

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 556**

51 Int. Cl.:

C07B 53/00 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2012 PCT/IN2012/000032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12104866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2012 E 12705463 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2670722**

54 Título: **1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-{N-[(3-t-butoxicarbonil-aminometil)]-piperidin-1-il}-pirrolidin-2-carboxamidas quirales como inhibidores de la activación y adhesión de plaquetas inducidas por colágeno**

30 Prioridad:

31.01.2011 IN DE02082011

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

28.04.2017

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH (100.0%)
Anusandhan Bhawan Rafi Marg
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**BARTHWAL, MANOJ, KUMAR;
DIKSHIT, DINESH, KUMAR;
DIKSHIT, MADHU;
SIDDIQUI, TANVEER, IRSHAD;
KUMAR, ANIL;
BHATTA, RABI, SANKAR;
JAIN, GIRISH, KUMAR;
MISRA, ANKITA;
KHANNA, VIVEK;
PRAKASH, PREM;
JAIN, MANISH;
SINGH, VISHAL;
GUPTA, VARSHA y
DWIVEDI, ANIL, KUMAR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 610 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-{N-[(3-t-butoxicarbonil-aminometil)]-piperidin-1-il}-pirrolidin-2-carboxamidas quirales como inhibidores de la activación y adhesión de plaquetas inducidas por colágeno

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a 1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-{N-[(3-t-butoxicarbonil-aminometil)]-piperidin-1-il}-pirrolidin-2-carboxamidas quirales. La presente invención también se refiere al uso de estos restos como inhibidores de la adhesión y agregación de plaquetas inducidas por colágeno mediadas a través de receptores de colágeno.

Antecedentes de la invención

15 Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen un importante problema de salud pública. A pesar de los importantes avances en el diagnóstico y tratamiento en los últimos años, las ECV siguen representando la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Las plaquetas, que son fundamentales para la hemostasia y limitan la pérdida normal de la sangre después de una lesión, también son los principales actores en condiciones patológicas, tal como la trombosis venosa profunda y la trombosis arterial. Conservan la integridad vascular y, de ese modo, previenen la hemorragia después de la lesión. Sin embargo, el daño vascular, tal como la rotura de una placa aterosclerótica, da lugar a una formación de trombos dependiente de las plaquetas, lo que puede conducir a la oclusión vascular con la hipoxia resultante y el infarto de los tejidos distales. Los escenarios clínicos resultantes abarcan la angina de pecho estable e inestable, el infarto agudo de miocardio (IM), el ictus isquémico y la enfermedad arterial periférica oclusiva.

25 La regulación de la interacción endotelial de las plaquetas y, por lo tanto, la hemostasia y la trombosis, se produce debido al precario equilibrio entre los mecanismos activadores e inhibidores que controlan la activación plaquetaria tras la exposición a los tejidos dañados, sin embargo, permite que las plaquetas permanezcan en reposo en la circulación sin daños. En vasculatura sano, las plaquetas circulantes se mantienen en un estado inactivo por el óxido nítrico y la prostaciclina liberados por las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos. Las células endoteliales también expresan ADPasa (adenosina difosfatasa), que degrada el ADP liberado de los glóbulos rojos de la sangre y las plaquetas activadas, evitando así una mayor activación de las plaquetas. Cuando la pared del vaso está dañada, la liberación de estas sustancias antiplaquetarias endógenas se deteriora y la matriz subendotelial queda expuesta. Las plaquetas se adhieren al colágeno expuesto y al factor de von Willebrand (vWF) a través de receptores que se expresan constitutivamente en la superficie de las plaquetas. Las plaquetas adherentes integran señales procedentes de la interacción de unión, cambian su forma, secretan ADP desde sus gránulos densos y sintetizan y liberan tromboxano A2 (TXA2). El ADP y el TXA2 que se liberan sirven como agonistas de las plaquetas mediante la activación de las plaquetas ambientales y su reclutamiento en el sitio de la lesión vascular. La interrupción de la pared del vaso también expone a las plaquetas a las células que expresan colágeno y factor tisular que desencadenan aún más la respuesta procoagulante. En una etapa avanzada de la activación, las plaquetas estimulan la coagulación de la sangre, proporcionando una superficie en la que se activan los factores de coagulación para generar trombina. Además de la conversión de fibrinógeno en fibrina, la trombina también sirve como un potente agonista de plaquetas y recluta más plaquetas hacia el sitio de la lesión vascular. Las plaquetas activadas potencian la coagulación mediante la expresión de fosfatidilserina en su superficie. Cuando se activan las plaquetas, la glicoproteína (GP) IIb/IIIa (α IIb β 3), el receptor más abundante en la superficie de las plaquetas, sufre un cambio conformacional, que aumenta su capacidad para unirse al fibrinógeno. Las moléculas divalentes de fibrinógeno forman puentes entre plaquetas adyacentes para formar agregados de plaquetas. A continuación, las hebras de fibrina, generados por la acción de la trombina, tejen estos agregados juntos para formar una malla de fibrina de las plaquetas

50 La idea de que la orientación de que la función plaquetaria puede ser beneficiosa en la prevención de la trombosis se confirma por varios ensayos clínicos y el amplio uso de terapias antiplaquetarias. Los agentes antiagregantes plaquetarios pueden subclasificarse, sobre la base de su sitio de acción, en los que inhiben (i) la adherencia, (ii) la activación, (iii) la agregación o (iv) los enlaces mediados por plaquetas con la inflamación. De los agentes actualmente disponibles, aspirina, clopidogrel, dipiridamol y cilostazol inhiben la activación de las plaquetas, aunque a través de mecanismos diferentes, mientras que los antagonistas de GPIIb/IIIa bloquean la agregación plaquetaria. Sin embargo, sigue habiendo una incidencia sustancial de la trombosis arterial en pacientes en terapia antiplaquetaria disponible actualmente. Las limitaciones de las terapias actuales incluyen débil inhibición de la función plaquetaria (por ejemplo, por la aspirina), el bloqueo de una sola vía de señalización mediada por ADP (por ejemplo, clopidogrel), inicio lento de la acción (por ejemplo, del clopidogrel), variabilidad de la respuesta entre pacientes con mala inhibición de la respuesta de las plaquetas en algunos pacientes (por ejemplo, a la aspirina y al clopidogrel), la incapacidad de transformar el éxito del tratamiento con antagonistas de α IIb β 3 por vía intravenosa en terapia oral y la incapacidad para separar completamente una reducción de los acontecimientos trombóticos a partir de un aumento de los acontecimientos de sangrado. Por lo tanto, los éxitos y las limitaciones de las terapias actuales, junto con los avances en nuestra comprensión de la biología de las plaquetas, son instructivos del diseño de nuevos fármacos para regular con mayor eficacia los objetivos validados.

- A pesar de la complejidad de la matriz extracelular, las interacciones de colágeno y las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la iniciación de la hemostasis y la trombosis *in vivo*. Dado que la adhesión estable de las plaquetas estable y la posterior activación por colágeno están mediadas por receptores de colágeno de las plaquetas, la consecuencia de la inhibición de cualquiera de estos ha ganado una atención considerable. Por otra parte, los estudios realizados en pacientes humanos con pacientes que carecen de cualquiera de los receptores, o con modelos de ratón equivalentes, revelan una reducción de la capacidad de respuesta de las plaquetas al colágeno, con sólo leves deficiencias en la hemostasia, y no conducen a un aumento de la tendencia a la hemorragia espontánea.
- Por tanto, la inhibición de la activación del receptor de colágeno en las plaquetas puede representar una nueva diana farmacológica en la búsqueda de agentes antitrombóticos más selectivos y específicos para la prevención y/o tratamiento de la trombosis arterial oclusiva aguda, por ejemplo, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. La interacción de las plaquetas es la primera etapa en el proceso hemostático, cuando la matriz extracelular (MEC) está expuesta en los sitios de la lesión. Entre los componentes macromoleculares de la MEC, se considera que el colágeno desempeña un papel importante en este proceso, dado que *in vitro* no solo soporta la adhesión de plaquetas a través de vías directas e indirectas, sino que también activa directamente a las células en el inicio de la actividad de agregación y coagulante. Las dianas principales de la terapia antiplaquetaria existentes son moléculas que participan en la activación y agregación de las plaquetas. En la actualidad, no existen fármacos en uso clínico que bloqueen la inmovilización inicial y adhesión de las plaquetas al colágeno y el factor de von Willebrand y, por lo tanto, su detención en la pared del vaso sanguíneo. La inhibición de esta etapa temprana en la formación de trombos es más probable que reduzca o prevenga la incidencia de trombosis arterial en pacientes de enfermedades cardiovasculares [Review of the subject: PNAS, 2009 vol. 106 no. 3 719-724, Small-molecule inhibitors of integrin $\alpha 2\beta 1$ that prevent pathological thrombus formation via an allosteric mechanism].
- Se han realizado varios informes sobre péptidos y proteínas que inhiben la agregación plaquetaria a través de la inhibición de la activación de las plaquetas por colágeno y otras moléculas de activación endoteliales s [FEBS Journal 277 (2010) 413-427, Aegyptin displays high-affinity for the von Willebrand factor binding site (RGQOGVMGF) in collagen and inhibits carotid thrombus formation *in vivo*; J Thromb Thrombolysis (2007) 24:275-282, Inhibition of collagen, and thrombin-induced platelet aggregation by Lansberg's hognose pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom; Acta Biochimica Polonica, Vol. 50 No. 4/2003,1119-1128, Inhibition of collagen-induced platelet reactivity by DGEA peptide; FEBS Journal 273 (2006) 2955-2962, Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*; documento US5851839: Inhibidores de la agregación plaquetaria; 6 patente de Estados Unidos 5.756.454, inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por colágeno; patente de Estados Unidos 5.710. 131, inhibidor de la agregación plaquetaria estimulada por colágeno; patente de Estados Unidos 5.587.360, Inhibidor de la adhesión plaquetaria].
- Sin embargo, hay muy pocos informes sobre moléculas pequeñas que son capaces de bloquear la activación/agregación plaquetaria por colágeno y otras moléculas de activación derivadas endoteliales [(documento WO1995/006038) Inhibidores de la agregación plaquetaria y referencias citadas en el mismo; patente de Estados Unidos 6.221.357, Flavonoides derivados de pieles de cítricos como inhibidores de la agregación plaquetaria inducida por colágeno; patente de Estados Unidos 5.814.636, Compuestos con actividad de inhibición de la agregación plaquetaria; patente de Estados Unidos 5.719.145, derivados de amidina e inhibidor de la agregación plaquetaria que contiene los mismos; patente de Estados Unidos 5.698.692, Compuesto con actividad de inhibición de la agregación plaquetaria; patente de Estados Unidos 5.629.321, compuesto bicíclico e inhibidor de la agregación plaquetaria que contiene el mismo; Med. Chem. 2007, 50, 5457-5462, Small Molecule Inhibitors of Integrin $\alpha 2\beta 1$; PNAS, 2009 vol. 106 no. 3 719-724, Small-molecule inhibitors of integrin $\alpha 2\beta 1$ that prevent pathological thrombus formation via an allosteric mechanism; Cardiovascular Research 75 (2007) 782-792, Characterization of a novel and potent collagen antagonist, caffeic acid phenethyl ester, in human platelets: *In vitro* and *in vivo* studies; Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27;1184-1190; EXP3179 Inhibits Collagen-Dependent Platelet Activation via Glycoprotein Receptor-VI Independent of AT1-Receptor Antagonism Potential Impact on Atherothrombosis; Phytother. Res. 16, 398-399 (2002), Human Platelet Aggregation Inhibitors from Thyme (*Thymus vulgaris* L.); J. Med. Chem., 2010, 53 (5), pág. 2087-2093, Structural Basis for Platelet Antiaggregation by Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Losartan (DuP-753) via Glycoprotein VI]
- Se han notificado amidas de ácidos piroglutámicos N-sustituidos como inhibidor moderado de la trombina (*Dikshit et al., 2001 patente india 1206/DELI2001*) y ha demostrado actividad antitrombótica en un modelo de ratones de trombosis.
- Por lo tanto, la presente invención se centra en la identificación y preparación de diastereómeros puros de una clase de compuestos que inhibe específicamente la agregación plaquetaria mediada por colágeno sin afectar a otras funciones de regulación y fisiológicamente relevantes de las plaquetas y, por lo tanto, proporciona un agente antitrombótico clínicamente útil. La presente invención prepara diastereómeros puros para la mejora de su actividad en comparación con la mezcla de diastereómeros.

Objetos de la invención

5 El objeto principal de la invención es proporcionar los compuestos que inhiben la adhesión y agregación plaquetaria inducidas por colágeno en ensayos *in vitro* y *ex vivo*. La invención se refiere a compuestos de fórmula general 6 y 7 que son formas de diastereoméricas de 1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-{N-[(3-t-butoxicarbonil-aminometil)]-piperidin-1-il}-pirrolidin-2-carboxamidas quirales de fórmula general I, en la fórmula general 1 que comprende el compuesto quiral de fórmula 6 y 7.

10 Otro objeto de la invención es los compuestos de fórmula 6 y 7 para la prevención de la trombosis, la adhesión y agregación plaquetarias y útiles en diversas patologías cardiovasculares como compuesto antiplaquetario.

15 Otro objeto de la invención es proporcionar los compuestos que tienen una duración de acción prolongada contra la trombosis inducida por colágeno-epinefrina en comparación con fármacos estándar, tales como la aspirina y el clopidogrel.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar los compuestos que tienen significativamente menos prolongación del tiempo de sangrado en comparación con los fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, tales como la aspirina y el clopidogrel.

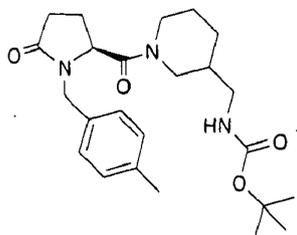
20 Un objeto más de la invención es proporcionar los compuestos que tienen una absorción más rápida, mayor solubilidad en agua y una mejor biodisponibilidad.

Un objeto adicional proporciona el proceso para la preparación de formas puras del compuesto 6 y el compuesto 7.

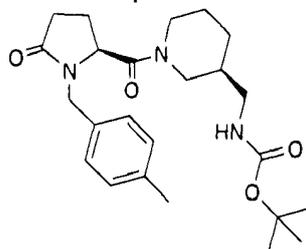
25 Un objeto adicional es proporcionar composiciones para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares que comprenden el compuesto de fórmula 6 o 7 individualmente con aditivos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Sumario de la invención

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona una 1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-{N-[(3-t-butoxicarbonil-aminometil)]-piperidin-1-il}-pirrolidin-2-carboxamida quiral de fórmula general 1, en la que la fórmula 1 comprende el compuesto quiral de fórmula 6 y 7

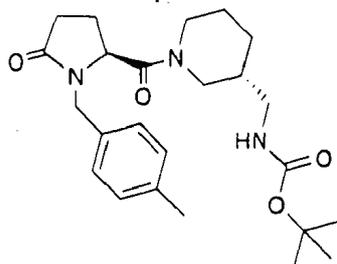


Compuesto 1



35

Compuesto 6



Compuesto 7

En una realización de la invención, los compuestos son útiles para prevenir la trombosis, la adhesión y agregación plaquetarias.

5 La realización preferente de la presente invención proporciona los compuestos de las fórmulas 6 y 7 de la misma para la prevención de la trombosis, la adhesión y agregación plaquetarias y útiles en diversas patologías cardiovasculares como compuesto antiplaquetario.

10 Una realización más preferente de la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 6 que es más activo con un efecto de larga duración en comparación con los fármacos estándar aspirina y clopidogrel, así como los compuestos 1 y 7 en la tromboembolia pulmonar inducida por colágeno-epinefrina en ratones.

15 Otra realización de la presente invención proporciona el compuesto 1, 6 y 7 (dosis de 30 μ M/kg, 1 hora por vía oral) que presenta prolongación del tiempo de sangrado, que fue significativamente menor en comparación con los fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, aspirina y clopidogrel.

20 Aún otra realización proporciona los compuestos 1, 6 y 7 que son activos frente a la agregación inducida por colágeno *in vitro* en plasma humano rico en plaquetas, mientras no tienen ningún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP, y los compuestos 6 y 7 son más específicos que el compuesto 1, que muestra una eficacia moderada contra la agregación plaquetaria inducida por el mimético de la trombina, SFLLRN (TRAP).

Todavía otra realización preferente proporciona el compuesto 6, que es mejor que el compuesto 7 en la atenuación de la agregación plaquetaria estimulada por colágeno en hámsteres hiperlipidémicos.

25 Otra realización es el compuesto 6 que exhibe reducción dependiente de la dosis de la adhesión plaquetaria sobre la matriz de colágeno y comparativamente mejor que la aspirina en ratones (*ex vivo*). Otra realización es que el compuesto 6 es mejor que el compuesto 7 en la inhibición de la adhesión plaquetaria sobre superficie recubierta por colágeno en el ensayo de adhesión plaquetaria mediada por $\alpha 2\beta 1$ y GPVI en colágeno (ser humano, *in vitro*).

30 En otra realización se trata que, en hámsteres hiperlipidémicos, el compuesto 6 muestra una atenuación significativa de la adhesión plaquetaria sobre la superficie de colágeno, en contraste con el compuesto 7, que no exhibe ningún efecto sobre la misma.

35 Otra realización proporciona la actividad amidolítica de trombina atenuada de forma no específica por los compuestos 1 y 7, mientras que el compuesto 6 no exhibió nada de dicha propiedad inhibidora de la trombina no específica.

Una realización adicional proporciona el compuesto 6 que reduce significativamente el peso del trombo incluso a 10 μ M/kg en el modelo de derivación arterio-venosa en ratas y hámsteres hiperlipidémicos.

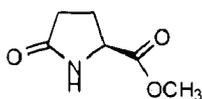
40 Incluso una realización adicional proporciona el compuesto 6 que prolongó significativamente el tiempo para ocluir la arteria carótida en ratas (trombosis arterial inducida por $FeCl_3$), mostrando de este modo su notable potencial antitrombótico, mientras que el compuesto 1 no pudo mostrar ningún tipo de protección a la misma dosis.

45 Una realización todavía adicional proporciona el compuesto 6 que aumentó significativamente el tiempo hasta la oclusión en hámsteres hiperlipidémicos, de modo que se confirma su eficacia antitrombótica sustancial en un modelo de enfermedad, mientras que el compuesto 7 se mantuvo ineficaz y, por lo tanto, no mostró ninguna característica antitrombótica en el mismo.

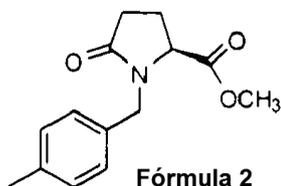
50 Una realización adicional proporciona que el compuesto 6 exhibe una absorción más rápida y mayor exposición sistémica durante más de 24 h $\{C_{m\acute{a}x} (149,49 \pm 53,12), t_{m\acute{a}x} 0,75 \pm 0,144 \text{ h}\}$ y mayor solubilidad en agua ($416,41 \pm 62,35 \mu\text{g/ml}$) en comparación con el compuesto 7 $\{C_{m\acute{a}x}(112,81 \pm 169,77, t_{m\acute{a}x} 8,67 \pm 0,66)\}$ y solubilidad en agua ($71,75 \pm 13,45 \mu\text{g/ml}$); y el compuesto 1 exhibe una absorción comparativamente rápida que conduce a una $C_{m\acute{a}x}$ de $947,02 \pm 237,4 \text{ ng/ml}$.

55 Otra realización proporciona el proceso para la preparación del compuesto 6 y el compuesto 7, en el que las etapas del proceso comprenden;

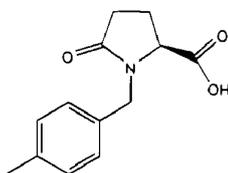
60 - hacer reaccionar piroglutamato de metilo con bencil bromuro de p-metilo en un disolvente aprótico en presencia de LiHMDS a una temperatura que varía entre 0 a 35 °C durante un periodo que varía entre 1 a 4 h, inactivar la mezcla de reacción con HCl y obtener el compuesto de fórmula 2,



Piroglutamato de metilo



- 5 - hacer reaccionar el compuesto de fórmula 2 con carbonato sódico a una temperatura que varía entre 0 °C a 30 °C durante un periodo que varía entre 0,5 a 4 h para obtener ácido (2S)-N-(p-metilfenilmetil)piroglutámico de fórmula 3



Fórmula 3

- 10 - hacer reaccionar el compuesto de fórmula 3 con el compuesto de fórmula 4 [(3R)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina] o 5 [(3S)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina] en un disolvente aprótico seleccionado de un grupo que consiste en diclorometano, tetrahidrofurano y dioxano, en presencia de un reactivo de acoplamiento seleccionado del grupo que consiste en diciclohexilcarbodiimida y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, o un agente de activación 1-hidroxi benzotriazol o cloroformiato de isobutilo a una temperatura que varía entre -20 °C a + 30 °C durante un periodo que varía de 1 a 3 h seguido de purificación usando cromatografía para producir el compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.
- 15

En una realización de la invención, en la que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con cloruro de oxalilo a 0 °C para obtener el cloruro de ácido seguido de reacción con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de trietilamina en diclorometano a temperatura ambiente durante un periodo que varía de 2 h a 3 h para obtener el compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.

20

En otra realización de la invención, en la que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de un reactivo de acoplamiento diciclohexilcarbodiimida y 1-hidroxi benzotriazol en diclorometano a una temperatura que varía entre -5 °C a 0 °C durante un periodo que varía entre 2 h a 3 h para obtener un compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.

25

En una realización más de la invención, en la que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de diisopropil etilamina, y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, en diclorometano a una temperatura que varía entre -5 °C a 0 °C durante un periodo que varía entre 2 h a 3 h seguido de agitación a una temperatura que varía entre 0 °C a 25 °C para obtener el compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.

30

Aún en otra realización de la invención, en la que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de trietil amina, y cloroformiato de isobutilo, en THF a -20 °C, durante un periodo que varía entre 1 h a 2 h seguido de agitación a una temperatura que varía entre 0 °C a 25 °C para obtener el compuesto de fórmula 6 o 7.

35

Incluso además, la realización que proporciona la purificación del compuesto 6 y 7 se realiza por cristalización usando los disolventes seleccionados de un grupo que consiste en pentano, hexano, ciclohexano, tolueno, acetato de etilo.

40

Otra realización divulga el uso de dichos compuestos 6 o 7 para proceso para el tratamiento del síndrome coronario (SCA), tal como infarto de miocardio (IM) con elevación del segmento ST, IM sin elevación del segmento ST, angina inestable, accidente cerebrovascular trombótico y, en pacientes de angioplastia, para prevenir la activación y adhesión plaquetarias.

45

Una realización adicional proporciona compuestos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares que comprenden el compuesto de fórmula 6 o 7 individualmente con aditivos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 Una realización adicional proporciona la composición en la que el aditivo farmacéuticamente aceptable se selecciona de un grupo que consiste en DMSO, goma arábica o CMC, beta ciclodextrina, o cualquier otro excipiente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

- 10 (*n= n.º de experimentos)

15 Fig. 1: Efecto de los compuestos 1, 6 y 7 sobre la tromboembolia pulmonar inducida por colágeno-epinefrina en ratones en un estudio dependiente del tiempo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 5, 10 animales/grupo/experimento)

20 Fig. 2: Efecto de los compuestos 1, 6 y 7 sobre el tiempo de sangrado en la cola en ratones en un estudio dependiente del tiempo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 5, 10 animales/grupo/experimento).

Fig. 3a: Efecto de los compuestos 6 y 7 sobre la agregación de plasma humano rico en plaquetas (*in vitro*) inducida por (i) colágeno (ii) convulxina y ristocetina (iii) ADP y TRAP. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 3).

25 Fig. 3b: Efecto del compuesto 6 sobre la agregación plasma de ratones rico en plaquetas (*ex vivo*) inducida por el colágeno, ADP y trombina. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 5, 5 animales/grupo/experimento).

30 Fig. 3c: Respuestas de agregación de sangre entera de hámsteres alimentados con pienso normal y alimentados con pienso rico en colesterol y rico en grasas inducida por ADP (10 μ M), colágeno (2,5 μ g/ml) y trombina (1 U/ml) (n.º de animales = 10/grupo). (i) efecto de fármacos antiagregantes plaquetarios y compuestos 6 y 7 sobre la agregación de sangre entera (b) efecto del compuesto 6 sobre la agregación plaquetaria de una manera dependiente de la dosis (n = 10, n.º de animales = 10/grupo). Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

35 Fig. 4a: Efecto de los compuestos 6 y 7 sobre la adhesión plaquetaria humana en una superficie (a) fibrilar y (b) recubierta con colágeno soluble. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 3).

40 Fig. 4b: Adhesión de las plaquetas de ratón sobre la matriz de colágeno como se observa con microscopio de fluorescencia 40X (método *ex vivo*). Diferentes imágenes muestran el diferente tratamiento realizado. Las plaquetas murinas lavadas (2×10^6 /ml) se obtuvieron de animales tratados previamente con el compuesto (compuesto 6) (dosis diferentes) y se sembraron en cubreobjetos recubiertos con BSA o colágeno (fibrilar) (A, B). Se dejó a las plaquetas de los animales no tratados que se adhirieran sobre cubreobjetos recubiertos con BSA o sin recubrir, respectivamente, para delimitar la posibilidad de unión no específica. C, D. Las plaquetas de control se adhirieron sobre cubreobjetos recubiertos con colágeno (control). E, F y G. Plaquetas obtenidas de animales pretratados con el compuesto 6 (10 μ M/kg, 30 μ M/kg y 100 μ M/kg), respectivamente, se adhirieron sobre cubreobjetos recubiertos con colágeno. H, I. Plaquetas de animales tratados con aspirina (100 μ M/kg) y clopidogrel (100 μ M/kg) (fármacos estándar) y adheridas sobre cubreobjetos recubiertos con colágeno (n=5, 5 animales/grupo/experimento).

50 Fig. 4c) (i) Efecto de los compuestos 6 y 7 y los fármacos estándar sobre la adhesión plaquetaria (*ex vivo*) en hámsteres hiperlipidémicos sobre la superficie recubierta de colágeno (ii) efecto del compuesto 6 sobre la adhesión plaquetaria de una manera dependiente de la dosis. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n.º de animales = 10/grupo).

55 Fig. 5: Efecto de los compuestos 1, 6 y 7 sobre la actividad amidolítica del sustrato fluorogénico usando alfa-trombina. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

60 Fig. 6 a: (i) Efecto de los compuestos 6 y 7 en la reducción del peso del trombo y su eficacia se comparó con las de los fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, la aspirina y el clopidogrel, en ratas. (ii) Efecto del compuesto 6 en función de la dosis. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 3).

Fig. 6(b): Efecto del compuesto 6 sobre el tratamiento con una dieta rica en grasas, que aumentó el peso del trombo, mostrando de este modo un estado protrombótico inducido por una dieta hiperlipidémica que imita al estado clínico. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 3).

65

Fig. 7a) (i) Efecto de los compuestos 6 y 7 sobre el tiempo total hasta la oclusión (TTO) en trombosis arterial inducida con cloruro en ratas (n=6) (ii) Efecto del compuesto 6 sobre el tiempo hasta la oclusión (TTO) en ratas de forma dependiente de la dosis. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n.º de animales = 6/grupo).

5 Fig. 7b: Efecto de los compuestos 6 y 7 sobre el tiempo total hasta la oclusión (TTO) en trombosis arterial inducida con cloruro en hámsteres hiperlipidémicos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n.º de animales = 6/grupo).

10 Fig. 8: Efecto del compuesto 6 sobre la movilización de calcio intracelular en plaquetas humanas cargadas con Fura-2 estimuladas por colágeno (5 μ g/ml) (n=3).

Fig. 9: Efecto del compuesto 6 sobre la fosforilación de tirosina de las proteínas de las plaquetas después de la estimulación con colágeno (2 μ g/ml) (n = 3).

15 Fig. 10: Perfil del tiempo y concentración del compuesto 1, 6 y 7 (n = 3).

Abreviaturas

20 ADP, difosfato de adenosina, PMA, acetato de 13-miristato de 12-forbol, AA, ácido araquidónico, TRAP, péptido activado del receptor de trombina, EGTA, ácido etilenglicol-tetraacético, ACD, ácido-citrato-dextrosa, gp, glicoproteína, PBS, solución salina tamponada con fosfato, FeCl₃, cloruro férrico, TTO, tiempo hasta oclusión, HRP, peroxidasa de rábano picante, CMC, carboximetil celulosa, PRP, plasma rico en plaquetas, PPP, plasma deficiente en plaquetas, DMSO, dimetilsulfóxido, HEPES, (N-[2-hidroxiethylpiperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico)], SDS, dodecil sulfato sódico, PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, TBST, solución salina tamponada con tris con Tween-20, p-Tyr, fosfo-tirosina BSA, albúmina sérica bovina, HCHF, rico en grasas y colesterol alto, SNP, nitroprusiato de sodio, μ g, microgramo, μ M, micromolar, kDa, kilo Dalton, C_{máx}, concentración plasmática máxima, t_{máx}, tiempo hasta alcanzar la concentración plasmática máxima, AUC, Área bajo la curva, MRT, tiempo de residencia medio LiHMDS, bis-(trimetilsilil)amida de litio, DIC, N,N'-Diisopropil carbodiimida, HOBt, 1-Hidroxibenzotriazol, PyBOP, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio, DCM, Diclorometano, HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento, IR, infrarrojos, RMN, espectroscopia de resonancia magnética nuclear, FAB MS, espectroscopía de masas por bombardeo atómico rápido, Na₂SO₄, sulfato sódico, HCl, ácido clorhídrico, p.f., punto de fusión, CDCl₃, cloroformo deuterado, MHz, Mega hertzio, mmol, milimol, [α]_D, rotación específica, δ , desplazamiento químico, KBr, bromuro potásico

35 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona ensayos de adhesión plaquetaria comparativa inducida por colágeno *ex vivo* representados por el Compuesto 1, que, como se indica en la patente india (1206/DEL/2001), es una mezcla 1: 1 de diastereómeros del compuesto 6 y el compuesto 7, que no pudo separarse por cristalización, o por métodos cromatográficos, tales como HPLC, más particularmente, pero no debe interpretarse como limitante, la invención divulgada y reivindicada en el presente documento se refiere a la síntesis quiral de ambos diastereoisómeros y la separación de acciones biológicas en el compuesto preferente (compuesto 1) a fin de identificar que uno de los diastereómeros quiralmente puros (compuesto 6) tiene una eficacia antitrombótica superior.

45 La invención utiliza eficientemente las sales de tartrato para la resolución quiral de éster terc-butílico del ácido piperidin-3-ilmetil-carbámico racémico, similar al procedimiento indicado (documento WO2006/28904 A1, 2006) para obtener éster terc-butílico del ácido 3S o 3R piperidin-3-ilmetil-carbámico.

50 Se preparó ácido N-p-metil-fenilmetilpiroglutámico de acuerdo con el protocolo indicado en la bibliografía descrito en la sección experimental.

En una actividad inventiva, para evitar cualquier racemización en el centro α -carboxílico, durante la N-alquilación, se reivindica el reactivo LiHMDS a bajas temperaturas para formar N-p-metil-fenilmetilpiroglutamato de metilo con buena pureza quiral.

60 Para evitar cualquier racemización en el centro α -carboxílico, por ejemplo, durante el proceso de acoplamiento, se usan en general agentes de acoplamiento muy eficientes y específicos del mecanismo como DCC con HOBt o PyBOP en DCM seco, pero esto no puede impedir el uso de acoplamientos mediados por cloruro de ácido sencillos, ya que la invención proporciona compuestos en forma microcristalina y la cristalización repetida puede proporcionar estos compuestos con una pureza quiral de casi el 99 % (HPLC quiral), como se indica de otro modo.

Aspirina y clopidogrel se utilizan como fármacos estándar y goma arábica, CMC como vehículos.

65 La invención utiliza un modelo de ratón de tromboembolia pulmonar inducida por colágeno-epinefrina y el tiempo de sangrado para justificar la eficacia (durante un período prolongado) del compuesto 6 sobre su compuesto análogo 7

de 7 y su mezcla de diastereoisómeros, el compuesto 1 (Fig. 1, 2).

La invención trata los estudios que detallan las actividades antiadhesión/antiagregantes de dos compuestos (6 y 7) en varios modelos *in vitro/ex vivo/in vivo*, que manifiestan mejor perfil farmacológico y farmacocinético sobre la mezcla de diastereoisómeros, el compuesto 1.

La invención incluye los compuestos 1, 6 y 7 que son activos frente a la agregación inducida por colágeno *in vitro* en plasma humano rico en plaquetas. La actividad antiagregante *in vitro* fue comparable entre los tres compuestos, ya que inhibieron los efectos mediados por colágeno a concentraciones similares (Fig. 3a).

Adicionalmente, la invención incluye los compuestos 6 y 7 que no muestran ningún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP, ristocetina y mimético de trombina, SFLLRN (TRAP), mientras que la mezcla de diastereoisómeros, el compuesto 1, exhibió una inhibición significativa contra la agregación plaquetaria inducida por TRAP, mostrando de ese modo su modo no específico de acción (Fig. 3 b, c).

La invención incluye el compuesto 6 que, incluso a concentraciones más altas (500 μM), no inhibe significativamente la agregación plaquetaria inducida por convulxina, un agonista del receptor de GPVI, pero inhibe la agregación inducida por colágeno (Fig. 3a).

Otra realización preferente incluye el compuesto 6 que exhibe una reducción dependiente de la dosis sobre la agregación plaquetaria mediada por colágeno en ratones cuando se evaluó *ex vivo* (Fig. 3b).

Además, la invención trata la medición de la inhibición de la agregación plaquetaria mediada por aspirina en hámsteres alimentados con HCHF, en los que la aspirina solo puede inhibir la agregación inducida por ADP y por trombina pero no por colágeno. (Fig. 3c)

Medición de la inhibición de la agregación plaquetaria mediada por clopidogrel en hámsteres alimentados con HCHF, en los que el clopidogrel solo puede inhibir la agregación inducida por ADP. (Fig. 3c)

Además se midió que los compuestos 1 y 6 participaban en la inhibición de la agregación plaquetaria en hámsteres alimentados con HCHF, mientras que el compuesto 7 se mantuvo ineficaz y se reivindica que el compuesto preferente (compuesto 6) inhibe significativamente la agregación plaquetaria inducida por colágeno en grupos alimentados con pienso rico en grasa de una manera dependiente de la dosis (Fig. 3c).

Los compuestos 1, 6 y 7 inhibieron parcialmente la adhesión plaquetaria humana mediada tanto por GP VI como por GP la IIa sobre el colágeno (*in vitro*), mientras que el efecto fue más prominente en la ruta mediada por GP VI (Fig. 4a).

Se reivindica que el tratamiento con el compuesto 6 preferente reduce significativamente la adhesión plaquetaria en ratones sobre las placas recubiertas con colágeno, comparable al tratamiento con clopidogrel (Fig. 4b).

La medición de la hiperactividad de las plaquetas en hámsteres alimentados con HCHF a través de los ensayos de adhesión plaquetaria aisladas en placas recubiertas con colágeno y fibrinógeno. La invención, el compuesto 1 y 6, muestra una reducción significativa de la adhesión plaquetaria que es comparable con el tratamiento con clopidogrel, mientras que se encontró que el tratamiento con el compuesto 7 y la aspirina era insignificante en la reducción de la adhesión plaquetaria en la superficie recubierta de colágeno en el modelo en hámster hiperlipidémico de aterosclerosis (Fig. 8a). El compuesto 6 preferente presenta una reducción dependiente de la dosis de la hiperactivación plaquetaria inducida por la dieta cuando se adhiere sobre la superficie recubierta con colágeno en hámsteres hiperlipidémicos (figura 4c).

La invención, en un conjunto de experimentos, describe el efecto de los compuestos 1, 6 y 7 sobre la actividad amidolítica de la α -trombina humana usando sustrato fluorogénico, en el que, al contrario que el compuesto 1 y el compuesto 7, el compuesto 6 mostró una actividad insignificante. (Fig. 5).

La invención, en general, utiliza varios ensayos *in vivo* y *ex vivo* para determinar su potencia antitrombótica en el modelo de derivación AV, trombosis de la carótida inducida con cloruro férrico, para justificar la eficacia de 6 sobre 7 contra diversos modelos de trombosis. [Fig. 6a,b, Fig. 7a,b]

La invención, en otro conjunto de experimentos, encuentra que el compuesto preferente (compuesto 6) inhibe el aumento inducido por colágeno de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y también se estudió la inhibición de los niveles de tirosina fosforilada de algunas proteínas (inexploradas) que están implicadas en la señalización intracelular mediada por colágeno unido a GP-VI en la presente invención. (Fig. 8,9).

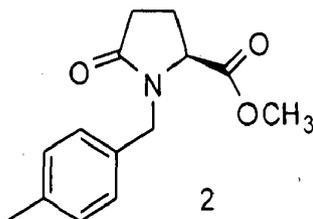
La invención comprende los receptores de colágeno de las plaquetas GP-VI como el objetivo plausible para los compuestos preferidos, pero no realizó observaciones sobre el subtipo de receptor específico.

La invención da a conocer el perfil farmacocinético en plasma de 6 sobre 7, los dos compuestos prometedores de la presente invención; revelan una buena disponibilidad sistémica en animales de experimentación que correlacionan bien con sus propiedades farmacodinámicas. (Fig. 10)

- 5 La invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que, no obstante, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

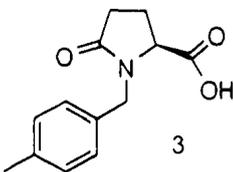
- 10 2S-N-(p-metilfenil metil) piroglutamato de metilo (Compuesto 2)



- 15 Se disolvió piroglutamato de metilo (10 g, 1 equiv., 70 mmol) en THF seco y se enfrió a -30 °C, se equipó con un septo en una atmósfera de N₂. Se añadió gota a gota LiHMDS (83,83 ml, 1,2 equiv., 77 mmol) y se agitó a esta temperatura durante 45 min. A la mezcla de reacción se le añadió gota a gota bencil bromuro de p-metilo (14,2 g, 1,1 equiv., 76 mmol), disuelto en THF seco y se agitó de 0 °C a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se inactivó con ácido clorhídrico frío 1 N y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El éster se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, malla de 230-400
20 usando cloroformo como sistema de disolvente) para formar el compuesto 2 que se usó directamente en la siguiente etapa.

Ejemplo 2

- 25 Síntesis de ácido (2S)-N-(p-metilfenil metil) piroglutámico (Compuesto 3)



- 30 Después, se disolvió el Compuesto 2 (6,0 g) en metanol (25 ml) y se enfrió a 0 °C. Después, a la mezcla de reacción se le añadió en porciones una solución al 20 % de carbonato sódico (75 ml). Después, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, el metanol se retiró por destilación y la mezcla de reacción reducida se extrajo entonces con éter (1 x 25 ml). La capa acuosa se acidificó con HCl conc. y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). La capa orgánica se secó y se concentró para dar un producto oleoso (5,2 g) que solidificó después de un periodo de reposo y se cristalizó en acetato de etilo caliente.

- 35 Rendimiento: 6,9 g, 42 % (producto cristalizado) $[\alpha_D^{27°C}]$: +33,96 (c = 0,10; Metanol) p.f.: 86-88 °C

IR (KBr) 3758, 3452, 2962, 1969, 1663, 1453, 1422, 1281, 1024, 801 cm⁻¹

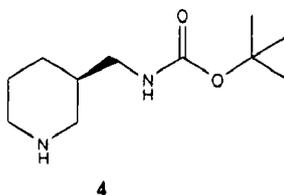
¹H RMN (CDCl₃, 200 MHz) 2,05-2,18 (m, 1H, 3-H_a); 2,20-2,27 (m, 1H, 3-H_b); 2,32 (s, 3H, -CH₃); 2,50- 2,60 (m, 2H, 4-H); 3,88 (d, 1H, -NCHPh); 4,02-4,04 (m, 1H, 2-H); 5,09-5,17 (d, 1H, -NCHPh); 7,12 (s, 4H, Ph-H)

- 40 ¹³C RMN (CDCl₃, 200 MHz) 14,57, 21,52, 23,26, 30,10, 45,83, 59,01, 61,00, 128,95, 129,92, 132,62, 138,11, 174,74, 176,90

FAB MS (m/z): 234 (M+1)⁺

Ejemplo 3

- 45 Síntesis de (3R)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina (compuesto 4)



Se mezclaron N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil piperidina (10 g, 1 equiv., 47 mmol), ácido (+)-O,O'-Di-p-toloil-D-tartárico (15,52, 1 equiv., 47 mmol) y metanol seco (100 ml) y se calentaron lentamente a reflujo hasta conseguir una solución. Esta solución se enfrió a temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante 5-6 horas para dar una suspensión de color blanco de la sal que se filtró y se lavó con una cantidad mínima de metanol seco. La sal en bruto se cristalizó una vez en metanol y la sal obtenida de esta manera se suspendió en agua destilada (25 ml) y se enfrió a 0 °C. Después, se añadió en porciones una solución al 10 % de carbonato sódico (100 ml) hasta que la suspensión se hizo fuertemente básica. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos más y se extrajo con acetato de etilo (5 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto de fórmula 4.

10 Rendimiento: 3,2 g, 62 % [$\alpha_D^{27^\circ C}$]: -8,97 (c = 1,0; Metanol)

p.f.: 64-66 °C

IR (puro): 3362, 2970, 1703, 1520, 1454, 1365, 1256, 1172 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,00-1,22 (m, 2H, H-4); 1,40 (s, 9H, -O-C(CH₃)₃); 1,57-1,72 (m, 3H, H-3, H-5); 2,21-2,32 (m, 1H, CH_aNHBoc); 2,44-2,2,57 (m, 1H, CH_bNHBoc); 2,92-3,05 (m, 4H, H-2, H-4); 4,72 (s a, 1H, NH)

15 ¹³C RMN (CDCl₃, 300 MHz) 26,56, 29,03, 29,58, 38,44, 44,99, 47,46, 51,16, 79,73, 156,72

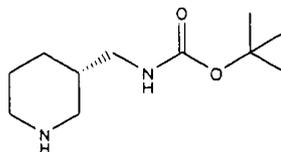
FAB MS (m/z):

215 [M+1]⁺, 114

Ejemplo 4

20

Síntesis de (3S)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina (compuesto 5)



5

25 Se mezclaron N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil piperidina (10 g, 1 equiv., 47 mmol), ácido (-)-O,O'-Di-p-toloil-L-tartárico (15,52, 1 equiv., 47 mmol) y metanol seco (100 ml) y se calentaron lentamente a reflujo hasta obtener una solución uniforme. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante 5-6 horas. El sólido de color blanco formado se retiró por filtración y se lavó con una cantidad mínima de metanol seco. El sólido en bruto se recrystalizó en metanol. El compuesto se suspendió en agua destilada (25 ml) y se enfrió a 0 °C. Después, se añadió en porciones una solución al 10 % de carbonato sódico (100 ml), hasta que se hizo básica, con agitación durante 10 min. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (5 x 50 ml). La capa orgánica se separó, se secó y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto de fórmula 3.

30 Rendimiento: 3,28 g, 65 % [$\alpha_D^{27^\circ C}$]: +11,03 (c = 0,10; Metanol)

p.f.: 64-66 °C

35 IR (Puro): 3360, 2972, 1703, 1519, 1455, 1365, 1255, 1172 cm⁻¹

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,01-1,21 (m, 2H, H-4); 1,39 (s, 9H, -O-C(CH₃)₃); 1,57-1,72 (m, 3H, H-3, H-5); 2,20-2,31 (m, 1H, CH_aNHBoc); 2,49-2,56 (m, 1H, CH_bNHBoc); 2,90-3,03 (m, 4H, H-2, H-4); 4,77 (s a, 1H, NH)

¹³C RMN (CDCl₃, 300 MHz) 26,56, 29,03, 29,58, 38,44, 44,99, 47,46, 51,16, 79,73, 156,72

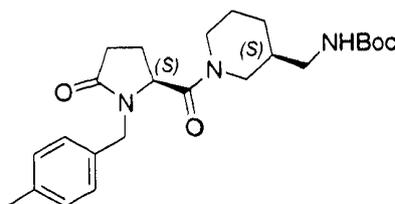
FAB MS (m/z): 215(M+1)⁺, 114

40

Ejemplo 5

Síntesis de (2S)-1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-(3S)-(N-[(3-t-butoxicarbonil aminometil)]-piperidin-1-il)-pirrolidin-2-carboxamida, (compuesto 6)

45



Método A

50 Etapa-1: Se disolvió ácido (2S)-N-(4-metilfenilmetil)-piroglutámico, el Compuesto 3 (3,50 g, 1 equiv., 15 mmol), en DCM seco (50 ml) y se enfrió a 0 °C. Después, se añadió en porciones cloruro de oxalilo (1,3 ml, 1,2 equiv., 18 mmol) a 0 °C y la mezcla se dejó calentar hasta una temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. Después, la mezcla de reacción se concentró sobre presión reducida.

Etapa-2: El Compuesto 4 (3,53 g, 1,1 equiv., 16 mmol) se disolvió en DCM seco (50 ml) y se enfrió a 0 °C. Después, a la mezcla de reacción se le añadió trietilamina (4,82 ml, 2,3 equiv., 35 mmol) y se agitó durante 10 min. Después, se añadió gota a gota cloruro de ácido (de la etapa-1) disuelto en DCM seco (25 ml) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después, la mezcla de reacción se lavó con bicarbonato sódico saturado (1 x 50 ml), HCl 1 N enfriado con hielo (1 x 50 ml) y después con salmuera. La capa orgánica se separó, se secó y se concentró. Después, el aceite viscoso obtenido se sometió a cromatografía ultrarrápida [gel de sílice, malla de 230-400 usando cloroformo-metanol (9,5:0,5) como sistema de disolvente] para obtener el compuesto puro. El compuesto se purificó adicionalmente por re-cristalización en acetato de etilo-hexano.

Rendimiento: 4,25 g, 66 % (doble cristalizado) [$\alpha_D^{27^\circ C}$]: +35,00 (c = 0,098; Cloroformo)

p.f.: 138-140 °C

IR (KBr): 3274, 2977, 2934, 2860, 1714, 1674, 1630, 1541, 1449, 1365, 1272, 12489, 1176, 1144, 1039,997, 958, 847, 759, 717, 654 ¹H RMN (CDCl₃; 600 MHz): δ 1,119-1,390 (m, 2H, 4'-H); 1,448 (s, 9H, -O-C(CH₃)₃); 1,704 (m, 1H, 3'-H); 1,725-1,887 (m, 2H, 5'-H); 2,138-2,175 (m, 1H, 3-H_a); 2,305 (s, 3H, Ph-CH₃), 2,361-2,398 (m, 1H, 3-H_b); 2,496-2,555 (m, 2H, 4-H); 2,646-2,757 (m, 2H, -CH₂-NH-Boc); 2,833-3,090 (m, 2H, 6'-H); 3,324-3,428 (m, 1H, 2'-H_a); 3,731-3,769 (m, 1H, 2'-H_b); 4,110-4,200 (m, 2H, -CH₂-Ph & 2-H); 4,871 (s, 1H, NH); 5,133-5,138 (d, 1H, -CH₂-Ph); 7,060-7,090 (dd, 4H, Ph-H)

¹³C RMN (CDCl₃; 600 MHz): 21,063, 21,086, 22,651, 24,614, 27,898, 28,287, 28,639, 29,748, 35,955, 38,330, 42,728, 43,118, 43,332, 45,065, 45,646, 49,273, 55,673, 55,841, 79,331, 128,427, 128, 733, 129,351, 133,078, 137,339, 156,028, 168,810, 169,253, 175,164

FAB MS (m/z): 429 (M⁺), 330, 374, 452 (M+Na)⁺

Método-B

Se disolvieron ácido (2S)-N-(4-metilfenilmetil)-piroglutámico, el Compuesto 3 (3,50 g, 1 equiv., 15 mmol) y 1-hidroxi benzotriazol (3,04 g, 1,5 equiv., 22,5 mmol) en DCM seco (50 ml) en un matraz de fondo redondo de tres bocas equipado con una entrada de N₂. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-sal. A ésta se le añadió dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (3,72 g, 1,2 equiv., 18 mmol) disuelta en DCM seco (20 ml) y se agitó mientras estaba a 0 °C durante 15 min. A la mezcla de reacción se le añadió gota a gota (3R)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina, el Compuesto 4 (3,21 g, 1 equiv., 15 mmol), disuelta en DCM seco (20 ml) y la agitación continuó durante 3 h a 0 °C. La mezcla de reacción se llevó a la temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se enfrió a 5 °C, se filtró y el filtrado se lavó sucesivamente con ácido cítrico dil. (3 x 50 ml), una solución dil. de bicarbonato sódico (3 x 50 ml) y salmuera (1 x 50 ml). La capa orgánica se separó, se secó y se concentró a presión reducida. El material en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida [gel de sílice, malla de 230-400 usando cloroformo-metanol (9,5:0,5) como sistema de disolvente] para obtener el Compuesto puro 6, 4,5 g, rendimiento del 70 %.

Método-C

Se disolvieron ácido (2S)-N-(4-metilfenilmetil)-piroglutámico, el Compuesto 3 (3,5 g, 1 equiv., 15 mmol), (3R)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina, el Compuesto 4 (3,21 g, 1 equiv., 15 mmol) y diisopropiletilamina (5,36 ml, 2 equiv., 30 mmol) en DCM seco (50 ml) en un matraz de fondo redondo de tres bocas equipado con una entrada de N₂ y un tapón de caucho. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-sal y se agitó durante 10 min. A la mezcla de reacción se le añadió gota a gota una solución de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-trispirrolidino-fosfonio (7,82 g, 1 equiv., 15 mmol) disuelta en DCM seco (20 ml) y la agitación continuó durante 3 horas a 0 °C. Después, la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó sucesivamente con ácido cítrico dil. (3 x 50 ml), una solución dil. de bicarbonato sódico (3 x 50 ml) y salmuera (1 x 50 ml). La capa orgánica se separó, se secó y se concentró a presión reducida. El material en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida [gel de sílice, malla de 230-400 usando cloroformo-metanol (9,5:0,5) como sistema de disolvente] para obtener el compuesto puro, 4,6 g, rendimiento del 72 %.

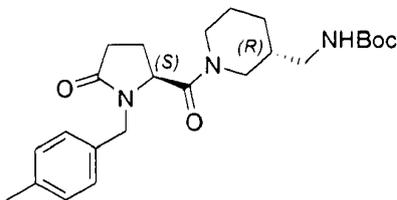
Método-D

Se disolvieron ácido (2S)-N-(4-metilfenilmetil)-piroglutámico, Compuesto 3 (3,5 g, 1 equiv., 15 mmol) y trietil amina seca (4,10 ml, 2 equiv., 30 mmol) en THF seco (50 ml) en un matraz de fondo redondo de tres bocas equipado con una entrada de N₂ seco y un tapón de caucho. La mezcla de reacción se enfrió a -20 °C y se agitó mientras estaba a -20 °C durante 10 minutos. A ésta se le añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (1,96 ml, 1 equiv., 15 mmol) a -20 °C y la agitación continuó durante 15 minutos. A ésta se le añadió gota a gota una solución de (3R)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina, Compuesto 4 (3,21 g, 1 equiv., 15 mmol) en diclorometano seco (25 ml) en 10 minutos a -20 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h de 0 °C a 25 °C, se inactivó añadiendo una solución saturada de NH₄Cl y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó sucesivamente con ácido cítrico dil. (3 x 50 ml), una solución dil. de bicarbonato sódico (3 x 50 ml) y salmuera (1 x 50 ml). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida: El material en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida [gel de sílice, malla de 230-400 usando cloroformo-metanol (9,5:0,5) como sistema de disolvente] para obtener el Compuesto puro 6 4,2 g, rendimiento del 65 %.

Ejemplo-6

Síntesis de (2S)-1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-(3R)-{N-[(3-t-butoxicarbonil-aminometil)]-piperidin-1-il}-pirrolidin-2-carboxamida (compuesto 7)

5



Método A

10 Etapa-1: Se disolvió ácido (2S)-N-(4-metilfenilmetil)-piroglutámico, (3,50 g, 1 equiv., 15 mmol) en DCM seco (10 ml) y se enfrió a 0 °C. Después se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (1,3 ml, 1,2 equiv., 18 mmol) a 0 °C y la mezcla se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. Después, la mezcla de reacción se concentró sobre presión reducida.

15 Etapa-2: El Compuesto 5 (3,53 g, 1,1 equiv., 16 mmol) se disolvió en DCM seco (20 ml) y se enfrió a 0 °C. Después, a la mezcla de reacción se le añadió trietilamina (4,82 ml, 2,3 equiv., 35 mmol) y se agitó durante 10 min. Después, se añadió gota a gota cloruro de ácido (de la etapa-1) disuelto en DCM seco (10 ml) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después, la mezcla de reacción se lavó con bicarbonato sódico saturado (1 x 50 ml), HCl 1 N enfriado con hielo (1 x 50 ml) y después con salmuera. La capa orgánica se separó, se secó y se concentró.

20 Después, el aceite viscoso obtenido se sometió a cromatografía ultrarrápida [gel de sílice, malla de 230-400 usando cloroformo-metanol (9,5:0,5) como sistema de disolvente] para dar el compuesto que se purificó adicionalmente por re-cristalización en acetato de etilo-hexano para dar el compuesto puro, 4,38 g, rendimiento del 68 % (doble cristalizado) $[\alpha_D^{27^\circ C}]$: +5,69 (c = 0,99; Cloroformo) p.f.: 180-182 °C

25 IR (KBr): 3330, 2974, 2935, 2857, 1710, 1677, 1642, 1528, 1444, 1363, 1274, 1173, 1146, 1080, 997, 958, 850, 756, 645

^1H RMN (CDCl_3 ; 600 MHz): δ 1,177-1,270 (m, 2H, 4'-H); 1,424 (s, 9H, -O-C(CH₃)₃); 1,668 (m, 1H, 3'-H); 1,768-1,856 (m, 2H, 5'-H); 2,138-2,175 (m, 1H, 3-H_a); 2,305 (s, 3H, Ph-CH₃); 2,361-2,398 (m, 1H, 3-H_b); 2,496-2,555 (m, 2H, 4-H); 2,646-2,757 (m, 2H, -CH₂-NH-Boc); 2,833-2,984 (m, 2H, 6'-H); 3,324-3,428 (dd, 1H, 2'-H_a); 3,731-3,769 (m, 1H, 2'-H_b); 4,160-4,180 (m, 2H, -CH₂-Ph & 2-H); 4,871 (s, 1H, NH); 5,133-5,138 (m, 1H, -CH₂-Ph); 7,060-7,090 (dd, 4H, Ph-H);

30 ^{13}C RMN (CDCl_3 ; 600 MHz): 21,086, 22,728, 23,866, 24,614, 28,096, 28,303, 28,700, 29,784, 36,405, 37,322, 42,828, 43,011, 43,263, 45,042, 45,852, 48,441, 55,986, 56,047, 79,316, 128,389, 128,710, 129,336, 133,048, 137,339, 156,080, 168,810, 169,001, 175,072

35 FAB MS (m/z): 429 (M⁺), 330, 374, 452 (M+Na)⁺

Estudio biológico

Estudios *in vitro*

40 Se extrajo sangre de sujetos humanos en citrato-fosfato-dextrosa (CPD) (1:7) de voluntarios sanos (edad entre 18-60 años) después de obtener el consentimiento previo. Antes de la flebotomía se realizaron una detallada historia clínica y una exploración física. Los donantes carecían de trastornos de corazón, pulmones, enfermedad renal, cáncer, epilepsia, diabetes, tuberculosis, tendencia anormal al sangrado, enfermedad alérgica, enfermedades de transmisión sexual, ictericia, malaria, fiebre tifoidea y trastornos del tiroides o cualquier otro trastorno endocrino. Los donantes no habían tomado ninguna medicación en las últimas 72 horas.

45

Preparación de plaquetas lavadas

50 Se extrajo sangre fresca mediante punción venosa de los voluntarios humanos sanos en citrato-fosfato-dextrosa. Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación a 180 g durante 20 minutos a temperatura ambiente (Beckman TJ6, EE.UU.). Se añadió 10 % (v/v) de tampón ACD (ácido cítrico 39 mM, citrato trisódico.2H₂O 75 mM, D-glucosa 135 mM, pH 4,5) y el plasma rico en plaquetas se centrifugó a 800 g durante 10 minutos (3K30 Sigma centrífuga, Alemania). A continuación, se lavaron las plaquetas dos veces con tampón (HEPES 20mM, NaCl 138 mM, KCl 2,9 mM, MgCl₂ 1mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, EGTA 1 mM, citrato trisódico 4,77 mM, y ácido cítrico 2,35 mM, glucosa 5 mM y apirasa 1 U/ml, pH 6,5) que contenía 0,1 % de seroalbúmina bovina (BSA) y, finalmente, se resuspendieron en la solución de Tyrode tamponada con HEPES (pH 7,4), para dar una concentración de 2×10^8 células/ml (Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, and Boni C Adhesion and Activation of Human Platelets Induced by Convulxin Involve Glycoprotein VI and Integrin $\alpha 2\beta 1$ J. Biol. Chem.1997; 272: 27035-27041).

55

Determinaciones de la agregación plaquetaria

Se aplicó un método turbidimétrico para medir la agregación plaquetaria, utilizando un agregómetro de doble canal (560 Ca, 230 VAC Chronolog-corp, Havertown, USA (Dikshit M, Kumari R, Srimal RC. Pulmonary thromboembolism induced alterations in nitric oxide release from rat circulating neutrophils. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1993; 265:1369-1373). El plasma rico en plaquetas (1×10^8 plaquetas/ml, 0,45 ml) se precalentó a 37 °C durante 2 minutos, después se incubó con el compuesto (3-100 μ M) o un control de disolvente isovolumétrico (0,5 % de DMSO) durante 5 minutos antes de la adición de los agonistas (es decir, 2 μ g/ml de colágeno, ADP 10 μ M, 1 U/ml de trombina, 15 ng/ml de convulxina, TRAP 25 μ M, 1,5 mg/ml de ristocetina). Se dejó que la reacción continuara durante al menos 5 minutos y el grado de agregación se expresó en unidades de transmisión de luz (Ivancic BT, Schlick P, Staritz P, Kurz K, Katas H A, Giannitsis E. Determination of clopidogrel resistance by whole blood platelet aggregometry and inhibitors of the P2Y12 receptor. Clinical Chemistry 2006; 52:383-88).

El porcentaje de agregación se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de agregación} = A/B \times 100$$

en la que A es el número de la división atravesado por la marca en el gráfico en presencia de inductor y B es el número total de divisiones (80).

Estudios de agregación plaquetaria (Fig. 3)

a) Agregación plaquetaria (humana, *in vitro*) (Fig. 3 a (i) (ii) (iii))

En la invención que incluye los compuestos 1, 6 y 7 se descubrió que eran activos frente a la agregación inducida por colágeno *in vitro* en plasma humano rico en plaquetas.

La actividad antiagregante *in vitro* fue comparable entre los tres compuestos, ya que inhibieron los efectos mediados por colágeno a concentraciones similares.

Los compuestos 6 y 7 de la invención no mostraron ningún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP y mimético de trombina hasta 300 mM, SFLLRN (TRAP), mientras que el compuesto 1 mostró una inhibición significativa contra la agregación plaquetaria inducida por TRAP, incluso a 100 μ M, mostrando de este modo su modo de acción no específico.

Los compuestos no tenían ningún efecto inhibitorio frente a la agregación plaquetaria inducida por otro agonista de GP VI, convulxina, y el agonista específico de GP 1 b, ristocetina.

De la Figura 3a se pudo deducir que los compuestos 1, 6 y 7 son activos contra la agregación inducida por colágeno *in vitro* en plasma humano rico en plaquetas, mientras que no se observaron efectos sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP. Además, los compuestos 6 y 7 son más específicos que el compuesto 1, que muestra una eficacia moderada contra la agregación plaquetaria inducida por el mimético de la trombina, SFLLRN (TRAP). La invención, además, no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria inducida por el agonista específico de GP VI, convulxina, y el agonista específico de GP 1 b, ristocetina.

Agregación plaquetaria (ratones, *ex vivo*) (Fig. 3 b)

El compuesto 6 exhibe inhibición dependiente de la dosis en la agregación plaquetaria (*ex vivo*) inducida por colágeno cuando se administró a ratones por vía oral.

Se podría deducir que el compuesto 6 inhibe específicamente la agregación plaquetaria inducida por colágeno.

Ensayo de adhesión plaquetaria inducida por GPVI y $\alpha 2\beta 1$

La unión de integrina $\alpha 2\beta 1$ sobre el colágeno soluble depende de la presencia de Mg^{2+}/Ca^{2+} (Onley D.J., Knight C.G., Tuckwell D. S., Barnes M. J., y Farndale R. W. Micromolar Ca^{2+} concentrations are essential for Mg^{2+} -dependent binding of collagen by the integrin $\alpha 2\beta 1$ in human platelets. J. Biol. Chem. 2000; 275: 24560-24564.) mientras que GPVI participa en la adhesión sobre el colágeno fibrilar en ausencia de iones divalentes (Nieswandt B., Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Nejad R M, Lindhout T, Heemskerk J W M, Zirngibl H y Fassler R. Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. The EMBO Journal, 2001; 20: 2120-2130) y, por tanto, los ensayos de adhesión se realizaron en presencia o ausencia de estos cationes divalentes. Placas de microtitulación de noventa y seis pocillos se recubrieron con colágeno de tipo I fibrilar de tendón equino insoluble o colágeno de tipo I de cola de rata soluble (no fibrilar), mantenidas en tampón acetato (pH 4,5), (Nakamura T., Jamieson G. A., Okuma M., Kambayashi J., y Tandon N. N. Platelet Adhesion to Native Type I Collagen Fibrils: role of gpVI in divalent cation-dependent and independent adhesion and thromboxane A2

generation. J. Biol. Chem 1998; 273: 4338-4334, Tandon NN, Ockenhouse CF, Greco NJ, Jamieson GA. Adhesive functions of platelet lacking GPIV (CD36). Blood 1991; 78: 2809-13). Los sitios de unión a la proteína no ocupados en los pocillos se bloquearon con 5 mg/ml de BSA a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se aclararon una vez en PBS. Las plaquetas lavadas, suspendidas en el tampón de Tyrode-HEPES (NaCl 136,7 mM, NaHCO₃ 13,8 mM, NaH₂PO₄.H₂O 0,36 mM, KCl 2,6 mM, MgCl₂.6H₂O 1,0 mM, glucosa 5,5 mM, 0,5 % de BSA, pH 7,4) a 1×10^8 células/ml se pre-incubaron con los compuestos durante 30 minutos a 37 °C y se añadieron a los pocillos (10^7 / pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. El tampón de adhesión libre de cationes divalente se preparó mediante la sustitución de Mg²⁺ (1 mM) en el tampón de Tyrode-HEPES 50 μM con EDTA (Yoshida S., Sudo T., M. Niimi, Tao L., Sun B., Kambayashi J., Watanabe H., Luo E., y Matsuoka H. L. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. Blood 2007; 111: 2007-201). Después de tres lavados en tampón de Tyrode, se evaluó colorimétricamente el número de plaquetas adherentes (como se describe en Bellavite P., Andrioli G., Gizzo P., Arigliano P., Chirumbolo S., Manzato F., Santonastaso C. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. Anal. Biochem. 1994; 216:444-450. En pocas palabras, se añadieron 150 μl de un tampón citrato 0,1 M (pH 5,4), que contiene p-nitrofenilfosfato 5 mM fosfato y 0,1 % de Triton X-100 a los pocillos después del lavado. Después de incubación durante 60 minutos a 25 °C en ausencia de luz ambiental, el color se desarrolló mediante la adición de 100 μl de NaOH 2 N y la absorbancia a 405 nm se leyó usando un lector de microplacas (Powerware XS, Biotek, EE.UU.).

Estudios de adhesión plaquetaria (Fig. 4 a)

Ensayo de adhesión plaquetaria mediada por GPVI y α2β1 en colágeno (humano, in vitro)

1) Los compuestos 6 y 7 inhibieron parcialmente la adhesión plaquetaria humana mediada por colágeno tanto fibrilar como soluble sobre el colágeno (in vitro), mientras que el efecto parecía ser más prominente contra la vía mediada por el colágeno fibrilar.

Se pudo deducir que el compuesto 6 es mejor que el compuesto 7 en lo que respecta a la inhibición de la adhesión plaquetaria sobre la superficie recubierta de colágeno.

Agregación plaquetaria (ratones, *ex vivo*) (Fig. 4 b)

El compuesto 6 exhibe inhibición dependiente de la dosis en la adhesión plaquetaria (*ex vivo*) sobre la superficie del colágeno cuando se administró a ratones por vía oral.

Sin embargo, la aspirina no mostró ningún efecto inhibitor sobre la adhesión plaquetaria sobre el recubrimiento de colágeno.

Se pudo deducir que el compuesto 6 exhibe reducción dependiente de la dosis en la adhesión plaquetaria sobre la matriz de colágeno y comparativamente mejor que la aspirina.

Medición de la concentración de calcio intracelular

La concentración de Ca⁺² ([Ca⁺²]_i) se monitorizó mediante fluorescencia Fura-2AM en las plaquetas (Fowler CJ, Tiger G Calibration of Fura-2 signals introduces errors into measurement of thrombin-stimulated calcium mobilization in human platelets. Clinica Chimica Acta. 1997; 265:247-261). Se incubó PRP humano con Fura-2 AM 5 μM (Sigma) durante 60 minutos a 37 °C. Después de 2 lavados con el tampón de lavado, las plaquetas se resuspendieron a 2×10^8 células/ml con el tampón de Tyrode-HEPES. Después de incubar con diversas concentraciones del compuesto durante 5 minutos, se estimuló a las plaquetas con colágeno (5 μg/ml) (la concentración de colágeno se varió de acuerdo con el número de células). La fluorescencia Fura-2 se midió durante 5 minutos a una longitud de onda de excitación de 340/380 nm y la longitud de onda de emisión de 500 nm (Yoshida S., Sudo T., Niimi M., Tao L., Sun B., Kambayashi J., Watanabe H., Luo E., and Matsuoka H. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. Blood 2007; 111: 2007-201) usando un espectrofotómetro de fluorescencia (VARIAN, Cary Eclipse).

Medición de la concentración de calcio intracelular (Fig. 8)

Puesto que un aumento de la [Ca²⁺]_i se considera que desempeña un papel fundamental en la agregación plaquetaria, se investigó la posible implicación del compuesto 6 en la regulación del [Ca²⁺]_i. El compuesto 6 exhibió una inhibición dependiente de la concentración en la movilización de calcio mejorada durante la estimulación del colágeno.

Se pudo deducir que el compuesto 6 inhibía la movilización del [Ca²⁺]_i de una manera dependiente de la concentración.

Inmunotransferencia

Plasma rico en plaquetas (2×10^8 /ml) se preincubó con compuesto de ensayo (10 a 100 μ M) o el disolvente isovolumétrico de control (0,5 % de DMSO) durante 5 minutos, seguido de la adición de colágeno, para desencadenar la activación de plaquetas. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de parada enfriado con hielo (EDTA 5 mM, EGTA 5 mM) y las suspensiones se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos y luego se volvieron a suspender inmediatamente en 300 μ l de tampón de lisis (HEPES 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, 1 % de Triton X-100, 10 μ g/ml de aprotinina, PMSF 1 mM, 10 mg/ml de leupeptina, NaF 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM y pirofosfato de sodio 5 mM) (Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, y Takayama H Physical and Functional Association of the Src Family Kinases Fyn and Lyn with the Collagen Receptor Glycoprotein VI-Fc Receptor Chain Complex on Human Platelets. J. Exp. Med. 1998; 188: 267-276). Los lisados se centrifugaron a 12.000 x g durante 5 minutos, después de lo cual los sobrenadantes se disolvieron en tampón de muestra de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras que contenían 30 μ g de proteína se separaron en 8 % de SDS-PAGE; las proteínas se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa mediante el método semi-seco (Amersham Biosciences). Las membranas se bloquearon con TBST (Tris-base (10 mM, NaCl 100 mM y 0,01 % de Tween 20) que contenía 5 % de BSA durante la noche a 4 °C, a continuación, se sondaron con los siguientes anticuerpos primarios durante 2 horas: anti-p-Tyr(PY20:4G10-1:1)(diluido a 1:10000 en TBST) o β -actina (1:5000). Las membranas se lavaron durante 30 minutos y después se incubaron con IgG anti-ratón unida a peroxidasa de rábano (diluido a 1: 20.000 en TBST) e IgG anti-conejo (1:5000) durante 1 hora. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de quimioluminiscencia potenciado con ECL (Inoue K, Ozaki Y, Satoh K, Wu Y, Yatomi Y, Shin Y y Morita T Signal Transduction Pathways Mediated by Glycoprotein VI in Human Platelets: Comparison with those of Glycoprotein VI. Biochem. J and Biophys. Res. Comm. 1999; 256: 114-120).

Inmunotransferencia (Fig. 9)

- 1) La activación de las plaquetas por colágeno contribuye al ensamblaje y la estabilización de diversos complejos de señalización. Esto implica la fosforilación de la tirosina de varias proteínas en las plaquetas.
- 2) El compuesto 6 atenuó la fosforilación de la tirosina de varias proteínas en las plaquetas estimuladas con colágeno de una manera dependiente de la concentración.

Se pudo deducir que el compuesto 6 inhibía la fosforilación de la tirosina de las proteínas de las plaquetas después de la estimulación con colágeno.

Ensayo amidolítico de la actividad de la trombina (Fig. 5)

En experimentos anteriores, el compuesto 1 mostró un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad amidolítica de la trombina a 300 μ M y 1 mM después de 15 minutos de incubación del sustrato. El compuesto 7 atenuó activamente la escisión proteolítica de un sustrato por la trombina en una forma dependiente de la concentración. El compuesto 6, por el contrario, se mantuvo ineficaz y no exhibió ninguna acción inhibitoria de la trombina o dependencia de la concentración.

Se pudo deducir que el compuesto 1 y 7 no atenuaron de forma específica la actividad amidolítica de trombina, mientras que el compuesto 6 no exhibió nada de dicha propiedad inhibitoria de la trombina no específica.

Estudios en un modelo animal (modelos *ex vivo* e *in vivo*)

Los animales se obtuvieron del National Laboratory Animal Centre of Central Drug Research Institute, Lucknow. Todos los experimentos con animales se sometieron a las directrices del Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) y se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Experimental Animal Care emitido por el Committee for Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals (CPCSEA). Se alojó a los animales en jaulas de polipropileno y se mantuvieron con pienso estándar y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a temperatura: 25 \pm 2 °C, humedad: 45-55 % y ventilación: 10-12 intercambios/hora.

Tromboembolia pulmonar inducida por epinefrina colágeno:

Para evaluar la eficacia antitrombótica de los compuestos, los ratones se dividieron en grupos tratados con vehículo, aspirina y compuestos, y en cada grupo se incluyó a diez animales. La tromboembolia pulmonar se indujo mediante la inyección de una mezcla de colágeno (150 μ g/ml) y adrenalina (50 μ g/ml) en la vena de la cola para lograr dosis finales de colágeno (1,5 mg/kg) y adrenalina (0,5 mg/kg) para inducir la parálisis de las extremidades posteriores o la muerte. Los resultados se han notificado como porcentaje de protección, que representa protección contra el colágeno y la trombosis inducida por epinefrina y se expresa como:

$$\text{Porcentaje de protección} = (1 - (P_{\text{ensayo}}/P_{\text{control}})) \times 100$$

P_{ensayo} – número de animales paralizados/muertos en el grupo tratado con el compuesto de ensayo;

$P_{control}$ – número de animales paralizados/muertos en el grupo tratado con vehículo.

Tromboembolia pulmonar inducida por epinefrina colágeno (Fig. 1):

- 5 a) El compuesto 6 (30 $\mu\text{M}/\text{kg}$) mostró una eficacia antitrombótica notable (1 hora dosis por vía oral), que se mantuvo durante más de 24 horas y, por lo tanto, pone de relieve su excelente biodisponibilidad.
- 10 b) El compuesto 6 exhibió eficacia antitrombótica significativa, incluso hasta 24 horas desde su administración. Aunque el compuesto 1 exhibía una eficacia casi similar a la del compuesto 6, pero solo hasta 12 horas después de lo cual se hizo gradualmente ineficaz, mientras que el compuesto 7 mostró un potencial antitrombótico relativamente más débil durante el cual se mantuvo durante hasta 12 horas, después de lo cual también disminuyó.
- 15 c) Los fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, aspirina (170 $\mu\text{M}/\text{kg}$) y clopidogrel (70 $\mu\text{M}/\text{kg}$) fueron eficaces solo hasta 5 horas, después de lo cual su efecto perezca y también a una dosis muy alta suficiente como para causar complicaciones hemorrágicas.

Tiempo de sangrado

20 El tiempo de sangrado en ratones se evaluó mediante el método de *Dejana et al*, (Dejana E, Callioni A, Quintana A, Gaetano G. Bleeding time in laboratory animals. II-A comparison of different assay conditions in rats. *Thromb Res.* 1979; 15:191-7). Se realizó una incisión en la cola a 2 mm de la punta y se empapó con la sangre un papel de filtro y se monitorizó a un intervalo de 10-15 segundos hasta que paró el sangrado. Se determinó que el tiempo transcurrido desde la incisión en la punta hasta que paró el sangrado era el tiempo de sangrado. Los compuestos preferidos, aspirina (30 mg/kg) o vehículo, se administraron por vía oral 60 minutos antes de la incisión de la cola en un grupo de 5 ratones cada uno.

25 Tiempo de sangrado en ratones (Fig. 2)

Se espera que un fármaco antitrombótico ideal mantenga el precario equilibrio entre la prevención de la trombosis y dejar la hemostasia lo suficientemente intacta para prevenir la hemorragia.

- 30 a) Se observó que el tiempo de sangrado estaba significativamente prolongado en los ratones tratados con fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, aspirina (170 $\mu\text{M}/\text{kg}$) y clopidogrel (30 $\mu\text{M}/\text{kg}$), a la dosis más eficaz para prevenir la trombosis.
- 35 b) Los compuestos 1, 6 y 7 (30 $\mu\text{M}/\text{kg}$, 1 hora dosis por vía oral) exhibieron una ligera prolongación del tiempo de sangrado (aproximadamente 1,5 veces), que fue significativamente menor en comparación con los fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, aspirina y clopidogrel.

40 Se pudo deducir de la Fig. 2 que, a igual eficacia, el compuesto 6 es comparativamente más seguro que los fármacos estándar, aspirina y clopidogrel.

Trombosis inducida por FeCl_3 en ratas:

45 Se anestesió a ratas SD con uretano (1,25 g/kg, i.p.). Cuidadosamente se diseccionó cuidadosamente la arteria carótida y un Doppler Probe pulsado (DBF-120A-CPx, CBI-8000, Crystal Biotech, EE.UU.) se colocó alrededor de ella para registrar la velocidad del flujo sanguíneo y la permeabilidad de los vasos sanguíneos. El FeCl_3 indujo trombosis de la arteria carótida del siguiente modo: un cuadrado (1x1 mm) de papel Whatman para cromatografía se sumergió en solución al 20 % de FeCl_3 durante 5 minutos y se coloca en la arteria carótida como se ha descrito anteriormente (Kurz KD, principal BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 1990; 60(4):269-80). La trombosis se controló como la reducción del flujo sanguíneo de la arteria carótida. El momento en que la velocidad de flujo de la sangre se redujo a cero se registró como la oclusión total (TTO) de la arteria carótida. Cuando la velocidad del flujo sanguíneo no se ocluyó en 120 minutos, al tiempo hasta la oclusión trombótica se le asignó un valor de > 120 minutos. (el cloruro férrico indujo trombosis (Fig. 7)).

55 Trombosis inducida por FeCl_3 en ratas (Fig. 7a):

- 60 1. El compuesto 6 prolongó significativamente el tiempo para ocluir la arteria carótida en ratas, mostrando de este modo su notable potencial antitrombótico, mientras que el compuesto 1 no pudo mostrar ningún tipo de protección a la misma dosis Fig. 7a(i)).
- 65 2. El fármaco antiagregante plaquetario estándar, aspirina, incluso a una dosis muy alta, se mantuvo ineficaz en la prolongación del tiempo hasta la oclusión en el mismo
3. El COMPUESTO 6 (10, 30 y 100 $\mu\text{M}/\text{kg}$) exhibió dependiente de la dosis del tiempo hasta la oclusión en comparación con las ratas normales con elevación significativa a 30 y 100 $\mu\text{M}/\text{kg}$ in en ratas (Fig. 7a (ii)).

Se pudo deducir el hecho de que el compuesto 1 es ineficaz, mientras que el compuesto 6 presenta una protección significativa y, por lo tanto, mejor.

Modelo de derivación arterio-venosa en ratas

5 Las ratas se agruparon en el grupo de control, de aspirina y del compuesto de ensayo, teniendo cada grupo seis animales. Se anestesió a las ratas con uretano (1,25 g/kg). Se realizó una incisión cervical y se expuso la arteria carótida y su vena yugular contralateral para preparar una derivación usando tubos de polietileno. Dos tubos de 7 cm de polietileno siliconado (0,5/1,0 mm de diámetro interior/exterior) estaban unidos a un tubo de silicona de 6 cm central (1,0/1,5 mm, diámetro interior/exterior) que contenía un hilo de seda de 5 cm (previamente pesado) y se llenaron con solución salina. El conjunto de derivación se canuló entre la vena yugular y la arteria carótida contralateral, y se dejó que la sangre circule a través de la derivación. El flujo de sangre a través de la derivación se mantuvo durante 10 minutos, después, se retiró la parte central de la derivación y se sacó el hilo de seda que tenía un depósito de trombo y se pesó. El trombo adherido/depositado sobre el hilo se calculó restando el peso húmedo del hilo de seda. Se administraron los fármacos estándar y los compuestos de ensayo 1 hora antes del establecimiento de la derivación arterio-venosa (Tohti I, Tursun M, Umar A, Turdi S, Imin H, Moore N. Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio-venous shunt thrombosis in vivo. *Thrombosis Res.* 2006; 118: 733-739).

20 Modelo de derivación arterio-venosa en ratas (Fig. 6a)

Los compuestos 6 y 7 fueron casi igual de eficaces en la reducción significativa del peso del trombo y su eficacia fue comparable con las de los fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, aspirina y clopidogrel, en ratas.

25 Se pudo deducir que la eficacia antitrombótica tanto del compuesto 6 como 7 es idéntica.

Modelo de hámster hiperlipidémico

30 En este estudio se utilizó un hámster sirio dorado (100-120 g) obtenido del National Laboratory Animal Centre of Central Drug Research Institute, Lucknow. Todos los procedimientos que implican hámsteres estaban sujetos a las directrices del Institutional Animal Ethical Committee (IAEC). Se alojó a los animales en jaulas de polipropileno y se mantuvieron con pienso estándar y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a temperatura: 25±2 °C, humedad del 45-55 % y ventilación: 10-12 intercambio/hora. Los animales se dividieron al azar en uno de dos grupos, alimentados con pienso normal (proteína 186,2 g/kg, 62,5 g de grasa/kg, 45,3 g/kg de fibra, 537,7 g/kg de extracto sin nitrógeno, vitaminas, minerales) y pienso HCHF alimentado (dieta con pienso suplementada con 3 % de colesterol y 15 % de grasa saturada) durante tres meses (n = 16). Estos grupos se dividieron de nuevo en los que recibieron aspirina (30 µM) o vehículo (en suspensión de goma arábiga) o uno de los compuestos preferidos (Ejemplo 1 o Ejemplo 15) (30 µM/Kg). Después del período de alimentación de doce semanas, se mantuvo a los animales en ayunas durante 14 horas antes del sacrificio (Cheema SK, Cornualles ML., Bio F1B hamster: a unique animal model with reduced lipoprotein lipase activity to investigate nutrient mediated regulation of lipoprotein metabolism. *Nutrition & Metabolism* 2007, 4:27). Se anestesió a los hámsteres mediante aspiración de éter anestésico, se realizó una punción en el corazón y se obtuvieron muestras de sangre en ayunas y se introdujeron en tubos que contenían 2,5 % de citrato trisódico. Se utilizó una cierta cantidad de sangre entera para los estudios de agregación y la sangre entera restante se centrifugó a 180 g durante diez minutos para la separación del plasma rico en plaquetas (PRP). Al plasma rico en plaquetas (PRP) se añadió 10 % de ACD (ácido cítrico 39 mM, citrato trisódico 75 mM, D-glucosa 135 mM pH 4,5) y se centrifugó a 800 g durante 10 minutos para obtener sedimento de plaquetas y plasma pobre en plaquetas (PPP). Se utilizó plasma pobre en plaquetas para los estudios de coagulación, y las plaquetas se utilizaron para evaluar la adhesión sobre la superficie recubierta de colágeno.

50 Adhesión plaquetaria sobre superficie recubierta de colágeno (hámsteres hiperlipidémicos)

La adhesión plaquetaria al colágeno se midió en placas de 96 pocillos de microtitulación de poliestireno. Las placas de microtitulación se recubrieron con colágeno de tipo I fibrilar nativo de tendón equino insoluble (ChronoLog Corp. Havertown, EE.UU.), 2 µg/pocillo en ácido acético 5 mM (Tandon NN, Ockenhouse CF, Greco NJ, Jamieson GA. Adhesive functions of platelet lacking GPIV (CD36). *Blood* 1991; 78: 2809-13) durante la noche a 4 °C. Los sitios de unión a la proteína no ocupados en los pocillos se bloquearon con 0,5 % de BSA en tampón de Tyrode-HEPES (NaCl 136,7 mM, NaHCO₃ 13,8 mM, NaH₂PO₄·H₂O 0,36 mM, KCl 2,6 mM, MgCl₂·6H₂O 1,0 mM, glucosa 5,5 mM, pH 7,4) a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se aclaró una vez con PBS. Las plaquetas lavadas se suspendieron en el tampón de Tyrode-HEPES y se añadieron a los pocillos (2x10⁷ células/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS, se evaluó colorimétricamente el número de plaquetas adherentes (Bellavite P., Andrioli G., Gizzo P., Arigliano P., Chirumbolo S., Manzato F., Santonastaso C.A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal. Biochem.* 1994; 216:444-450). Brevemente, se añadieron 150 µl de un tampón de citrato 0,1 M (pH 5,4), que contenía fosfato de p-nitrofenilo 5 mM de y 0,1 % de Triton X-100 a los pocillos después del lavado. Después de incubación durante 30 minutos a 25 °C en ausencia de luz ambiental, el color se desarrolló mediante la adición de 100 µl de NaOH 2 N y la absorbancia

a 405 nm se leyó usando un lector de microplacas (Powerware XS, Biotek, EE.UU.).

Adhesión plaquetaria sobre la superficie recubierta por colágeno (modelo de hámster hiperlipidémico, *ex vivo*) (Fig. 4 c)

- 5
- 1) El fármaco antiagregante plaquetario estándar aspirina no mostró ninguna alteración en la adhesión plaquetaria, mientras que el clopidogrel mostró una reducción significativa en la adhesión plaquetaria sobre la superficie recubierta de colágeno.
 - 2) El compuesto 6 pero no 7 exhibió una inhibición significativa de la adhesión plaquetaria sobre la superficie de colágeno en el modelo de hámster hiperlipidémico de aterosclerosis, con un perfil de eficacia mejor que la aspirina.
 - 3) Además, el compuesto 6 exhibió una inhibición dependiente de la dosis de la adhesión plaquetaria sobre la superficie recubierta de colágeno.

15 Se pudo deducir que el compuesto 6 presenta una atenuación significativa de la adhesión plaquetaria sobre la superficie de colágeno, en contraste con el compuesto 7, que no exhibe ningún efecto sobre la misma.

Agregación de sangre entera

20 Se llevaron a cabo estudios de agregación de sangre entera en un agregómetro de canal doble (560 Ca, 230 VAC, Chrono-log Corp, EE.UU.) utilizando el método de la impedancia (*Ivandić et al, 2006*). La sangre entera citrada (450µl) se mezcló por inversión suave después se diluyó con solución salina fisiológica (0,9 % de NaCl, 450 µl) y cloruro de calcio (10 µl, 1,0 % en p/v), se incubaron a (37 °C) hasta el momento de uso. La respuesta de agregación se tomó después de la adición de inductores en las siguientes concentraciones finales: ADP 10 µM; 1 U/ml de trombina, 2,5 µg/ml de colágeno, con agitación. Después de la adición inductores, la impedancia se midió durante un intervalo de tiempo de 6 minutos. La agregación plaquetaria se midió mediante el cálculo de la impedancia (Ohms). El porcentaje de agregación se calculó por el método convencional como se ha descrito anteriormente (Torres Duarte AP, Dong QS, Young J, Abi-Younes S, Myers AK. Inhibition of platelet aggregation in whole blood by alcohol. *Thromb Res* 1995; 78 (2):107-15, Kumari R, Singh MP, Seth P, Dikshit M. Inhibition of platelet aggregation by a protein factor present in rat peripheral polymorphonuclear leukocyte supernatant. *Thromb Res* 1998; 91 (2): 75-82).

Agregación de sangre entera en hámsteres hiperlipidémico (*ex vivo*) (Fig. 3c)

- 35
- 1) Se encontró que la agregación plaquetaria máxima media en respuesta a ADP, colágeno y trombina estaba aumentada de manera significativa en hámsteres alimentados con dieta rica en grasas y rica en colesterol en comparación con los alimentados con pienso normal.
 - 2) Los hámsteres alimentados con HCHF tratados con aspirina (100 µM/kg) mostraron agregación plaquetaria reducida en respuesta al colágeno, pero no en los efectos mediados por ADP y trombina.
 - 40 3) El tratamiento con clopidogrel (30 µM/kg) también inhibió la agregación plaquetaria inducida por ADP y colágeno, pero no las respuestas de las plaquetas mediadas por trombina.
 - 45 4) La invención (Ejemplo 6) inhibió significativamente la agregación plaquetaria inducida por colágeno en el grupo rico en grasas en función de la dosis, mientras que el Ejemplo 7 fue incapaz de hacerlo. Asimismo, la activación inducida por ADP y trombina permanecieron sin obstaculizar.

Se pudo deducir que el compuesto 6 es mejor que el compuesto 7 en la atenuación de la agregación plaquetaria estimulada por colágeno en hámsteres hiperlipidémicos.

50 Trombosis inducida por FeCl₃ en hámsteres hiperlipidémicos

Se anestesió a hámsteres tratados con HCHF con uretano (1,25 g/kg, i.p.). Cuidadosamente se diseccionó cuidadosamente la arteria carótida y un Doppler Probe pulsado (DBF-120A-CPx, CBI-8000, Crystal Biotech, EE.UU.) se colocó alrededor de ella para registrar la velocidad del flujo sanguíneo y la permeabilidad de los vasos sanguíneos. El FeCl₃ indujo trombosis de la arteria carótida del siguiente modo: un cuadrado (1x1 mm) de papel Whatman para cromatografía se sumergió en solución al 30% de FeCl₃ durante 5 minutos y se coloca en la arteria carótida como se ha descrito anteriormente (Kurz KD, principal BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 1990; 60(4):269-80). La trombosis se controló como la reducción del flujo sanguíneo de la arteria carótida. El momento en que la velocidad de flujo de la sangre se redujo a cero se registró como la oclusión total del vaso.

b) Trombosis inducida por FeCl₃ en hámsteres hiperlipidémicos (Fig. 7b):

- 65
- 1) El tratamiento con una dieta rica en grasas redujo el tiempo hasta la oclusión de la arteria carótida, de modo que se mostró la incidencia de un estado pro-trombótico durante la hiperlipidemia en hámsteres.

2) Los fármacos antitrombóticos estándar aspirina y clopidogrel prolongaron significativamente el tiempo hasta la oclusión (TTO) en hámsteres.

5 3) El compuesto 6 aumentó significativamente el tiempo hasta la oclusión en hámsteres, de modo que se confirma su eficacia antitrombótica sustancial en un modelo de enfermedad, mientras que el compuesto 1 y el compuesto 7 se mantuvo ineficaz y, por lo tanto, no mostró ninguna característica antitrombótica en el mismo.

Se pudo deducir el hecho de que los compuestos 1 y 7 eran ineficaces, mientras que el compuesto 6 prolongó significativamente el tiempo hasta la oclusión y, por tanto, es mejor que los dos.

10 Modelo de derivación arterio-venosa en hámsteres hiperlipidémicos (Fig. 6b):

1) El tratamiento con una dieta rica en grasas aumentó significativamente el peso del trombo, mostrando de este modo un estado protrombótico inducido por una dieta hiperlipidémica que imita al estado clínico.

15 2) Los fármacos antitrombóticos estándar aspirina y clopidogrel redujeron significativamente el peso del trombo formado.

20 3) El compuesto 6 aumentó significativamente el peso del trombo, incluso a una dosis muy baja (10µM/kg) y fue casi equivalente a los de los fármacos estándar.

4) Se pudo deducir como que el compuesto 6 reducía significativamente el peso del trombo incluso a 10 µM/kg y es mejor.

25 Datos de farmacocinética (Fig. 10)

Se generaron parámetros farmacocinéticos in vivo en conejos macho NZ a una dosis de 20 mg/kg por vía de administración oral. Las muestras de sangre se extrajeron 0,25 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas después de la dosis, se procesaron y analizaron mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM). La concentración plasmática a diferentes puntos de tiempo se representó para dar el perfil de concentración plasmática-tiempo y los datos se ajustaron de forma no compartimental usando software Win Nonlin, versión 5.1, y las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron con valores medios de SD. La concentración plasmática máxima (C_{máx}), el tiempo hasta alcanzar la concentración plasmática máxima (t_{máx}), el área bajo la curva (AUC) y el tiempo medio de residencia (TMR) del compuesto 1, el compuesto 6 y el compuesto 7 se dan en la Tabla 1.

Tabla 1: representa las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos de 6 y 7 en conejos NZ machos en una dosis de 20 mg/kg de peso corporal.

Parámetros farmacocinéticos	Compuesto 1(a) Mezcla 1:1 de 6 y 7	Compuesto 6	Compuesto 7
C _{máx} (ng/ml)	947,02 ± 237,4	149,49 ± 53,12	112,40 ± 10,25
T _{máx} (h)	0,68 ± 0,29	0,75 ± 0,144	8,67 ± 0,66
AUC (ng.h/ml)	6524,15 ± 1502,7	874,8 ± 232,01	1112,81 ± 169,77
TMR (h)	16,20 ± 1,46	5,25 ± 1,75	16,20 ± 1,46

40 Resumen de los ensayos biológicos

Tabla 2: Resumen de los ensayos biológicos

Sistemas del ensayo	Mezcla 1:1 de 6 y 7	Compuesto 6	Compuesto 7	Conclusión
Trombosis inducida por colágeno-epinefrina en ratones	Hasta 18 horas	> 24 horas	< 12 horas	Compuesto 6 más activo, el efecto es duradero
Tiempo de sangrado en ratones	2 veces	1,5 veces	1,5 veces	A igual eficacia, el compuesto 6 es más seguro
Modelo de derivación arterio-venosa en ratas	Protector	Protector	Protector	Actividad similar
Modelo de derivación arterio-venosa en hámsteres hiperlipidémicos		Protector incluso a 10 µM		El compuesto 6 es mejor
Trombosis inducida por cloruro férrico	No protector	Protector		El compuesto 6 es mejor
Trombosis inducida por cloruro férrico en hámsteres hiperlipidémicos	No protector	Protector	No protector	El compuesto 6 es mejor

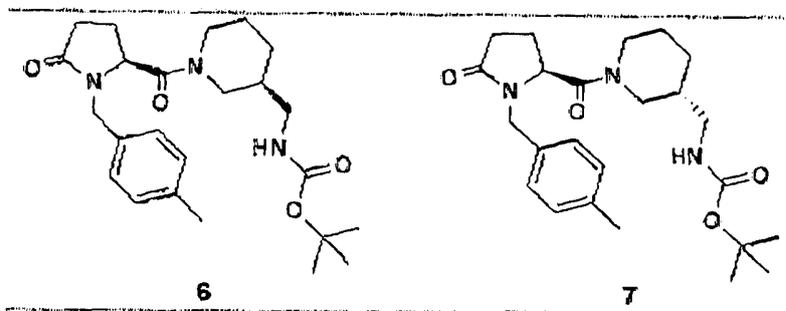
Sistemas del ensayo	Mezcla 1:1 de 6 y 7	Compuesto 6	Compuesto 7	Conclusión
Estudios de agregación plaquetaria inducida por colágeno (humano) CI50	~ 10 μ M	~ 10 μ M	> 10 μ M	El compuesto 6 es mejor que el compuesto 7
Estudios de agregación plaquetaria inducida por TRAP (humano) CI50	> 100 μ M	> 500 μ M	> 500 μ M	Ambos compuestos, 6 y 7, son más específicos que la mezcla
Adhesión plaquetaria	Eficaz (100 μ M)	Eficaz (30 y 100 μ M)	Eficaz (100 μ M)	El compuesto 6 es mejor
Agregación de sangre entera en hámsteres hiperlipidémicos	Eficaz	Eficaz	Sin efectos	El compuesto 6 es mejor que el compuesto 7
Adhesión plaquetaria en hámsteres hiperlipidémicos	Eficaz	Eficaz	Sin efectos	El compuesto 6 es mejor que el compuesto 7

Ventajas:

- 5 1. Los compuestos de la presente invención actúan como inhibidores de la activación plaquetaria y la adhesión plaquetarias inducidas por colágeno
- 10 2. La otra ventaja es evitar cualquier racemización en el centro α -carboxílico, durante la N-alquilación, se reivindica que el reactivo LiHMDS a bajas temperaturas proporciona N-p-metil-fenilmetilpiroglutamato de metilo con una pureza quiral buena
3. Otra ventaja es evitar cualquier racemización en el centro α -carboxílico
4. Los compuestos de la presente invención mostraron una absorción rápida con valores de $C_{m\acute{a}x}$ eficaces
- 15 5. Los compuestos de la presente invención mostraron niveles óptimos de solubilidad
6. Los compuestos de la presente invención mostraron niveles plasmáticos bajos
7. Los compuestos de la presente invención mostraron acumulación periférica baja
- 20 8. Los compuestos de la presente invención mostraron niveles bajos de toxicidad

REIVINDICACIONES

1. Compuestos diastereoméricos puros de fórmulas 6 y 7 que tienen la fórmula general 1-(4-metilfenilmetil)-5-oxo-{N-[(3-t-butoxicarbonil-aminometil)]-piperidin-1-il}-pirrolidín-2-carboxamidas.



2. Los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los compuestos son útiles para la prevención de la trombosis, la adhesión y la agregación plaquetaria.

3. Los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que se usan los compuestos de las fórmulas 6 y 7, de forma individual o mezclados, para la prevención de la trombosis, la adhesión y agregación plaquetarias y útiles en diversas patologías cardiovasculares como compuesto antiagregante plaquetario.

4. Los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los compuestos son útiles para el tratamiento del síndrome coronario (SCA), tal como infarto de miocardio (IM) con elevación del segmento ST, IM sin elevación del segmento ST, angina inestable, accidente cerebrovascular trombótico y, en pacientes de angioplastia, para prevenir la activación y adhesión plaquetarias.

5. Los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el compuesto de fórmula 6 es más activo con efecto de larga duración cuando se compara con los fármacos estándar aspirina y clopidogrel, así como los compuestos 1 y 7 en la tromboembolia pulmonar inducida por colágeno-epinefrina en ratones, en los que el compuesto 1 es una mezcla diastereomérica de los compuestos 6 y 7 en una relación de 1: 1.

6. Los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los compuestos 1, 6 y 7 (30 $\mu\text{M}/\text{kg}$, 1 h de dosificación por vía oral) mostraron una prolongación del tiempo de sangrado, que fue significativamente menor en comparación con los fármacos antiagregantes plaquetarios estándar, aspirina y clopidogrel y en los que el compuesto 1 es una mezcla diastereomérica de los compuestos 6 y 7 en una relación de 1:1.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los compuestos 1, 6 y 7 son activos frente a la agregación inducida por colágeno *in vitro* en plasma humano rico en plaquetas, mientras que no tienen ningún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP y los compuestos 6 y 7 son más específicos que el compuesto 1, que muestra una eficacia moderada contra la agregación plaquetaria inducida por el mimético de la trombina, SFLLRN (TRAP), en el que el compuesto 1 es una mezcla diastereomérica de los compuestos 6 y 7 en una relación de 1:1.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 es mejor que el compuesto 7 en la atenuación de la agregación plaquetaria estimulada por colágeno en hámsteres hiperlipidémicos.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 muestra reducción dependiente de la dosis en la adhesión plaquetaria sobre la matriz de colágeno y comparativamente mejor que la aspirina.

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 es mejor que el compuesto 7 en la inhibición de la adhesión plaquetaria sobre superficie recubierta por colágeno en el ensayo de adhesión plaquetaria mediada por $\alpha 2\beta 1$ y GPVI en colágeno (ser humano, *in vitro*).

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 presenta una atenuación significativa de la adhesión plaquetaria sobre la superficie de colágeno, en contraste con el compuesto 7, que no muestra ningún efecto sobre la misma.

12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los compuestos 1 y 7 atenuaron de forma no específica la actividad amidolítica de la trombina, mientras que el compuesto 6 no mostró nada de dicha propiedad inhibidora de la trombina no específica, en el que el compuesto 1 es una mezcla diastereomérica de los compuestos 6 y 7 en una relación de 1:1.

13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 reduce significativamente el peso del trombo incluso a 10 $\mu\text{M/kg}$.

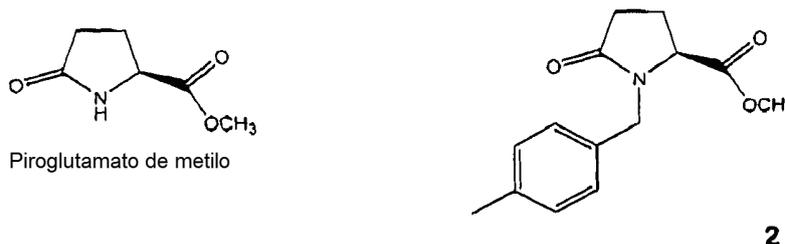
5 14. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 prolongó significativamente el tiempo hasta la oclusión de la arteria carótida en ratas, mostrando de este modo su notable potencial antitrombótico, mientras que el compuesto 1 no pudo mostrar ningún tipo de protección a la misma dosis, en el que el compuesto 1 es una mezcla diastereomérica de los compuestos 6 y 7 en una relación de 1:1.

10 15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 aumentó significativamente el tiempo hasta la oclusión en hámsteres, confirmando de este modo su eficacia antitrombótica sustancial en un modelo de enfermedad, mientras que el compuesto 1 y el compuesto 7 permanecieron ineficaces y, por lo tanto, no mostraron característica antitrombótica en el mismo, en el que el compuesto 1 es una mezcla diastereomérica de los compuestos 6 y 7 en una relación de 1:1.

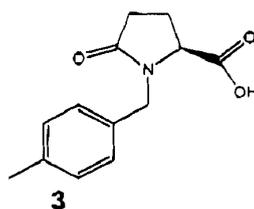
15 16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto 6 muestra una absorción más rápida y exposición sistémica prolongada durante más de 24 h $\{C_{\text{máx}} (149,49 \pm 53,12), t_{\text{máx}} 0,75 \pm 0,144 \text{ h}\}$ y mayor solubilidad en agua $(416,41 \pm 62,35 \mu\text{g/ml})$ en comparación con el compuesto 7 $\{C_{\text{máx}} (112,81 \pm 169,77), t_{\text{máx}} 8,67 \pm 0,66\}$ y solubilidad en agua $(71,75 \pm 13,45 \mu\text{g/ml})$; en el que el compuesto 1 muestra comparativamente una absorción rápida que conduce a una $C_{\text{máx}}$ de $947,02 \pm 237,4 \text{ ng/ml}$, en el que el compuesto 1 es una mezcla diastereomérica de los compuestos 6 y 7 en una relación de 1:1.

20 17. Un proceso para la preparación del compuesto 6 y del compuesto 7, en el que las etapas del proceso comprenden:

25 a) hacer reaccionar piroglutamato de metilo con bencil bromuro de p-metilo en un disolvente aprótico en presencia de LiHMDS a una temperatura que varía entre 0 a 35 $^{\circ}\text{C}$ durante un periodo que varía entre 1 a 4 h, inactivar la mezcla de reacción con HCl y obtener el compuesto de fórmula 2,



30 b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula 2 con carbonato sódico a una temperatura que varía entre 0 $^{\circ}\text{C}$ a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante un periodo que varía entre 0,5 a 4 h para obtener ácido 2S)-N-(p-metilfenilmetil)piroglutámico de fórmula 3

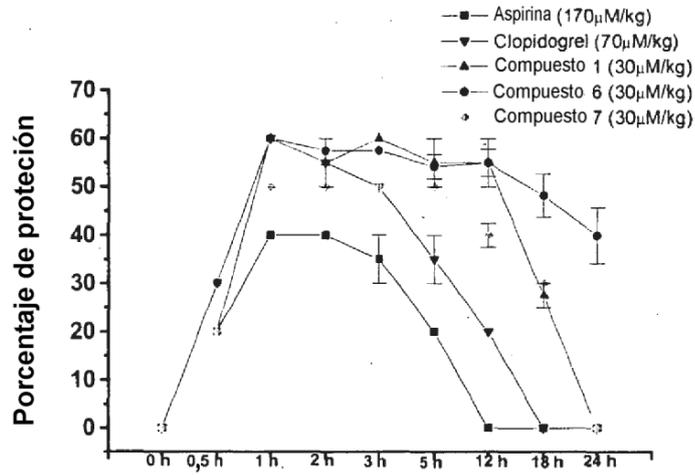


35 c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula 3 con el compuesto de fórmula 4 [(3R)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina] o 5 [(3S)-N-(t-butoxicarbonil)-3-aminometil-piperidina] en un disolvente aprótico seleccionado de un grupo que consiste en diclorometano, tetrahydrofurano, dioxano en presencia de un reactivo de acoplamiento seleccionado del grupo que consiste en diciclohexilcarbodiimida, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, o un agente de activación 1-hidroxi benzotriazol o cloroformiato de isobutilo a una temperatura que varía entre -20 $^{\circ}\text{C}$ a + 30 $^{\circ}\text{C}$ durante un periodo que varía de 1 a 3 h seguido de purificación usando cromatografía para producir el compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.

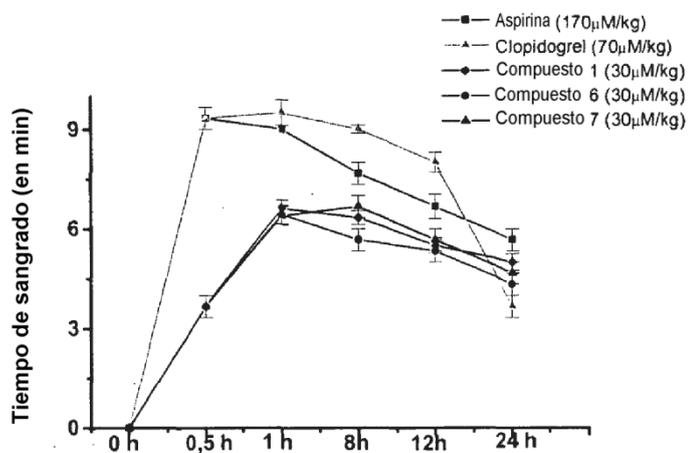
40 18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con cloruro de oxalilo a 0 $^{\circ}\text{C}$ para obtener el cloruro de ácido seguido de reacción con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de trietilamina en diclorometano para obtener el compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.

45 19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de un reactivo de acoplamiento diciclohexilcarbodiimida y 1-hidroxi benzotriazol en diclorometano a una temperatura que varía entre -5 $^{\circ}\text{C}$ a 0 $^{\circ}\text{C}$ durante un periodo que varía entre 2 h a 3 h para obtener el compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.

- 5 20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de diisopropil etilamina, y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-trispirrolidino-fosfonio, en diclorometano a una temperatura que varía entre -5 °C a 0 °C durante un periodo que varía entre 2 h a 3 h seguido de agitación a una temperatura que varía entre 0 °C a 25 °C para obtener el compuesto de fórmula 6 o 7 respectivamente.
- 10 21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el compuesto de fórmula 3 se hace reaccionar con el compuesto de fórmula 4 o 5 en presencia de trietil amina, y cloroformiato de isobutilo, en THF a -20 °C, durante un periodo que varía entre 1 h a 2 h seguido de agitación a una temperatura que varía entre 0 a 25 °C para obtener el compuesto de fórmula 6 o 7.
- 15 22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la purificación del compuesto 6 y 7 se realiza por cristalización usando los disolventes seleccionados de un grupo que consiste en pentano, hexano, ciclohexano, tolueno, acetato de etilo.
- 20 23. Una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad cardiovascular que comprende el compuesto de fórmula 6 o 7 con aditivos y excipientes farmacéuticamente aceptables.
24. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23, en la que los aditivos farmacéuticamente aceptables se seleccionan de un grupo que consiste en DMSO, goma arábica o CMC, beta ciclodextrina, o cualquier otro excipiente farmacéuticamente aceptable.

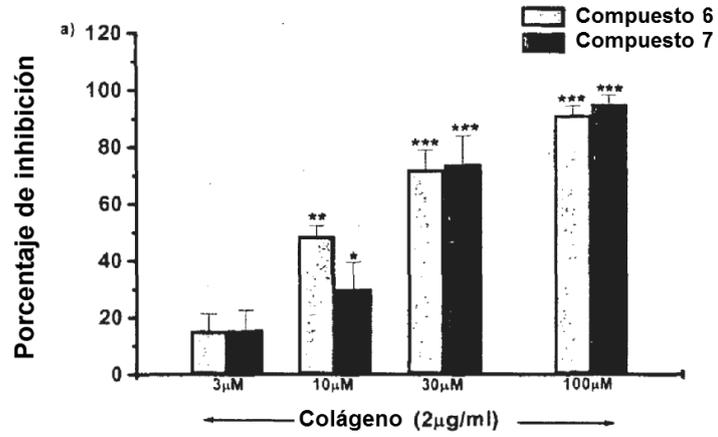


Tiempo (h)	Aspirina (170 μ M/kg)	Clopidogrel (70 μ M/kg)	Compuesto 1 (30 μ M/kg)	Compuesto 6 (30 μ M/kg)	Compuesto 7 (30 μ M/kg)
PORCENTAJE DE PROTECCIÓN					
0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
0,5	20 \pm 0	30 \pm 0	20 \pm 0	30 \pm 0	20 \pm 0
1	40 \pm 0	60 \pm 0	60 \pm 0	60 \pm 0	50 \pm 0
2	40 \pm 0	55 \pm 5	55 \pm 5	57,5 \pm 0	50 \pm 0
3	35 \pm 5	50 \pm 0	60 \pm 0	57,5 \pm 0	50 \pm 0
5	20 \pm 0	35 \pm 5	55 \pm 5	54,2 \pm 2,5	50 \pm 0
12	0 \pm 0	20 \pm 0	55 \pm 5	55 \pm 2,8	40 \pm 2,5
18	0 \pm 0	0 \pm 0	27,5 \pm 2,5	48,2 \pm 4,46	30 \pm 0
24	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	40 \pm 5,8	0 \pm 0



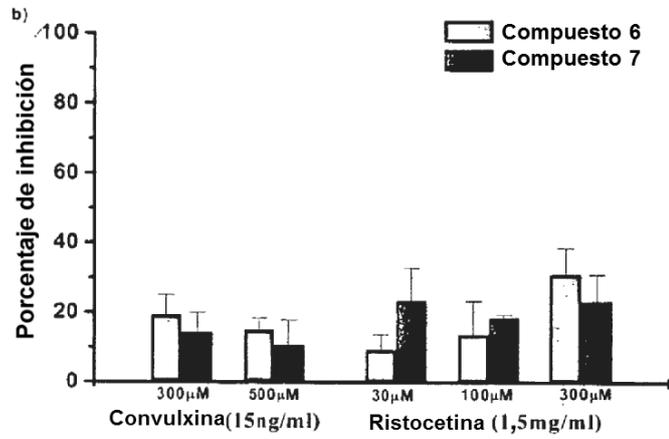
Tiempo (h)	Aspirina (170µM/kg)	Clopidogrel (70µM/kg)	Compuesto 1 (30µM/kg)	Compuesto 6 (30µM/kg)	Compuesto 7 (30µM/kg)
TIEMPO DE SANGRADO (en minutos)					
0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,5	9,3±0,3	9,3±0,3	3,67±0,3	3,67±0,3	3,67±0,3
1	9±0	9,5±0,4	6,62±0,24	6,43±0,3	6,4±0,28
8	7,67±0,3	9±0,12	6,3±0,21	5,67±0,3	6,67±0,3
12	6,67±0,3	8±0,3	5,5±0,22	5,3±0,3	5,67±0,3
24	5,67±0,3	3,67±0,3	5±0,26	4,3±0,3	4,67±0,3

Fig 2



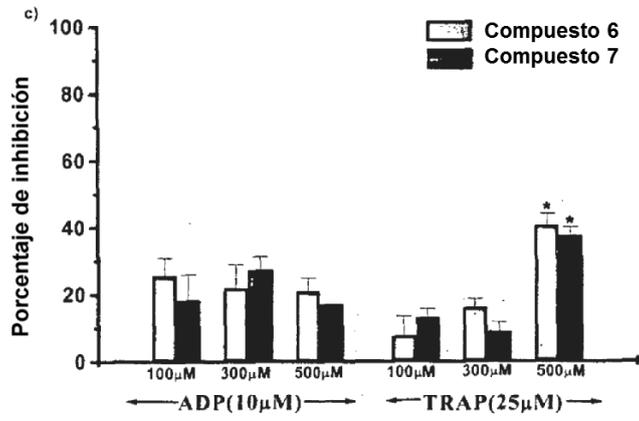
Agregación plaquetaria inducida por colágeno		
Conc. (µM)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
	Compuesto 6	Compuesto 7
3	15,44±6,1	15,5±7,14
10	48,83±3,76	30,1±9,5
30	72,2±6,7	73,9±9,9
100	91,2±3,13	95±3,2

Fig 3a(i)



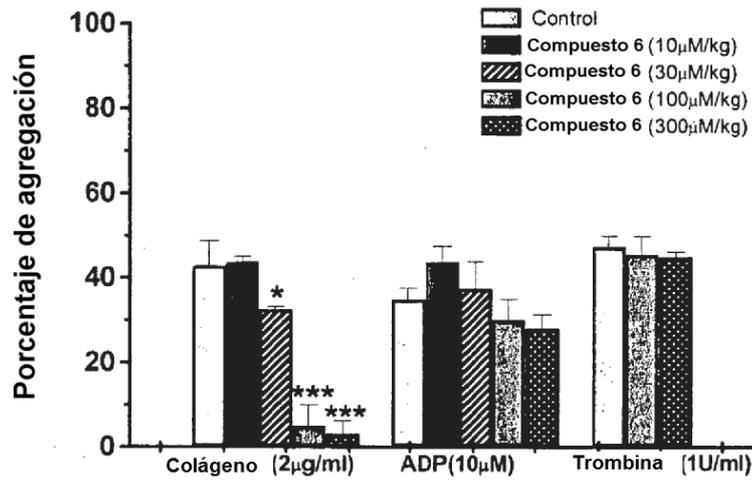
Agregación plaquetaria inducida por convulxina		
Conc. (µM)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
	Compuesto 6	Compuesto 7
300	19,17±5,83	14,15±5,85
500	15,005±3,33	10,56±7,22
Agregación plaquetaria inducida por ristocetina		
Conc. (µM)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
	Compuesto 6	Compuesto 7
30	9,3±4,4	23,28±9,58
100	13,7±9,58	18,5±0,96
300	30,96±7,67	23,3±7,67

Fig 3 a (ii)



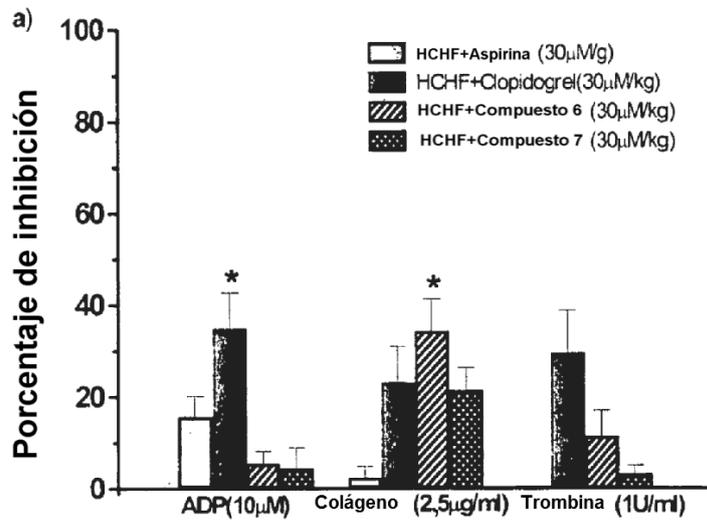
Agregación plaquetaria inducida por ADP		
Conc. (μM)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
	Compuesto 6	Compuesto 7
100	25,67±5.36449	18,333±7,7
300	22±7	27,3±4
500	21±4	17±0
Agregación plaquetaria inducida por TRAP		
Conc. (μM)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
	Compuesto 6	Compuesto 7
100	7,65±5,93205	13,15±2,65283
300	16,15±2,6056	8,85±2,90215
500	40,525±3,55583	37,575±2,58791

Fig 3a(iii)



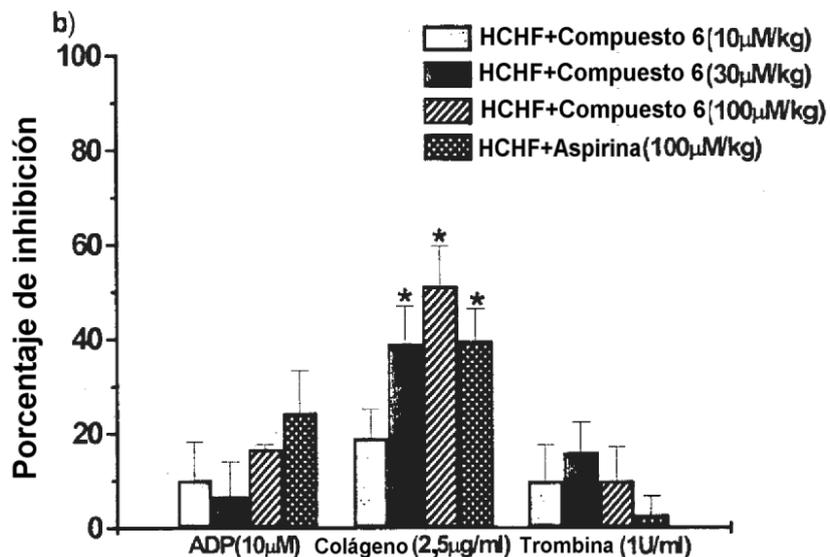
Dosis del compuesto 6 (μM/kg)	Colágeno	ADP	Trombina
	PORCENTAJE DE AGREGACIÓN		
0	42,91±5,8	35±2,6	47,5±2,5
10	43,75±1,25	43,75±3,75	
30	32,5±0,72169	37,5±6,25	
100	5±1,5	30±5	45,625±4,375
300	3,125±0,76	28,125±3,125	45±1,25

Fig 3b



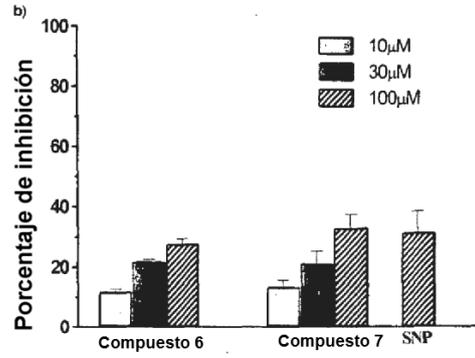
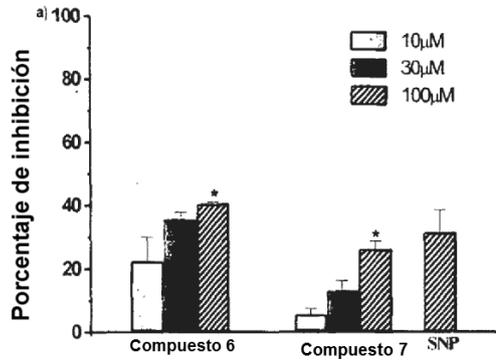
	ADP	Colágeno	Trombina
	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN		
HCHF+Aspirina	15,74 \pm 2.4	2,4 \pm 2	0,33 \pm 0,2
HCHF+CLOPIDOGREL	35 \pm 7,6	23,1 \pm 7,8	29,63 \pm 9,2
HCHF+Compuesto 6	5,6 \pm 2,7	34,4 \pm 6,9	11,4 \pm 5,6
HCHF+Compuesto 7	4,4 \pm 4,4	21,5 \pm 4,9	3,14 \pm 1,8

Fig 3 c(i)



	ADP	Colágeno	Trombina
	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN		
HCHF+Compuesto 6 (10µM/kg)	10,2±8,0	19±6,1	10±7,5
HCHF+Compuesto 6 (30µM/kg)	6,8±7,2	39,0±8	16,0±6,3
HCHF+Compuesto 6 (100µM/kg)	16,8±0,8	51,2±8,4	10,0±7,0
HCHF+Aspirina (100µM/kg)	24,5± 8,8	39,6± 7	4±2,8

Fig 3c(ii)

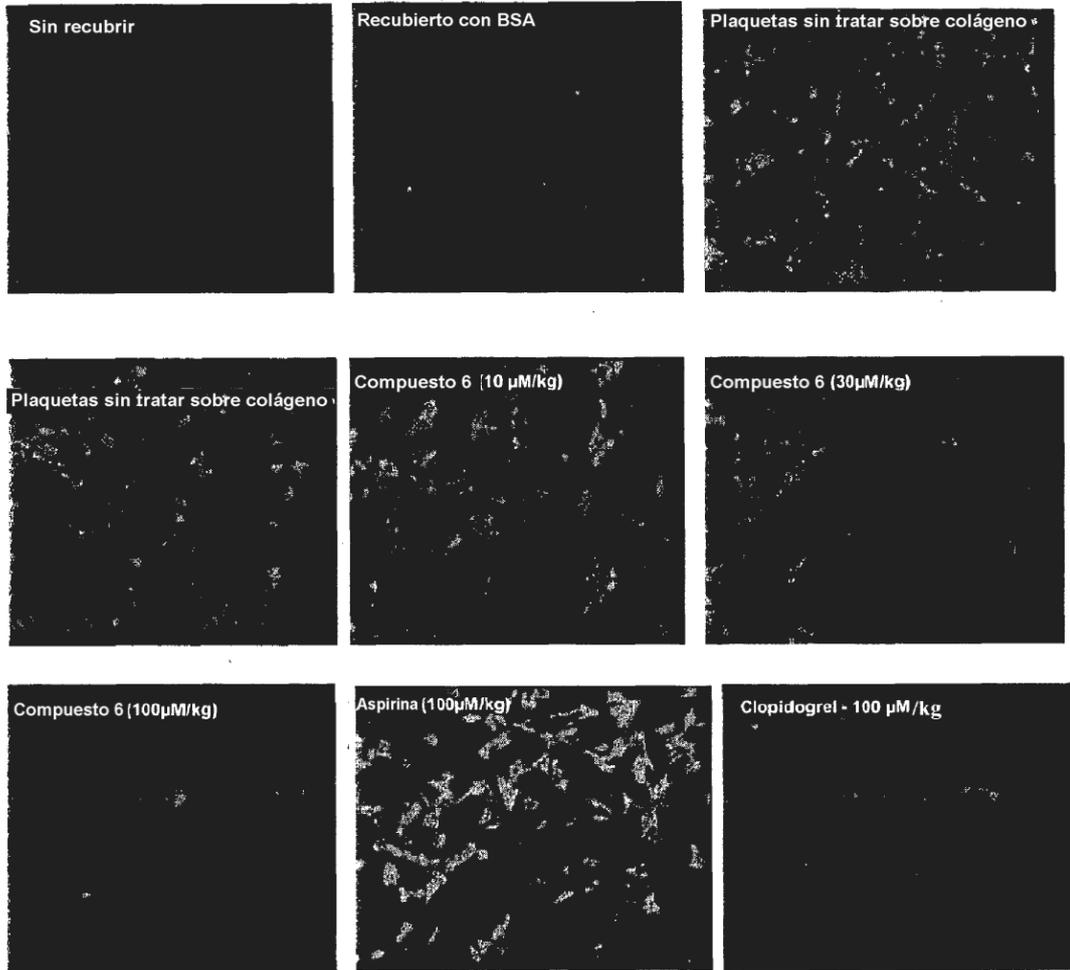


Conc (μ M/kg g)	Compuesto 6	Compuesto 7	SNP (30 μ M)
	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN EN LA ADHESIÓN PLAQUETARIA (%)		
10 μ M	22,55 \pm 7,5 5	5,63 \pm 1,83	31,5 \pm 7
30 μ M	35,73 \pm 2,0 3	13,2 \pm 3	
100 μ M	40,5 \pm 0,53	26,26 \pm 2,4	

Conc (μ M/kg)	Compuesto 6	Compuesto 7	SNP (30 μ M)
	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN EN LA ADHESIÓN PLAQUETARIA (%)		
10 μ M	12,1 \pm 0,7	13,6 \pm 2,2	31,5 \pm 7
30 μ M	22,017 \pm 0, 6	21,34 \pm 4,0	
100 μ M	27,8 \pm 1,7	33,02 \pm 4,5	

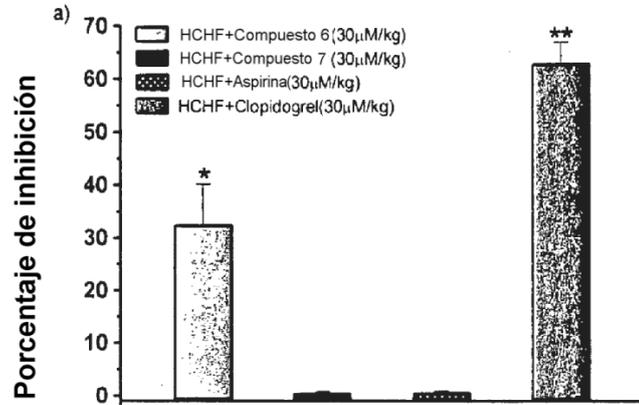
Fig 4a(i)

Fig 4a(ii)



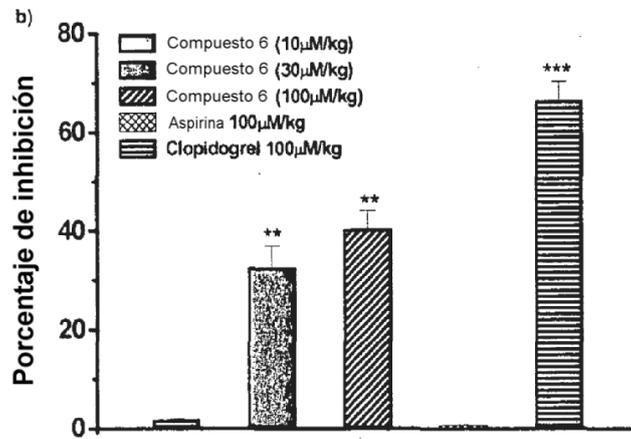
Conc. (μ M)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN EN LA ADHESIÓN PLAQUETARIA (%)		
	Compuesto 6	Aspirina	Clopidogrel
10	10,44 ± 6,127		
30	33,81 ± 3,54		
100	55,71 ± 3,5	2,5 ± 2	71,72 ± 5

Fig 4b



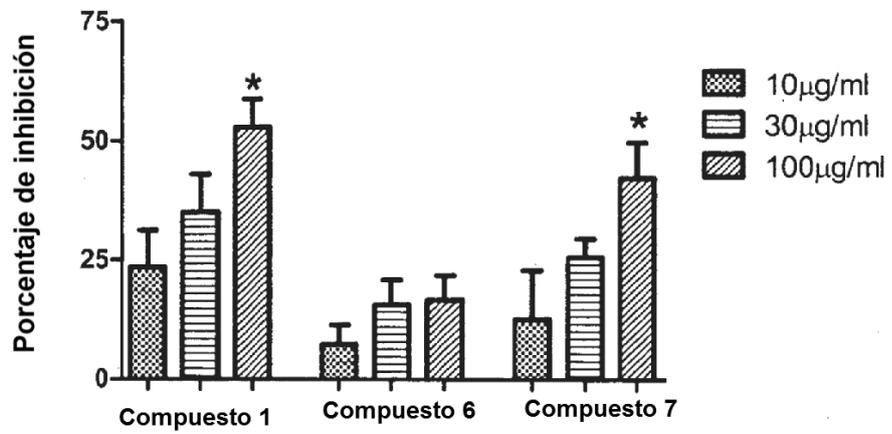
Aspirina (30µM/kg)	Clopidogrel (30µM/kg)	Compuesto 7 (30µM/kg)	Compuesto 6 (30µM/kg)
PORCENTAJE DE INHIBICIÓN EN LA ADHESIÓN PLAQUETARIA			
0,83±0,05 3	63±4	0,7±0,06	33±7,5

Fig 4c(i)



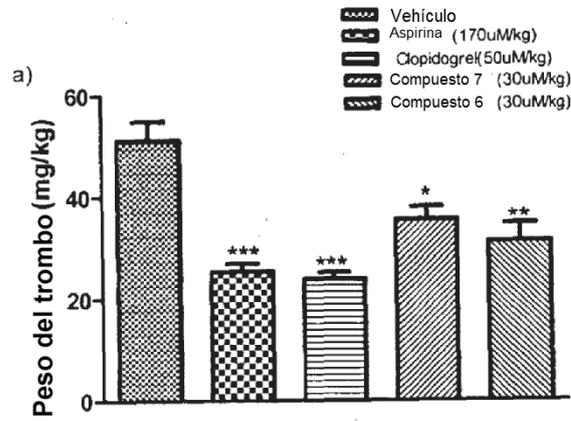
Aspirina (100µM/kg)	Compuesto 6 (10µM/kg)	Compuesto 6 (30µM/kg)	Compuesto 6 (100µM/kg)	Clopidogrel (100µM/kg)
PORCENTAJE DE INHIBICIÓN EN LA ADHESIÓN PLAQUETARIA				
0,7±0,06	1,83±0,076	32,71±4,3	40,5±3,7	66,4±3,86

Fig 4c(ii)



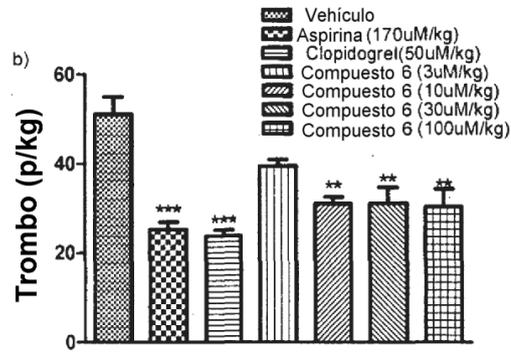
Concentración	Compuesto 1	Compuesto 6	Compuesto 7
	Porcentaje de inhibición		
100µM	23,5±7,8	7,3± 4,0	12,7± 10,3
300µM	35,1±8	15,7± 5,2	25,7± 4
1mM	53±6	16,7± 5,2	42,3± 7,5

Fig 5



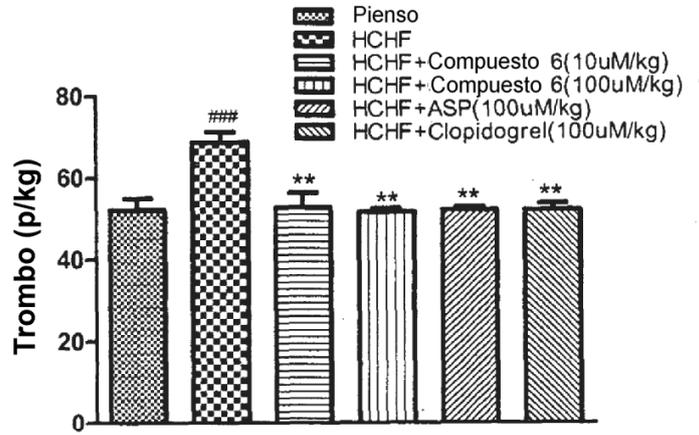
V	Aspirina (170µM/kg)	Clopidogrel (50µM/kg)	Compuesto 7 (30µM/kg)	Compuesto 6 (30µM/kg)
PESO DEL TROMBO (mg/kg)				
51,21 ±3,799	25,37 ±1,647	23,87± 1,342	35,55 ±2,493	31,21± 3,602

Fig 6a(i)



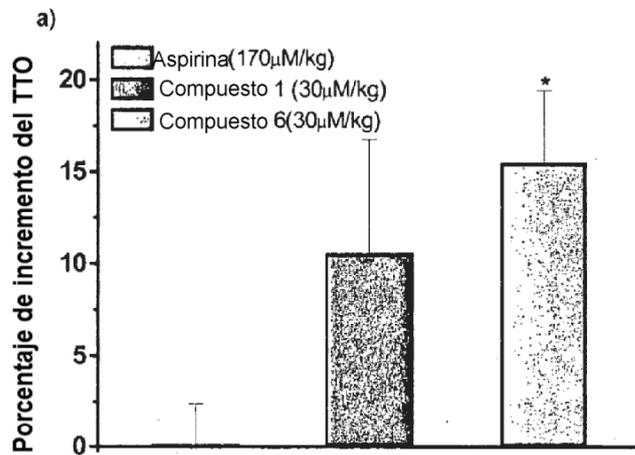
Vehículo	Aspirina (170 μ M/kg)	Clopidogrel (50 μ M/kg)	Compuesto 6 (3 μ M/kg)	Compuesto 6 (10 μ M/kg)	Compuesto 6 (30 μ M/kg)	Compuesto 6 (100 μ M/kg)
PESO DEL TROMBO (mg/kg)						
51,21 \pm 3, 8	25,37 \pm 1,6	23,87 \pm 1,3	39,51 \pm 1,5	31,19 \pm 1,5	31,21 \pm 3,6	30,46 \pm 3,9

Fig 6a(ii)



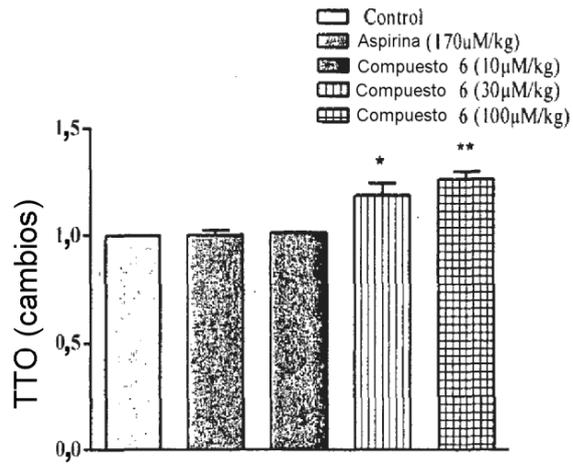
Pienso	HCHF	HCHF+ Compuesto 6 (10uM/kg)	HCHF+ Compuesto 6 (100uM/kg)	HCHF+ASP (100uM/kg)	HCHF+Clopidogrel (100uM/kg)
PESO DEL TROMBO (mg/kg)					
52,14 ± 2,825	68,70 ± 2,573	52,67 ± 3,666	51,65 ± 0,8203	52,12 ± 0,7155	52,13 ± 1,550

Fig 6b



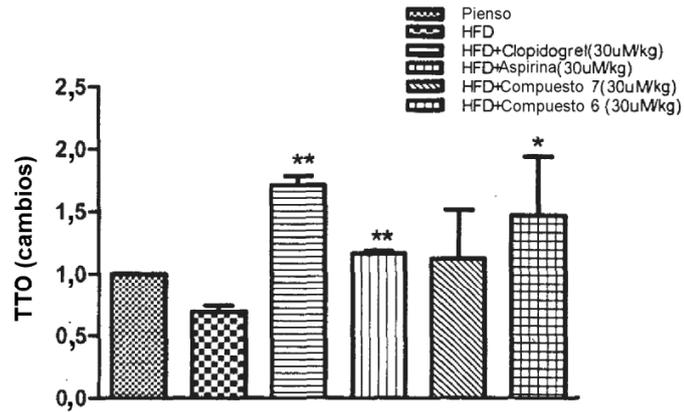
Aspirina (170 μ M/kg)	Compuesto 1 (30 μ M/kg)	Compuesto 6 (30 μ M/kg)
Porcentaje de incremento del tiempo hasta la oclusión (TTO)		
0,12 ± 2,3	10,6 ± 6,2	15,5 ± 4

Fig 7a (i)



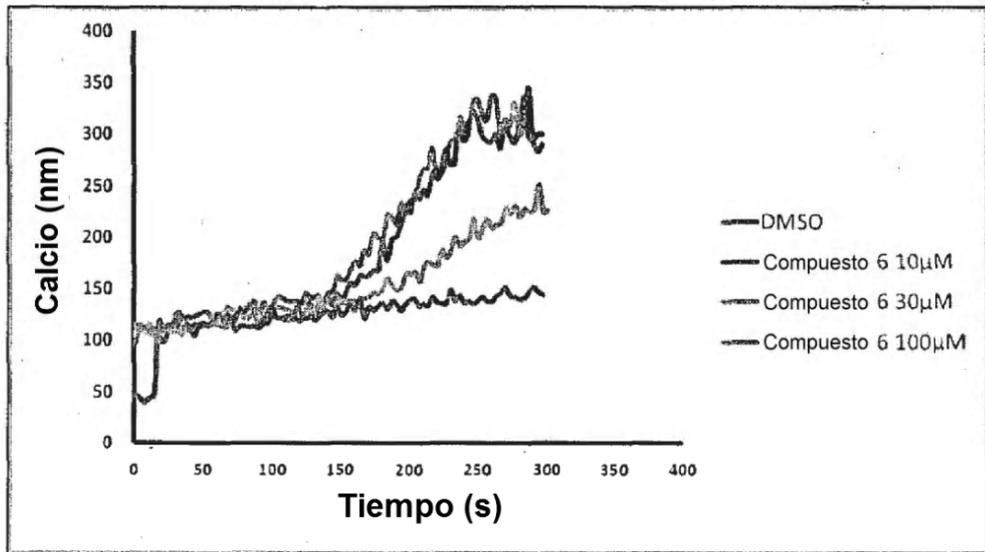
Control	Aspirina (170µM/kg)	Compuesto 6 (10µM/kg)	Compuesto 6 (30µM/kg)	Compuesto 6 (100µM/kg)
Porcentaje de incremento del tiempo hasta la oclusión (TTO)				
1,00±0	1,004±0,02	1,015±0,003	1,2±0,06	1,3±0,035

Fig 7a(ii)



Pienso	HFD	HFD+Clopidogrel (30uM/kg)	HFD+Aspirina (30uM/kg)	HFD+Compuesto 7 (30uM/kg)	HFD+Compuesto 6 (30uM/kg)
Porcentaje de incremento del tiempo hasta la oclusión (TTO)					
1,0± 0,0	0,7± 0,05	1,7±0,07	1,2± 0,02	1,1± 0,4	1,5± 0,5

Fig 7b



Tiempo (s)	DMSO (vehículo)	Compuesto 6 (10µM)	Compuesto 6 (30µM)	Compuesto 6 (100µM)
	Calcio (nm)			
300° s	345	298,4	226	144

Fig 8

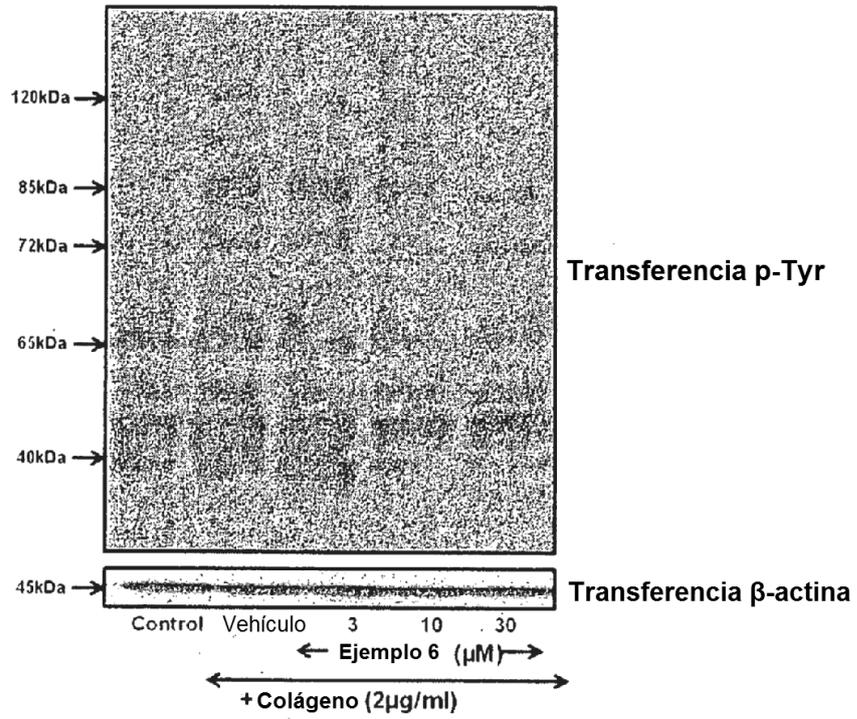
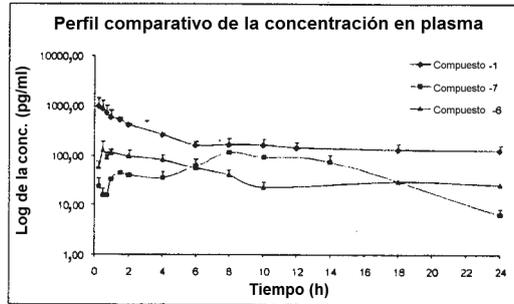


Fig 9

**Perfil del tiempo concentración
en plasma de los compuestos 1, 6 y 7**



2

Fig 10