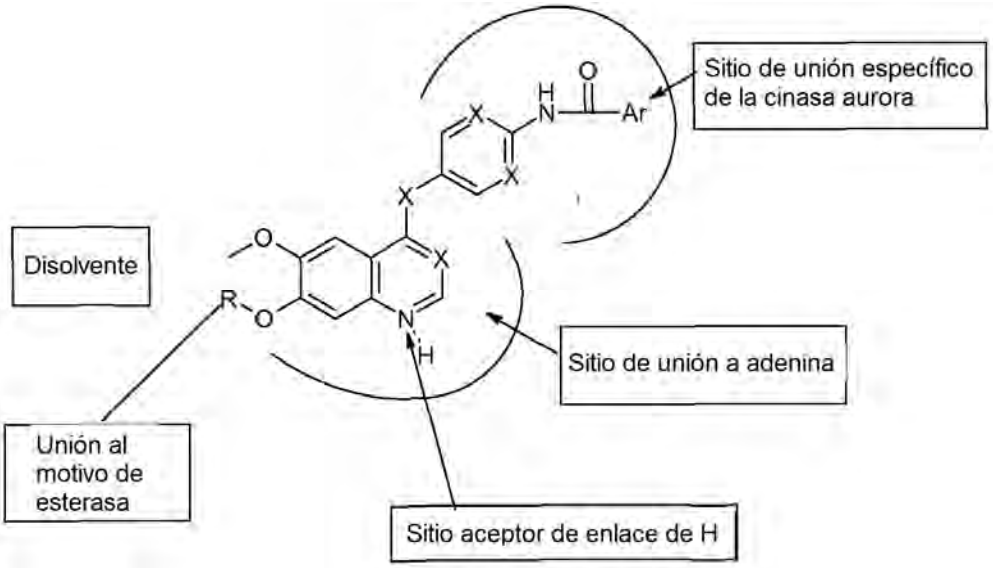
Objetivo	Referencia de la estructura cristalina	Enfermedad objetivo
PDK-1	Komander y col., *Biochem J* 375, 255 (2003)	Trastornos proliferativos
HMGCoA reductasa	Istvan y Deisenhofer *Science* 292, 1160 (2001)	Ateroesclerosis
Oxidoescualeno ciclasa	Lenhart y col., *Chem Biol* 9, 639 (2002)	Hipercolesterolemia
Estimulador de la piruvato deshidrogenasa	Mattevi y col., *Science* 255, 1544 (1992)	Enfermedad cardiovascular
Adenilato ciclasa	Zhang y col., *Nature* 386, 247 (1997)	Enfermedad cardiovascular
Agonista de PPARγ	Ebdurp y col., *J Med Chem* 46, 1306 (2003)	Diabetes
Alcohol deshidrogenasa	Bahnson y col., *PNAS USA* 94, 12797 (1997)	Intoxicación alcohólica
Lipasa sensible a hormonas	Wei y col., *Nat Struct Biol* 6, 340 (1999)	Diabetes resistente a la insulina
Adenosina cinasa	Mathews y col., *Biochemistry* 37, 15607 (1998)	Epilepsia
Aldosa reductasa	Urzhmsee y col.,*Structure* 5, 601 (1997)	Diabetes
Receptor de la vitamina D3	Tocchini-Vatentini y col., *PNAS USA* 98, 5491 (2001)	Osteoporosis
Proteína tirosina fosfatasa	Andersen y col., *J Biol Chem* 275, 7101 (2000)	Diabetes
Proteasa del VIH	Louis y col., *Biochemistry* 37, 2105 (1998)	VIH
Polimerasa del VHC	Bressanelli y col., *PNAS USA* 96, 13034 (1999)	Hepatitis C
Neuraminidasa	Taylor y col., *J Med Chem* 41, 798 (1998)	Gripe
Transcriptasa inversa	Das y col., *J Mol Biol* 264, 1085 (1996)	VIH
Proteasa del CMV	Khayat y col., *Biochemistry* 42, 885 (2003)	Infección por CMV
Timidina cinasa	Champness y col., *Proteins* 32, 350 (1998)	Infecciones por herpes
Integrasa del VIH	Molteni y col., *Acta Crystallogr Sect* D 57, 536 (2001)	VIH

Con fines ilustrativos, se hace referencia a inhibidores conocidos de 5 de los objetivos intracelulares anteriores, cuyo modo de unión al objetivo se conoce. Estos ejemplos ilustran cómo dichos datos estructurales pueden usarse para determinar las posiciones apropiadas para la unión del motivo de éster de carboxilesterasa. Se muestran esquemas de los sitios activos junto con inhibidores representativos. En general, las posiciones distantes de la interfaz de unión entre el modulador y el objetivo y, por tanto, que apuntan para el otro lado de la interfaz de unión de la enzima en el disolvente son lugares adecuados para la unión del motivo de éster de carboxilesterasa y estos se indican en los diagramas.

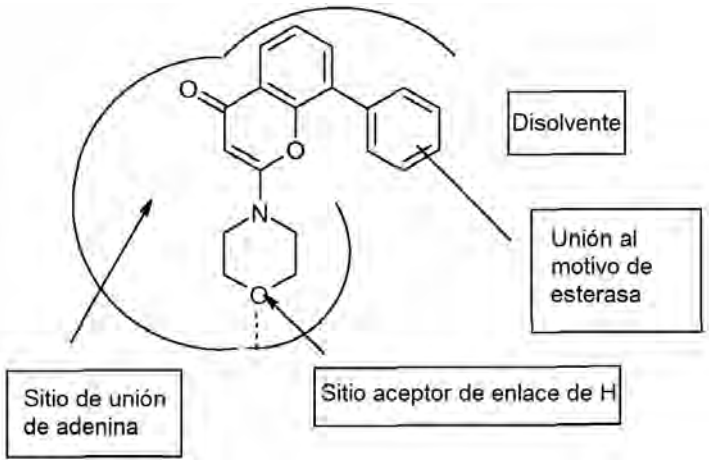
HDAC (Ejemplo de referencia)



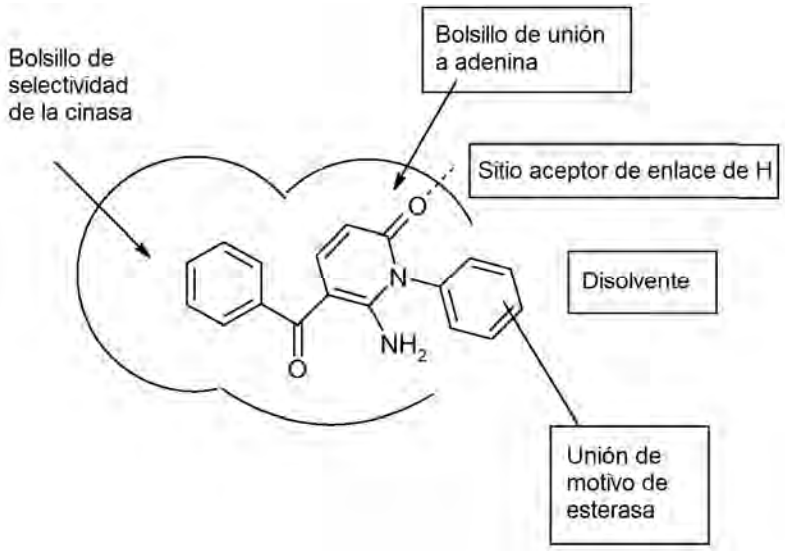
Cinasa aurora **(Ejemplo de referencia)**



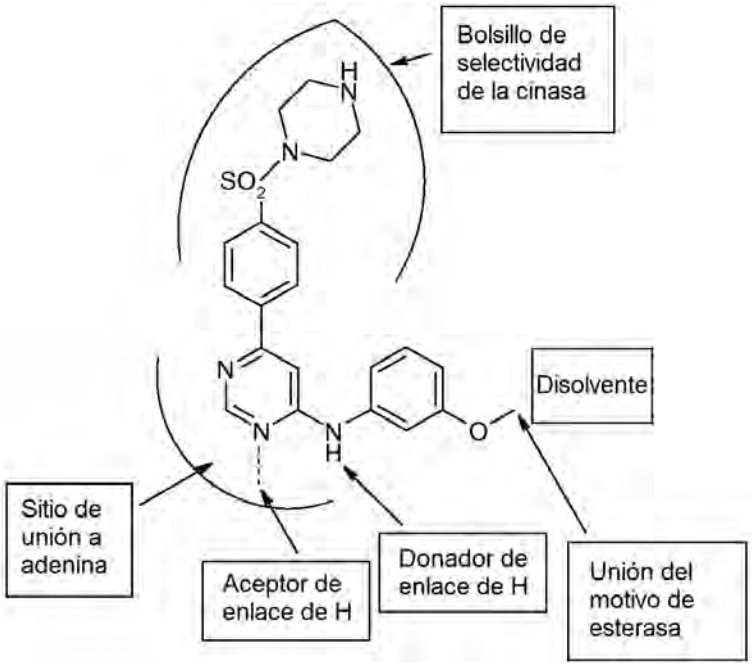
PI3 cinasa **(Ejemplo de referencia)**



P38 MAP cinasa



IKK cinasa (Ejemplo de referencia)



También puede usarse un enfoque similar para los otros ejemplos identificados en la Tabla 1. El procedimiento de la invención para aumentar la potencia celular y/o el tiempo de residencia intracelular de un inhibidor de la actividad de la p38 MAP cinasa objetivo, puede implicar varias etapas:

Etapa 1: Identificar una posición o posiciones en el inhibidor dado de la actividad de la enzima p38 MAP cinasa intracelular objetivo, o en una pluralidad de inhibidores dados de la actividad de la enzima p38 MAP cinasa intracelular objetivo que comparten el mismo modo de unión para la enzima p38 MAP cinasa objetivo, estando dicha posición o posiciones distantes de la interfaz de unión entre los inhibidores y la enzima p38 MAP cinasa intracelular objetivo.

Por lo general dichas posiciones se identifican de la estructura co-cristalina de rayos X (o la estructura derivada de RMN) de la enzima p38 MAP cinasa objetivo con un modulador conocido (o un análogo estructural cercano del mismo) unido a la enzima mediante inspección de la estructura. Como alternativa, la estructura cristalina de rayos X de la enzima p38 MAP cinasa objetivo con el inhibidor anclado en el sitio activo de la enzima se modela mediante procedimientos gráficos de ordenador y el modelo se inspecciona. La suposición es que la modificación estructural del modulador en posiciones distantes de la interfaz de unión es improbable que interfiera significativamente con la unión del modulador al sitio activo de la enzima. Las posiciones adecuadas aparecerán normalmente a partir de la estructura co-cristalina o del modelo de anclaje para orientarse hacia el disolvente.

Etapa 2: Modificar covalentemente el o los inhibidores mediante la unión de un radical éster de alfa aminoácido o una gama de diferentes radicales éster de alfa aminoácido en una o más posiciones de las identificadas en la Etapa 1.

La unión de los radicales éster de alfa aminoácido (es decir, los motivos de carboxilesterasa potenciales) pueden ser a través de un grupo funcional de acoplamiento covalente existente en el o los inhibidores, o a través de un grupo funcional adecuado introducido específicamente para ese fin. Los motivos de carboxilesterasa pueden espaciarse del volumen molecular principal mediante un elemento espaciador o enlazador, para colocar el motivo más profundo en el disolvente y, de este modo, reducir adicionalmente cualquier efecto pequeño del motivo sobre el modo de unión del inhibidor y/o para garantizar que el motivo sea accesible a la carboxilesterasa mediante la reducción de la interferencia estérica que puede ser resultado del volumen molecular principal del inhibidor.

El funcionamiento de la Etapa 2 da como resultado la preparación de uno o, más por lo general, una pequeña biblioteca de inhibidores candidatos, cada uno modificado covalentemente con respecto a su inhibidor parental mediante la introducción de una diversidad de radicales éster de aminoácido, en uno o más puntos de unión identificados en la Etapa 1.

Etapa 3: Ensayar el o los inhibidores conjugados con alfa aminoácido preparados en la etapa 2 para determinar su actividad frente a la enzima p38 MAP cinasa objetivo.

Como es normal en la química médica, la o las versiones del motivo carboxilesterasa del inhibidor o inhibidores parentales, preparados como resultado de realizar las Etapas 1 y 2, se ensayan preferentemente en ensayos apropiados para determinar si la retención esperada de la actividad inhibidora se ha conservado de verdad y en qué

grado y con qué perfil de potencia. De acuerdo con la finalidad subyacente de la invención, que es provocar la acumulación de actividad inhibidora en las células, los ensayos adecuados normalmente incluirán los ensayos en estirpes celulares para evaluar el grado de actividad celular, el perfil de potencia del inhibidor modificado. Otros ensayos que pueden emplearse en la Etapa 3 incluyen ensayos de inhibición de la enzima o el receptor in vitro para determinar la actividad intrínseca del inhibidor modificado y su supuesto producto de hidrólisis por carboxilesterasa; ensayos para determinar la velocidad de conversión de los inhibidores modificados en el ácido carboxílico correspondiente por carboxilesterasas; y ensayos para determinar la velocidad y/o el nivel de acumulación del producto de hidrólisis por carboxilesterasa (el ácido carboxílico) en las células. En dichos ensayos, las células tanto monocíticas como no monocíticas, y/o un panel de carboxilesterasas aisladas, pueden usarse para identificar compuestos que muestren selectividad celular.

En caso necesario o deseable, la Etapa 3 puede repetirse con un conjunto diferente de versiones de conjugado de éster de alfa aminoácido candidatas del inhibidor parental.

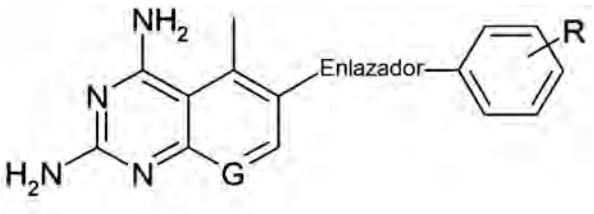
Etapa 4: A partir de los datos obtenidos en la Etapa 3, se seleccionan una o más de las versiones de conjugado de éster de alfa aminoácido ensayadas del modulador o moduladores parentales que provoque la inhibición de la enzima p38 MAP cinasa dentro de las células, que se conviertan y se acumulen como el correspondiente ácido carboxílico dentro de las células y que muestren una potencia celular aumentada o prolongada.

Las Etapas 1-4 descritas anteriormente representan un algoritmo general para la implementación de los principios de la presente invención. La aplicación del algoritmo se ilustra en el Ejemplo A a continuación, aplicado a un inhibidor conocido de la enzima intracelular dihidrofolato reductasa (DHFR).

Ejemplo de Referencia A

El ácido fólico (pteroilglutámico) es una vitamina que es un componente clave en la biosíntesis de los nucleótidos púricos y pirimidínicos. Después de su absorción, el folato de la dieta se reduce a dihidrofolato y, después, se reduce adicionalmente a tetrahidrofolato mediante la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). La inhibición de la DHFR conduce a una reducción en la biosíntesis de los nucleótidos que da como resultado la inhibición de la biosíntesis de ADN y una división celular reducida. Los inhibidores de la DHFR se usan ampliamente en el tratamiento del cáncer (Bertino J, *J. Cin. Oncol.* 11, 5-14, 1993), las enfermedades proliferativas tales como la artritis reumatoide (Cronstein N., *Pharmacol. Rev*. 57, 163-1723), la psoriasis y el rechazo de trasplantes. Los inhibidores de la DHFR también han encontrado un uso como agentes antiinfecciosos (Salter A., *Rev. Infect. Dis.* 4, 196-236, 1982) y antiparasitarios (Plowe C. *BMJ* 328, 545-548, 2004).

Se han señalado muchos tipos de compuestos inhibidores de la DHFR y varios compuestos de este tipo se usan como agentes antineoplásicos, antiinflamatorios, antiinfecciosos y antiparasitarios. A continuación se muestra una matriz general para los inhibidores de la DHFR conocidos:



G = N o CH

1

El metotrexato, ácido (*S*)-2-(4-(((2,4-diaminopteridin-6-il)metil)metilamino)-benzamido)pentanodioico, es el inhibidor de la DHFR más ampliamente usado y contiene un grupo funcional glutamato que permite que se transporte activamente al interior de las células y se mantenga allí. Sin embargo, las células cancerosas pueden volverse resistentes al metotrexato mediante la modificación de su mecanismo de transporte activo. Además, las células que no son de mamífero carecen del sistema de transporte activo y el metotrexato tiene una utilidad limitada como agente antiinfeccioso. Por tanto, se han desarrollado inhibidores lipófilos de la DHFR tales como el trimetrexato (2,4-diamino-5-metil-6-[(3,4,5-trimetoxianilino)metil]quinazolina) **(2 G = CH)** (patente del RU 1345502) y análogos tales como **(2 G = N)** (Gangjee y col., *J. Med. Chem.* 1993, 36, 3437-3443) que pueden ser captados por difusión pasiva, tanto para sortear la resistencia de las células cancerosas como para su uso como agentes antiinfecciosos.

2

Sin embargo, los agentes que difunden pasivamente al interior de las células también salen de la célula fácilmente y no son retenidos fácilmente dentro de la célula. Por tanto, un inhibidor de la DHFR modificado de acuerdo con la presente invención, que es lipófilo pero cuya actividad se acumula dentro de la célula podría tener ventajas significativas. Además, ambas clases de inhibidores de la DHFR tienen efectos secundarios que limitan las dosis que pueden usarse en la clínica. Un inhibidor de la DHFR cuya actividad de acumula selectivamente en los macrófagos podría tener valor ya que se sabe que los macrófagos, a través de la producción de citocinas, desempeñan un papel principal en los trastornos inflamatorios y están aumentando las pruebas de que tienen un papel negativo en el cáncer.

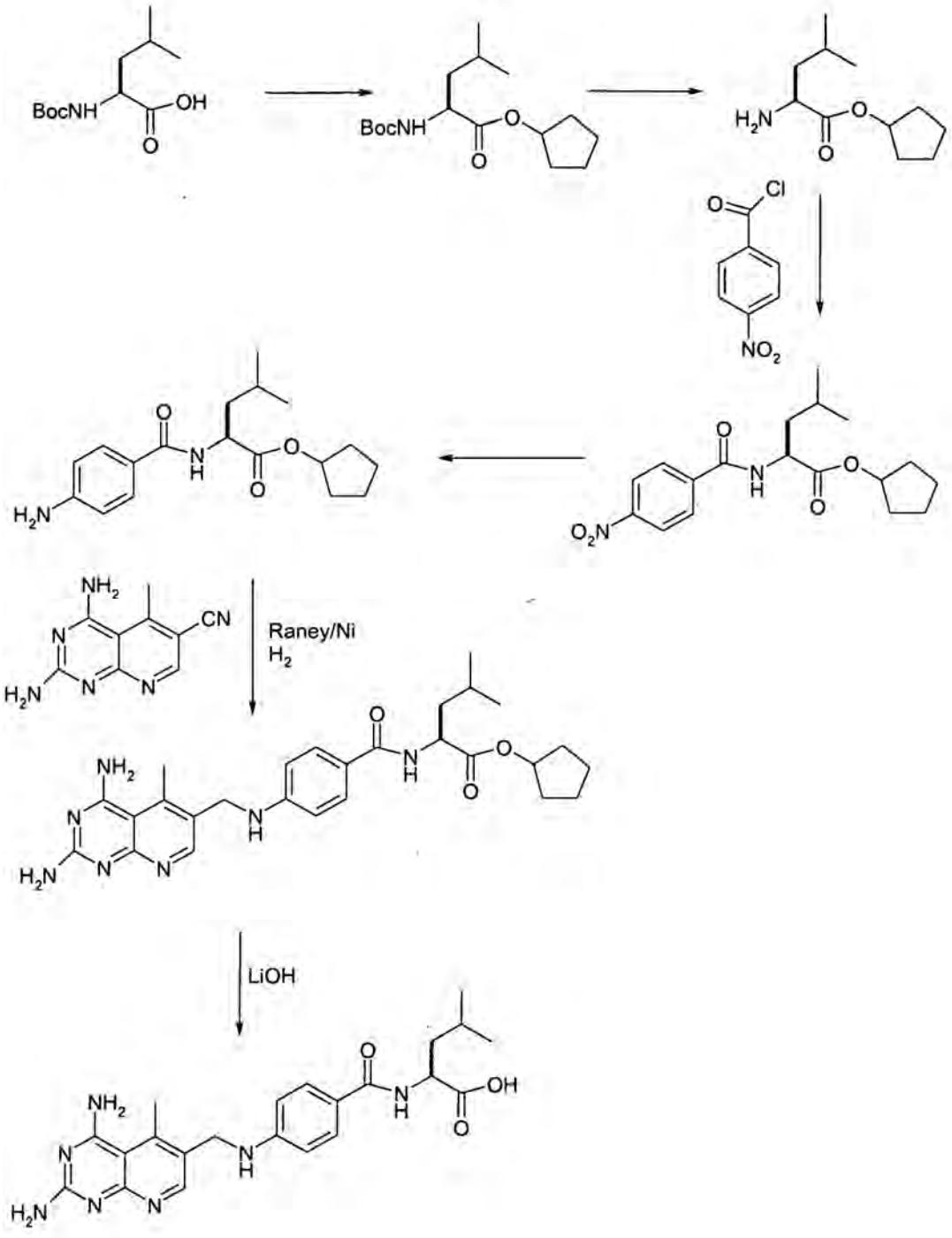
Etapa 1 del algoritmo general descrito anteriormente

La estructura de RMN de la DHFR con trimetrexato (2 G = CH) anclado en el sito activo se ha publicado (Polshakov, V.I. y col., *Protein Sci.* 1999, 8 ,467-481) y es evidente que la posición más apropiada para colocar un motivo de carboxilesterasa de acuerdo con la invención estaba en el anillo de fenilo como se muestra a continuación. Se dedujo que también sería adecuada la unión a este punto en análogos estructurales cercanos conocidos del trimetrexato, tales como **(2 G = N)**. La Figura 2 muestra (2 G = N) anclado a la DHFR lo que demuestra que un punto adecuado de unión está en la posición 4 del anillo aromático ya que este apunta para el otro lado del sitio activo de la enzima.

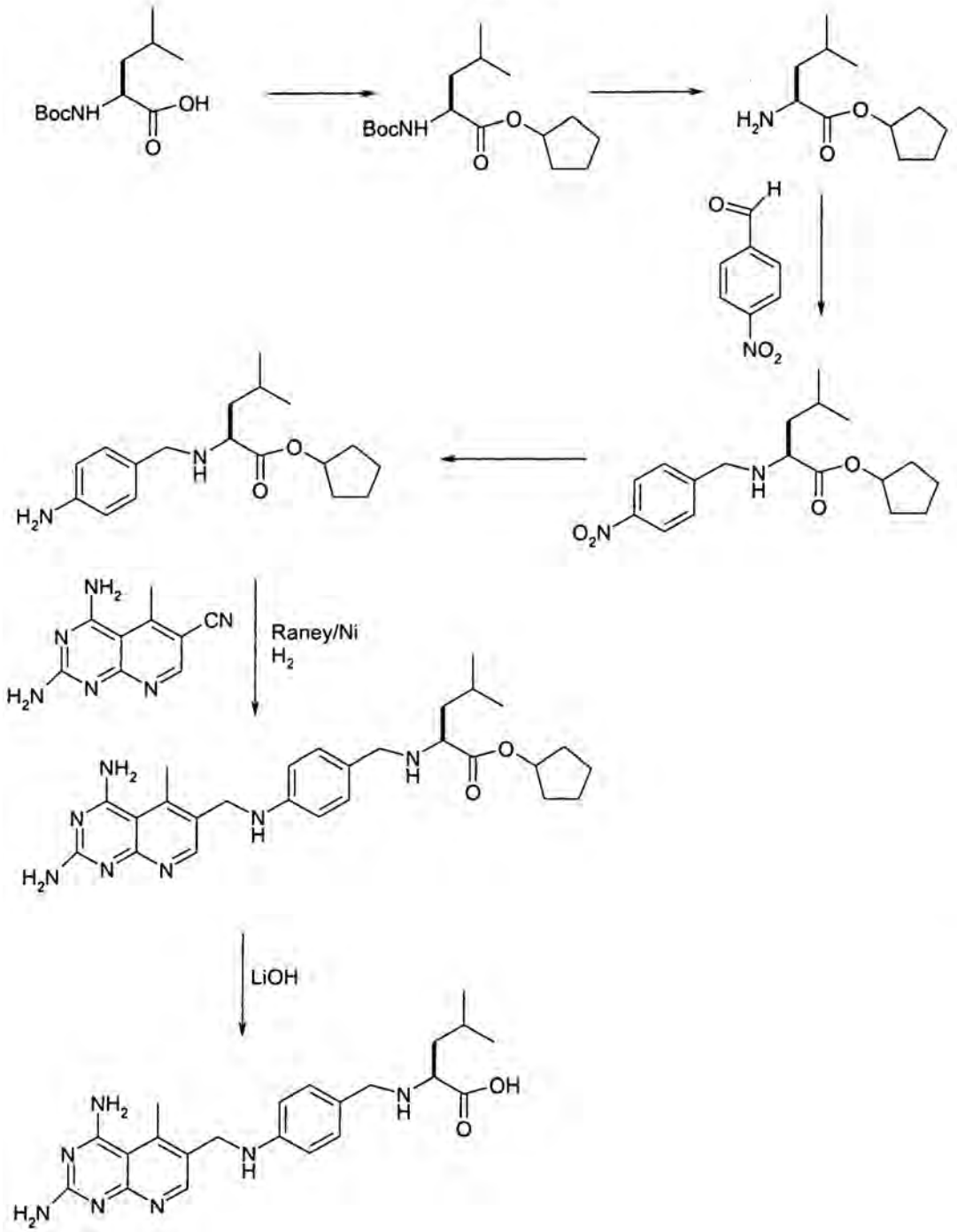
Etapa 2 del algoritmo general descrito anteriormente

Los compuestos en los que el motivo de carboxilesterasa está unido a través de su nitrógeno del alfa aminoácido se prepararon como se muestra en los esquemas I y II. Dentro de esta serie se fabricaron compuestos con y sin un carbonilo para identificar los compuestos selectivos para macrófagos potenciales.

Esquema I

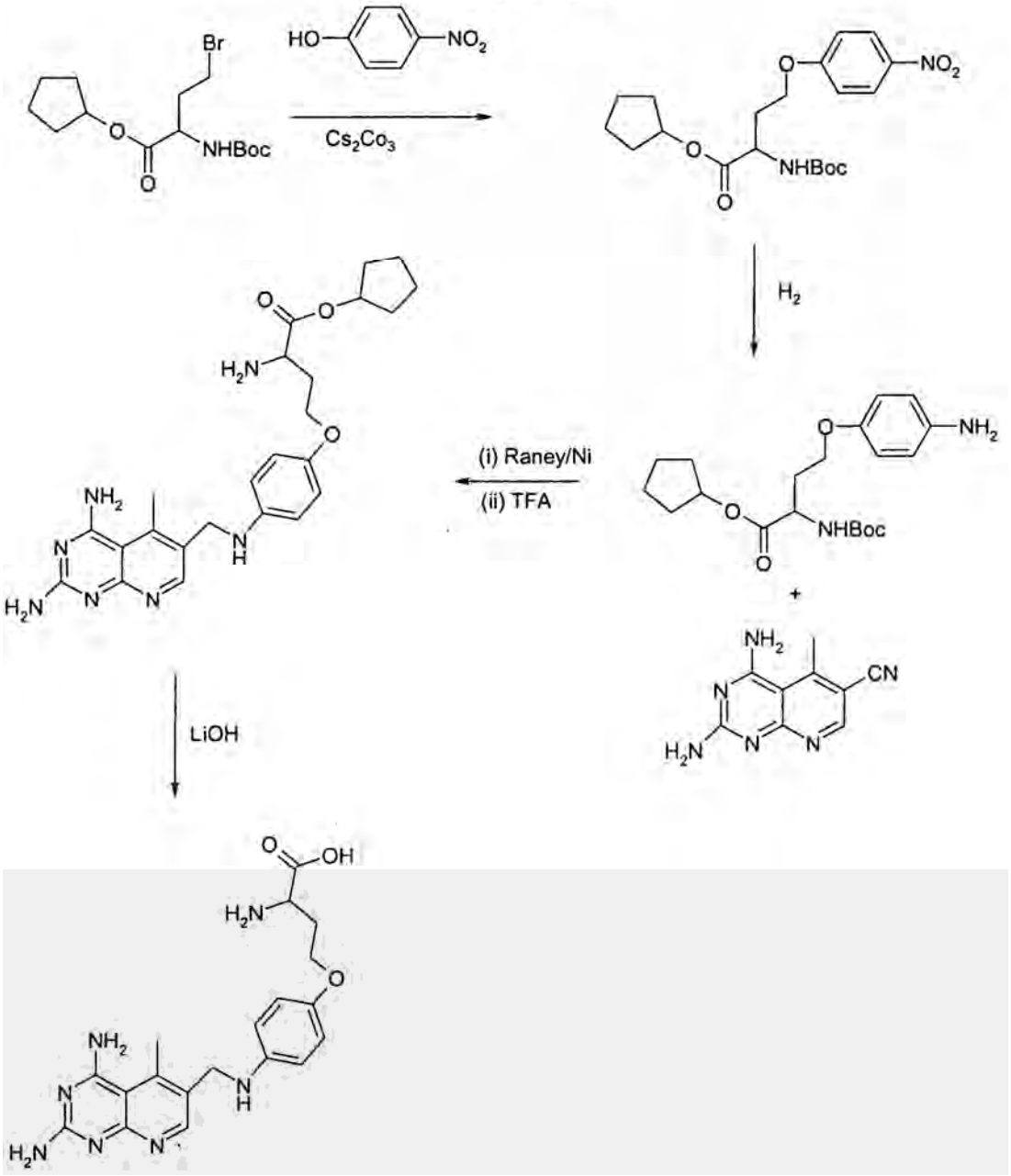

BocNH
OH
O
BocNH
O
O
H2N
O
O
Cl
NO2
O2N
N
H
O
O
O
H2N
O
N
H
O
O
NH2
N
N
H2N
N
CN
Raney/Ni
H2
NH2
N
N
H2N
N
N
H
O
N
H
O
O
LiOH
NH2
N
N
H2N
N
N
H
O
N
H
OH
O

Esquema II

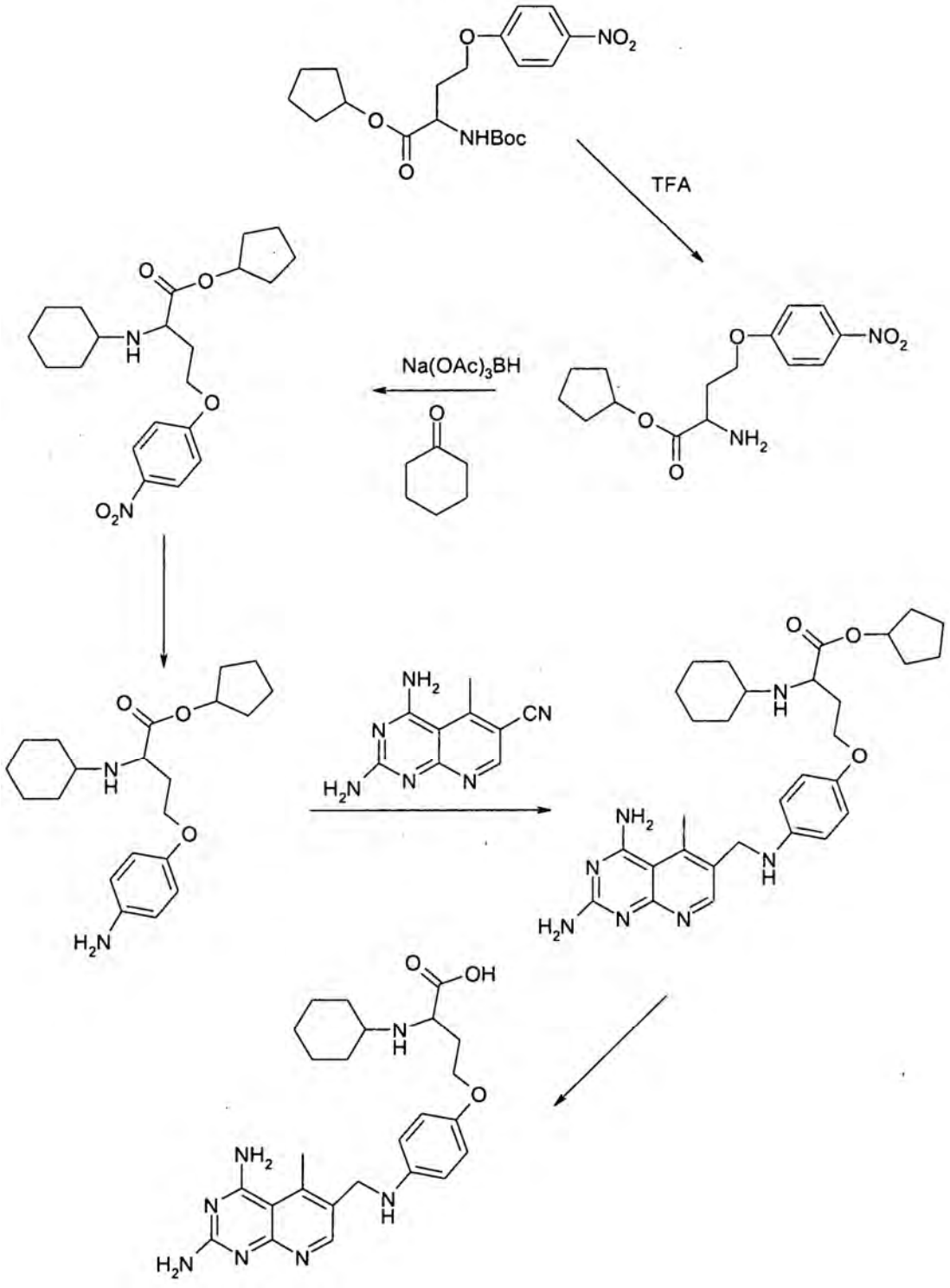


También se fabricaron compuestos en los que el motivo de esterasa se unió al modulador a través de la cadena lateral del alfa aminoácido, esquemas III y IV. Dentro de esta serie, también se prepararon compuestos con sustitución alquílica en el nitrógeno para identificar compuestos selectivos de macrófagos (Esquema IV).

Esquema III


Br
HO
NO2
Cs2Co3
NHBoc
O
NO2
NHBoc
H2
NH2
(i) Raney/Ni
(ii) TFA
NHBoc
+
NH2
CN
LiOH
OH
NH2
NH
H2N

Esquema IV



Etapa 3 del algoritmo general descrito anteriormente

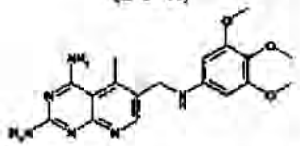
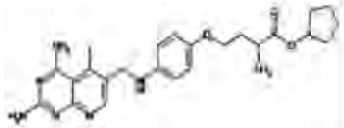
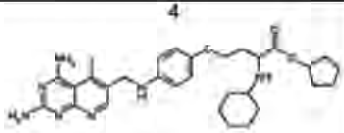
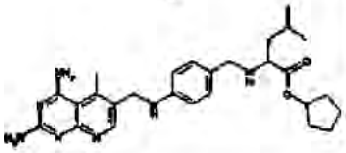
Los compuestos que incluyen el análogo del trimetrexato **(2 G = N)** se ensayaron en el ensayo de la enzima DHFR, el ensayo de proliferación celular, usando estirpes celulares tanto monocíticas como no monocíticas, y el ensayo de células rotas con el fin de evaluar la escindibilidad de los ésteres mediante estirpes celulares tanto monocíticas como no monocíticas. Los detalles de todos estos ensayos se proporcionan a continuación.

Etapa 4 del algoritmo general descrito anteriormente

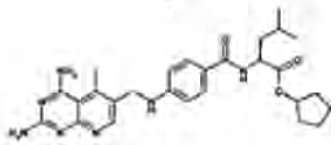
Como se muestra en la Tabla 2 se identificaron compuestos cuyos ácidos tienen una actividad frente a la enzima comparable al análogo trimetrexato **(2 G = N)**. También puede verse que alterar el modo en el que el motivo de esterasa se une puede conducir a un compuesto (6) que es 100 veces más potente en células U937 y 15 veces más potente en HCT116 que el análogo sin modificar **(2 G=N)**.

Además, las modificaciones ya sea del enlazador o del sustituyente en el nitrógeno del motivo de esterasa permitieron la identificación de los compuestos **4** y **5** que mostraron escisión selectiva en estirpes celulares monocíticas pero no en las no monocíticas y que eran significativamente más antiproliferativas en las estirpes celulares monocíticas que en las estirpes celulares no monocíticas (véase la tabla 2).

Tabla 2

Compuesto		U937 (Estirpe celular monocítica)			HcT11& [estirpe celular no monocítica)		
	CI50 nM de enzima [1](ácido)	CI50 nM proliferación celular	Relación de GI50 célula/enzima	Ácido producido [2]ng/ml	CI50 nM proliferación celular	Relación de GI50 célula/enzima	Ácido producido [3]ng/ml
(2 G=N) 	10	2200	220	NA	1700	170	NA
3 	2700 (11)	5100	1,9	80	7300	1,4	180
4 	1033(25)	310	0,3	970	6900	6,6	40
5 	4000 [10)	310	0,8	210	6700	1,7	2

(Continuación

Compuesto		U937 (Estirpe celular monocitica)			HcT11& [estirpe celular no monocitica)		
	CI50 nM de enzima [1](ácido)	CI50 nM proliferación celular	Relación de GI50 célula/enzima	Ácido producido [2]ng/ml	CI50 nM proliferación celular	Relación de GI50 célula/enzima	Ácido producido [2]ng/ml
6 	1700 (8)	23	0,013	110	110	0,04	150

Notas

[1] Las figuras entre paréntesis se refieren a la CI50 de la enzima para el ácido resultante de la escisión de los esteres

[2] La cantidad de ácido producido después de la incubación del éster durante 80 minutos en el ensayo de carboxilesterasa en células rotas que se describe a continuación

ES 2 577 433 T3

Usando estrategias similares el concepto se ha aplicado satisfactoriamente a una gama de objetivos intracelulares como se esboza en los ejemplos a continuación.

Los siguientes Ejemplos se presentan a modo de ilustración adicional de los principios de la presente invención. En la síntesis de compuestos que se describe a continuación:

Se usaron reactivos y disolventes disponibles en el mercado (de calidad para HPLC) sin purificación adicional. La irradiación con microondas se realizó usando un reactor de microondas enfocado CEM Discover. Los disolventes se retiraron usando un GeneVac Series I sin calentamiento o un Genevac Series II con VacRamp a 30 ºC.
La purificación de los compuestos mediante columna de cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice, tamaño de partícula de 40-63 µm (malla 230-400) obtenido de Silicycle. La purificación de los compuestos mediante HPLC preparativa se realizó en sistemas Gilson usando columnas de fase inversa ThermoHypersil-Keystone Hyperprep HS C18 (12 µm, 100 × 21,2°mm), gradiente de 20-100 % de B (A = agua/0,1 % de TFA, B = acetonitrilo/0,1 % de TFA) durante 9,5 min, caudal = 30 ml/min, disolvente de inyección DMSO:acetonitrilo 2:1 (1,6 ml), detección UV a 215 nm.

Los espectros de RMN ^{1}H se registraron usando un espectrómetro Bruker 400 MHz AV en disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) están en partes por millón. El análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se realizó con placas Kieselgel 60 F_{254} (Merck) y se visualizó usando luz UV. El análisis por HPCLEM analítica se realizó en sistemas Agilent HP1100, Waters 600 o Waters 1525 LC usando columnas de fase inversa Hypersil BDS C18 (5 µm, 2,1 × 50°mm), gradiente de 0-95 % de B (A = agua/0,1 % de TFA, B = acetonitrilo/0,1 % de TfA) durante 2,10 min, caudal = 1,0 ml/min. Los espectros de UV se registraron a 215 nm usando un detector de diodos en serie Gilson G1315A, un detector de UV G1214A de una sola longitud de onda, un detector de UV Waters 2487 de doble longitud de onda, un detector de UV Waters 2488 de doble longitud de onda o un detector de UV de diodos en serie Waters 2996. Los espectros de masas se obtuvieron en el intervalo m/z de 150 a 850 a una velocidad de muestreo de 2 exploraciones por segundo o de 1 exploración cada 1,2 segundos usando Micromass LCT con interfaz de pulverización Z o Micromass LCT con interfaz de pulverización Z o MUX. Los datos se integraron y se presentaron usando el software OpenLynx y OpenLynx Browser.

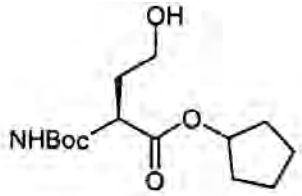
Se han usado las siguientes abreviaturas:

MeOH = MeOH
EtOH = EtOH
EtOAc = EtOAc
Boc = terc-butiloxicarbonilo
DCM = DCM
DMF = dimetilformamida
DMSO = dimetilsulfóxido
TFA = ácido trifluoroacético
THF = tetrahidrofurano
Na_2CO_3 = carbonato de sodio
HCl = ácido clorhídrico
DIPEA = diisopropiletilamina
NaH = hidruro de sodio
NaOH = hidróxido de sodio
$NaHCO_3$ = carbonato ácido de sodio
Pd/C = paladio sobre carbono
TBME = éter metil terc-butílico
N_2 = nitrógeno
PyBop = Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
Na_2SO_4 = sulfato de sodio
Et_3N = trietilamina
NH_3 = amoníaco
TMSCI = trimetilclorosilano
NH_4Cl = cloruro de amonio
$LiAlH_4$ = hidruro de litio-aluminio
PyBrOp = Hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino fosfonio
$MgSO_4$ = $MgSO_4$
^{n}BuLi = n-butil-litio
CO_2 = dióxido de carbono
EDCI = clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida
Et_2O = éter dietílico
LiOH = hidróxido de litio
HOBt = 1-hidroxibenzotriazol
DLE = Dispersión de luz evaporativa

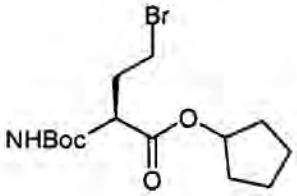
CCF= cromatografía en capa fina
ml = mililitro
g =gramo o gramos
mg= miligramo o miligramos
mol = moles
mmol =milimol o milimoles
CL/EM = cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas
RMN= resonancia magnética nuclear
t.a.= temperatura ambiente.
min =minuto o minutos
h= hora u horas

INTERMEDIOS

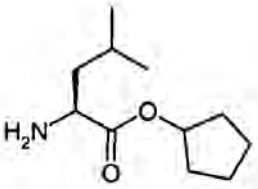
Se usaron los siguientes componentes básicos para la síntesis de los moduladores modificados:



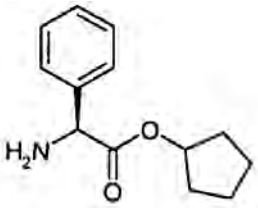
Éster ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-butírico



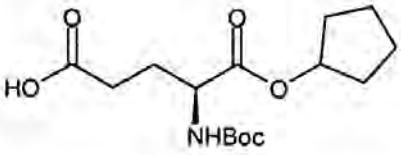
Éster ciclopentílico del ácido (S)-4-bromo -2-terc-butoxicarbonilamino-butírico



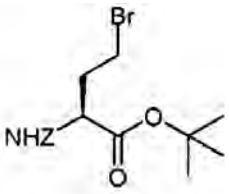
Éster ciclopentílico del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico



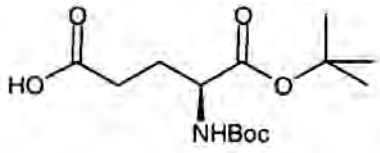
Éster ciclopentílico del ácido (S)-amino-fenil-acético



Éster 1-ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico

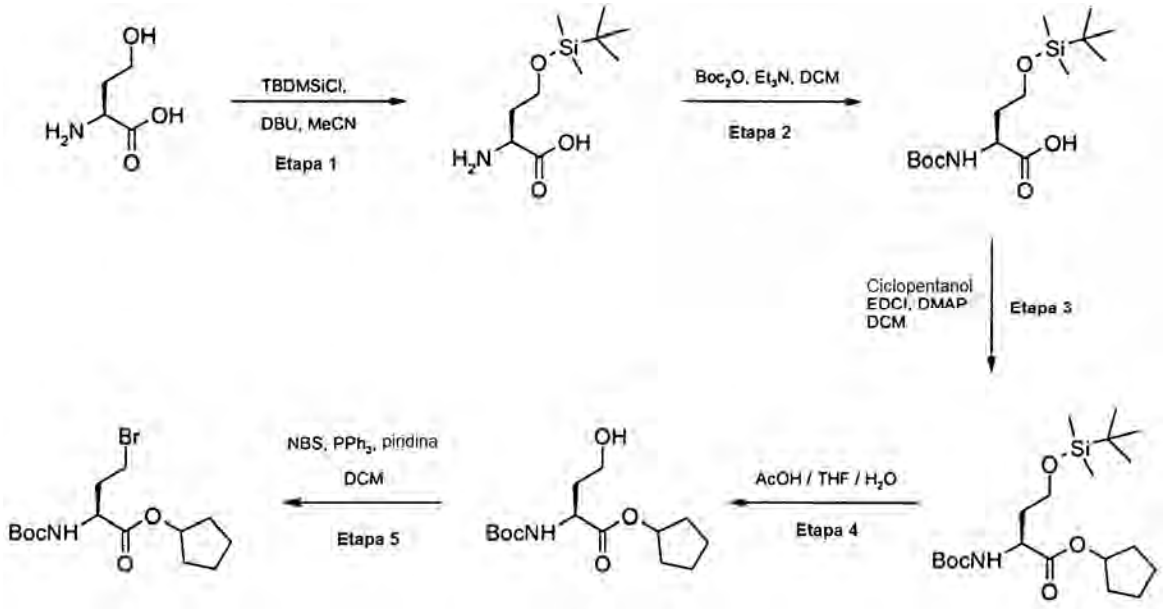


Éster terc-butílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-4-bromo-butírico

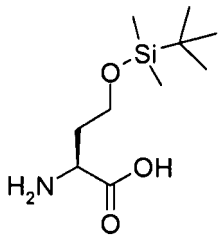


Éster 1-terc butílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico

Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-butírico y éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-butírico

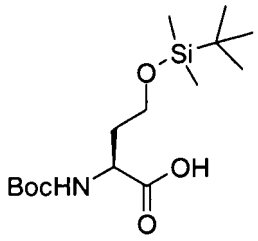


Etapa 1 - Síntesis de ácido (S)-2-amino-4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)butírico



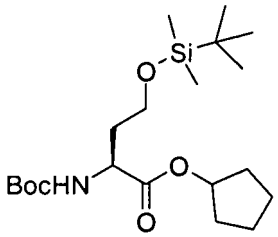
A una suspensión de L-homoserina (1 g, 8,4°mmol) en acetonitrilo (10 ml) a 0 ºC se le añadió 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (1,32 ml, 8,8°mmol, 1,05 eq). Después se añadió en porciones cloruro de terc-butil-dimetilsililo (1,33 g, 8,8°mmol, 1,05 eq) en 5 minutos y la mezcla de reacción se dejó calentar a t.a. y se agitó durante 16 horas. Se formó un precipitado de color blanco que se retiró por filtración y se lavó con acetonitrilo antes de secar al vacío. El compuesto del título se aisló en forma de un sólido de color blanco (1,8 g, 92 %). RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO), δ: 7,5 (1H, s a), 3,7 (1H, m), 3,35 (4H, m a), 1,95 (1H, m), 1,70 (1H, m), 0,9 (9H, s), 0,1 (6H, s).

Etapa 2 - Síntesis de ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)butírico



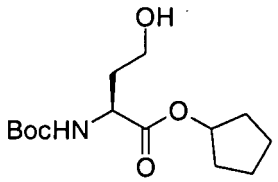
Una suspensión del producto de la Etapa 1 (1,8 g, 7,7°mmol) en DCM (100 ml) a 0 ºC se trató con trietilamina (2,15 ml, 15,4°mmol, 2 eq) y dicarbonato de di-terc-butilo (1,77 g, 8,1°mmol, 1,05 eq). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 16 horas para completar la reacción. El DCM se retiró a presión reducida y la mezcla se trató con EtOAc/salmuera. La fase de EtOAc se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se usó sin purificación adicional (2,53 g, 99 %). RMN ^{1}H (500 MHz, CDCl3), δ: 7,5 (1H, s a), 5,85 (1H, d, J = 6,5 Hz), 4,3 (1H, m), 3,75 (2H, m), 1,95 (2H, m), 1,40 (9H, s), 0,85 (9H, s), 0,1 (6H, s).

Etapa 3 – Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-(terc-butil-cimetil-silaniloxi)-butírico



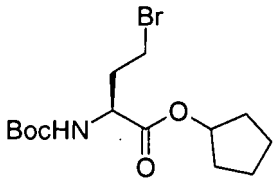
A una solución del producto de la Etapa 2 (2,53 g, 7,6°mmol) en DCM (50 ml) a 0 ºC se le añadió ciclopentanol (1,39 ml, 15,3°mmol, 2 eq), EDCl (1,61 g, 8,4°mmol, 1,1 eq) y DMAP (0,093 g, 0,76°mmol, 0,1 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a t.a. antes de la evaporación a presión reducida. El residuo en bruto se disolvió en EtOAc (100 ml) y se lavó con HCl 1 M, Na_2CO_3 1 M y salmuera. La fase orgánica se secó después sobre $MgSO_4$ y se evaporó a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc/heptano (1:4) para proporcionar el compuesto de título (2,24 g, 73 %). Pureza por CLEM del 100 %, m/z 402,5 [M^++H], RMN ^{1}H (250 MHz, CDCl3), δ: 5,2 (1H, d, J = 6,3 Hz), 5,15 (1H, m), 4,2 (1H, m), 3,6 (2H, m), 2,0 (1H, m), 1,95-1,55 (9H, m a), 1,4 (9H,s), 0,85 (9H,s), 0,1 (6H,s).

Etapa 4 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-butírico



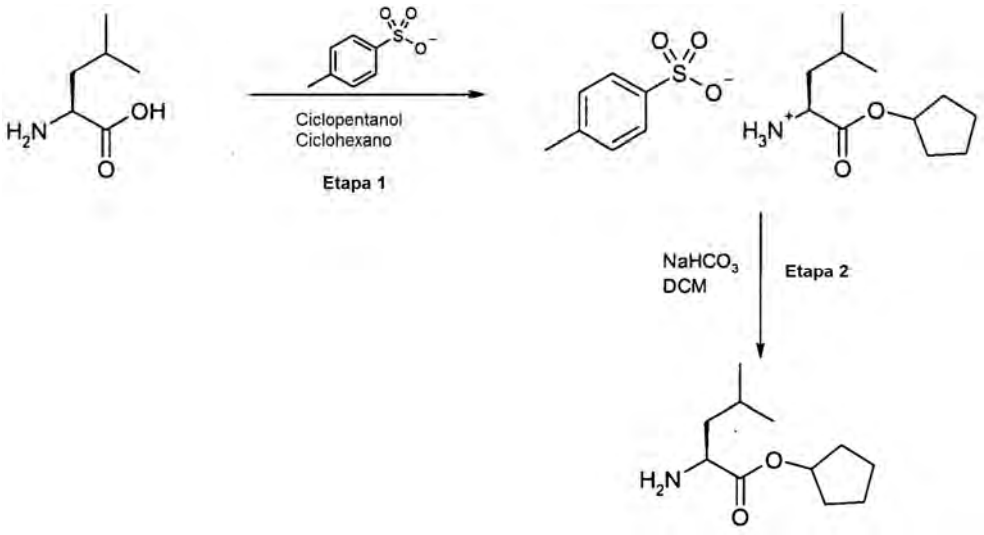
El producto de la Etapa 3 (1,57 g, 3,9°mmol) se disolvió en ácido acético:THF:agua (3:1:1, 100 ml). La mezcla de reacción se agitó a 30 ºC durante 16 horas para completar la reacción. Se añadió EtOAc (200 ml) y se lavó con Na_2CO_3 1 M, HCl 1 M y salmuera. Los extractos de EtOAc se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el producto en forma de un aceite transparente que cristalizó en reposo (1,0 g, 95 %). Pureza por CLEM del 100 %, m/z 310,3 [M^++Na], RMN ^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$), δ: 5,4 (1H, d, J = 6,5 Hz), 5,2 (1H, m), 4,4 (1H, m), 3,65 (2H, m), 2,15 (1H, m), 1,9-1,55 (9H, m a), 1,45 (9H, s).

Etapa 5 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-4-bromo-2-terc-butoxicarbonilamino-butírico

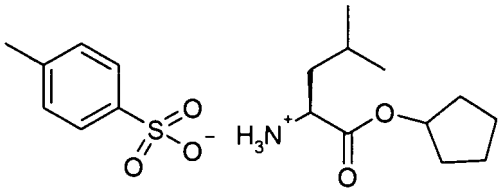


A una suspensión de N-bromo succinimida (1,86 g, 10,4°mmol) en DCM (16,2 ml) se le añadió una solución de trifenilfosfina (2,56 g, 9,74°mmol) en DCM (7,2 ml). La solución se agitó durante 5 minutos adicionales tras la adición. Se añadió piridina (338 µl, 4,18°mmol) seguida de una solución de producto de la Etapa 4 (1,00 g, 3,48°mmol) en DCM (8,8 ml). La solución se agitó durante 18 horas, se concentró a presión reducida y el disolvente residual se destiló azeotrópicamente con tolueno (16 ml, 3 veces). El residuo se trituró con éter dietílico (10 ml) y acetato de etilo:heptano (1:9, 10 ml, 2 veces). Las soluciones combinadas de éter y heptano se concentraron en sílice y se purificaron mediante cromatografía en columna eluyendo con EtOAc/heptano (1:9 a 2:8) para proporcionar el compuesto de título (1,02 g, 84 %). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 5,30-5,05 (2H, m), 4,45-4,30 (1H, m), 3,45 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,50-2,30 (1H, m), 2,25-2,10 (1H, m), 1,95-1,60 (8H, m a), 1,47 (9H, s).

Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico

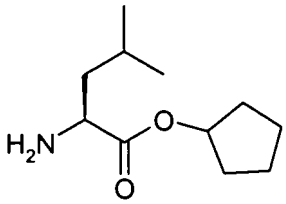


Etapa 1 - Síntesis de ácido tolueno-4-sulfónico éster ciclopentílico del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico



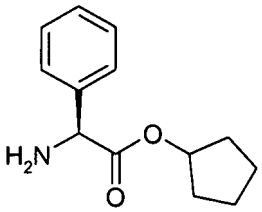
A una suspensión de (S)-leucina (15 g, 0,11 mol) en ciclohexano (400 ml) se le añadieron ciclopentanol (103,78 ml, 1,14°mmol) y ácido p-toluenosulfónico (23,93 g, 0,13°mmol). La suspensión se calentó a reflujo para efectuar el sulfato. Después de calentar a reflujo la solución durante 16 horas, se enfrió para proporcionar una suspensión de color blanco. A la mezcla se le añadió heptano (500 ml) y la suspensión se filtró para proporcionar el producto en forma de un sólido de color blanco (35 g, 85 %). RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD), δ: 1,01 (6H, t, J = 5,8 Hz), 1,54-2,03 (11H, m), 2,39 (3H, s), 3,96 (1H, t, J = 6,5 Hz), 5,26-5,36 (1H, m), 7,25 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,72 (2H, d, J = 8,3 Hz).

Etapa 2 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanoico



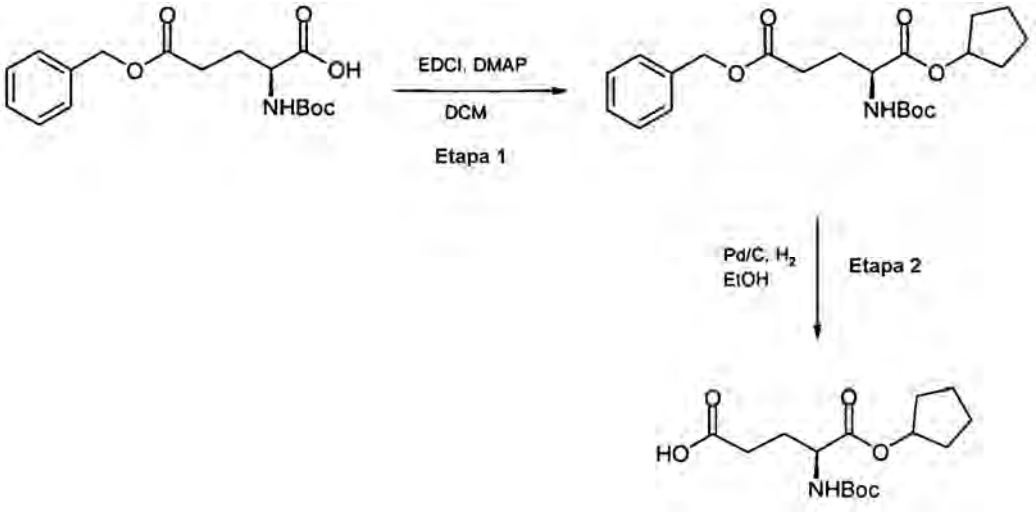
Una solución del producto de la Etapa 1 (2,57 g, 0,013 mol) en DCM (5 ml) se lavó con una solución de $NaHCO_3$ saturada acuosa (3 ml, 2 veces). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con DCM (4 ml, 3 veces). Las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$) y el disolvente se retiró al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (1,10 g, 80 %). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), δ: 0,90 (6H, t, J = 6,4 Hz), 1,23-1,94 (11H, m), 3,38 (1H, dd, J = 8,4, 5,9 Hz), 5,11-5,22 (1H, m).

Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-amino-fenil-acético

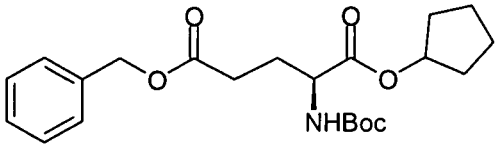


Se preparó éster ciclopentílico del ácido (S)-amino-fenil-acético a partir de ácido (S)-amino-fenil-acético siguiendo el mismo procedimiento usado para la síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-amino-4-metil-pentanoico.

Síntesis de éster 1-ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico

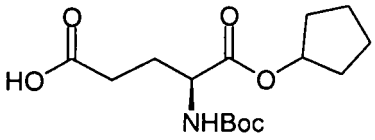


Etapa 1 - Síntesis de éster 1-ciclopentílico del éster 5-bencílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico



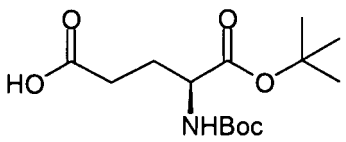
A una solución agitada de éster 5-bencílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico (5 g, 14,8°mmol) en una mezcla de DCM (50 ml) y DMF (30 ml) a 0 ºC se le añadieron ciclopentanol (2,7 ml, 29,6°mmol), EDCI (4,25 g, 22,2°mmol) y DMAP (0,18 g, 1,48°mmol). La agitación continuó a t.a. durante la noche, tiempo después del cual la CLEM mostró la finalización de la reacción. El DCM se retiró a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (200 ml), se lavó con agua (100 ml), HCl acuoso 1 M (50 ml) seguido de $NaHCO_3$ acuoso saturado (50 ml). La fase de EtOAc se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar un aceite viscoso que solidificó en reposo durante la noche. La trituración con Et_2O (10 ml, 2 veces) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (43,78 g, 80 %). Pureza por CLEM del 94 %.

Etapa 2 – Síntesis de éster 1-ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico



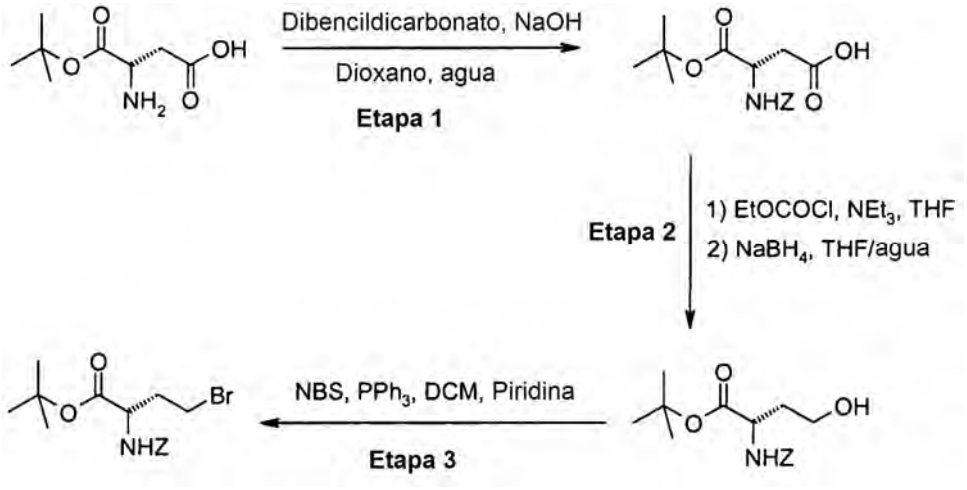
Una mezcla del producto de la Etapa 1 (3 g, 3,20°mmol) y Pd al 10 %/C (0,5 g) en EtOH (150 ml) se agitó en H_2 (globo) a t.a. durante 4 horas, tiempo después del cual la CLEM mostró la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite, se lavó con EtOH (20 ml) y se concentró al vacío para proporcionar un sólido de color blanco. Para retirar el EtOH residual, el sólido se disolvió en una mezcla de tolueno/THF (5/1) (20 ml) y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,8 g, 79 %). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD), δ: 1,35 (9H, s), 1,60-2,10 (10H, m), 4,05 (1H, m), 5,20 (1H, m).

Síntesis de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico

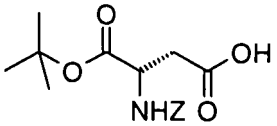


Se preparó éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico a partir de éster 5-bencílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico siguiendo el mismo procedimiento usado para la síntesis de éster 1-ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-pentanoico.

Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-4-bromo-butírico

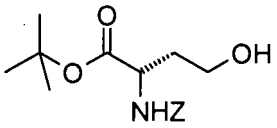


Etapa 1 - Síntesis de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-succínico



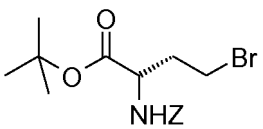
Se disolvieron éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-amino-succínico (0,9 g, 4,75°mmol) e hidróxido de sodio (0,28 g, 7,13°mmol, 1,5 eq) en agua al 25 % en dioxano (50 ml). La solución se agitó a 5 ºC y se añadió lentamente dibencildicarbonato (2 g, 4,13°mmol, 1,5 eq) en dioxano (10 ml). La mezcla se agitó a 0 ºC durante 1 hora y después a t.a. durante la noche. Se añadió agua (10 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (20 ml, 2 veces). La fase orgánica se extrajo con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (10 ml, 2 veces). Las fases acuosas combinadas se acidificaron a pH 1 con HCl 1 M y se extrajeron con EtOAc (10 ml, 3 veces). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentran a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 35 % en heptano) para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (0,76 g, 50 %). m/z 346 [M+23]+, RMN ^{1}H (300 MHz, CDCl3), δ: 7,39-7,32 (5H, m), 5,72 (1H, d, J = 8,1 Hz), 5,13 (2H, s), 4,58-4,50 (1H, m), 3,10-2,99 (1H, m), 2,94-2,83 (1H, m), 1,45 (9H, s).

Etapa 2 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-4-hidroxi-butírico



A una solución del producto de la Etapa 1 (0,6 g, 1,87°mmol) en THF anhidro (20 ml) a -20 ºC se le añadió lentamente trietilamina (0,032 ml, 2,24°mmol, 1,2 eq) y cloroformiato de etilo (0,021 ml, 2,24°mmol, 1,2 eq). La mezcla se agitó a -20 ºC durante 2 horas. El sólido formado se filtró y se lavó con THF (10 ml, 2 veces). El filtrado se añadió gota a gota a una solución de borohidruro de sodio (0,2 g, 5,61°mmol, 3 eq) a 0 ºC y se agitó a t.a. durante 4 h. El disolvente se retiró a presión reducida, el residuo se diluyó con agua (10 ml), se acidificó a pH 5 con HCl 1 M y se extrajo con EtOAc. Las fracciones orgánicas se combinaron y se lavaron con hidróxido de sodio acuoso al 10 %, agua y salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite transparente (0,3 g, 51 %). m/z 332 $[M+23]^+$.

Etapa 3 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-4-bromo-butírico



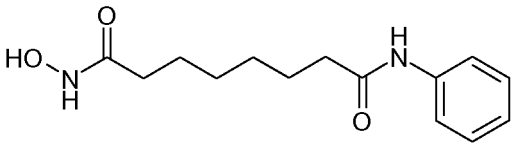
A una solución de N-bromosuccinimida (0,52 g, 2,91°mmol, 3 eq) en DCM (10 ml) se le añadió lentamente una solución de trifenilfosfina (0,71 g, 2,72°mmol, 2,8 eq) en DCM (10 ml). La mezcla se agitó a t.a. durante 5 minutos. Se añadieron gota a gota piridina (0,094 ml, 1,16°mmol, 1,2 eq) y una solución del producto de la Etapa 2 (0,3 g, 0,97°mmol, 1 eq) en DCM (20 ml) y la mezcla se agitó a t.a. durante la noche.

El disolvente se retiró a presión reducida, el residuo se destiló azeotrópicamente con tolueno (15 ml, 2 veces) y se trituró con éter dietílico (25 ml, 2 veces) y EtOAc al 10 % en heptanos. Las soluciones de la trituración se combinaron y evaporaron a sequedad. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 15 % en heptanos) para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite transparente (0,16 g, 44 %). m/z 395 $[M+23]^+$, RMN ^1H (300 MHz, CDCl3), δ: 7,39-7,30 (5H, m), 5,40 (1H, d, J = 6,8 Hz), 5,12 (2H, s), 4,38 (1H, c, J = 7,7 Hz), 3,47-3,38 (2H, m), 5,49-2,33 (1H, m), 2,28-2,13 (1H, m), 1,48 (9H, s).

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Este ejemplo describe la modificación del inhibidor conocido de la HDAC (histona desacetilasa) ácido suberoilanilida hidroxámico (compuesto 7) denominado en el presente documento "SAHA", mediante la unión de motivos de éster de aminoácido en puntos distantes de la interfaz de unión con el objetivo, donde no se produce ninguna alteración de su modo de unión.

Compuesto 7: Ácido suberoilanilida hidroxámico (SAHA)



El SAHA se adquirió de BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania.

Procedimiento de lavado convencional para la química de resina

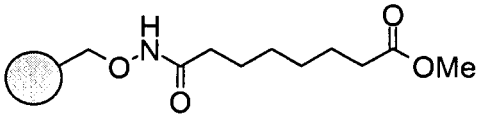
La resina se lavó con la siguiente secuencia: DMF, MeOH, DMF, MeOH, DCM, MeOH, DCM, MeOH 2 veces, TBME 2 veces.

Escisión de ensayo de resina

Una cantidad pequeña de resina de hidroxilamina-2-clorotritilo funcionalizada (aproximadamente 0,3 ml de mezcla de reacción, aproximadamente 10 mg de resina) se trató con TFA al 2 %/DCM (0,5 ml) durante 10 min a t.a. La resina se filtró y el filtrado se concentró soplando con una corriente de gas de N_2. Se obtuvo la CLEM del residuo.

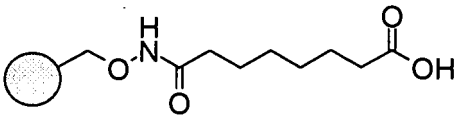
Preparación de resina de hidroxilamina-2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico

Etapa 1 - Inmovilización a resina de 2-clorotritil-O-NH_2



A un matraz de fondo redondo cargado con resina de 2-clorotritil-O-NH_2 (6 g, que carga 1,14°mmol/g, 6,84°mmol) y DCM (60 ml) se le añadió DIPEA (5,30 g, 41,0°mmol, 6 eq). Se añadió lentamente 8-cloro-8-oxooctanoato de metilo (4,2 g, 20,5°mmol, 3 eq) a la mezcla de reacción con agitación orbital y la mezcla de reacción se agitó durante 48 horas. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado convencional. La resina se secó al vacío. La pureza de CLEM se determinó mediante detección por DLE, 100 %, m/z 204 $[M^+H]^+$.

Etapa 2 - Saponificación

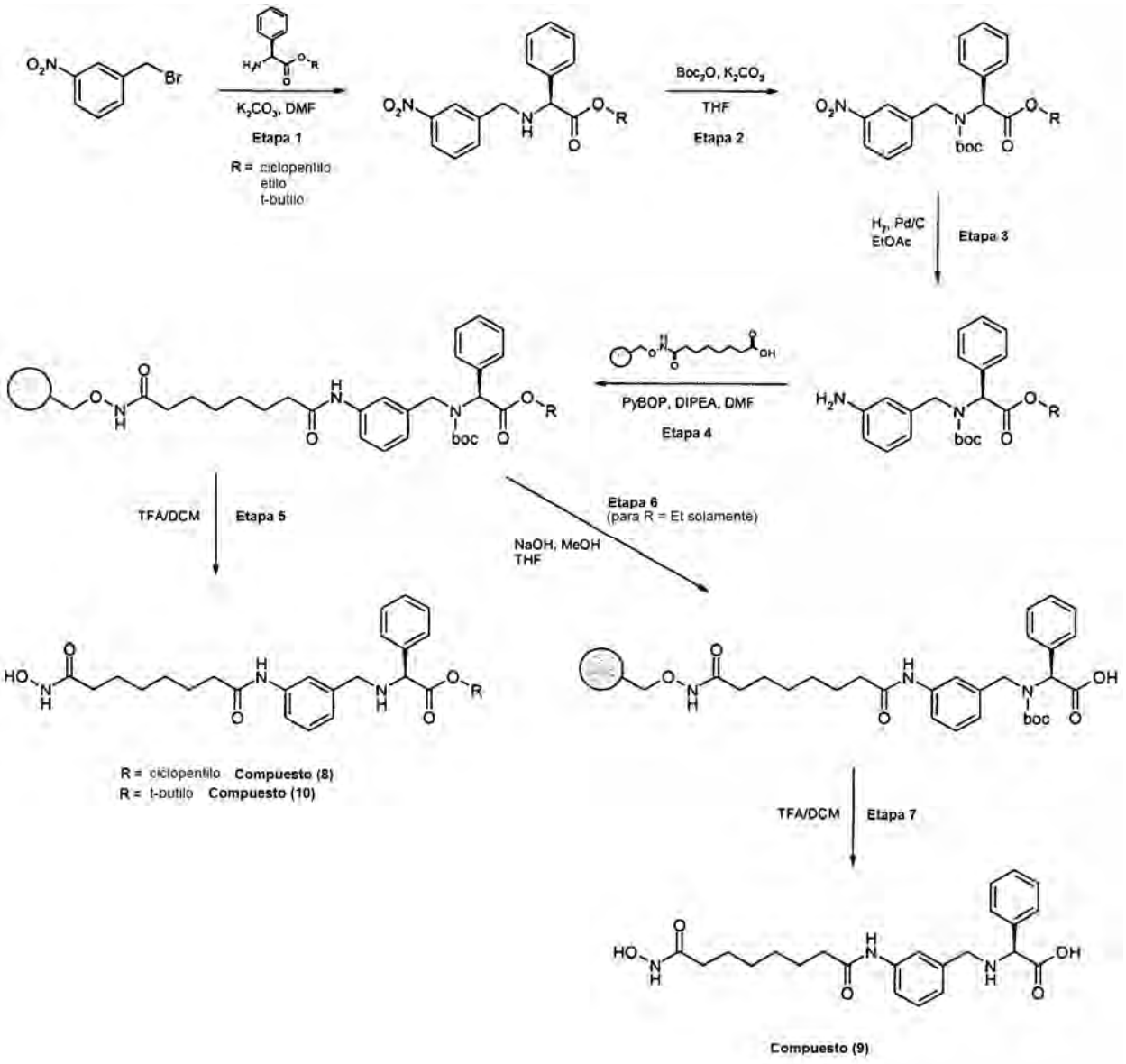


A un matraz de fondo redondo cargado con la resina de la Etapa 1 (4 g, que carga 1,14°mmol/g, 4,56°mmol) se le añadieron THF (16 ml) y MeOH (16 ml). A la reacción se le añadió una solución de NaOH (0,91 g, 22,8°mmol, 5 eq) en agua (16 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas. La resina se filtró y se lavó con agua 2 veces, MeOH 2 veces, seguido del procedimiento de lavado convencional. La resina se secó al vacío. La pureza de CLEM se determinó mediante detección por DLE, 100 %, m/z 190 $[M^+H]^+$.

Preparación de derivados de SAHA

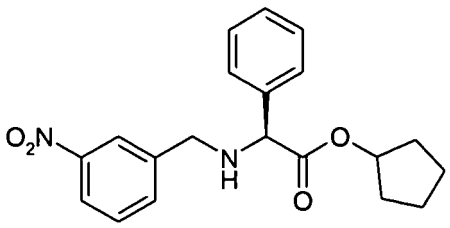
Los compuestos a base de SAHA se prepararon mediante los procedimientos que se esbozan a continuación.

Los compuestos (8), (9) y (10) se prepararon mediante la metodología que se describe en el siguiente esquema:



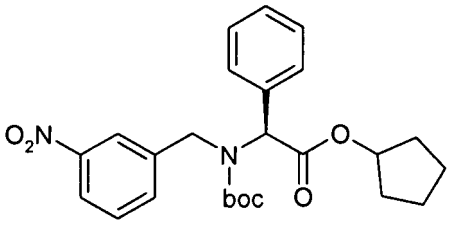
Las Etapas 1 a 5 se ejemplifican para R = ciclopentilo

Etapa 1 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-(3-nitro-bencilamino)-fenil-acético



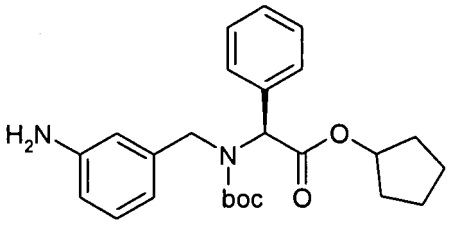
Se disolvió bromuro de 3-nitrobencilo (46°mmol) en DMF (180 ml) y se añadió carbonato de potasio (92°mmol), seguido de éster de (S)-fenilglicina (10,6 g, 46°mmol). La reacción se agitó durante 17 h a t.a. antes de evaporar a sequedad. El residuo se volvió a disolver en EtOAc (150 ml) y se lavó con agua (80 ml, 3 veces), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a sequedad. Después de la purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 30 %/hexano) se obtuvo el éster y se usó directamente en la Etapa 2.

Etapa 2 – Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-[terc-butoxicarbonil-(3-nitro-bencil)-amino]-fenil-acético



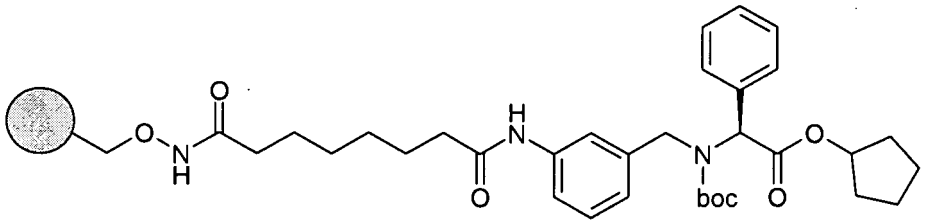
El producto de la Etapa 1 (40,9°mmol) se disolvió en THF (250 ml) antes de la adición de carbonato de potasio (61,4°mmol) y agua (150 ml). Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (163°mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 50 ºC durante 18 h. Se añadió DCM y la mezcla resultante se lavó consecutivamente con HCl 0,1 M (150 ml), $NaHCO_3$ acuoso saturado y agua (150 ml). La fase de DCM se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a sequedad. Después de la purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 5 %/hexano) se aisló el sulfato del título y se usó directamente en la Etapa 3.

Etapa 3 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-[(3-amino-bencil)-terc-butoxicarbonil-amino]-fenil-acético



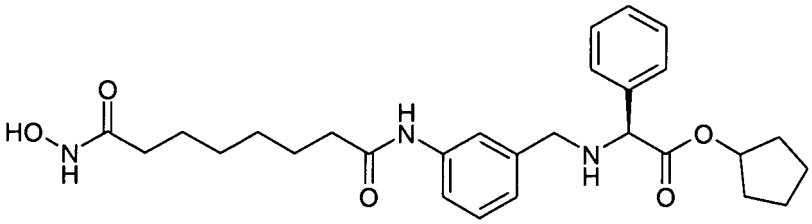
El producto de la Etapa 2 (11,5°mmol) se disolvió en EtOAc (150 ml) antes de la adición de catalizador Pd/C (humedad del 10 %) (0,8 g) y se hidrogenó a presión de globo a t.a. durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite y se evaporó a sequedad para proporcionar un sólido.

Etapa 4 - Acoplamiento de la resina



Se hinchó resina de hidroxilamina 2-clorotritilo derivatizada con ácido subérico (1,0 g, que carga 0,83°mmol/g) en DCM (15 ml) y se añadió PyBOP (1,36 g, 2,61°mmol), seguido de DIPEA (1,5 ml, 8,7°mmol). El producto de la Etapa 3 (2,61°mmol) se disolvió en DCM (15 ml) y se añadió a la mezcla de reacción. La reacción se agitó durante 24 h a t.a. La resina se filtró y se lavó usando el procedimiento de lavado convencional. La resina se secó al vacío.

Etapa 5 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-[3-(7-Hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenilacético, compuesto (8)



El producto de la Etapa 4 (que carga 0,83°mmol) se agitó suavemente en TFA al 2 %/DCM (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró. El filtrado se evaporó a presión reducida a t.a.

La resina se volvió a tratar con lavó con TFA al 2 %/DCM (10 ml) y se filtró después de 20 min. Los filtrados combinados se evaporaron a sequedad a presión reducida a t.a. para proporcionar un residuo oleoso. El residuo se dejó reposar en TFA al 20 %/DCM durante 40 min. Después de la evaporación a sequedad, también a presión reducida a t.a., el producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa.

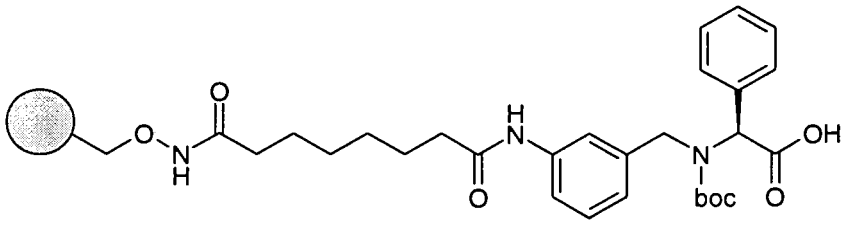
Datos analíticos para el Compuesto 8

Pureza por CLEM del 100 %, m/z 496 $[M^+ + H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, MeOD), δ: 1,30-1,70 (16H, m), 2,00 (2H, t), 2,30 (2H, t), 4,05 (2H, dd), 5,00 (1H, m), 5,15 (1H, m), 7,05 (1H, m), 7,30 (2H, m), 7,40 (5H, m), 7,75 (1H, m).

Datos analíticos para el Compuesto (10)

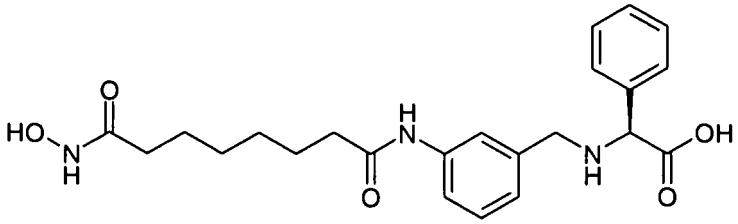
Pureza por CLEM del 97 %, m/z 484 $[M^+ + H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, MeOD), δ: 1,30 (13H, m), 1,45-1,65 (4H, m), 1,93-2,05 (2H, m), 2,20-2,40 (2H, m), 3,99 (2H, c), 4,65-4,95 (1H, m) 7,05 (1H, d), 7,25-7,33 (2 H, m), 7,35-7,50 (5H, m), 7,75 (1H, s).

Etapa 6 - Saponificación



El producto de la Etapa 5 en el que R = Et (1,4 g, que carga 0,83°mmol) se suspendió en THF (8,6 ml) y MeOH (8,6 ml) y se añadió una solución de hidróxido de sodio 1,4 M (5,98°mmol). La mezcla se agitó durante 24 h y la resina se filtró y se lavó con agua 2 veces, MeOH 2 veces, seguido del procedimiento de lavado convencional. La resina se secó al vacío.

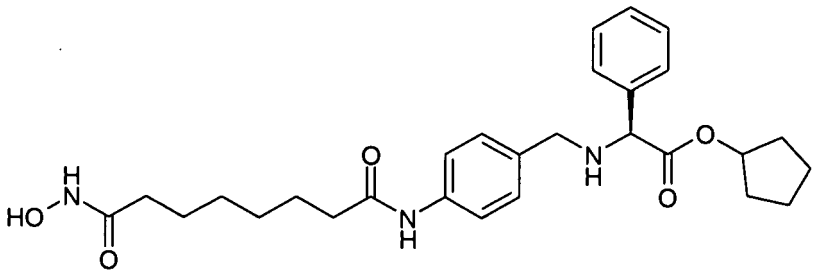
Etapa 7 - Síntesis del ácido (S)-[3-(7-Hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-bencilamino]-fenilacético **(9)**



El producto de la Etapa 6 (1,44 g, que carga 0,83°mmol) se agitó después suavemente en TFA al 2 %/DCM (10 ml) durante 20 min. La resina se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida a t.a. La resina se volvió a tratar con TFA al 2 %/DCM (10 ml) y se filtró después de 20 min. Los filtrados combinados se evaporaron a sequedad a presión reducida a t.a. para proporcionar un residuo oleoso. El residuo se dejó reposar en TFA al 20 %/DCM durante 40 min. Después de la evaporación a sequedad, a presión reducida a t.a., el producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el compuesto **(9)**. Pureza por CLEM del 100 %, m/z 428 $[M^+ + H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, MeOD), δ: 1,20-1,35 (4H, m), 1,50-1,65 (4H, m), 2,00 (2H, m), 2,30 (2H, m), 4,00 (2H, dd), 4,90 (1H, m), 7,05 (1H, m), 7,25-7,50 (7H, m), 7,70 (1H, m).

*El compuesto **(24)** se preparó siguiendo la misma metodología descrita para la síntesis del compuesto* (*8).*

Éster ciclopentílico del ácido ({(R)-[4-7-hidroxicarbamoil-heptanoilamino)-fenil]-fenil-metil}-amino)acético **(24)**

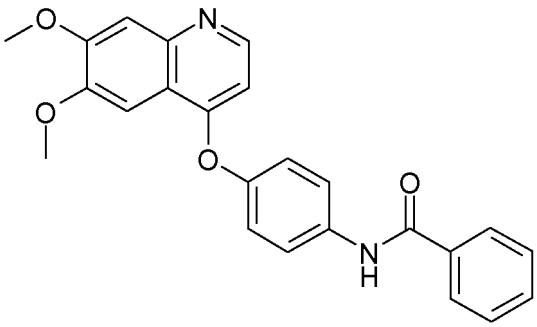


Pureza por CLEM del 95 %, m/z 496 $[M^+ + H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 1,30-1,50 (6H, m), 1,50-1,70 (8H, m), 1,80 (2H, m), 2,10 (2H, t), 2,45 (2H, t), 4,1 (2H, dd), 5,25 (1H, m), 5,35 (1H, m), 7,45 (2H, d), 7,60 (5H, m), 7,80 (2H, d), 10,00-10,10 (2H, s a), 10,50 (1H, s).

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

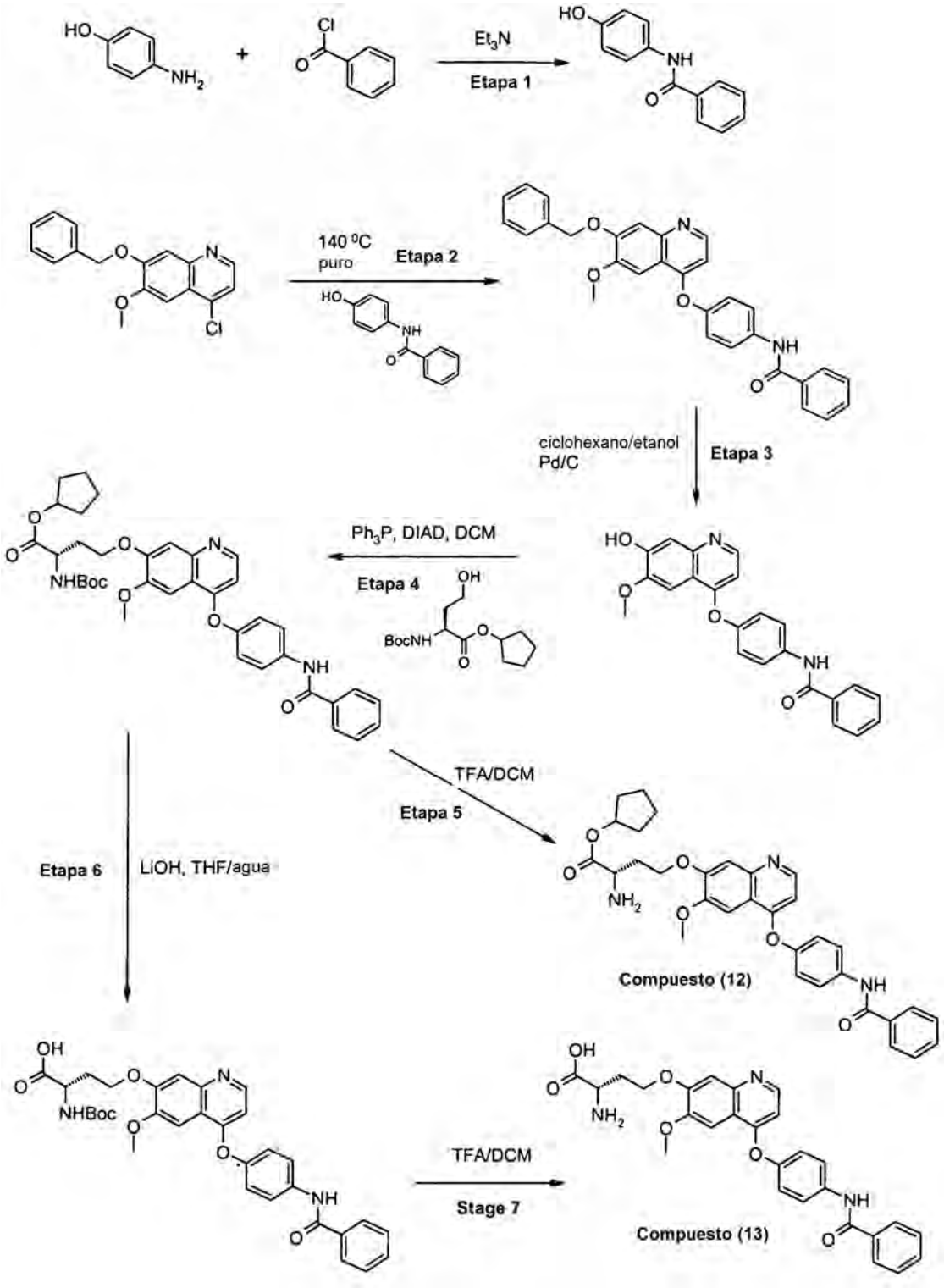
Este ejemplo describe la modificación del inhibidor conocido de la Cinasa Aurora A ("Aurora A") N-{4-(7-metoxi-6-metoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil}-benzamida (compuesto **(11)**) mediante la unión de un motivo de éster de aminoácido en un punto donde no se produce ninguna alteración de su modo de unión.

Compuesto (11): N-{4-(7-metoxi-6-metoxi-quinolin-4-iloxi)-fenil}-benzamida

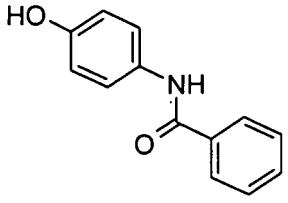


El compuesto **(11)** se preparó como se describe en la patente de los EE.UU. n° 6.143.764. Se prepararon compuestos basados en el compuesto **(11)** mediante los procedimientos que se esbozan a continuación.

*Los compuestos **(12)** y **(13)** se prepararon mediante el procedimiento que se describe en el esquema a continuación:*

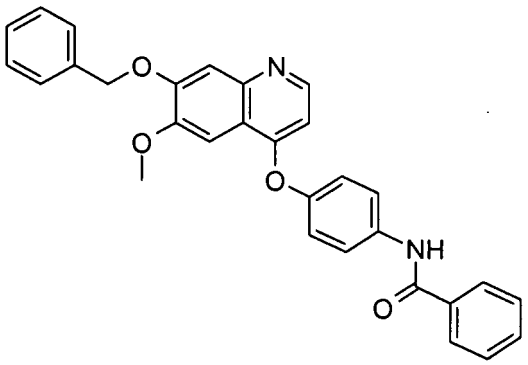


Etapa 1 – Síntesis de N-(4-hidroxi-fenil)-benzamida



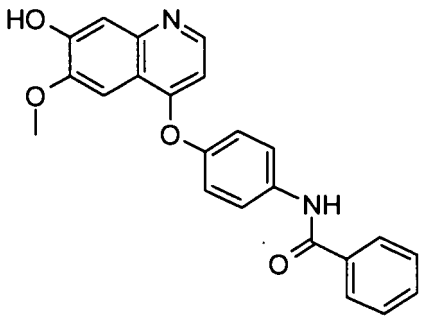
A una solución de 4-aminofenol (4,27 g, 39,1°mmol) en DMF (50 ml) a 0 ºC en atmósfera de argón se le añadió trietilamina (7,44 ml, 53,4°mmol, 1,5 eq). La reacción se agitó durante 10 minutos antes de la adición lenta de cloruro de benzoílo (5 g, 35,6°mmol, 1 eq) durante un periodo de 5 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar a t.a. y se agitó durante 18 h. El DMF se retiró a presión reducida y la mezcla se trató con EtOAc/agua. Dio como resultado la precipitación de un sólido de color blanco, éste se retiró por filtración y se secó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (8,0 g, 96 %). RMN ^{1}H (270 MHz, DMSO), δ: 10,0 (1H, s), 9,35 (1H, s), 7,9 (2H, d, J = 7,2 Hz), 7,5 (5H, m), 6,75 (2H, d, J = 7,4 Hz).

Etapa 2 - Síntesis de N-[4-(7-Benciloxi-6-metoxi-quinolin-4-iloxi)-fenil]-benzamida



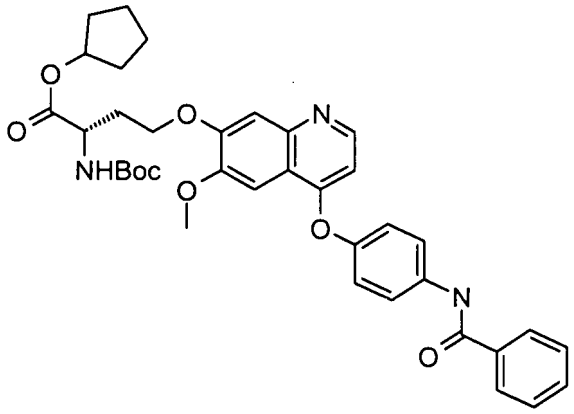
A un matraz de fondo redondo cargado con 4-cloro-6-metoxi-7-benciloxiquinolina [véanse *Org. Synth. Col.* Vol. 3, 272 (1955) y el documento US006143764A (Kirin Beer Kabushiki Kaisha) para los procedimientos de síntesis] (1,09 g, 3,6°mmol) se le añadió el producto de la Etapa 1 (2,33 g, 10,9°mmol, 3 eq). La reacción se calentó a 140 ºC durante 3 h. Después de enfriar a t.a., se añadió agua a la mezcla de reacción y la mezcla se extrajo 3 veces con EtOAc. La fase de EtOAc combinada se lavó con NaOH acuoso al 5 %, salmuera, y se secó sobre $MgSO_4$. El disolvente se retiró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna eluyendo con EtOAc/heptano (2:1) para obtener el compuesto del título (0,56 g, 32 %). m/z 477 [M^++H].

Etapa 3 - Síntesis de N-[4-(7-hidroxi-6-metoxi-quinolin-4-iloxi)-fenil]-benzamida



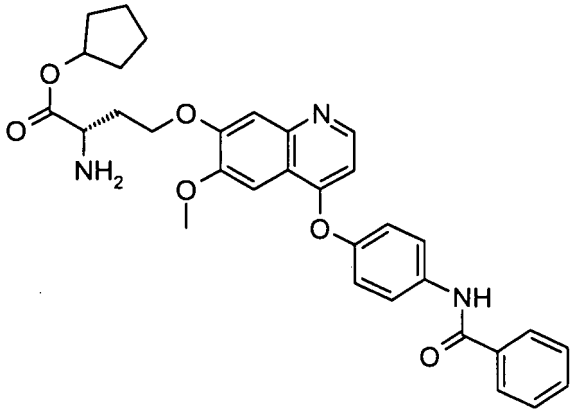
Una mezcla del producto de la Etapa 2 (0,56 g, 1,17°mmol) y Pd al 10 %/C (0,08 g) en ciclohexano al 10 %/EtOH (80 ml) se calentó a reflujo durante 3 h. El catalizador Pd/C de filtró a través de un lecho de celite, lavando dos veces con MeOH. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (0,34 g, 75 %). m/z 387 [M^++H].

Etapa 4 – Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-4-[4-(4-benzoilamino-fenoxi)-6-metoxi-quinolin-7-iloxi]-2-terc-butoxicarbonilamino-butírico



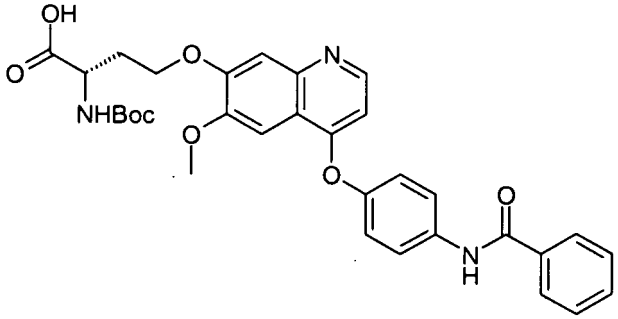
A una solución del producto de la Etapa 3 (0,2 g, 0,52°mmol) en DCM anhidro (30 ml) a 0 ºC se le añadió éster ciclopentílico del ácido (S)-2-terc-Butoxicarbonilamino-4-hidroxi-butírico (0,223 g, 0,78°mmol, 1,5 eq) en 5 ml de DCM. Después se añadieron Ph_3P (0,557 g, 2,1°mmol, 4,1 eq) y DIAD (0,412 ml, 2,1°mmol, 4,1 eq) y la mezcla de reacción se dejó calentar a t.a. y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción en bruto se evaporó a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título (0,135 g, 46 %). m/z 656,3 [M^++H].

Etapa 5 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-amino-4-[4-(4-benzoilamino-fenoxi)-6-metoxi-quinolin-7-iloxi]-butírico **(12)**



A una solución del producto de la Etapa 4 (5,8 mg, 0,009°mmol) en DCM (1 ml) se le añadió TFA (1 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 16 h antes de la evaporación a presión reducida, destilando azeotrópicamente con tolueno para retirar las trazas de TFA. El compuesto (12) se aisló en forma de un sólido de color blanquecino (4,7 mg). Pureza por CLEM del 95 %, m/z 556,2 [M^++H], RMN ^{1}H (270 MHz, DMSO), δ: 10,4 (1H, s), 8,8 (1H, d, J = 6,5 Hz), 8,55 (2H, s a), 8,01 (4H, m), 7,65 (4H, m), 7,35 (1H, d, J = 7,6 Hz), 6,75 (1H, d, J = 6,5 Hz), 5,25 (1H, m), 4,35 (3H, m), 4,0 (3H, s), 2,4 (2H, m), 1,85-1,4 (8H, m a).

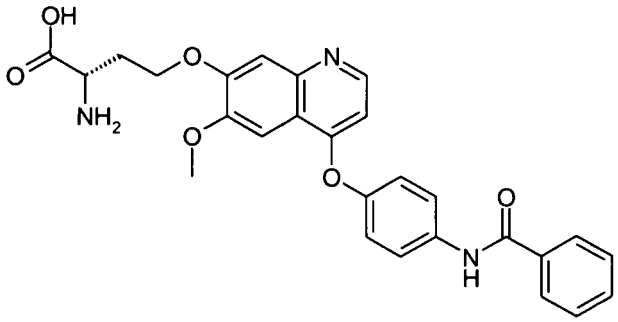
Etapa 6 – Síntesis de ácido (S)-4-[4-(4-benzoilamino-fenoxi)-6-metoxi-quinolin-7-iloxi]-2-terc-butoxicarbonilamino-butírico



A una solución del producto de la Etapa 4 (17 mg, 0,02°mmol) en THF (1 ml) se le añadió NaOH 2 M (0,026 ml, 0,046°mmol, 2 eq). Después de 16 h, la reacción estaba incompleta, por lo que se añadieron 2 equivalentes adicionales de NaOH. La agitación se completó después de 6 h y el THF se retiró a presión reducida. La fase

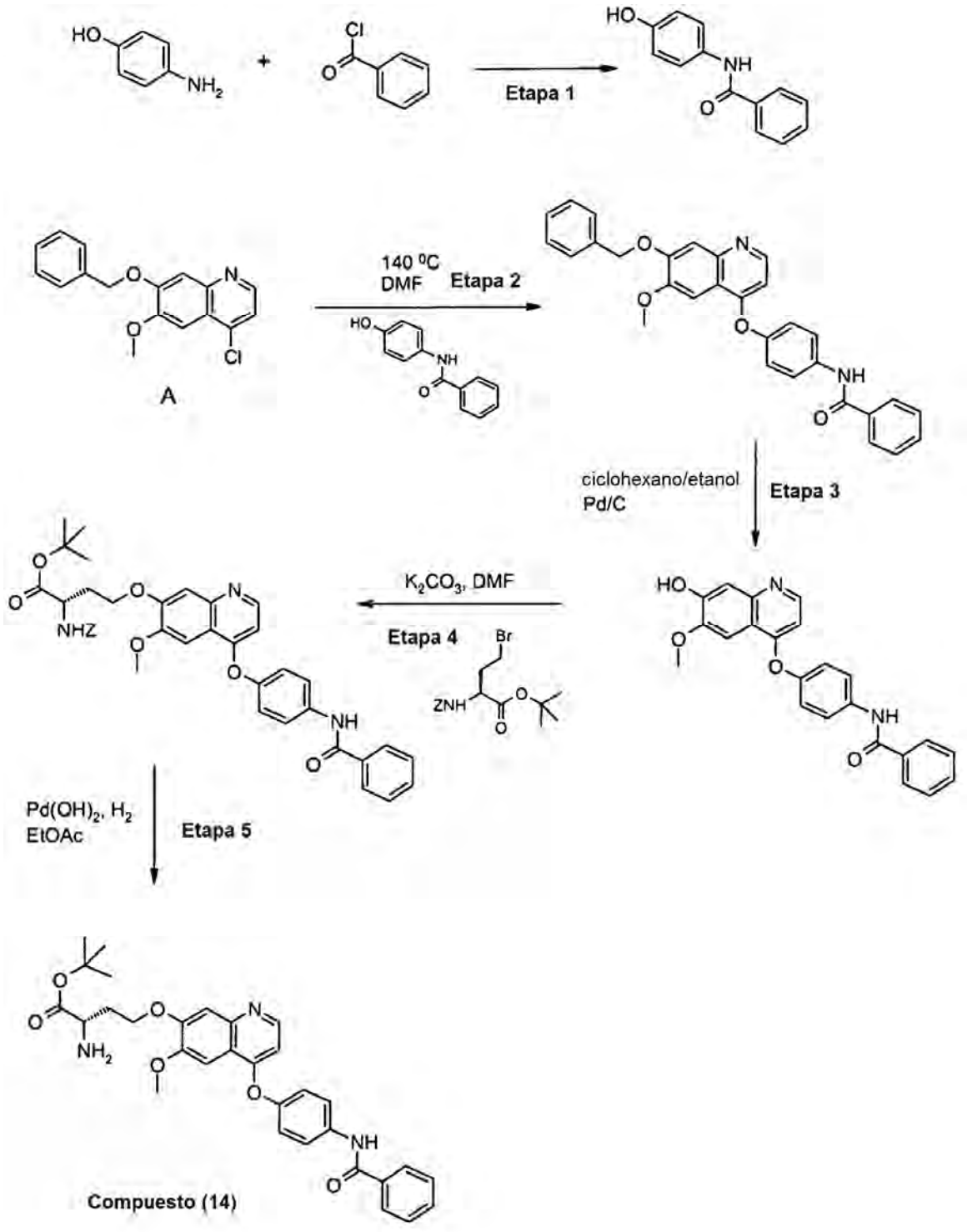
acuosa se diluyó con 3 ml de agua y se acidificó a pH 6 con HCl 1 M. El compuesto del título se extrajo en EtOAc, se secó sobre $MgSO_4$ y se aisló en forma de un sólido de color blanco. Éste se usó directamente en la etapa 7 sin purificación adicional.

Etapa 7 - Síntesis de ácido (S)-4-[4-(4-benzoilamino-fenoxi)-6-metoxi-quinolin-7-iloxi]-2-terc-butoxicarbonilamino-butírico (13)



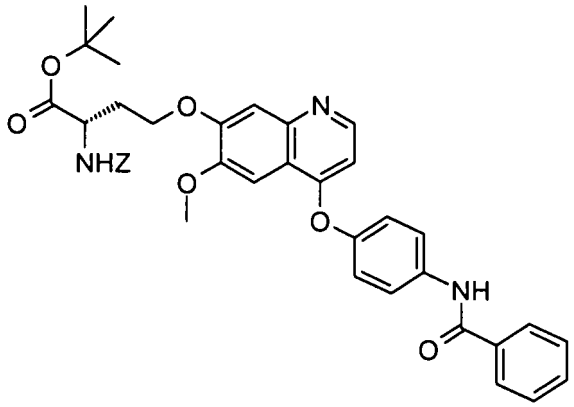
A una solución del producto de la Etapa 6 (6,5 mg, 0,011°mmol) en DCM (1 ml) se le añadió TFA (1 ml). La reacción se dejó en agitación durante 6 h y después se evaporó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (13) en forma de un sólido de color blanquecino (90 %). Pureza por CLEM del 100 %, m/z 488,2 [M^++H], RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD), δ: 8,75 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,00 (4H, m), 7,65 (4H, m), 7,4 (1H, d, J = 7,6 Hz), 6,95 (1H, d, J = 8,0 Hz), 4,6 (2H, m), 4,3 (1H, m), 4,2 (3H, s), 2,6 (2H, m).

El compuesto (14) se preparó mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:



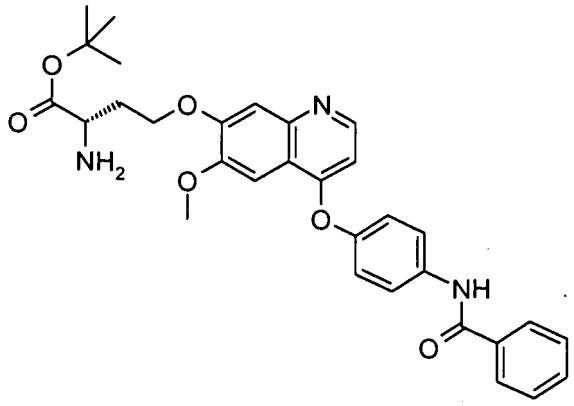
Las Etapas 1, 2 y 3 son las mismas que se han descrito anteriormente para la síntesis del compuesto **(12)**.

Etapa 4 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-4-[4-(4-benzoilamino-fenoxi)-6-metoxi-quinolin-7-iloxi]-2-benciloxicarbonilamino-butírico



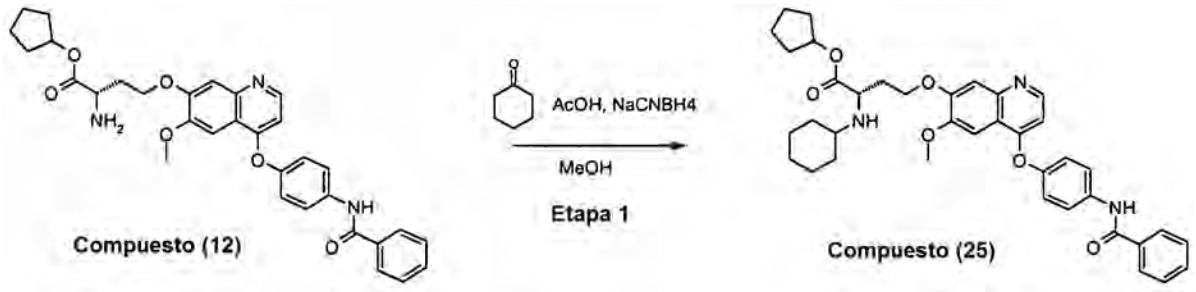
El producto de la Etapa 3 (0,15 g, 0,39°mmol), éster terc-butílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-4-bromo-butírico (0,16 g, 0,43°mmol, 1,1 eq) y K_2CO_3 (0,11 g, 0,78°mmol, 2 eq) se disolvieron en DMF anhidro (10 ml) en atmósfera de nitrógeno. La reacción se agitó a 35 ºC durante la noche antes de que se retirara el DMF a presión reducida. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con agua seguida de salmuera. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó a presión reducida. La cromatografía en columna (eluyendo con MeOH al 1 %/ DCM) proporcionó el compuesto del título (0,16 g, 60 %). m/z 678 $[M+H]^+$, RMN ^1H (300 MHz, CDCl3), δ: 8,49 (1H, d, J = 5,3 Hz), 7,98 (1H, s), 7,92 (2H, dd, J = 8,2, 1,4 Hz), 7,80-7,72 (2H, m), 7,63-7,48 (4H, m), 7,43-7,29 (4H, m), 7,24-7,17 (2H, m), 6,64 (1H, d, J = 8,9 Hz), 6,49 (1H, d, J = 5,3 Hz), 5,15 (2H, s), 4,66-4,57 (1H, m), 4,43-4,34 (1H, m), 3,85 (3H, s), 2,55-2,33 (2H, m), 1,41 (9H, m).

Etapa 5 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-2-amino-4-[4-(4-benzoilamino-fenoxi)-6-metoxi-quinolin-7-iloxi]-butírico **(14)**

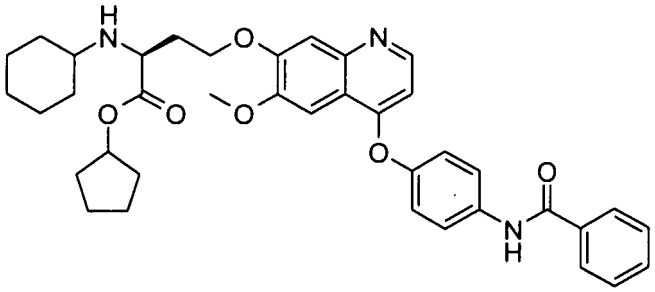


El producto de la Etapa 4 (0,045 g, 0,066°mmol), se disolvió en EtOAc anhidro (5 ml) y se añadió $Pd(OH)_2/C$ en atmósfera de nitrógeno. La reacción se desgasificó y se agitó en atmósfera de hidrógeno a t.a. durante la noche. El catalizador se retiró por filtración a través de un lecho de celite y el disolvente se retiró a presión reducida. El compuesto (14) se purificó mediante HPLC preparativa. m/z 544 $[M+H]^+$, RMN ^1H (300 MHz, CD3OD), δ: 8,67 (1H, d, J = 6,8 Hz), 7,98 (4H,d, J = 8,7 Hz), 7,90 (1H,s), 7,68-7,51 (4H, m), 7,42-7,36 (2H, m), 6,97 (1H, d, J = 6,6 Hz), 4,52 (2H, t, J = 5,7 Hz), 4,28 (1H, t, J = 6,5 Hz), 4,13 (3H, s), 2,69-2,45 (2H,m), 1,53 (9H, s).

*El compuesto **(25)** se preparó mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:*



Etapa 1 – Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-4-[4-(4-benzoilamino-fenoxi)-6-metoxi-quinolin-7-iloxi]-2-ciclohexilamino-butírico **(25)**

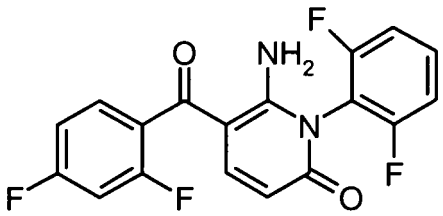


Al compuesto **(12)** (37 mg, 0,066°mmol) en MeOH anhidro (1 ml) se le añadieron 100 µl de una solución 1 M de ciclohexanona en MeOH y 1 gota de ácido acético. La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 3 h. Después se añadió cianoborohidruro de sodio (10,3 mg, 0,165°mmol) y la reacción se dejó en agitación durante 4 h a t.a. antes de la concentración al vacío. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó el compuesto del título **(25)** en forma de una sal de di-TFA. m/z 638 $[M+H]^+$. RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), δ: 8,72 (1H, d, J = 6,8 Hz), 8,02-7,98 (4H, m), 7,93 (1H, s), 7,67 (1H, s), 7,66-7,53 (3H, m), 7,42 (2H, m), 6,99 (1H, d, J = 6,8 Hz), 5,38 (1H, m), 4,49 (3H, m), 4,14 (3H, s), 3,27 (11H, m), 2,66 (2H, m), 2,20 (2H, m), 12,05-1,46 (16H, m).

EJEMPLO 3

Este ejemplo describe la modificación del inhibidor conocido de la P38 cinasa, 6-Amino-5-(2,4-difluoro-benzoil)-1-(2,6-difluoro-fenil)-1H-piridin-2-ona (compuesto **3258**), mediante la unión de un motivo de éster de aminoácido en un punto donde no se produce ninguna alteración de su modo de unión.

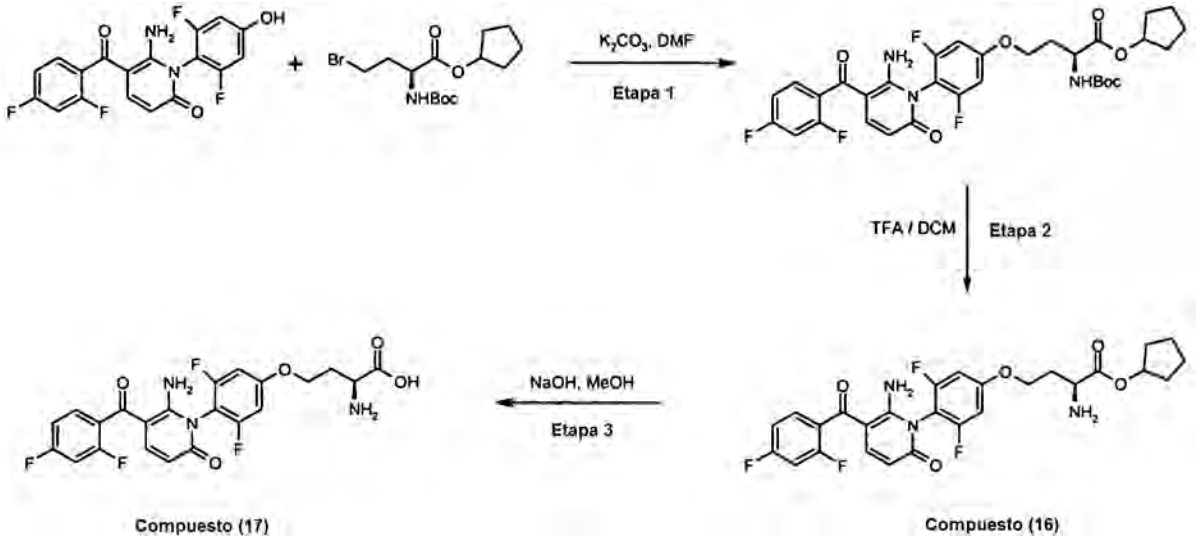
Compuesto (15): 6-Amino-5-(2,4-difluoro-benzoil)-1-(2,6-difluoro-fenil)-1H-piridin-2-ona



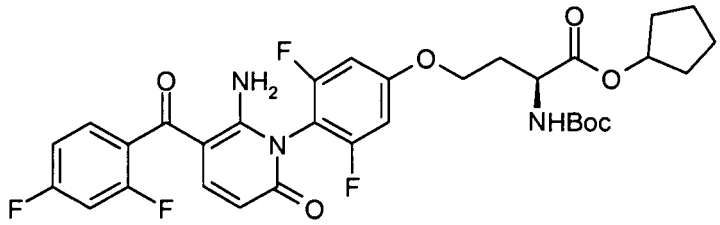
El compuesto **(15)** se preparó como se describe en el documento WO03/076405.

Los compuestos basados en el compuesto **(15)** se prepararon mediante los procedimientos que se esbozan a continuación.

*Los compuestos **(16)** y **(17)** se prepararon mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:*

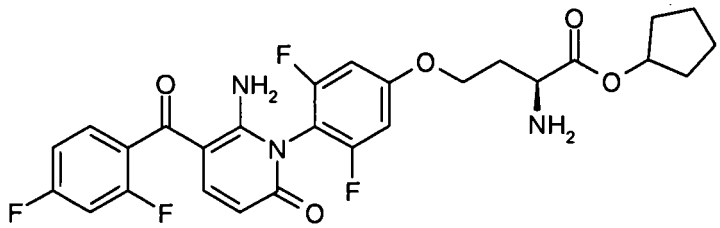


Etapa 1 – Síntesis de (S)-4-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-2-oxi-2H-piridin-1-il]-3,5-difluorofenoxi}-2-terc-butoxicarbonilaminobutirato de ciclopentilo



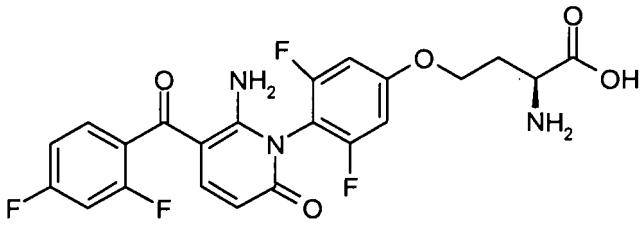
A una mezcla agitada de 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-1-(2,6-difluoro-4-hidroxi-fenil)-1H-piridin-2-ona [preparada mediante los procedimientos descritos en el documento WO03/076405] (100 mg, 0,265°mmol) y K_2CO_3 en DMF (1,5 ml) se le añadió éster ciclopentílico del ácido (L)-5-bromo-2-terc-butoxicarbonilaminopentanoico (96 mg, 0,265°mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 ºC durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (15 ml) y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado (3 ml) y agua (10 ml). La fase de EtOAc se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a sequedad, La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 20 %/heptano) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (50 mg, 29 %). Pureza por CLEM del 100 %, m/z 648 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD), δ: 1,30 (9H, s), 1,40-1,65 (6H, m), 1,70-1,85 (2H, m), 1,95-2,30 (2H, m), 4,00-4,10 (2H, m), 4,15-4,20 (1H, m), 5,05-5,10 (1H, m), 5,65 (1H, d), 6,70-6,80 (2H, m), 6,95-7,05 (2H, m), 7,25-7,45 (2H, m).

Etapa 2 - Síntesis de trifluoroacetato de (S)-2-amino-4-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-2-oxo-2H-piridin-1-il]-3,5-difluorofenoxi}butanoato de ciclopentilo **(16)**



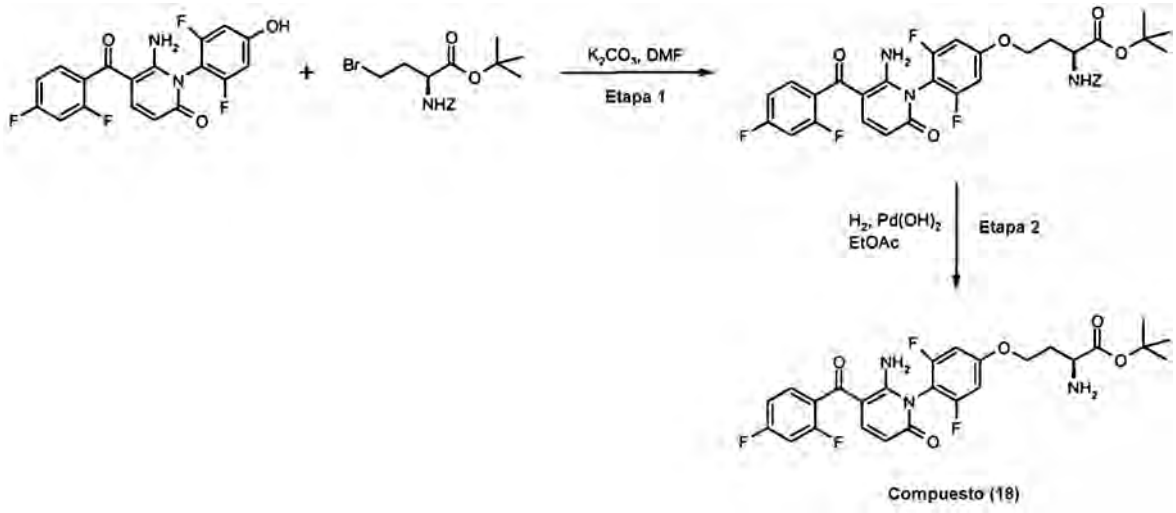
Una mezcla del producto de la Etapa 1 (10 mg) y TFA al 20 %/DCM (0,5 ml) se dejó reposar a t.a. durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad soplando en N_2. El residuo se trituró con Et_2O (0,3 ml, 2 veces) para proporcionar el compuesto **(16)** en forma de un sólido de color blanco (9,3 mg, 91 %). Pureza por CLEM del 100 %, m/z 548 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD), δ: 1,55-1,80 (6H, m), 1,85-2,00 (2H, m), 2,30-2,50 (2H, m), 4,15-4,30 (3H, m), 5,25-5,35 (1H, m), 5,75 (1H, d), 6,85-6,95 (2H, m), 7,05-7,15 (2H, m), 7,40-7,55 (2H, m).

Etapa 3 - Síntesis de ácido (S)-2-amino-4-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-2-oxo-2H-piridin-1-il]-3,5-difluorofenoxi}butanoico **(17)**

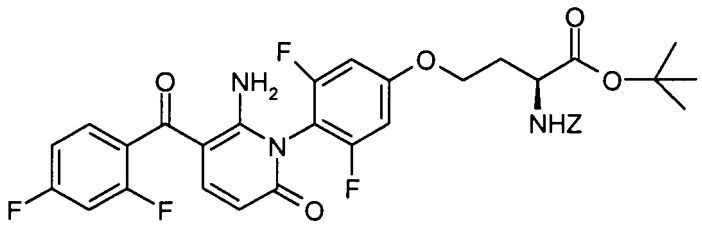


A una solución del compuesto (16) (20 mg, 0,0317°mmol) en una mezcla de MeOH (0,3 ml) y THF (0,3 ml) se le añadió NaOH acuoso 2 M (0,3 ml). La mezcla de reacción se dejó reposar a t.a. durante 3 h. Tras la finalización, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad soplando en un flujo de N_2, se acidificó a pH 1-2 mediante la adición gota a gota de HCl acuoso 2 M. El sólido resultante de color blanco formado se recogió mediante filtración. Rendimiento = 9 mg, 48 %. Pureza por CLEM del 97 %, m/z 480 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD), δ: 2,35-2,55 (2H, m, CH_2), 4,15-4,20 (1H, m, CH), 4,25-4,35 (2H, m, CH_2), 5,75 (1H, d, CH), 6,85-7,00 (2H, m, Ar), 7,05-7,20 (2H, m, Ar), 7,40-7,55 (2H, m, Ar).

*El Compuesto **(18)** se preparó mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:*

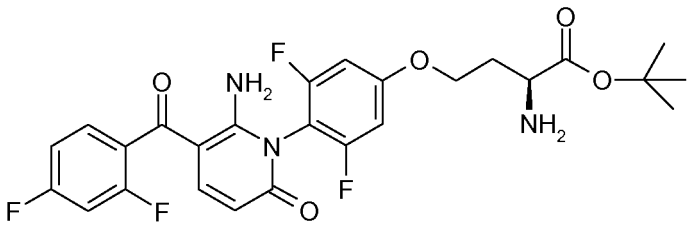


Etapa 1 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-4-{4-[6-amino-5-(2,4-difluoro-benzoil)-2-oxo-2H-piridin-1-il]-3,5-difluoro-fenoxi}-2-bencilozicarbonilamino-butírico



A una solución de 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-1-(2,6-difluoro-4-hidroxifenil)-1H-piridin-2-ona (100 mg, 0,26°mmol) y éster t-butílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-4-bromo-butírico (108 mg, 0,29°mmol) en acetona (2 ml) se le añadió yoduro de sodio (79 mg, 0,53°mmol) y carbonato de potasio (146 mg, 1,06°mmol). La reacción se calentó a reflujo durante 12 h y se repartió entre agua (20 ml) y acetato de etilo (20 ml). La fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (10 ml, 2 veces) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo. Este residuo se sometió a cromatografía en columna [gel de sílice, acetato de etilo al 40 %-heptano] para proporcionar el producto deseado (186 mg, 79 %) en forma de un sólido incoloro, m/z 670 [M+H].

Etapa 2 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-2-amino-4-{4-[6-amino-5-(2,4-difluoro-benzoil)-2-oxo-2H-piridin-1-il]-3,5-difluoro-fenoxi}-butírico

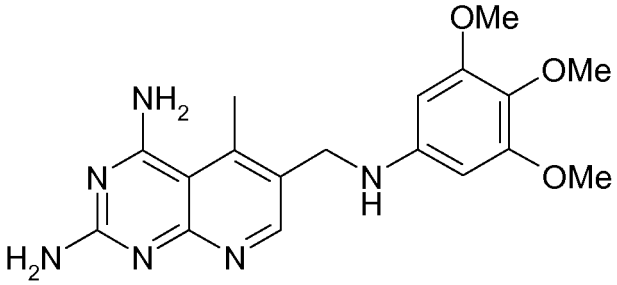


Se disolvió éster terc-butílico del ácido (S)-2-amino-4-{4-[6-amino-5-(2,4-difluoro-benzoil)-2-oxo-2H-piridin-1-il]-3,5-difluoro-fenoxi}-2-benciloxicarbonilamino-butírico (140 mg, 0,2°mmol) en acetato de etilo (15 ml) que contenía hidróxido de paladio al 10 % sobre carbono (20 mg) y se agitó en atmósfera de hidrógeno (1 atm) durante 1 hora. La mezcla de reacción se purgó con N_2 y se filtró a través de Celite® lavando con acetato de etilo adicional. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido que se sometió a cromatografía en columna [gel de sílice: MeOH al 5 % en diclorometano]. Esto proporcionó el producto deseado (60 mg, 54 %) en forma de un sólido de color gris. Pureza por CLEM del 98 %, m/z 536 $[M+H]^+$, RMN ^1H (300 MHz, CDCl3) 7,65-7,44 (1H, m), 7,39-7,29 (2H, m), 6,96-6,82 (2H, m), 6,66 (2H, d a, J = 8,1 Hz), 5,82 (1H, d, J = 9,9 Hz), 4,20-4,07 (3H, m), 3,48 (1H, dd, J = 4,8, 8,7 Hz), 2,22-2,15 (1H, m), 1,91-1,84 (1H, m), 1,62 (2H, s a), 1,43 (9H, s).

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Este ejemplo describe la modificación del inhibidor conocido de la DHFR, 5-Metil-6-((3,4,5-trimetoxifenilamino)metil)pirido[2,3-*d*]pirimidina-2,4-diamina (compuesto **(2 G=N)**) mediante la unión de un motivo de éster de aminoácido en un punto donde no se produce ninguna alteración de su modo de unión.

Compuesto (2 G=N): 5-Metil-6-((3,4,5-trimetoxifenilamino)metil)pirido[2,3-*d*]pirimidina-2,4-diamina

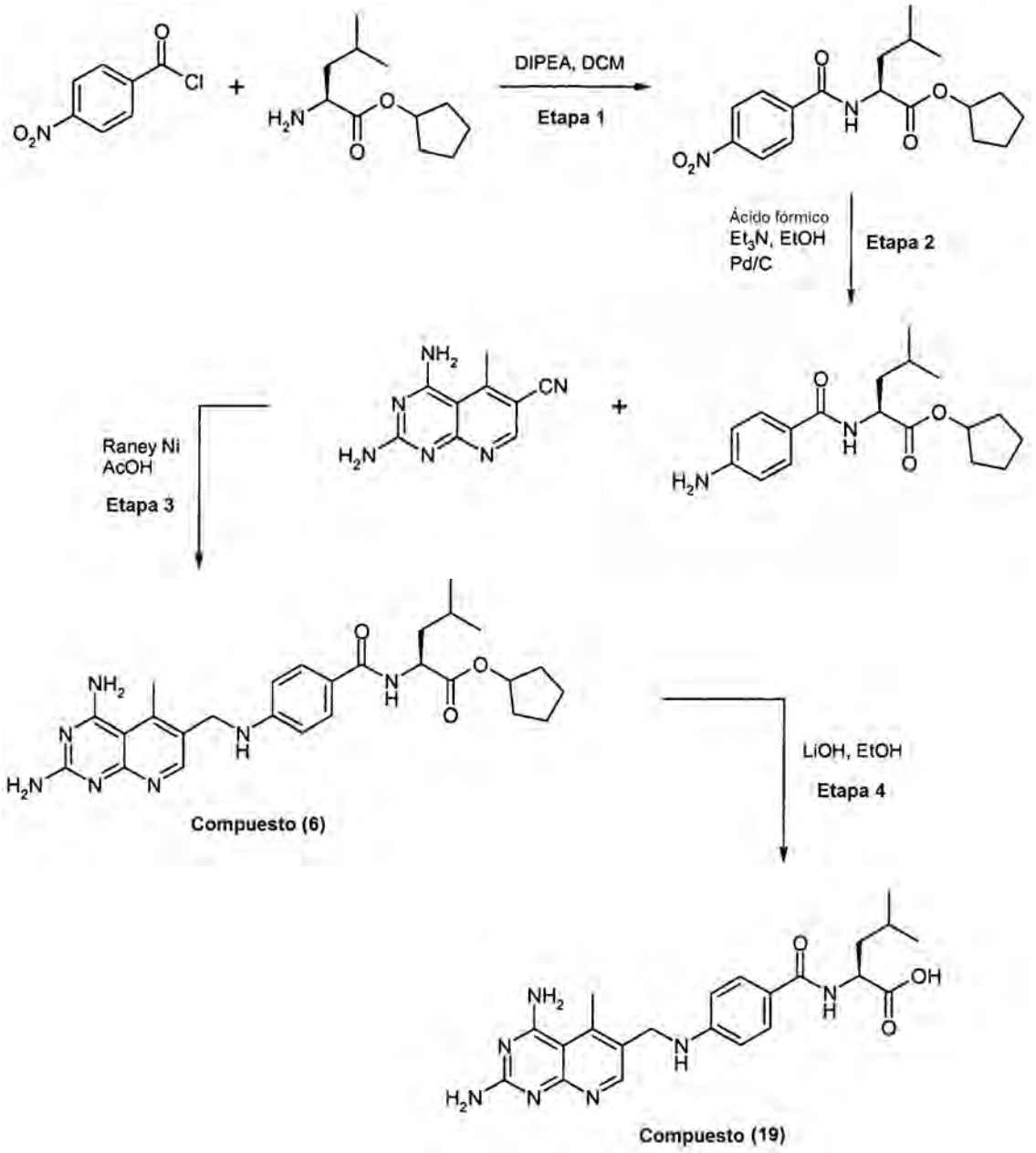


El compuesto **(2 G=N)** se preparó mediante una modificación del procedimiento descrito en *J. Med. Chem.* 1993, 36, 3437-3443.

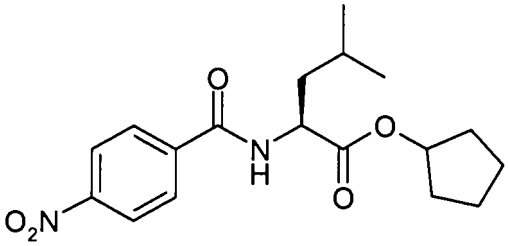
Se agitaron 2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-d]pirimidina-6-carbonitrilo (0,10 g, 0,5°mmol), 3,4,5-trimetoxianilina (0,10 g, 0,55°mmol) y níquel Raney (0,7 g, húmedo) en ácido acético (20 ml) a t.a. en atmósfera de hidrógeno. Después de 2 h, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa, para proporcionar el compuesto **(2 G=N)** en forma de un sólido (22 mg, 16 %). Pureza por CLEM del 94 %, m/z 371,1 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 8,5 (1H, s), 7,0 (2H, s a), 6,2 (2H, s a), 6,0 (2H, s), 5,7 (1H, m), 4,2 (2H, d), 3,7 (6H, s), 3,5 (3H, s), 2,7 (3H, s).

Los compuestos basados en el compuesto **(2 G=N)** se prepararon mediante los procedimientos que se esbozan a continuación.

Los compuestos ***(6)*** *y* ***(19)*** *se prepararon mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:*

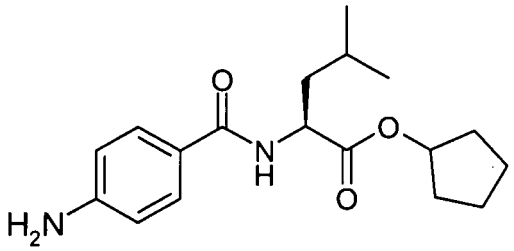


Etapa 1 – Síntesis de 4-metil-2-(4-nitrobenzamido)pentanoato de (*S*)-ciclopentilo



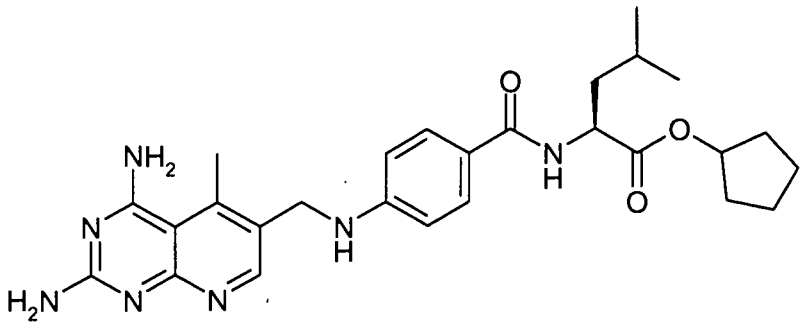
Se añadió gota a gota cloruro de 4-nitrobenzoílo (0,60 g, 3,9°mmol) en DCM (2 ml) durante 10 minutos a una solución de 2-amino-4-metilpentanoato de (*S*)-ciclopentilo (0,70 g, 3,5°mmol) y diisopropiletilamina (0,94 ml, 5,3°mmol) en DCM (10 ml) a -5 ºC en atmósfera de nitrógeno. Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar a t.a. y se agitó durante 30 minutos adicionales. La mezcla de reacción se vertió sobre $NaHCO_3$ saturado acuoso y la fase acuosa se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido oleoso en rendimiento cuantitativo. Pureza por CLEM del 92 %, m/z 347,1 $[M+H]^+$.

Etapa 2 – Síntesis de 2-(4-amidobenzamido)-4-metilpentanoato de (*S*)-ciclopentilo



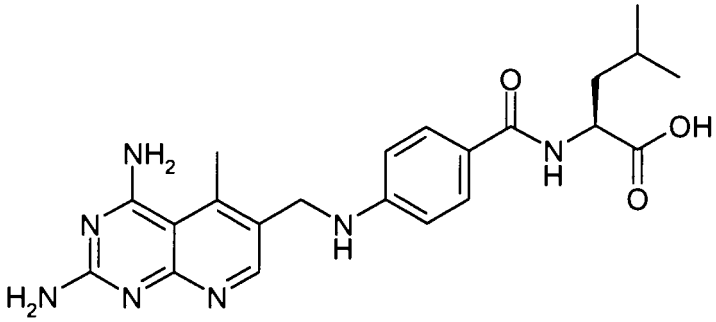
Se disolvieron trietilamina (1,09 g, 10,8°mmol) y ácido fórmico (0,50 g, 10,8°mmol) en EtOH (10 ml) y se añadieron a una solución del producto de la Etapa 1 (1,2 g, 3,4°mmol) en EtOH (10 ml). Se añadió Pd al 10 %/C (aproximadamente el 10 % molar) y la mezcla se calentó a reflujo. Después de 1 h, la mezcla de reacción caliente se filtró a través de celite y el residuo se lavó con MeOH. El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron y el residuo se repartió entre DCM y $NaHCO_3$ acuoso saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,80 g, 73 %). Pureza por CLEM del 97 %, m/z 319,2 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, CDCl3), δ: 7,6 (2H, dd), 6,6 (2H, dd), 5,2 (1H, m), 6,4 (1H, d) 4,7 (1H, m), 4,0 (2H, s), 1,9 (2H, m), 1,7 (5H, m), 1,6 (4H, m), 0,9 (6H, dd).

Etapa 3 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-{4-[(2,4-diamino-5-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilmetil)-amino]-benzoilamino}-4-metil-pentanoico



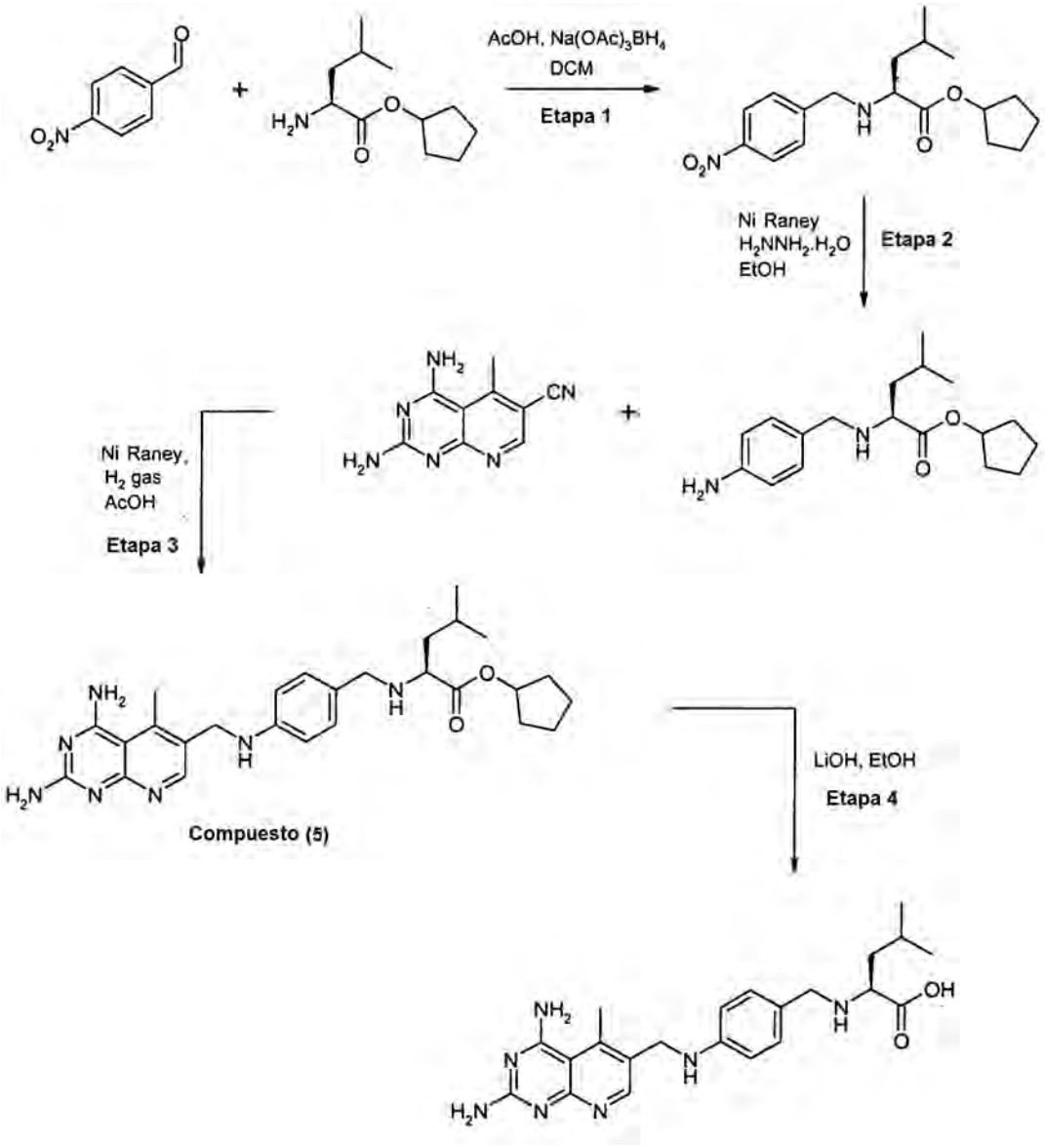
Se agitaron 2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-d]pirimidina-6-carbonitrilo (0,47 g, 2,4°mmol), el producto de la Etapa 2 300 mg, 0,94°mmol) y níquel Raney (1 g, húmedo) en ácido acético (40 ml) a t.a. en atmósfera de hidrógeno. Después de 48 h, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se evaporó a presión reducida. El material se cargó en MeOH en una columna de ICF y se eluyó con una solución de amoníaco al 1 % en MeOH. El producto en bruto se absorbió después en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH al 10 %/DCM) para proporcionar el compuesto **(6)** (60 mg, 13 %). Pureza por CLEM del 95 %, m/z 506,1 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 8,5 (1H, s), 8,2 (1H, d), 7,7 (2H, d), 7,0 (2H, s a), 6,7 (2H, d), 6,5 (1H, m), 6,2 (2H, s a), 5,1 (1H, m), 4,4 (1H, m), 4,3 (2H, d), 2,7 (3H, s), 1,7 (11H, m), 0,9 (6H, dd).

Etapa 3 - Síntesis de ácido (*S*)-2-{4-[(2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-d]pirimidin-6-il)metilamino]benzamido)-4-metilpentanoico **(19)**

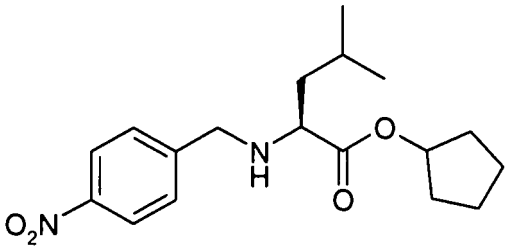


Se suspendió el producto de la Etapa 3 (39 µM) en EtOH (1,0 ml). A lo anterior se añadió una solución de hidróxido de litio 1 M (156 µl) y la suspensión se dejó en agitación durante 48 horas. El EtOH se retiró posteriormente a presión reducida, el residuo se diluyó con agua y se llevó a pH 4 con ácido acético diluido. La solución se lavó con DCM, se evaporó y se sometió a purificación por ICF para proporcionar el compuesto **(19)**. Pureza por CLEM del 92 %, m/z 438 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 8,5 (1H, s), 8,1 (1H, d), 7,7 (2H, d), 7,2 (2H, s a), 6,7 (2H, d), 6,5 (1H, t), 6,4 (2H, s a), 4,4 (1H, m), 4,3 (2H, d), 2,7 (3H, s), 1,8-1,6 (2H, m), 1,6-1,5 (1H, m), 0,9 (6H, dd).

El compuesto (5) y el ácido correspondiente se prepararon mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:

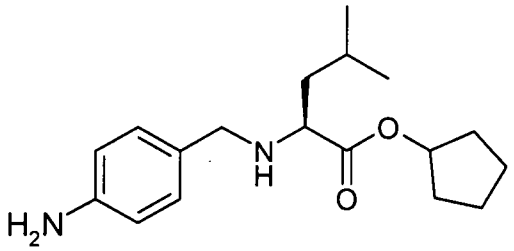


Etapa 1 – Síntesis de 4-metil-2-(4-nitrobencilamino)pentanoato de (*S*)-ciclopentilo



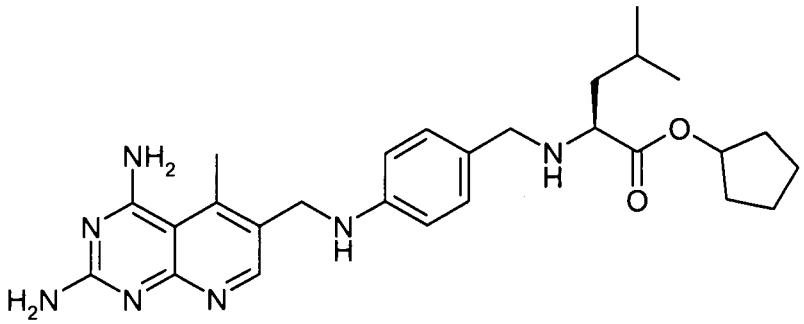
A una solución de 2-amino-4-metilpentanoato de (*S*)-ciclopentilo (2,00 g, 10,0°mmol) y 4-nitrobenzaldehído (3,04 g, 20,0°mmol) en DCM (40 ml) se le añadió ácido acético glacial (2 gotas). La solución se dejó en agitación a t.a. durante 1 h, después de lo cual se añadió triacetoxiborohidruro (6,40 g, 30,2°mmol) en una sola porción. Después de agitar durante 3 horas, la solución se vertió en HCl acuoso 1 M, se dejó en agitación durante 30 min, se neutralizó con NaOH acuoso 1 M y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporaron a presión reducida. El material en bruto se purificó mediante cromatografía (EtOAc al 5 %/isohexano) para proporcionar el compuesto de título en forma de un aceite (1,51 g). Éste se usó sin purificación adicional para la etapa siguiente. Pureza por CLEM del 71 %, m/z 335,1 $[M-H]^+$.

Etapa 2 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-(4-amino-bencilamino)-4-metil-pentanoico



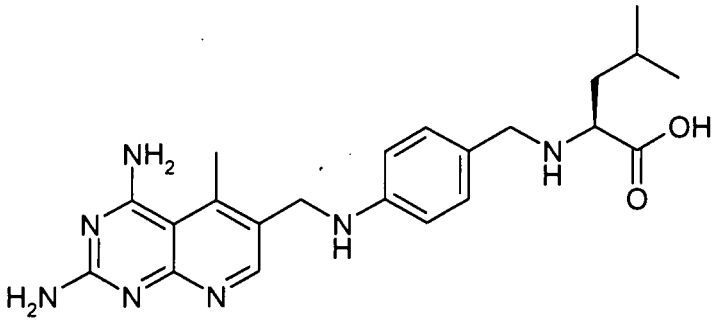
El producto de la Etapa 1 (0,90 g, 2,7°mmol) se disolvió en EtOH (5 ml) y se añadió a una suspensión de níquel Raney (~ 0,5 g) y monohidrato de hidrazina (0,38 ml, 8,1°mmol) en EtOH (5 ml). Después de calentar a reflujo durante 1 h, la mezcla de reacción caliente se filtró a través de celite y el residuo se lavó con MeOH. El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron y el residuo se repartió entre DCM y carbonato ácido de sodio acuoso saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó a presión reducida. El material en bruto se purificó mediante cromatografía (EtOAc en 20 %/isohexano) para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite (0,50 g, 61 %). Pureza por CLEM del 99 %, m/z 305,2 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, CDCl3), δ: 7,1 (2H, d), 6,6 (2H, d), 5,2 (1H, m), 3,7 (1H, d), 3,5 (1H, d), 3,2 (1H, t), 1,9 (2H, m), 1,7 (5H, m), 1,6 (4H, m), 0,9 (6H, dd).

Etapa 3 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-{4-[(2,4-diamino-5-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilmetil)-amino]-benciamino}-4-metil-pentanoico **(5)**



Se agitaron 2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-*d*]pirimidina-6-carbonitrilo (0,16 g, 0,83°mmol), el producto de la Etapa 2 (100 mg, 0,33°mmol) y níquel Raney (1 g, húmedo) en ácido acético (10 ml) a t.a. en atmósfera de hidrógeno. Después de 5 h, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se evaporó a presión reducida. El material se cargó en MeOH en una columna de ICF y se eluyó con una solución de amoníaco al 1 % en MeOH. El producto en bruto se adsorbió después en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH al 10 %/DCM) para proporcionar el compuesto del título **(5)** (30 mg, 19 %). Pureza por CLEM del 95 %, m/z 492,1 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 8,5 (1H, s), 7,2 (2H, s a), 7,0 (2H, d), 6,6 (2H, d), 6,2 (2H, s a), 5,8 (1H, m), 5,1 (1H, m), 4,2 (2H, s), 3,6 (1H, m), 3,4 (1H, m), 3,1 (1H, m), 2,7 (3H, s), 1,5 (11 H, m), 0,8 (6H, dd).

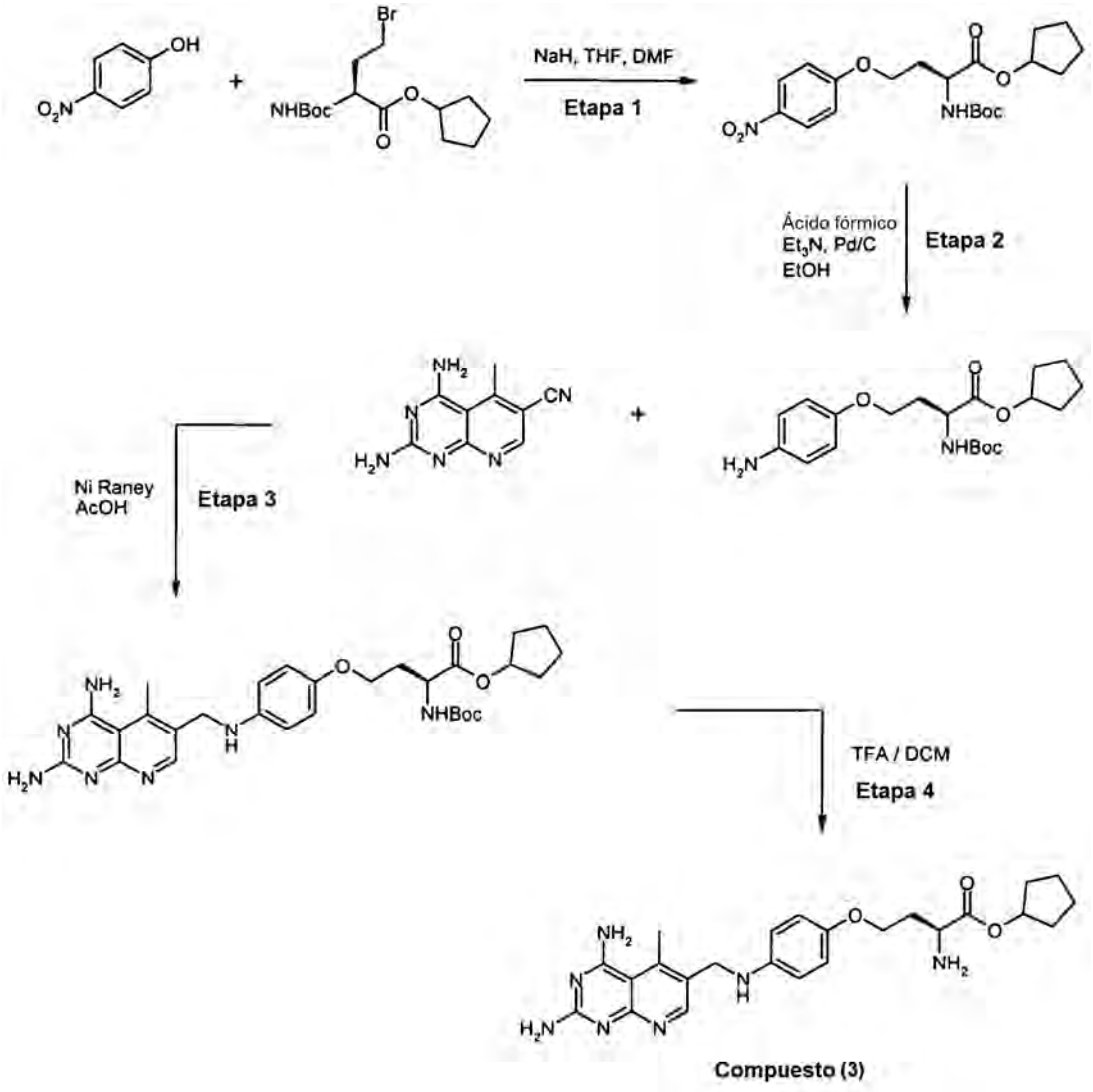
Etapa 4 - Síntesis de ácido (S)-2-{4-[(2,4-diamino-5-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilmetil)-amino]-bencilamino}-4-metil-pentanoico



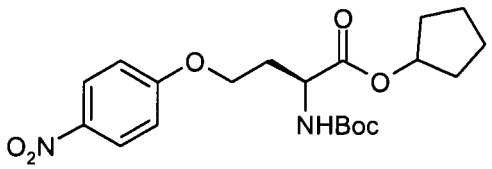
El producto de la Etapa 3 (39 µM) se suspendió en EtOH (1,0 ml). A lo anterior se le añadió una solución de hidróxido de litio 1 M (156 µl) y la suspensión se dejó en agitación durante 48 h. El EtOH se retiró posteriormente a presión reducida, el residuo se diluyó con agua y se llevó a pH 4 con ácido acético diluido. La solución se lavó con DCM, se evaporó y se sometió a purificación por ICF para proporcionar el compuesto del título. CLEM: pureza del 95 % a T_R 0,52 y 1,91 min, m/z (EN^+) 424 $[M+H]^+$; RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ: 8,5 (1H, s), 7,1 (2H, d), 7,0 (2H, s

a), 6,6 (2H, d), 6,2 (2H, s a), 5,7 (1H, t), 4,3 (2H, d), 3,6 (1H, m), 3,3 (2H, oscurecido por agua), 2,7 (3H, s), 1,8 (1H, m), 1,3 (1H, m), 1,2 (1H, m).

El compuesto ***(3)*** *se preparó mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:*

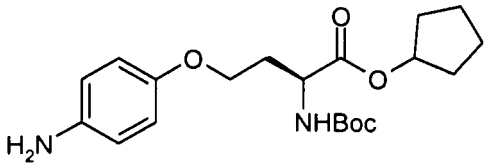


Etapa 1 - Síntesis de 2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-(4-nitrofenoxi)butanoato de (S)-ciclopentilo



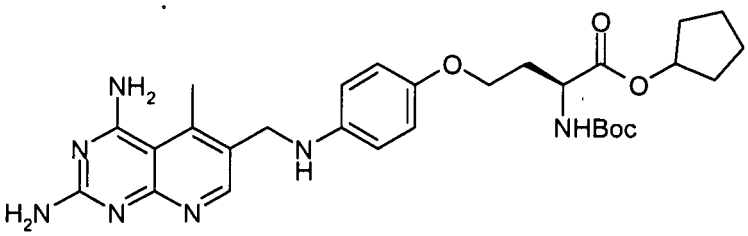
A una solución de 4-nitrofenol (2,18 g, 15,7°mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) a 0 ºC en nitrógeno se le añadió hidruro de sodio (0,63 g, 15,7°mmol). Después de calentar a t.a y de agitar durante 10 min, se añadió una solución de 4-bromo-2-(terc-butoxicarbonilamino)butanoato de (S)-ciclopentilo (5,0 g, 14,3°mmol) en DMF (20 ml). La reacción se calentó a 60 ºC durante 10 h, después de lo cual la reacción se enfrió a t.a. y se vertió en éter/carbonato de sodio. La fase orgánica se recogió y se lavó con una solución de carbonato de sodio acuoso, HCl 1 M y salmuera antes de que se secara sobre $MgSO_4$ y se concentrara a presión reducida para proporcionar un aceite que solidificó tras el reposo para proporcionar el compuesto del título (4,0 g, 69 %). Pureza por CLEM del 97 %, m/z 407,1 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ: 8,2 (2H, d), 7,4 (1H, d), 7,1 (2H, d), 5,1 (1H, m), 4,1 (3H, m), 2,1 (2H, m), 1,8 (2H, m), 1,6 (6H, m), 1,4 (9H, s).

Etapa 2 – Síntesis de 4-(4-aminofenoxi)-2-(*terc*butoxicarbonilamino)butanoato de (*S*)-ciclopentilo



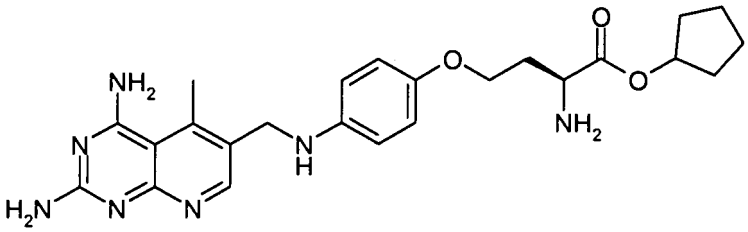
Se disolvieron trietilamina (0,77 ml, 5,2°mmol) y ácido fórmico (0,19 ml, 5,2°mmol) en EtOH (4 ml) y se añadieron a una solución del producto de la Etapa 1 (0,7 g, 1,7°mmol) en EtOH (4 ml). Se añadió Pd al 10 %/C (aproximadamente el 10 % molar) y la mezcla se calentó a reflujo. Después de 2 h, la mezcla de reacción caliente se filtró a través de celite y el residuo se lavó con MeOH. El filtrado y los lavados se combinaron y evaporaron y el residuo se repartió entre DCM y carbonato ácido de sodio acuoso saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (elución por gradiente, EtOAc al 10-40 % en hexano) para proporcionar el compuesto del título (0,3 g, 46 %). Pureza por CLEM del 93 %, m/z 379,1 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ: 6,9 (2H, d), 6,8 (2H, d), 5,3 (2H, m), 4,4 (1H, m) 4,0 (2H, m), 2,3 (1H, m), 2,2 (1H, m), 1,9 (2H, m), 1,7 (4H, m), 1,6 (2H, m), 1,4 (9H, s).

Etapa 3 - Síntesis de 2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-(4-((2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-d]pirimidin-6-il)metilamino)fenoxi)butanoato de (*S*)-ciclopentilo



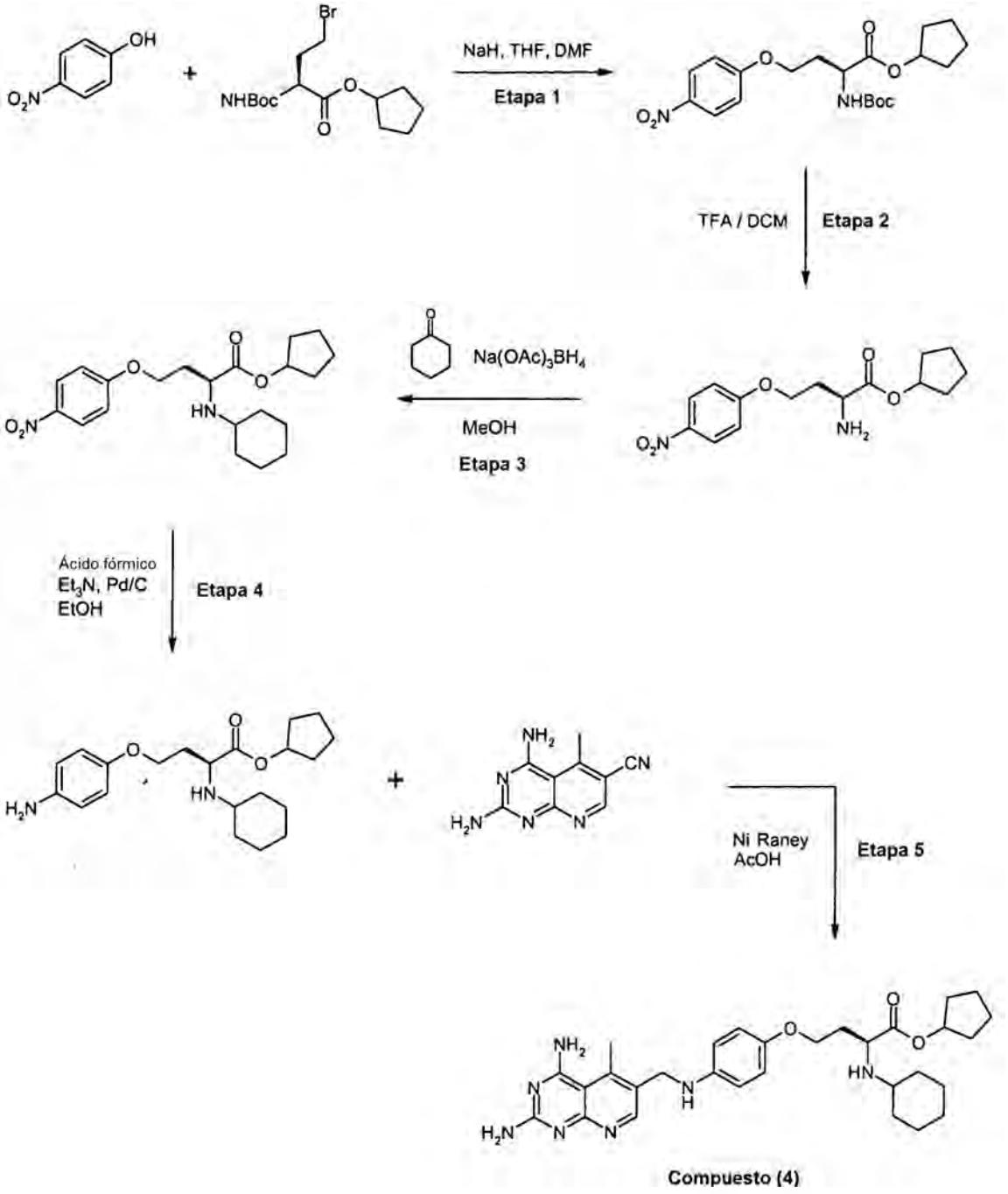
Se agitaron 2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-*d*]pirimidin-6-carbonitrilo (0,50 g, 2,5°mmol), el producto de la Etapa 2 (0,38 g, 1,0°mmol) y níquel Raney (3 g, húmedo) en ácido acético (40 ml) a t.a. en atmósfera de hidrógeno. Después de 16 h, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se evaporó a presión reducida. El material se cargó en MeOH en una columna de ICF y se eluyó con una solución de amoníaco al 1 % en MeOH. El producto en bruto se adsorbió después en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH al 5 %/DCM) para proporcionar el compuesto del título (145 mg, 26 %). Pureza por CLEM del 95 %, m/z 566,2 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 8,5 (1H, s), 7,3 (2H, m), 7,0 (2H, m), 6,7 (2H, d), 6,6 (2H, d), 6,2 (2H, s a), 5,5 (1H, s a), 5,1 (1H, m), 4,1 (3H, m), 3,9 (2H, m), 2,6 (3H, s), 2,0 (1H, m), 1,8 (3H, m), 1,6 (6H, m), 1,4 (9H, s).

Etapa 4 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (*S*)-2-amino-4-{4-[(2,4-diamino-5-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilmetil)-amino]-fenoxi}butírico **(3)**



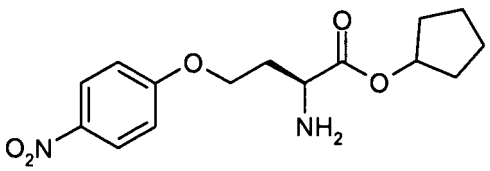
A una solución del producto de la Etapa 3 (145 mg, 0,26°mmol) en DCM (3 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (3 ml) y la reacción se agitó durante 30 min a t.a. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo en bruto se purificó mediante la carga en MeOH en una columna de ICF y eluyendo con una solución al 1 % de amoníaco en MeOH para proporcionar el compuesto **(3)** (39 mg, 33 %). Pureza por CLEM del 94 %, m/z 466,1 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 8,5 (1H, s), 7,0 (2H, s a), 6,7 (2H, d), 6,6 (2H, d), 6,2 (2H, s a), 5,5 (1H, s a), 5,1 (1H, m), 4,1 (2H, s), 3,9 (2H, m), 3,4 (1H, m), 2,7 (3H, s), 2,0 (2H, m), 1,8 (3H, m), 1,6 (6H, m).

*El compuesto **(4)** se preparó mediante el método que se describe en el siguiente esquema:*



La Etapa 1 es la misma que se ha descrito para el compuesto **(3)**.

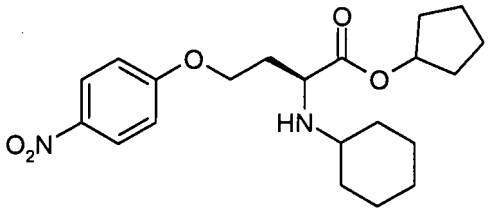
Etapa 2 - Síntesis de 2-amino-4-(4-nitrofenoxi)butanoato de (*S*)-ciclopentilo



A una solución del producto de la Etapa 1 (4,0 g, 9,8°mmol) en DCM (12 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (12 ml). Después de agitar a t.a. durante 1 h, la reacción se diluyó con DCM, se enfrió en hielo y se neutralizó mediante la adición de amoníaco acuoso. La fase orgánica se recogió y se lavó con agua, carbonato ácido de sodio acuoso y salmuera, después se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo (3,0 g, 100 %). Pureza por CLEM del 97 %, m/z 309,1

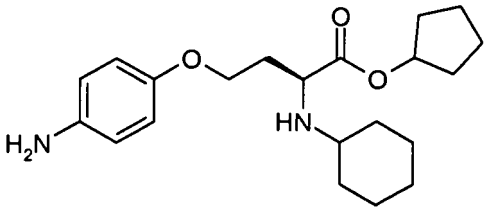
$[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ: 8,2 (2H, d), 7,0 (2H, d), 5,2 (1H, m), 4,2 (2H, m), 3,6 (1H, dd), 1,7-1,5 (10H, m).

Etapa 3 - Síntesis de 2-(ciclohexilamino-4-(4-nitrofenoxi)butanoato de (*S*)-ciclopentilo



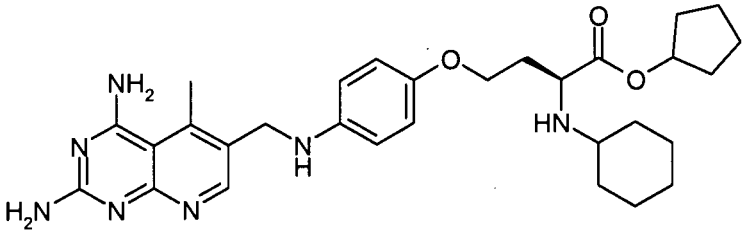
A un matraz que contenía el producto de la Etapa 2 (1,0 g, 3,3°mmol) y ciclohexanona (34 ml, 3,3°mmol) en nitrógeno se le añadió MeOH anhidro (10 ml). Después de agitar durante 12 h a t.a., se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (2,07 g, 9,75°mmol). Después de 4 horas, la reacción se vertió lentamente sobre una mezcla de DCM/HCl acuoso (1 M). Después de agitar durante 10 min, la fase orgánica se recogió y se lavó con carbonato ácido de sodio, después se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido oleoso de color amarillo (1,21 g, 95 %). Pureza por CLEM del 92 %, m/z 391,1 $[M+H]^+$.

Etapa 4 - Síntesis de 4-(4-aminofenoxi-2-(ciclohexilamino)butanoato de (*S*)-ciclopentilo



Se disolvieron trietilamina (1,29 ml, 9,3°mmol) y ácido fórmico (348 µl, 9,3°mmol) en EtOH (10 ml) y se añadieron a una solución del producto de la Etapa 3 (1,2 g, 3,1°mmol) en EtOH (10 ml). Se añadió Pd al 10 %/C (aproximadamente el 10 % molar) y la mezcla se calentó a reflujo. Después de 30 min, la mezcla de reacción caliente se filtró a través de Celite y el residuo se lavó con MeOH. El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron y el residuo se repartió entre DCM y $NaHCO_3$ acuoso saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (1,01 g, 92 %). Pureza por CLEM del 94 %, m/z 361,1 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ: 6,7 (2H, d), 6,6 (2H, d), 5,2 (1H, m), 4,0 (1H, m), 3,9 (1H, m), 3,5 (1H, dd), 2,3 (1H, m), 2,1 (1H, m), 1,9 (4H, m), 1,7 (7H, m), 1,6 (3H, m), 1,3-0,9 (5H, m).

Etapa 5 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-ciclohexilamino-4-{4-[(2,4-diamino-5-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilmetil)-amino]-fenoxi}butírico

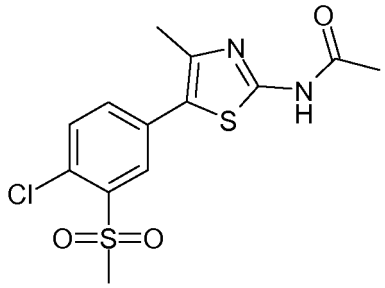


Se agitaron 2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-*d*]pirimidina-6-carbonitrilo (0,50 g, 2,5°mmol), el producto de la Etapa 4 (0,36 g, 1,0°mmol) y níquel Raney (3 g, húmedo) en ácido acético (40 ml) a t.a. en atmósfera de hidrógeno. Después de 48 h, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se evaporó a presión reducida. El material se cargó en MeOH en una columna de ICF y se eluyó con una solución de amoníaco al 1 % en MeOH. El producto en bruto se adsorbió después en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH al 10 %/DCM) para proporcionar el compuesto del título (76 mg, 14 %). Pureza por CLEM del 90 %, m/z 548,2 $[M+H]^+$, RMN ^1H (400 MHz, DMSO), δ: 8,5 (1H, s), 7,0 (2H, s a), 6,7 (2H, d), 6,6 (2H, d), 6,2 (2H, s a), 5,5 (1H, m), 5,1 (1H, m), 4,1 (2H, s), 3,9 (2H, m), 3,4 (1H, m), 2,7 (3H, s), 2,3 (1H, m), 1,9 (1H, m), 1,8 (4H, m), 1,6 (11H, m), 1,1 (5H, m).

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Este ejemplo describe la modificación del inhibidor conocido de la PI3 cinasa, N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2-il]-acetamida (compuesto **(20)**), mediante la unión de un motivo de éster de aminoácido en un punto donde no se produce ninguna alteración de su modo de unión.

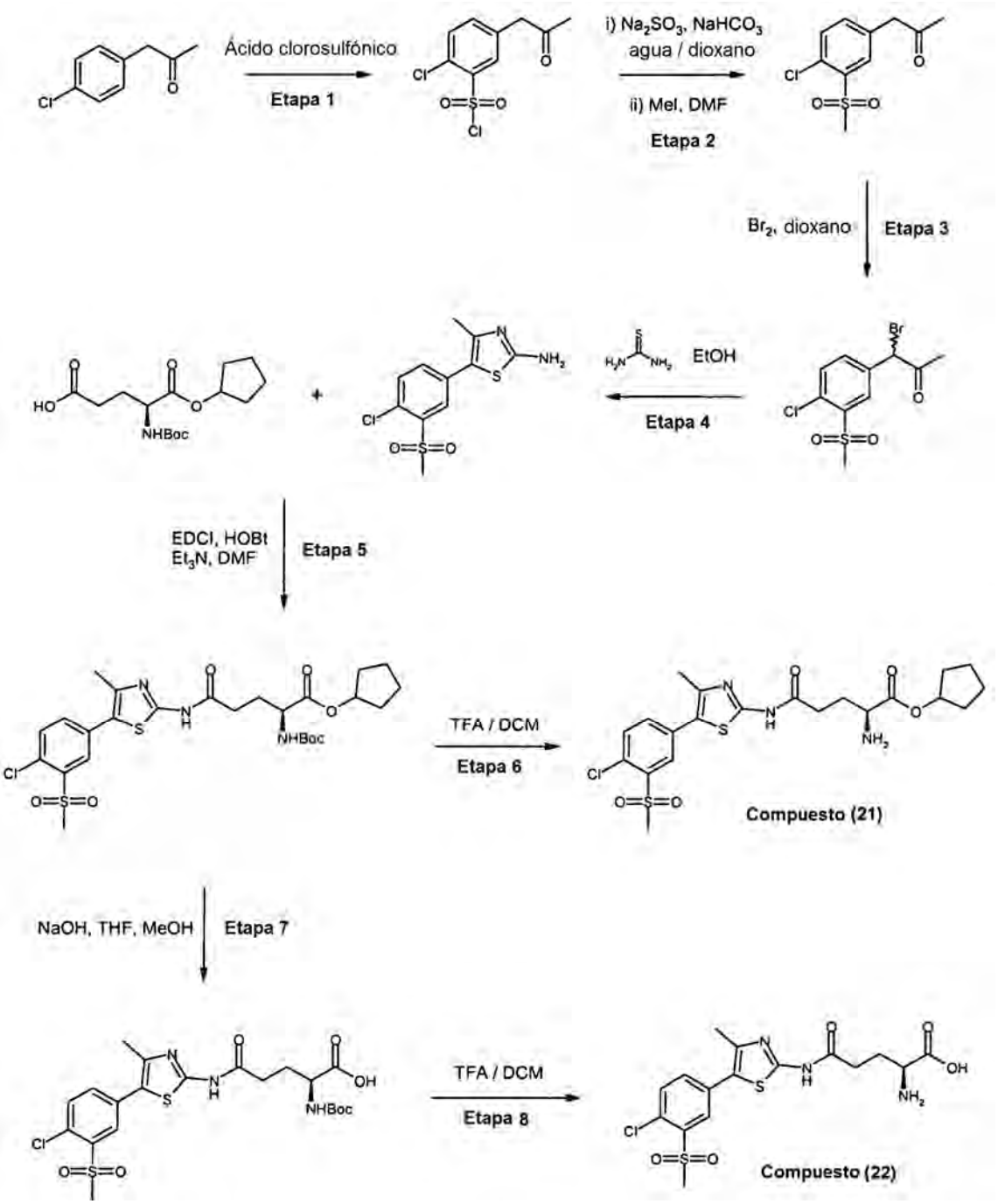
Compuesto (20): N-[5-(4-Cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-il]-acetamida



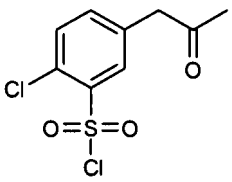
El compuesto **(20)** se preparó como se describe en el documento WO03072552.

Los compuestos basados en el compuesto **(20)** se prepararon mediante los procedimientos que se esbozan a continuación.

Los compuestos ***(21)*** *y* ***(22)*** *se prepararon mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema:*

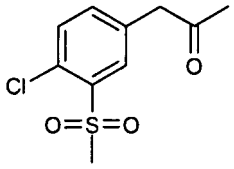


Etapa 1 - Síntesis de cloruro de 2-cloro-5-(2-oxo-propil)bencenosulfonilo



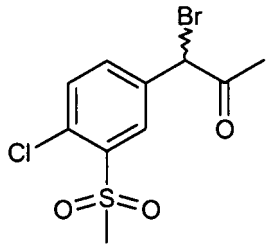
Se añadió 4-clorofenil acetona (4 g, 0,023 mol) gota a gota a ácido clorosulfónico (30 ml, 0,45 mol) a -10 ºC en N_2 con agitación suave. La mezcla de reacción se dejó calentar a t.a. y la agitación continuó durante 18 h. La mezcla de reacción se inactivó cuidadosamente mediante la adición gota a gota a hielo triturado (500 ml). La solución acuosa se extrajo con EtOAc (250 ml, 3 veces). Las capas de EtOAC combinadas se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron a sequedad al vacío para proporcionar el compuesto del título en bruto (6,3 g, 65 %) que se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. Pureza por CLEM del 92 %. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$), δ: 2,30 (3H, s), 3,85 (2H, s), 7,50 (1H, d), 7,65 (1H, d), 7,95 (1H, s).

Etapa 2 - Síntesis de 1-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-propan-2-ona



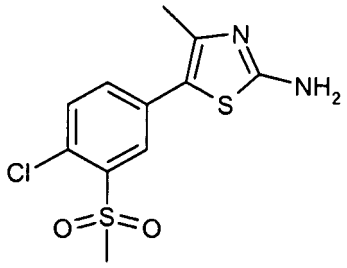
Una mezcla de Na_2SO_3 (3,79 g, 0,030 mol) y $NaHCO_3$ (2,53 g, 0,030 mol) en agua (90 ml) se agitó a 70 ºC. A esta solución se le añadió una solución del producto de la Etapa 1 (4,65 g, 0,015 mol) en dioxano (190 ml). La agitación continuó a 70 ºC durante 1 h. Tras enfriar a t.a., la mezcla de reacción se concentró a sequedad al vacío proporcionando un sólido de color marrón. Se añadió DMF (190 ml) seguida de MeI (1,88 ml, 0,030 mol). La mezcla de reacción se agitó a 40 ºC durante 1 h. Después de la finalización, la mezcla de reacción se vertió en agua (90 ml) y se extrajo con EtOAc (500 ml). El EtOAC se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título en bruto en forma de un sólido de color marrón (2,49 g, 67 %), que se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. Pureza por CLEM del 81 %, m/z 247 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$), δ: 2,15 (3H, s), 3,20 (3H, s), 3,75 (2H, s), 7,35 (1H, d), 7,45 (1H, d), 7,85 (1H, s).

Etapa 3 - Síntesis de 1-bromo-1-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-propan-2-ona



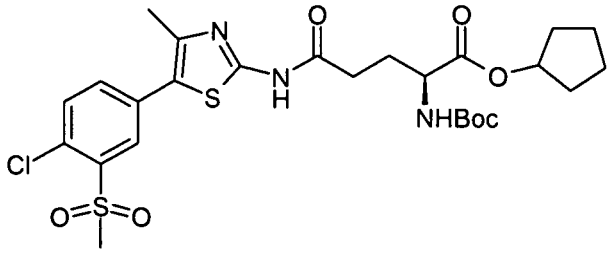
A una solución agitada del producto de la Etapa 2 (1,88 g, 7,60°mmol) en 1,4-dioxano (120 ml) se le añadió gota a gota a t.a. bromo (0,292 ml, 5,72°mmol) proporcionando una solución de color naranja oscuro. La agitación continuó durante 18 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad al vacío evitando calentar por encima de 30 ºC durante la evaporación. El residuo se volvió a disolver en EtOAc (100 ml) y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado (20 ml), seguido de agua (20 ml). La fase de EtOAc se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a sequedad al vacío. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 50 %/heptano) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo (2,0 g, 80 %). Pureza por CLEM del 74 %, m/z 325/327 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2,35 (3H, s), 3,25 (3H, s), 5,35 (1H, s), 7,50 (1H, d), 7,65 (1H, dd), 8,05 (1H, s).

Etapa 4 - Síntesis de 5-(4-cloro-3-metanesulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilamina



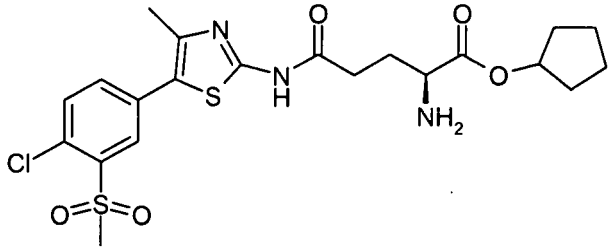
Una mezcla del producto de la Etapa 3 (2 g, 6,15°mmol) y tiourea (468 mg, 6,15°mmol) en EtOH (65 ml) se agitó a 70 ºC durante 1,5 h. Después, la reacción se enfrió a t.a y se produjo la precipitación. El sólido de color crema se recogió mediante filtración para proporcionar el compuesto del título (1,2 g, 64 %). Pureza por CLEM del 91 %, m/z 303 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ: 2,35 (3H, s), 3,35 (3H, s), 7,75-7,85 (2H, m), 8,15 (1H, s).

Etapa 5 – Síntesis de Ciclopentil éster del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-butírico



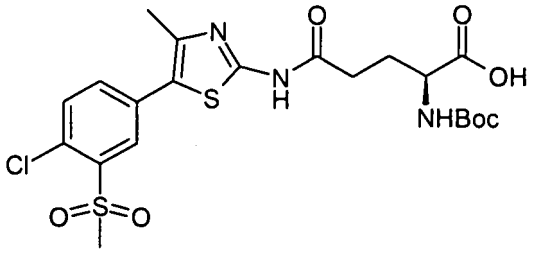
A una mezcla agitada de éster 1-ciclopentílico del ácido 2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico (208 mg, 0,66°mmol), EDCI (190 mg, 0,99°mmol) y HOBt (107 mg, 0,79°mmol) en DMF (1,5 ml) se le añadió gota a gota una solución del producto de la Etapa 4 (200 mg, 0,66°mmol) en DMF (1,5 ml) a t.a. Se añadió trietilamina (0,138 ml, 0,99°mmol) y la agitación continuó durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo con EtOAc (15 ml). La fase de EtOAc se lavó con agua (10 ml), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío. La purificación mediante CCF preparativa (EtOAc al 70 %/heptano, F_R 0,5) proporcionó el compuesto del título (160 mg, 40 %). Pureza por CLEM del 91 %, m/z 600/602 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO), δ: 1,45-1,55 (9H, s), 1,65-2,15 (10H, m), 2,45 (3H, s), 2,70 (2H, m), 3,45 (3H, s), 4,10-4,25 (1H, m), 5,25 (1H, m), 7,75-7,90 (2H, m), 8,25 (1H, s).

Etapa 6 - Síntesis de éster ciclopentílico del ácido (S)-2-amino-4-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-butírico **(21)**



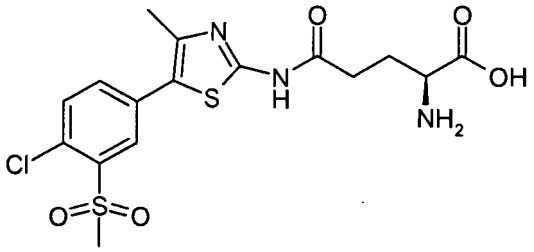
Una solución del producto de la Etapa 5 (140 mg, 0,233°mmol) en TFA al 20 %/DCM (2 ml) se dejó reposar a t.a. durante 3 h. Después de la finalización, la mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **(21)** (143 mg, 100 %). Pureza por CLEM del 97 %, m/z 500/502 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD), δ: 1,35-1,85 (8H, m), 2,00-2,20 (2H, m), 2,25 (3H, s), 2,60 (2H, m), 3,20 (3H, s), 3,85-4,00 (1H, m), 5,10 (1H, m), 7,50-7,65 (2H, m), 7,95 (1H, s).

Etapa 7 - Síntesis de ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-4-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-butírico



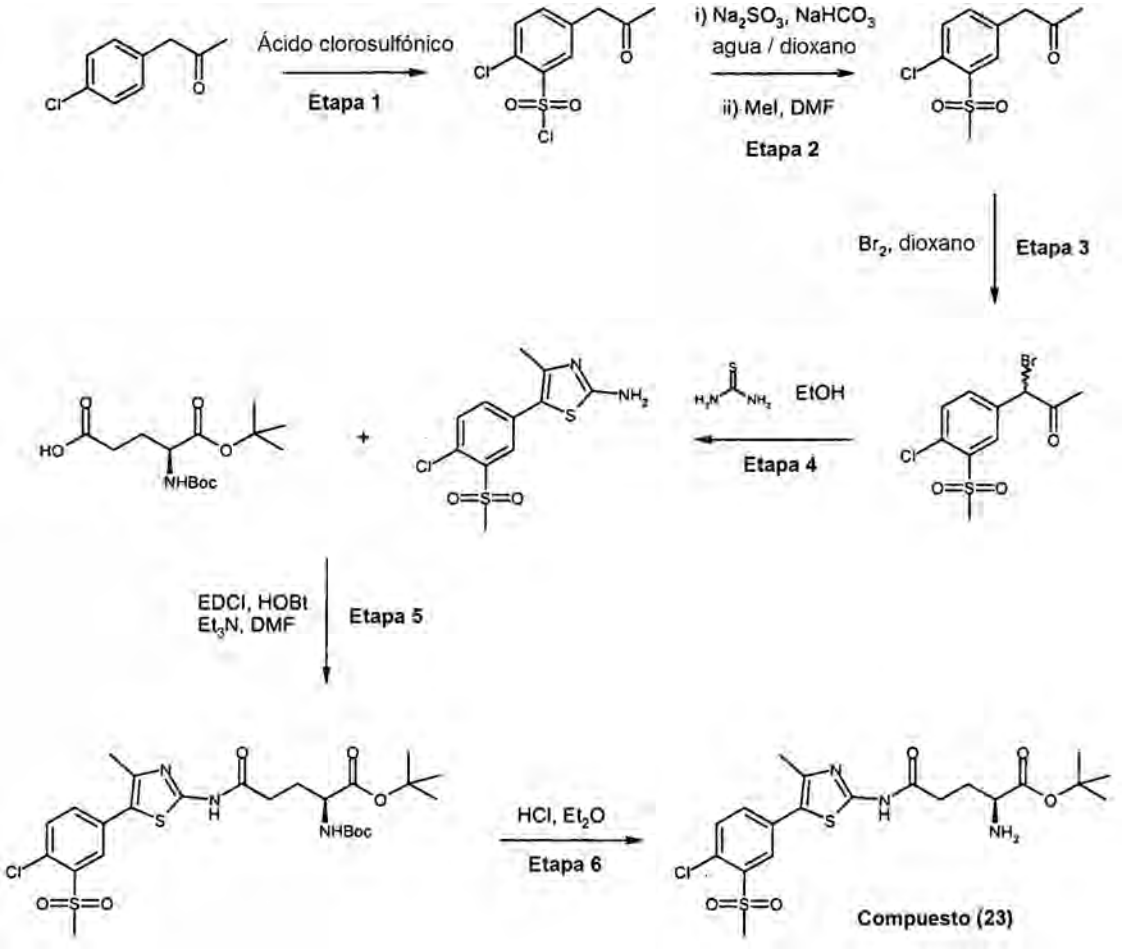
A una solución del producto de la Etapa 5 (20 mg, 0,033°mmol) en una mezcla de THF (0,5 ml) y MeOH (0,5 ml) se le añadió NaOH acuoso 2 M (0,5 ml).La mezcla se dejó reposar a t.a. durante 3 h. Tras la finalización, la mezcla de reacción se concentró casi a sequedad y HCl 1 M se añadió gota a gota hasta un pH 1-2. El precipitado resultante se recogió mediante filtración a presión ligera. El sólido se lavó con agua (0,5 ml) y se secó minuciosamente al vacío para proporcionar el compuesto del título (12 mg, 68 %). Pureza por CLEM del 94 %, m/z 532/534 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$), δ: 1,55-1,70 (9H, s), 2,15-2,55 (2H, m), 2,60 (3H, s), 2,75-2,90 (2H, m), 3,55 (3H, s), 4,25-4,45 (1H, m), 7,85-8,00 (2H, m), 8,35 (1H, s).

Etapa 8 – Síntesis de ácido (S)-2-amino-4-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-butírico **(22)**



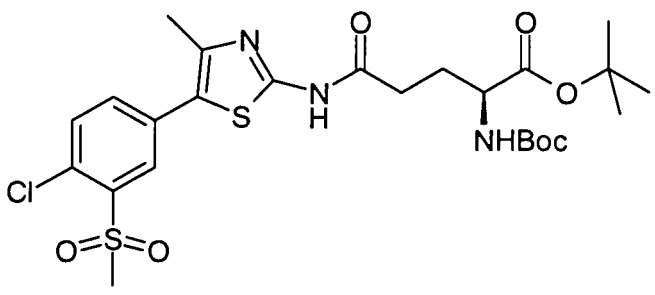
Una solución del producto de la Etapa 7 (12 mg, 0,0225°mmol) en TFA al 20 %/DCM (0,3 ml) se dejó reposar a t.a. durante 3 h. Después de la finalización, la mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título **(22)** (12 mg, 100 %). Pureza por CLEM del 94 %, m/z 432/434 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD), δ: 2,10-2,25 (2H, m), 2,30 (3H, s), 2,65-2,75 (2H, m), 3,25 (3H, s), 3,95-4,05 (1H, m), 7,60-7,80 (2H, m), 8,05 (1H, s).

*El compuesto **(23)** se preparó mediante el procedimiento que se describe en el siguiente esquema.*



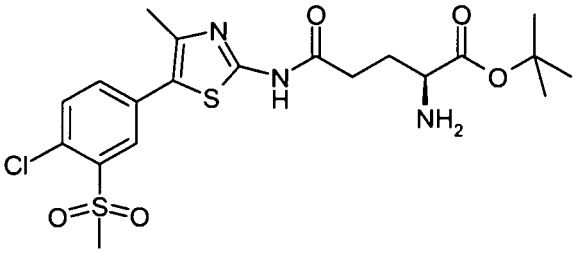
Las Etapas 1, 2, 3 y 4 son las mismas que se han descrito para la preparación de los compuestos **(21)** y **(22)**.

Etapa 5 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-2-amino-4-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-butírico



Este compuesto se preparó a partir del éster terc-butílico del ácido 2-terc-butoxicarbonilamino-pentanodioico y de 5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilamina (producto de la Etapa 4) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto **(21)**.

Etapa 6 - Síntesis de éster terc-butílico del ácido (S)-2-amino-4-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-butírico **(23)**



A una solución del producto de la Etapa 5 (50 mg, 0,085°mmol) en EtOAc (0,25 ml) se le añadió una solución de HCl 2 M/éter (0,25 ml) a t.a. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 4 horas. La reacción se volvió a tratar con una mezcla de EtOAc (0,25 ml) y HCl 2 M/éter (0,25 ml). La agitación continuó durante 1 h. El precipitado formado se recogió mediante filtración por gravedad, se repartió entre EtOAc (3 ml) y $NaHCO_3$ acuoso saturado (0,5 ml). La fase de EtOAc se lavó con agua (1 ml), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **(23)** (6,5 mg, 16 %). Pureza por CLEM del 95 %, m/z 488/490 [M^++H], RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD), δ: 1,35-1,40 (9H, s), 1,80-2,05 (2H, m), 2,30 (3H, s), 2,45-2,55 (2H, m), 3,25 (3H, s), 3,30-3,35 (1H, m), 7,60-7,70 (2H, m), 8,05 (1H, s).

Ensayos biológicos

<u>Ensayo de actividad inhibidora de la histona desacetilasa</u>

La capacidad de los compuestos para inhibir las actividades de la histona desacetilasa se midió usando el ensayo de actividad fluorescente HDAC disponible en el mercado de Biomol. En resumen, el sustrato *Fluor de Lys™,* una lisina con una acetilación en el amino épsilon, se incubó con la fuente de la actividad histona desacetilasa (extracto nuclear de células HeLa) en presencia o ausencia de inhibidor. La desacetilación del sustrato sensibilizó el sustrato a desarrollador de *Fluor de* Lys™ lo que generó un fluoróforo. Por tanto, la incubación del sustrato con una fuente de actividad de HDAC dio como resultado un aumento de la señal que disminuyó en presencia de un inhibidor de la HDAC.

Los datos se expresaron como porcentaje del control, medidos en ausencia de inhibidor, restándose la señal de fondo de todas las muestras del siguiente modo:

$$\% \text{ de actividad} = ((S^i - B) / (S^o - B)) \times 100$$

en la que S^i es la señal en presencia de sustrato, enzima e inhibidor, S^o es la señal en presencia de sustrato, enzima y el vehículo en el que se disuelve el inhibidor y B es la señal de fondo medida en ausencia de enzima.

Los valores de CI50 se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados de ocho puntos de datos a la ecuación para una dosis-respuesta sigmoidea con una pendiente variable (% de actividad frente al log de la concentración del compuesto) usando el software Graphpad Prism.

Se usó para la exploración la actividad histona desacetilasa del extracto nuclear en bruto derivado de células HeLa. La preparación, adquirida de 4C (Seneffe, Bélgica), se preparó a partir de células HeLa recogidas mientras estaban en la fase de crecimiento exponencial. El extracto nuclear se preparó de acuerdo con Dignam JD 1983 *Nucl. Acid. Res.* 11, 1475-1489, se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 ºC. La composición final de tampón fue HEPES 20°mM, KCl 100°mM, EDTA 0,2°mM, DTT 0,5°mM, PMSF 0,2 mM y glicerol al 20 % (v/v).

<u>Ensayo de actividad inhibidora de la cinasa Aurora A</u>

La capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de la cinasa Aurora A se midió usando un ensayo de microplacas. En resumen, se recubrieron previamente Flashplates ® de 96 pocillos (PerkinElmer Life Sciences) con la proteína básica de la mielina (PBM). Se incubó PBM (100 ul de 100 mg/ml en PBS) a 37 ºC durante 1 h, seguido de la incubación durante la noche a 4 ºC. Después, las placas se lavaron con PBS y se dejaron secar al aire.

Para determinar la actividad de la cinasa Aurora A, se incubaron 40 ng de la enzima (ProQuinase: Cinasa Aurora A recombinante, de longitud completa, condensada en el extremo N-terminal con GST y expresada por baculovirus en células de insecto Sf21) en tampón de ensayo (Tris 50°mM (pH 7,5), NaCl 10°mM, $MgCl_2$ 2,5°mM, DTT 1°mM, DMSO al 0,4 %), ATP 10 µM (Km de la enzima) y [γ-^{33}P]-ATP 0,5 µCi y con concentraciones variables del inhibidor. Los pocillos que carecían de inhibidor se usaron como vehículo control y los pocillos que no contenían enzima se

usaron para medir la señal "de fondo". Las placas se incubaron durante la noche a 30 ºC. Después de la incubación, los contenidos de los pocillos se retiraron y las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía pirofosfato de tetra sodio 10°mM antes del recuento por centelleo usando Wallac MicroBeta TriLux.

Se generaron curvas de dosis-respuesta de 10 concentraciones (concentración final superior 10 µM, con diluciones con factor de dilución 3) usando pocillos por triplicado.

Los valores de CI50 se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados de los puntos de datos a la ecuación para una dosis-respuesta sigmoidea con una pendiente variable (% de actividad frente al log de la concentración del compuesto) usando el software Graphpad Prism.

Ensayo de actividad inhibidora de la dihidrofolato reductasa (DHFR)

La capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de la DHFR se midió usando un ensayo basado en la capacidad de la DHFR para catalizar la reducción reversible dependiente de NADPH del ácido dihidrofólico al ácido tetrahidrofólico usando un kit Sigma (número de catálogo CS0340). Éste usa un tampón de ensayo patentado y DHFE humana recombinante a $7{,}5 \times 10^{-4}$ Unidades por reacción, NADPH a 60 µM y ácido dihidrofólico a 50 µM. La reacción se siguió mediante el control de la disminución de la absorbancia a 340 nm, durante un periodo de 2 minutos, a temperatura ambiente, y la actividad enzimática se calculó como la tasa de disminución de la absorbancia. La actividad enzimática, en presencia de inhibidor, se expresó como un porcentaje de la actividad sin inhibidor y la CI50 de inhibidor se determinó a partir de una curva dosis-respuesta sigmoidea usando el software XIfit (% de actividad frente al log de la concentración del compuesto). Cada muestra se procesó por triplicado y cada curva dosis-respuesta se compuso de 10 diluciones del inhibidor.

Ensayo de actividad inhibidora de la P38 MAP cinasa α

La capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de la P38 MAP cinasa α (enzima humana de longitud completa que se expresa en E. coli como una proteína marcada con GST en el extremo N-terminal) se midió usando un ensayo realizado por Upstate (Dundee RU). En un volumen de reacción final de 25 µl, se incubó P38 MAP cinasa α (5-10 mU) con Tris 25°mM a pH 7,5, EGTA 0,02°mM, proteína básica de la mielina 0,33 mg/ml, acetato de magnesio 10°mM, ATP 90 µM (Km 97 µM) y [γ^{33}P]-ATP (actividad específica aproximada 500 cpm/pmol). La reacción se inició mediante la adición de la mezcla de MgATP. Después de la incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de una solución de ácido fosfórico al 3 %. Después se colocaron 10 µl de la reacción sobre una tira de filtro P30 y se lavó tres veces durante 5 minutos con ácido fosfórico 75°mM y una vez con metanol, antes del secado y el recuento por centelleo.

Las curvas de dosis-respuesta se generaron a partir de una serie de diluciones con factor de dilución ½ log de una solución madre del inhibidor en DMSO. Se realizaron nueve diluciones a partir de una concentración superior final de 10 µM y se incluyó un blanco "sin compuesto". Las muestras se procesaron por duplicado. Los datos de los recuentos por centelleo se recogieron y sometieron a un análisis de ajuste libre mediante el software Graphpad Prism. A partir de la curva generada se determinó la concentración que proporcionaba una inhibición del 50 %.

Ensayo de inhibición de la PI 3-cinasa γ

La medición de la actividad de la PI 3-cinasa γ depende de la afinidad de unión específica y elevada del dominio de homología de pleckstrina (PH) de GRP1 al PIP3, el producto de la actividad de la PI 3-cinasa. Se forma un complejo entre el anticuerpo monoclonal anti-GST marcado con europio, un dominio PH de GRP1 marcado con GST, PIP3 biotinilado y estreptavidina-aloficocianina (APC). Este complejo genera una señal de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) resuelta en el tiempo y estable, que disminuye por la competición del PIP3, generado en el ensayo de la PI 3-cinasa, con el PIP3 biotinilado.

El ensayo se realizó en Upstate (Dundee, RU) del siguiente modo: en un volumen de reacción final de 20 µl, se incubó la PI 3-cinasa γ (enzima humana recombinante de longitud completa, marcada con Hi6 en el extremo N-terminal y expresada por baculovirus en células de insecto Sf21) en tampón de ensayo que contenía fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 10 µM y MgATP 100 µM (Km de la enzima 117 µM). La reacción se inició mediante la adición de la mezcla de MgATP. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de solución de detención que contenía EDTA y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato biotinilado. Por último, se añadieron 5 µl de tampón de detención, que contenía el anticuerpo monoclonal anti-GST marcado con europio, un dominio PH de GRP1 marcado con GST y estreptavidina-APC. Después, la placa se leyó en modo fluorescencia resuelta en el tiempo y la señal homogénea de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF) se determinó de acuerdo con la fórmula HTRF =10000 x (Em665nm/Em620nm).

Los puntos de datos duplicados se generaron a partir de una serie de diluciones con factor de dilución ½ log de una solución madre del compuesto en DMSO. Se realizaron nueve diluciones a partir de una concentración superior final de 10 µM y se incluyó un blanco "sin compuesto". Los datos de la relación de HTRF se transformaron en % de actividad de los controles y se analizaron con una aplicación de dosis-respuesta sigmoidea de cuatro parámetros (pendiente variable). Se determinó la concentración que proporcionaba una inhibición del 50 % (CI).

Ensayo de inhibición de la proliferación celular

Se recogieron estirpes celulares de cáncer (U937 y HCT 116) que crecían en fase logarítmica y se sembraron a 1000-2000 células/pocillo (volumen final de 100 µl) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Después de 24 horas de crecimiento las células se trataron con el compuesto. Las placas se volvieron a incubar durante 72-96 horas adicionales antes de que se realizara un ensayo de viabilidad celular WST-1 de acuerdo con las instrucciones de los proveedores (Roche Applied Science).

Los datos se expresaron como un porcentaje de inhibición del control, medidos en ausencia de inhibidor del siguiente modo:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - ((S^i / S^o) \times 100)$$

donde S^i es la señal en presencia de inhibidor y S^o es la señal en presencia de DMSO.

Se generaron curvas de dosis-respuesta a partir de 8 concentraciones (concentración final superior 10 µM, con diluciones con factor de dilución 3) usando 6 duplicados.

Los valores de CI50 se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal, después de ajustar los resultados a la ecuación para una dosis-respuesta sigmoidea con una pendiente variable (% de actividad frente al log de la concentración del compuesto) usando el software Graphpad Prism.

Estimulación con LPS de sangre entera humana

La sangre entera se extrajo mediante punción venosa usando tubos de tipo vacutainer heparinizados (Becton Dickinson) y se diluyó en un volumen igual de medio de cultivo tisular RPMI1640. Se sembraron 100 µl en placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo en V. Se añadió inhibidor en 100 µl de medio RPMI1640 y 2 horas después la sangre se estimuló con LPS (cepa de *E. coli* 005:B5, Sigma) a una concentración final de 100 ng/ml y se incubó a 37 ºC en CO_2 al 5 % durante 6 h. Se midieron los niveles de TNF-α en los sobrenadantes sin células mediante ELISA de tipo sándwich (R&D Systems n.º QTA00B).

Ensayo de carboxilesterasa en células rotas

Preparación del extracto celular

Se lavaron células tumorales U937 o HCT 116 (~ 10^9) en 4 volúmenes de PBS de Dulbeccos (~ 1 litro) y se sedimentaron a 525 g durante 10 min a 4 ºC. Esto se repitió dos veces y el sedimento celular final se resuspendió en 35 ml de tampón homogeneizante frío (Trizma 10°mM, NaCl 130°mM, $CaCl_2$ 0,5°mM pH 7,0 a 25 ºC). Los homogeneizados se prepararon mediante cavitación con nitrógeno (700 psi (4,83 MPa) durante 50 min a 4 ºC). El homogeneizado se mantuvo en hielo y se complementó con una mezcla de inhibidores a las concentraciones finales de:

Leupeptina 1 µM
Aprotinina 0,1 µM
E64 8 µM
Pepstatina 1,5 µM
Bestatina 162 µM
Quimostatina 33 µM

Después de aclarar el homogeneizado celular mediante centrifugación a 525 g durante 10 minutos, el sobrenadante resultante se usó como fuente de actividad esterasa y se almacenó a -80 ºC hasta que se necesitó.

Medición de la escisión del éster

La hidrólisis de los ésteres a los correspondientes ácidos carboxílicos puede medirse usando el extracto celular preparado como se ha indicado anteriormente. A tal efecto, se incubó extracto celular (~30 µg/volumen total del ensayo de 0,5 ml) a 37 ºC en un tampón Tris-HCl 25°mM, NaCl 125°mM, pH 7,5 a 25 ºC. A tiempo cero, el éster (sustrato) se añadió a una concentración final de 2,5 µM y las muestras se incubaron a 37 ºC durante el tiempo apropiado (normalmente 0 u 80 min). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de volúmenes 3 x de acetonitrilo. Para las muestras a tiempo cero el acetonitrilo se añadió antes que el compuesto éster. Después de la centrifugación a 12000 g durante 5 minutos, las muestras se analizaron para determinar el éster y su correspondiente ácido carboxílico a temperatura ambiente mediante CLEM (Sciex API 3000, bomba binaria HP1100, CTC PAL). La cromatografía se basó en una columna AceCN (75 * 2,1 mm) y una fase móvil de acetonitrilo al 5-95 % en agua/ácido fórmico al 0,1 %.

Cuantificación de la expresión de hCE-1, hCE-2 y hCE-3 en líneas celulares monocíticas y no monocíticas

Se usaron cebadores específicos del gen para amplificar por PCR hCE-1, -2 y -3 de ADNc humano. Los productos de la PCR se clonaron en un vector plasmídico y se verificó la secuencia. Después, se diluyeron en serie para su

uso como curvas patrón en reacciones de PCR en tiempo real. Se extrajo ARN total de diversas estirpes celulares humanas y se preparó el ADNc. Para cuantificar los niveles absolutos de las hCE en las estirpes celulares se compararon los niveles de expresión génica con los patrones del producto de PCR clonados en un ensayo SYBR Green PCR en tiempo real. La Figura 1 muestra que la hCE-1 solo se expresa en una cantidad significativa en una estirpe de células monocíticas.

Resultados biológicos

Los compuestos a los que se hace referencia en los Ejemplos 1-5 anteriores se investigaron en los ensayos de inhibición enzimática, proliferación celular y escisión del éster descritos anteriormente y los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4.

Potencia

Tabla 3

HDAC	CI50 nM de inhibición enzimática (HDAC - extracto nuclear de células HeLa)	CI50 (nM) de proliferación celular	Relación de CI50 célula/enzima
Compuesto (7) modulador sin modificar (SAHA)	100	400	4
Compuesto (8) modulador modificado (éster ciclopentílico)	100	50	0,5
Acido resultante de la escisión del éster del **Compuesto (9)** modulador modificado	70	Inactivo	NA
Compuesto (10) modulador modificado (éster t-butílico)	130	1300	10

Los resultados anteriores muestran que:

(i) los compuestos modificados con éster de aminoácido (Compuestos 8 y 10) y el ácido (Compuesto 9) que resultaría de la escisión del motivo de éster, tienen unas CI50 en el ensayo enzimático comparables al valor para el inhibidor HDAC sin modificar (SAHA - Compuesto 7), lo que indica que el motivo de éster de alfa aminoácido estaba unido a SAHA en un punto que no alteraba su modo de unión.
(ii) aunque los ésteres (Compuestos 8 y 19) y el ácido (Compuesto 9) tienen actividades comparables al inhibidor sin modificar (SAHA - Compuesto 7) existe un aumento significativo de la potencia celular del éster ciclopentílico escindible por la esterasa (Compuesto 8) sobre el inhibidor sin modificar (Compuesto 7) pero también una disminución sustancial de la potencia celular en el caso del éster terc-butílico estable a la esterasa (Compuesto 10), lo que indica que éste último no acumuló el ácido en las células para generar una potencia celular aumentada.
(iii) la mayor actividad en el ensayo de proliferación celular del Compuesto 8 sobre el homólogo sin modificar, Compuesto 7 (o el derivado de éster no hidrolizable, Compuesto 10), indica que el éster se hidroliza al ácido parental Compuesto 9 en la célula, donde se acumula y ejerce un mayor efecto inhibidor.

Tabla 3 Continuación

Cinasa Aurora	CI50 nM de inhibición enzimática (cinasa Aurora A)	CI50 nM de proliferación celular (células U937)	Relación de CI50 célula/enzima
Compuesto (11) modulador sin modificar	350	430	1,3
Compuesto (12) modulador modificado (éster ciclopentílico)	2300	3,5	0,0015
Acido resultante de la escisión del éster del **Compuesto (13)** modulador modificado	500	>5000	NA
Compuesto (14) modulador modificado (éster t-butílico)	3000	75	0,025

Los resultados anteriores muestran que:

(i) el inhibidor modificado con alfa aminoácido, Compuesto 13, que resultaría de la escisión del motivo de éster en el Compuesto 12, tiene un valor de CI50 en el ensayo enzimático comparable al del inhibidor sin modificar de la cinasa aurora (Compuesto 11), lo que indica que es posible unir el motivo de éster de alfa aminoácido en un punto que no altere la unión a la cinasa aurora A.
(ii) aunque el ácido (Compuesto 13) tiene una actividad inhibidora enzimática comparable a la del inhibidor sin modificar (Compuesto 11) y el éster (Compuesto 12) es un inhibidor más débil, existe un incremento significativo de la potencia celular del Compuesto 12 sobre la del inhibidor sin modificar (Compuesto 11). El éster t-butílico menos fácilmente escindido (Compuesto 14) tiene una actividad enzimática comprable a la del éster ciclopentílico escindible (Compuesto 12) pero es unas 20 veces menos activo en el ensayo celular.
(iii) la mayor actividad en el ensayo de proliferación celular del Compuesto 12 sobre el homólogo sin modificar (Compuesto 11) y el éster t-butílico menos fácilmente escindido (Compuesto 14) indica que el éster ciclopentílico se hidroliza al ácido parental en la célula, donde se acumula y ejerce un mayor efecto inhibidor.

Tabla 3 Continuación

P38 MAP cinasa	CI50 nM de inhibición enzimática (P38 MAP cinasa)	CI50 nM de inhibición de la producción de TNFα en sangre entera humana	Relación de IC50 de SE/enzima
Compuesto (15) modulador sin modificar	50	300	6
Compuesto (16) modulador modificado (éster ciclopentílico)	25	20	0,8
Acido resultante de la escisión del éster del **Compuesto (17)** modulador modificado	30	No analizado	NA
Compuesto (18) modulador modificado (éster t-butílico)	40	750	18

Los resultados anteriores muestran que:

(i) el inhibidor modificado con éster de alfa aminoácido, Compuesto 16 y el ácido, Compuesto 17, que resultaría de la escisión del motivo de éster en el Compuesto 16, tienen valores de CI50 en el ensayo enzimático comparable al valor para el inhibidor sin modificar de la P38 MAP cinasa (Compuesto 15), lo que indica que es posible unir el motivo de éster de alfa aminoácido en un punto que no altere la unión a la P38 MAP cinasa.
(ii) el ácido, Compuesto 17, tiene una actividad contra la enzima comparable a la del inhibidor sin modificar (Compuesto 15) y al éster t-butílico (Compuesto 18). Sin embargo, existe un aumento significativo de la capacidad del éster ciclopentílico (Compuesto 16) para inhibir la producción del TNF dentro de las células monocíticas presentes en la sangre entera en comparación con el inhibidor sin modificar (Compuesto 15) y el éster t-butílico menos fácilmente escindido (Compuesto 18).
(iii) la mayor actividad en el ensayo de sangre entera para el Compuesto 16 sobre el homólogo sin modificar, Compuesto 15, y el éster t-butílico menos fácilmente escindido, Compuesto 18, indica que el éster ciclopentílico se hidroliza al ácido parental en la célula, donde se acumula y ejerce un mayor efecto inhibidor.

Tabla 3 Continuación

DHFR	CI50 nM de la inhibición enzimática (DHFR)	CI50 nM de proliferación celular (células U937)	Relación de CI50 célula/enzima
Compuesto (2 G=N) modulador sin modificar	10	2200	220
Compuesto (6) modulador modificado (éster ciclopentílico)	1700	23	0,013
Acido resultante de la escisión del éster del **Compuesto (19)** modulador modificado	10	No analizado	No aplicable

Los resultados anteriores muestran que:

(i) el inhibidor modificado con alfa aminoácido, Compuesto 19, que resultaría de la escisión del motivo de éster en el Compuesto 6, tiene un valor de CI50 en el ensayo enzimático comparable al del inhibidor sin modificar de la

DHFR (Compuesto 2 (G=N)), lo que indica que es posible unir el motivo de éster de alfa aminoácido en un punto que no altere la unión a la DHFR.
(ii) aunque el ácido (Compuesto 19) tiene una actividad inhibidora enzimática comparable a la del inhibidor sin modificar (Compuesto 2 (G=N)), el éster (Compuesto 6) es significativamente más potente en la inhibición de la proliferación celular que el inhibidor sin modificar (Compuesto 2 (G=N)).
(iii) la mayor actividad en el ensayo de proliferación celular del Compuesto 6 sobre el homólogo sin modificar ((Compuesto 2 (G=N)) indica que el éster ciclopentílico se hidroliza al ácido parental en la célula, donde se acumula y ejerce un mayor efecto inhibidor.

Tabla 3 Continuación

PI 3-cinasa	CI50 nM de inhibición enzimática (PI 38-cinasa)	CI50 nM de inhibición de la producción de TNFα en sangre entera humana	Relación de IC50 de SE/enzima
Compuesto (20) modulador sin modificar	500	8500	17
Compuesto (21) modulador modificado (éster ciclopentílico)	2700	400	0,15
Acido resultante de la escisión del éster del modulador modificado **(22)**	3600	No analizado	No aplicable
Compuesto (23) modulador modificado (éster-t-butílico)	7100	5200	0,75

Los resultados anteriores muestran que:

(i) el inhibidor modificado con éster de alfa aminoácido, Compuesto 21, y el ácido, Compuesto 22, que resultaría de la escisión del motivo de éster en el Compuesto 21, tienen valores de CI50 en el ensayo enzimático dentro de un factor de 10 del valor para el inhibidor sin modificar de la PI3 cinasa (Compuesto 20), lo que indica que es posible unir el motivo de éster de alfa aminoácido en un punto que todavía retenga una unión razonable a la PI 3-cinasa.

(ii) aunque el ácido, Compuesto 22, tiene una actividad comparable con la del inhibidor sin modificar (Compuesto 20) y el éster (Compuesto 21), existe un aumento significativo de la potencia del éster para inhibir la producción de TNF en células monocíticas presentes en sangre entera en comparación con el inhibidor sin modificar (Compuesto 20) y el éster t-butílico menos fácilmente escindido (Compuesto 23).

(iii) la mayor actividad en el ensayo de sangre entera para el Compuesto 21 sobre el homólogo sin modificar, Compuesto 20 y el éster t-butílico menos fácilmente escindido Compuesto 23 indica que el éster ciclopentílico se hidroliza al ácido parental en la célula, donde se acumula y ejerce un mayor efecto inhibidor.

Selectividad

Tabla 4: Comparación de la proliferación celular y la escisión del éster para una estirpe celular monocítica y no monocítica

HDAC	**U937 (estirpe celular monocítica)**		**HCT116 (estirpe celular no monocítica)**	
Compuesto	CI50 nM de proliferación celular	Ácido producido[1] ng/ml	CI50 nM de proliferación celular	Ácido producido[1] ng/ml
Compuesto (7) modulador sin modificar	400	No aplicable	700	No aplicable
Compuesto (24) modulador modificado	60	110	2100	1

[1] La cantidad de ácido producido después de la incubación del compuesto modificado (Compuesto 24) durante 80 minutos en el ensayo de carboxilesterasa de células rotas descrito anteriormente.

Los resultados anteriores muestran que:

(i) el compuesto sin modificar (Compuesto 7) no muestra selectividad entre una estirpe celular monocítica y no monocítica, mientras que esto puede conseguirse mediante la unión de un motivo de éster apropiado, como en el Compuesto 24.

(ii) esta selectividad se relaciona con la escisión mejorada del éster al ácido por la estirpe celular monocítica.

(iii) la actividad celular mejorada solo se ve en la estirpe celular en la que se produce ácido, lo que indica que esta mejora en la potencia celular se deba a la acumulación del ácido.

Tabla 4 Continuación

Cinasa aurora A	**U937 (estirpe celular monocítica)**		**HCT116 (estirpe celular no monocítica)**	
Compuesto	CI50 nM de proliferación celular	Ácido producido[1] ng/ml	CI50 nM de proliferación celular	Ácido producido[1] ng/ml
Compuesto (10) modulador sin modificar	430	NA	560	NA
Compuesto (25) modulador modificado	1900	50	6100	0

[1] La cantidad de ácido producido después de la incubación del compuesto (25) durante 80 minutos en el ensayo de carboxilesterasa de células rotas descrito anteriormente.

Los resultados anteriores muestran que:

(i) el compuesto sin modificar (Compuesto 10) no muestra selectividad entre una estirpe celular monocítica y no monocítica, mientras que esto se consigue mediante la unión de un motivo de éster apropiado, como en el Compuesto 25.

(ii) esta selectividad se relaciona con la de la escisión mejorada del éster al ácido por la estirpe celular monocítica.

(iii) la actividad celular mejorada solo se ve en la estirpe celular en la que se produce ácido, lo que indica que esta mejora en la potencia celular se debe a la acumulación del ácido.

Tabla 4 Continuación

DHFR	**U937 (estirpe celular monocítica)**		**HCT116 (estirpe celular no monocítica)**	
Compuesto	CI50 nM de proliferación celular	Ácido producido[1] ng/ml	CI50 nM de proliferación celular	Ácido producido[1] ng/ml
Compuesto (2 G=N) modulador sin modificar	2200	No aplicable	1700	NA
Compuesto (5) modulador modificado	310	210	6700	2

[1] La cantidad de ácido producido después de la incubación del Compuesto (5) durante 80 minutos en el ensayo de carboxilesterasa de células rotas descrito anteriormente.

Los resultados anteriores muestran que:

(i) el compuesto sin modificar (compuesto 2 G = N) no muestra selectividad entre una estirpe celular monocítica y no monocítica, mientras que esto se consigue mediante la unión de un motivo de éster apropiado, como en el Compuesto 5.

(ii) esta selectividad se relaciona con la escisión mejorada del éster al ácido por la estirpe celular monocítica.

(iii) La actividad celular mejorada solo se ve en la estirpe celular en la que se produce ácido, lo que indica que esta mejora en la potencia celular se debe a la acumulación del ácido.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado covalente de un éster de alfa aminoácido y un inhibidor de la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, en el que:

el grupo éster del conjugado es hidrolizable por una o más enzimas carboxilesterasas intracelulares al ácido correspondiente,
el nitrógeno del grupo amino del éster de aminoácido está sustituido pero no directamente unido a un resto carbonilo, o se deja sin sustituir; y
el éster de alfa aminoácido está conjugado con el inhibidor en una posición distante de la interfaz de unión entre el inhibidor y la enzima p38 MAP cinasa; en el que la posición de la conjugación es distante cuando la inhibición de la producción de TNFα en sangre entera humana mostrada por el conjugado es al menos tan alta como la del inhibidor sin conjugar.

2. Un conjugado covalente de un éster de alfa aminoácido y un inhibidor de la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, en el que:

el grupo éster del conjugado es hidrolizable por una o más enzimas carboxilesterasas intracelulares al ácido correspondiente,
el nitrógeno del grupo amino del éster de aminoácido está sustituido pero no directamente unido a un resto carbonilo, o se deja sin sustituir; y
el éster de alfa aminoácido está conjugado con el inhibidor, de manera que el modo de unión del inhibidor conjugado y dicho ácido correspondiente a la enzima objetivo p38 MAP cinasa es el mismo que el del inhibidor sin conjugar,
en el que el modo de unión es el mismo cuando la inhibición de la producción de TNFα en sangre entera humana mostrada por el conjugado es al menos tan alta como la del inhibidor sin conjugar.

3. Un conjugado covalente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, conjugado que es para su uso en el tratamiento del cáncer, la inflamación o la enfermedad autoinmune.

4. Un conjugado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el éster de alfa aminoácido conjugado covalentemente no es el elemento C-terminal de un motivo de dipéptido del inhibidor conjugado.

5. Un conjugado para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el inhibidor es uno que se une no covalentemente a la enzima p38 MAP cinasa.

6. Un conjugado para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el éster de alfa aminoácido se conjuga covalentemente al inhibidor a través de un radical enlazador.

7. Un conjugado para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el éster de alfa aminoácido se conjuga al inhibidor a través del grupo amino del éster de aminoácido.

8. Un conjugado para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el éster de alfa aminoácido se conjuga con el inhibidor a través del carbono alfa del éster de aminoácido.

9. Un conjugado para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el éster es hidrolizable por células que contienen una o más de las enzimas carboxilesterasas intracelulares hCE-1, hCE-2 y hCE-3 al alfa aminoácido correspondiente.

10. Un conjugado para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el éster es hidrolizable por células que contienen la enzima carboxilesterasa intracelular hCE-1 al alfa aminoácido correspondiente pero no por células que contienen hCE-2 o hCE-3.

11. Un conjugado para su uso como se reivindica en la reivindicación 10 en el que el nitrógeno del grupo amino del éster de aminoácido está sustituido pero no directamente unido a un grupo carbonilo.

12. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, comprendiendo la composición un conjugado como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

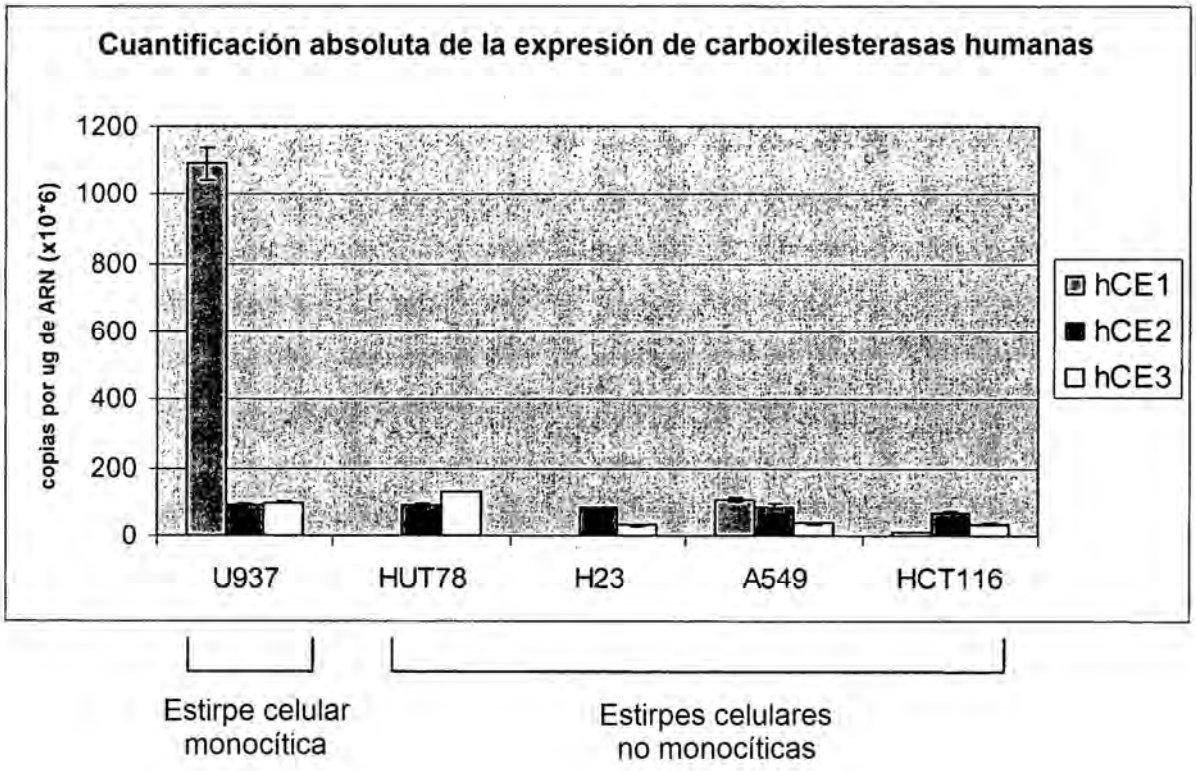
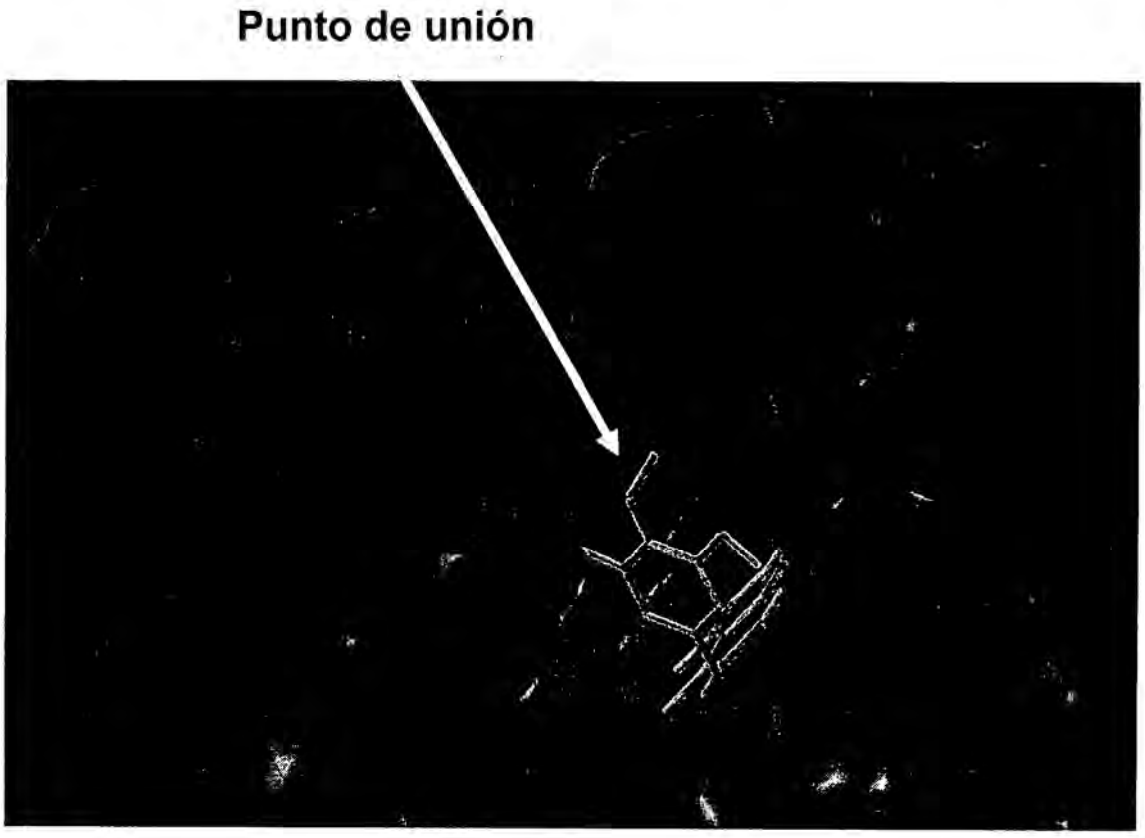
13. Una composición farmacéutica para su uso como se reivindica en la reivindicación 12 que está adaptada para la administración tópica y en la que en el conjugado (a) cuando el éster de alfa aminoácido está unido al inhibidor a través de su grupo amino, el carbono adyacente al carbono alfa del éster de alfa aminoácido está monosustituido, o (b) cuando el éster de alfa aminoácido está unido al inhibidor a través de un átomo de carbono del aminoácido, el átomo de carbono adyacente a ese átomo de carbono del aminoácido está sin sustituir.

14. Un procedimiento in vitro para aumentar o prolongar selectivamente la potencia intracelular y/o el tiempo de residencia de un inhibidor de la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa en los macrófagos y/o monocitos en relación con otros tipos celulares, que comprende tratar una población mixta de células con un conjugado del inhibidor como se reivindica en la reivindicación 11.

15. Un procedimiento para identificar un conjugado covalente de un éster de alfa aminoácido de un inhibidor dado de la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa, teniendo dicho conjugado una potencia celular aumentada o prolongada en relación con el inhibidor dado, procedimiento que comprende:

(i) identificar una posición o posiciones en el inhibidor dado de la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa, o en una pluralidad de inhibidores dados de la actividad de la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa que compartan el mismo modo de unión para la enzima objetivo, estando dicha posición o posiciones distantes de la interfaz de unión entre los inhibidores y la enzima intracelular objetivo p38 MAP cinasa;
(ii) modificar covalentemente el inhibidor o inhibidores mediante la unión de un radical éster de alfa aminoácido, o una gama de diferentes radicales éster de alfa aminoácido en una o más de las posiciones identificadas en (i);
(iii) ensayar el inhibidor o inhibidores conjugados con alfa aminoácido preparados en (ii) para determinar su actividad contra la enzima objetivo p38 MAP cinasa; y
(iv) a partir de datos obtenidos en (iii), seleccionar una o más de las versiones conjugadas con éster de alfa aminoácido ensayadas del inhibidor o inhibidores dados que provoquen la inhibición de la actividad de la p38 MAP cinasa dentro de las células, se conviertan en y se acumulen como el ácido carboxílico correspondiente dentro de las células, y que muestren una potencia celular aumentada o prolongada.

La Figura 1 muestra la expresión de carboxilesterasas humanas en diferentes estirpes celulares



La Figura 2 muestra (2 G = N) anclado en la DHFR y el punto de unión del motivo de esterasa