

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 727**

51 Int. Cl.:

C07D 471/02 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2013** **PCT/US2013/033289**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13148460**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2013** **E 13767859 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2831072**

54 Título: **Nuevos antagonistas de receptores de esfingosina-1-fosfato**

30 Prioridad:

26.03.2012 US 201261615454 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.07.2017

73 Titular/es:

ARROYO BIOSCIENCES L.L.C. (100.0%)
1812 Pelling Court
Silver Spring, MD 20905, US

72 Inventor/es:

SWENSON ROLF E.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 625 727 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

Nuevos antagonistas de receptores de esfingosina-1-fosfato

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a receptores de esfingosina-1-fosfato (S1P) y compuestos usados en el tratamiento y la prevención de afecciones asociadas con dichos receptores. Más concretamente, la presente invención se refiere a la síntesis y al ensayo biológico de nuevos derivados de JTE013, un conocido antagonista del receptor de
 10 esfingosina-1-fosfato 2 (S1P₂). Los antagonistas de S1P₂ se pueden usar en el cáncer, en la aterosclerosis, en la retinopatía diabética y en otras enfermedades inflamatorias. Entre estas enfermedades inflamatorias que se podrían tratar con un antagonista de S1P₂ se encuentran aquellas caracterizadas por fibrosis, incluyendo la enfermedad pulmonar crónica, la enfermedad renal y hepática crónica, la cardiopatía crónica y las enfermedades de la piel tales como esclerosis/esclerodermia. Los antagonistas de S1P₂ también se pueden usar en el tratamiento del
 15 glioblastoma multiforme (cáncer cerebral), el neuroblastoma pediátrico y otros cánceres.

Antecedentes de la invención

Los antagonistas de los receptores son compuestos químicos que actúan como ligandos de receptores celulares que
 20 no provocan una respuesta biológica al unirse a un receptor, pero que bloquean o amortiguan las respuestas mediadas por los agonistas. En farmacología, los antagonistas tienen afinidad por sus receptores afines, pero no tienen eficacia, y la unión a los mismos interrumpirá la interacción e inhibirá la función de un agonista o un agonista inverso en el sitio receptor. Los antagonistas median sus efectos uniéndose al sitio activo o a los sitios alostéricos de
 25 receptores, o pueden interactuar en sitios de unión únicos que normalmente no intervienen en la regulación biológica de la actividad del receptor celular. La actividad antagonista puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la longevidad del complejo de antagonista-receptor que, a su vez, depende de la naturaleza de la unión del receptor al antagonista. La mayoría de los antagonistas de fármacos obtienen su potencia compitiendo con ligandos o sustratos endógenos en sitios de unión estructuralmente definidos en receptores. La angiogénesis interviene directamente en
 30 una serie de afecciones patológicas tales como el crecimiento tumoral, la inflamación y la retinopatía diabética. Las metodologías actuales para el tratamiento de la angiogénesis anómala en el ojo incluyen la terapia con láser, que destruye parte del tejido retiniano con el fin de conservar cierta visión, y la administración de anticuerpo anti-VEGF y/o aptómero de ARN anti-VEGF. Sigue existiendo una clara necesidad de métodos y agentes mejorados para la prevención y el tratamiento de afecciones que implican una angiogénesis anómala y angiogénesis patológica perjudicial en los tejidos del ojo. La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un mediador lipídico que regula diversos procesos
 35 biológicos tales como la proliferación, la migración, la supervivencia y la diferenciación celular. La S1P, que se genera mediante la fosforilación de la esfingosina por parte de la esfingosina cinasa 1 (Sphk1) y la esfingosina cinasa 2 (Sphk2), es degradada por fosfatases específicas de S1P y una liasa. Es un ligando con alta afinidad por cinco (5) receptores de S1P acoplados a proteína G en la superficie celular, S1P_{1R}, S1P_{2R}, S1P_{2R}, S1P_{4R} y S1P_{5R}, que regulan distintas vías de señalización intracelular. Los receptores S1P₁, S1P₂ y S1P₃ se expresan ampliamente,
 40 mientras que la expresión de S1P₄ y S1P₅ es destacada en las células de los sistemas inmunológico y nervioso, respectivamente. El receptor S1P₁ se acopla exclusivamente a la vía de señalización de G_i, mientras que los receptores S1P₂ y S1P₃ se acoplan a G_i, así como a las vías Gq y G_{12/13}. Sin embargo, S1P₂ activa G_{12/13} potentemente, mientras que S1P₃ activa preferentemente a Gq.

45 FTY720 es un potente inmunomodulador que tiene un mecanismo de acción que incluye la fosforilación hasta dar FTY720-P, que es un agonista para cuatro de los cinco receptores de S1P en los linfocitos T. Previamente, se demostró que FTY720 es un potente modulador del tráfico de linfocitos, sin embargo, el efecto de FTY720 en los elementos vasculares se desconocía previamente.

50 Se ha demostrado que las células endoteliales vasculares contienen sistemas enzimáticos que "activan" FTY720 y sus análogos. Se aceptan células endoteliales cultivadas tales como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en los sistemas de modelos *in vitro* para estudiar la angiogénesis. Tras la incubación con medio acondicionado o extractos celulares de HUVEC, FTY720 está fosforilado y es capaz de activar las células endoteliales para que migren de una manera sensible a la toxina pertussis, lo que sugiere que está activando los
 55 receptores de S1P acoplados a G_i. En el presente documento se muestra que la esfingosina cinasa-2 (SK2) derivada de las células endoteliales participa en la activación de FTY720 hasta dar FTY720-P.

Los receptores de S1P también regulan importantes funciones fisiológicas del sistema vascular, tales como la
 60 morfogénesis y la maduración vascular, la función cardíaca, la permeabilidad vascular y la angiogénesis tumoral. De hecho, los embriones con anulación de S1P₁ mueren debido a una hemorragia masiva en E de 12,5 a 14,5 días de gestación, ya que el receptor S1P₁ es esencial para la estabilización apropiada del sistema vascular embrionario potenciando la formación de fuertes uniones basadas en N-cadherina entre las células endoteliales y del músculo liso vascular. Sin embargo, los ratones que carecen del receptor S1P₂ o S1P₃ son viables y fértiles.

65 Curiosamente, los embriones con anulación doble de S1P₁/S1P₂ mostraron un fenotipo más grave que los embriones con la sola anulación de S1P₁, lo que sugiere que el receptor S1P₂ también es significativo durante el

desarrollo vascular embrionario. Además, los ratones con anulación de S1P₂ son profundamente sordos debido a anomalías vasculares en la estría vascular del oído interno y a la degeneración de las células ciliadas sensoriales del órgano de Corti. Por otra parte, una mutación en el gen del pez cebra *miles-apart* (Mil), un análogo de S1P₂, produce defectos en el desarrollo cardíaco (cardia bifida) debido a la migración defectuosa de los precursores de cardiomiocitos, lo que subraya la importancia de este receptor para el desarrollo cardíaco de los peces. Sin embargo, el papel del receptor S1P₂ en el desarrollo y la patología vascular es un área de estudio activa.

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos se denomina angiogénesis. Durante la angiogénesis, las células endoteliales vasculares experimentan una proliferación ordenada, migración y morfogénesis para formar nuevas redes capilares. En condiciones normales o no patológicas, la angiogénesis se produce en condiciones bien definidas, tales como la cicatrización, la respuesta tisular y celular a la isquemia y durante el desarrollo embrionario y fetal. Sin embargo, la angiogénesis persistente o no controlada puede conducir a una variedad de estados patológicos o afecciones y, en el caso de los tumores sólidos, puede ser una condición necesaria para mantener el estado patológico.

La patente de Estados Unidos n.º 7.838.562, concedida a Hla *et. al.*, desvela y reivindica una serie de compuestos agonistas de receptor de esfingosina-1-fosfato endotelial vascular que se afirma que son útiles en el tratamiento de trastornos de permeabilidad vascular, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que comprende 2-amino-2-[2-(4-octafenil)etil]propan-1,3-diol o 2-amino-2-metil-4-[4-heptoxi-fenil]butan-1-ol. El trastorno de permeabilidad vascular puede ser cualquiera asociado con la lesión endotelial, trombocitopenia, enfermedad vascular periférica isquémica, cualquiera de una serie de trastornos vasculares periféricos asociados con la diabetes, la fiebre hemorrágica del dengue, el síndrome de dificultad respiratoria aguda, el síndrome de fuga vascular o una combinación de los mismos. Los compuestos anteriormente mencionados pueden ser fosforilados por la esfingosina cinasa-2 hasta las formas fosforiladas que sirven como agonistas de los receptores de esfingosina-1-fosfato.

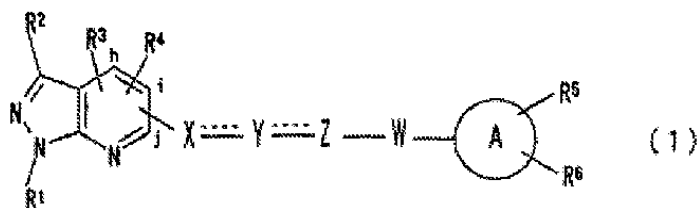
La patente de EE.UU. n.º 7.910.626, concedida a Brinkman *et. al.*, desvela compuestos para tratar la insuficiencia cardíaca crónica o congestiva que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propan-1,3-diol en forma libre o una sal o un fosfato farmacéuticamente aceptable del mismo.

La patente de EE.UU. n.º 8.114.902, concedida a Kiuchi *et. al.*, desvela y reivindica compuestos útiles en el tratamiento o en la profilaxis de enfermedades autoinmunes o rechazo agudo y crónico debido al trasplante de órganos o tejidos, enfermedad de injerto contra hospedador (GvH) debida al trasplante de médula ósea, y en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades alérgicas. Los compuestos particularmente adecuados incluyen la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, el hidrato o un solvato de 2-amino-2-[2-[2'-fluoro-4'-(4-metilfeniltio)bifenil-4-il]etil]propan-1,3-diol y 2-amino-4-[2'-fluoro-4'-(4-metilfeniltio)bifenil-4-il]-2-(fosforiloximetil)butanol.

La solicitud de patente de EE.UU. n.º 2011/0015159, también concedida a Hla *et. al.*, desvela y reivindica una serie de nuevos agonistas de receptor de esfingosina-1-fosfato endotelial vascular. Los compuestos agonistas conocidos tales como FTY720 pueden ser fosforilados por la esfingosina cinasa-2 hasta dar las formas fosforiladas que sirven como agonistas de los receptores de esfingosina-1-fosfato. Estos agonistas de receptores endoteliales vasculares pueden formularse en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos de permeabilidad vascular y la apoptosis no deseada de células endoteliales vasculares.

El documento WO 01/98301, concedido a Kawasaki *et al.*, se refiere a nuevos compuestos de pirazolopiridina que tienen actividad antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato y su uso en composiciones farmacéuticas como remedios de la fibrosis que contienen actividad antagonista del receptor de Sph-1-P o sales farmacéuticamente aceptables como principio activo. En concreto, la invención se refiere a nuevos compuestos de la fórmula:

一般式 (1)



en la que cada R¹, R² y R³ son alquilo C₁₋₈ y similares; R⁴ es hidrógeno y similares; cada R⁵ y R⁶ son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₈, alcoxi C₁₋₆, halógeno; X es NH-, -O-, -CH₂-, Y es NH-; Z es CO-; W es NH-; y A es arilo o heteroarilo. Se afirma que estos compuestos tienen una eficacia terapéutica para la fibrosis hepática, renal y pulmonar o la arteriosclerosis causada por el engrosamiento del músculo liso vascular.

La solicitud de patente europea EP 1 424 078 A1, concedida a S. Nakade *et. al.*, desvela y reivindica una serie de antagonistas de S1P como remedios para las enfermedades respiratorias que comprenden un controlador de receptor de esfingosina-1-fosfato. Estos compuestos se pueden usar para tratar o prevenir la constricción de las vías respiratorias, el asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el enfisema pulmonar, la traqueostenosis, la panbronquitis difusa o la bronquitis con infección, enfermedades o trasplante de tejidos conectivos, linfangioleiomiomatosis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), neumonía intersticial, cáncer de pulmón, alveolitis alérgica o neumonía intersticial idiopática.

El documento WO 2011/048287 A1, concedido a W. K. Fang *et. al.*, desvela y reivindica compuestos de piridina de anillo condensado como moduladores selectivos del subtipo de receptores de esfingosina-1-fosfato-2 (S1P₂). Estos compuestos se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades y afecciones que consisten en enfermedades oculares: enfermedades o afecciones cardíacas, fibrosis, dolor y heridas.

La solicitud de patente de EE.UU. n.º 2009/00004207, concedida a Hla *et. al.*, desvela y reivindica una serie de nuevos agonistas de receptores de esfingosina-1-fosfato endoteliales vasculares. Los compuestos agonistas conocidos tales como FTY720 pueden ser fosforilados por la esfingosina cinasa-2 hasta dar las formas fosforiladas que sirven como agonistas de los receptores de esfingosina-1-fosfato. Estos agonistas de receptores endoteliales vasculares pueden formularse en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos de permeabilidad vascular y células endoteliales vasculares no deseadas. Los agonistas conocidos tales como FTY720 pueden ser fosforilados por la esfingosina cinasa-2 hasta dar las formas fosforiladas que sirven como agonistas de los receptores de esfingosina-1-fosfato. Estos agonistas de receptores endoteliales vasculares pueden formularse en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos de permeabilidad vascular y tumores no deseados de células endoteliales vasculares.

La solicitud de patente de EE.UU. N.º 2011/041287, también concedida a Hla *et al.*, desvela una serie de compuestos que inhiben la angiogénesis anómala en el ojo, en particular, en la retina. Se afirma que los compuestos son inhibidores eficaces de la actividad del receptor S1P₂. Las composiciones incluyen el antagonista del receptor S1P₂ y un excipiente oftálmicamente aceptable.

El documento WO2011/159864 desvela análogos de JTE013 como inhibidores de S1p. Para determinar el papel del receptor S1P₂ en el desarrollo vascular de mamíferos se examinó el desarrollo vascular retiniano de ratones que carecían del receptor S1P₂ en condiciones fisiológicas (desarrollo normal de la retina) y fisiopatológicas (retinopatía inducida por isquemia). El desarrollo vascular post-natal de la retina de ratón proporciona un sistema modelo atractivo para explorar los mecanismos de la angiogénesis y la estabilización vascular. Tras el nacimiento, las células endoteliales emergen del disco óptico y forman la vasculatura primaria de la retina de ratón. Los vasos que crecen con orientación radial se forman a lo largo del plexo neuronal y astrocitario de la retina. Por otro lado, la angiogénesis patológica de la retina produce vasos disfuncionales de crecimiento anómalo y orientados caóticamente, que crecen adentrándose en el humor vítreo como "mechones vasculares" y, finalmente, conducen a la pérdida de visión. Este fenotipo es común en la retinopatía pediátrica del prematuro (ROP) y en la retinopatía diabética del adulto.

Se ha demostrado que el proceso angiogénico normalmente tiene lugar en ratones S1P₂^{-/-} durante el desarrollo normal de la retina. Sin embargo, cuando se expusieron los ratones al estrés isquémico, las retinas S1P₂^{-/-} parecieron haber aumentado la angiogénesis intrarretiniana "fisiológica" y reducido la neovascularización intravítrea "patológica". Se demostró además que el receptor S1P₂ es necesario para la infiltración de células inflamatorias, la inducción de la enzima ciclooxigenasa proinflamatoria y proangiogénica (COX)-2 y la supresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que produce el óxido nítrico (NO) vasodilatador. Este estudio identificó la señalización de S1P por el receptor S1P₂ como una nueva diana para la prevención y/o el tratamiento de las retinopatías peligrosas para la visión.

En un trabajo de Schwalm Pfeilschifter y Huwiler (*Biochimica et Biophysica Acta* 1831 (2013) 239-250) se examinaron los efectos generales de la S1P extracelular e intracelular en la cascada de múltiples etapas de la fibrogénesis patológica incluyendo la lesión tisular, la inflamación y la acción de las citocinas profibróticas que estimulan la producción y la deposición de ECM. Los conocimientos actuales sobre la implicación de S1P sugieren que está implicada en el control de la señalización en el desarrollo de la fibrosis de órganos del pulmón, del riñón, del hígado, del corazón y de la piel. Se muestra además que dirigirse a la vía de señalización de la esfingosina cinasa-1/S1P ofrece un potencial terapéutico en el tratamiento de diversos procesos fibróticos.

Los compuestos de la presente invención son adecuados para su uso en un método de tratamiento de la angiogénesis anómala en el ojo, que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz de un antagonista de receptor S1P₂. Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye la administración a un individuo que padece angiogénesis anómala del ojo, así como la administración, tanto preventiva como profiláctica, a un individuo en riesgo de angiogénesis anómala del ojo. La administración de un antagonista del receptor S1P₂ a un individuo en riesgo de angiogénesis anómala del ojo puede prevenir la angiogénesis anómala del ojo. En una realización, el individuo está en riesgo o ha sido diagnosticado de angiogénesis anómala del ojo.

Los compuestos de la invención son adecuados para su uso en un método de tratamiento que implica la angiogénesis patológica en el ojo asociada con una enfermedad neovascular ocular. Este tipo de enfermedad se caracteriza por la invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo, tal como la retina o la córnea. Es la causa más común de ceguera y participa en aproximadamente veinte (20) enfermedades oculares. En la degeneración macular relacionada con la edad, los problemas visuales asociados están causados por una

5
10
15

increscencia de los capilares coroideos a través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación de tejido fibrovascular bajo el epitelio pigmentario de la retina. El daño angiogénico también está asociado con la retinopatía diabética, la retinopatía de prematuridad, el rechazo del injerto corneal, el glaucoma neovascular y la fibroplasia retrolenticular. Otras enfermedades asociadas con la neovascularización corneal incluyen, pero sin limitación,

queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de Vitamina A, desgaste por lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis sicca pterigiana, enfermedad de Sjogrens, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zoster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismos, sarcoidosis de Wegener, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, penfigoide y queratotomía radial.

20
25

Otras enfermedades asociadas con la neovascularización retiniana/coroidea incluyen, pero sin limitación, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoidosis, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de carótida, uveítis crónica/vitritis, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía infantil, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, retinitis o coroiditis causada por infección bacteriana o vírica, histoplasmosis ocular presunta, enfermedad de Best, miopía, fosas ópticas, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento de retina crónica, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismos y complicaciones posteriores al láser. Otras enfermedades relacionadas con los ojos incluyen, pero sin limitación, enfermedades asociadas con la rubeosis (neovascularización ocular) y enfermedades causadas por la proliferación anómala de tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreo-retinopatía prolífica.

La angiogénesis patológica del ojo está asociada con una enfermedad ocular neoplásica. Las enfermedades

30
35

oculares neoplásicas incluyen tumores oculares primarios, tales como melanomas uveales, melanocitomas, retinocitomas, hematomas retinianos y coristomas, angiomas retinianos, gliomas y astrocitomas retinianos, hemangiomas coroideos, neurofibromas coroideos, hematomas y coristomas coroideos, linfomas oculares y fakomatosis oculares; y tumores oculares metastásicos relacionados con la neovascularización coroidea y retiniana. Al igual que las enfermedades no neoplásicas, los tumores anteriores también comparten la neovascularización retiniana como un componente clave.

La angiogénesis patológica y varios tipos de enfermedad inflamatoria se han correlacionado con el aumento de los niveles de receptores S1P₂. JTE013 es el único compuesto antagonista selectivo de los receptores S1P₂ actualmente disponible. Sin embargo, los informes anecdóticos han confirmado que JTE013 tiene características *in vivo* muy malas, basadas, al menos en parte, en su rápido aclaramiento metabólico. Estas características limitan la

40

eficacia y la utilidad de JTE013 en el tratamiento y la prevención de las enfermedades y los trastornos mediados por la esfingosina-1-fosfato.

Ferrer y Hla han informado que las líneas celulares de neuroblastoma sobreexpresan los receptores S1P₂ y sugieren que los antagonistas de S1P₂ se podrían usar para este cáncer pediátrico. Van Brooklyn y Young, y otros, han demostrado la importancia de los receptores S1P₂ en la morfología de la invasividad celular y su proliferación en las células de glioma (que son responsables del glioblastoma multiforme).

45

JTE013 es una clase bien conocida de antagonistas del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 (S1P₂) que tienen el potencial de ser útiles como agentes antiangiogénesis en el cáncer, la aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias. La presente invención comprende el desarrollo de un grupo de derivados del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 (S1P₂) que funcionan como antagonistas de S1P₂ que son útiles como agentes antiangiogénesis en el cáncer, la aterosclerosis y en otros trastornos inflamatorios, bloqueando o inhibiendo la señalización del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 (S1P₂).

50
55

Sumario de la invención

La presente invención comprende el desarrollo de un grupo específico de compuestos que funcionan como antagonistas de S1P₂ útiles como agentes antiangiogénesis para el tratamiento del cáncer, la aterosclerosis y en otros trastornos inflamatorios, bloqueando o inhibiendo un receptor de esfingosina-1-fosfato 2 (S1P₂). Los antagonistas de S1P₂ podrían ser útiles en el tratamiento del glioblastoma multiforme, el neuroblastoma y otros cánceres. Estas composiciones son eficaces en la inhibición de la angiogénesis anómala en el ojo, en particular, en la retina, basándose en características *in vivo* mejoradas tales como parámetros farmacocinéticos mejorados, mayores niveles de concentración en sangre a lo largo del tiempo y mayor afinidad por el receptor, basándose, al menos en parte, en su aclaramiento más lento. También se proporcionan en el presente documento métodos de

60
65

tratamiento o de prevención de ciertos tipos de ceguera a través de la administración de composiciones que comprenden un antagonista del receptor S1P₂ y un excipiente oftálmicamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

La angiogénesis patológica y varios tipos de enfermedad inflamatoria se han correlacionado con el aumento de los niveles de receptores S1P₂. En la técnica anterior, JTE013 es un compuesto antagonista conocido selectivo de los receptores S1P₂. Este compuesto tiene características *in vivo* muy malas, basadas, al menos en parte, en su rápido aclaramiento. Estas características pueden limitar la eficacia y la utilidad de este compuesto en el tratamiento y la prevención de las enfermedades mediadas por la esfingosina-1-fosfato.

La presente invención, entonces, comprende composiciones y compuestos para su uso en métodos de inhibición de la angiogénesis anómala en el ojo, en particular, en la retina. También se proporcionan en el presente documento compuestos para su uso en métodos de tratamiento o prevención de ciertos tipos de ceguera.

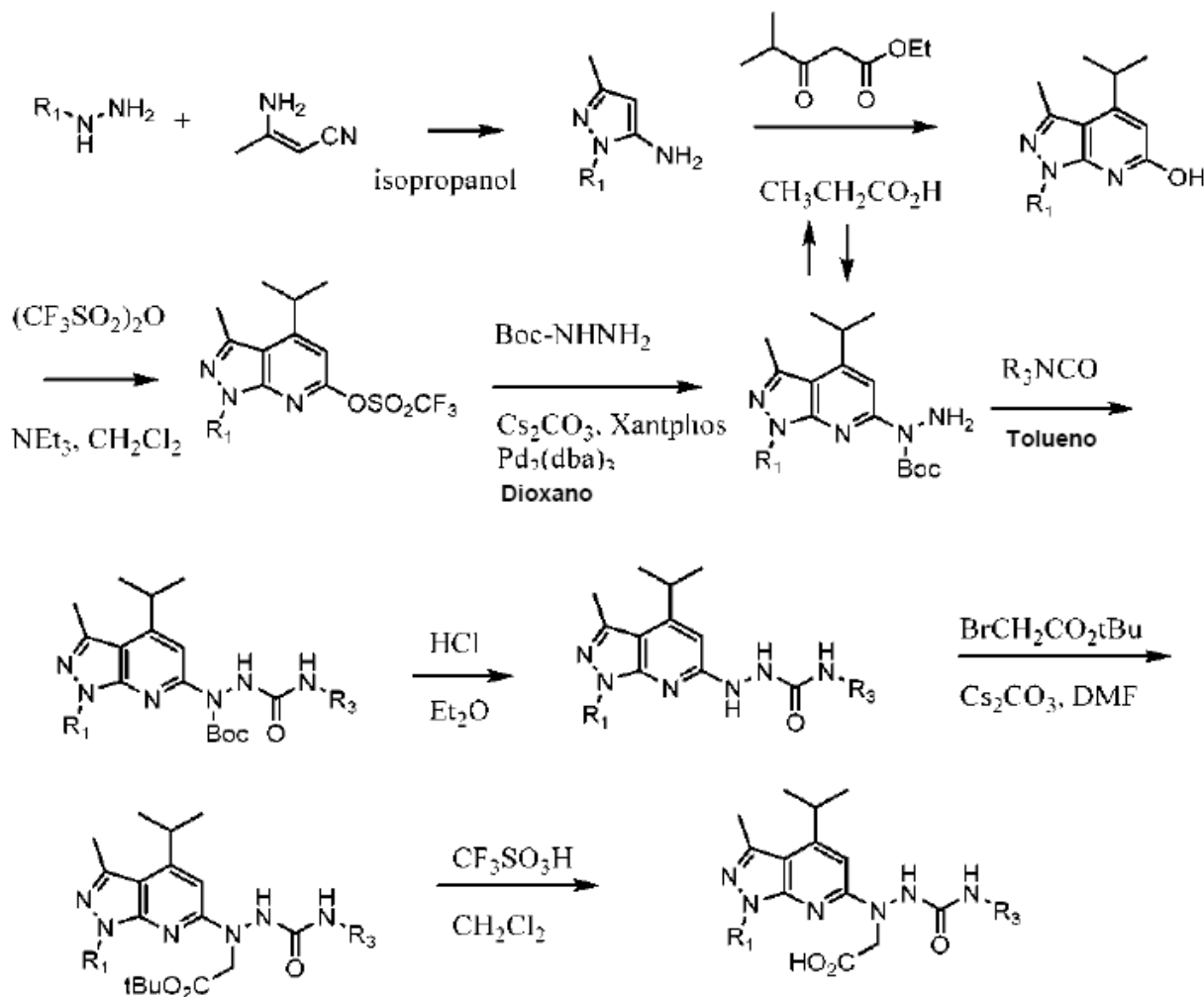
También se proporcionan composiciones que comprenden un antagonista de receptor S1P₂ y un excipiente oftálmicamente aceptable con características *in vivo* mejoradas. La presente invención comprende composiciones y compuestos para su uso en métodos de inhibición de la angiogénesis anómala en el ojo, en particular, en la retina. También se proporcionan en el presente documento compuestos para su uso en métodos de tratamiento o prevención de ciertos tipos de ceguera. También se proporcionan composiciones que comprenden un antagonista de receptor S1P₂ y un excipiente oftálmicamente aceptable, con características *in vivo* mejoradas, basadas en la estabilidad metabólica y/o en el aumento de la duración de la acción.

La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un mediador lipídico multifuncional que señala a través de la familia S1P de receptores acoplados a proteína G (S1P_R). Se sabe que S1P regula la maduración vascular, la permeabilidad y la angiogénesis. Por ejemplo, se sabe que S1P es un estimulante de la angiogénesis, es decir, del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Como se usan en el presente documento, los términos S1P_{2R}, S1P_{2R}, receptor S1P₂ y receptor S1P₂ se usan indistintamente para referirse al receptor de esfingosina-1-fosfato 2.

Se prepararon una serie de nuevos antagonistas del receptor de la esfingosina-1-fosfato 2 (S1P₂). La información detallada para preparar compuestos antagonistas se proporciona en los ejemplos. Estos compuestos mostraron inesperadamente una mayor estabilidad a los microsomas hepáticos usando un modelo *in vitro* bien establecido para el metabolismo y la estabilidad metabólica *in vivo*. Además, la mayoría de estos compuestos se une inesperadamente a receptores tanto S1P₂ como S1P₅. Los compuestos tienen utilidad como fármacos terapéuticos para el tratamiento y la prevención de afecciones o enfermedades mediadas por los receptores de S1P. Dichas afecciones y enfermedades incluyen, pero sin limitación, una amplia variedad de enfermedades y afecciones inflamatorias, así como enfermedades y afecciones mediadas por procesos angiogénicos.

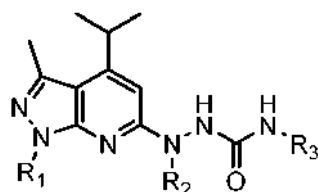
En una realización de la presente invención, los nuevos compuestos antagonistas de esfingosina-1-fosfato se pueden usar para tratar o prevenir la aterosclerosis y las afecciones asociadas con la misma, incluyendo enfermedades cardiovasculares y vasculares cerebrales tales como, por ejemplo, infarto de miocardio, apoplejía, angina y enfermedad vascular periférica. Estos compuestos también se pueden usar para tratar o prevenir la sepsis y el choque séptico, así como una amplia variedad de otras enfermedades incluyendo diabetes, cirrosis hepática, enfermedades vasculares con mayor permeabilidad y reacciones alérgicas. El método general de síntesis de estos compuestos es el siguiente:

Esquema 1



Los compuestos preferidos de la presente invención comprenden los de estructura general

5

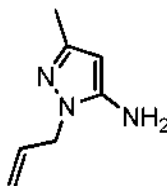


en la que cada uno consiste en lo siguiente:

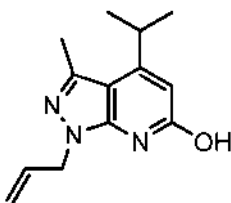
- 10 R_1 es $-CH_3$, R_2 es $-CH_2CO_2H$ o $-CH_2CH_2OH$ y R_3 es 2,6-dicloropiridina sustituida en 4, 2-cloro-6-hidroxietilpiridina sustituida en 4, 2-cloro-6-hidroxipropilpiridina sustituida en 4, 2-(aminoetil)-6-cloropiridina sustituida en 4, 2-(aminoetilmetil)-6-cloro-piridina sustituida en 4, 2,3-dicloro-tiéfeno sustituido en 5, y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables.
- 15 Los siguientes ejemplos se proporcionan para exponer y definir de manera más específica el proceso de la presente invención. Se reconoce que pueden realizarse cambios en los parámetros e intervalos específicos que se desvelan en el presente documento, y que hay una serie de diferentes maneras conocidas en la técnica para cambiar las variables desveladas. Y aunque, en el presente documento, se entiende que solo se desvelan las realizaciones preferidas de estos elementos como se exponen en la memoria descriptiva y en las figuras, la invención no debería
- 20 limitarse ni interpretarse en términos del alcance de las reivindicaciones que se presentan a continuación en el presente documento.

Ejemplo de referencia 1

a. Síntesis de 5-amino-1-alil-3-metilpirazol



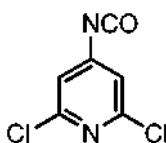
Se disolvieron β -amino-crotononitrilo (4,2 g, 50 mmol) y alilhidrazina (3,6 g, 50 mmol) en isopropanol (20 ml) y se calentó la solución gradualmente hasta el reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 5 h. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna usando metanol al 2,5 % en DCM, dando 5-amino-1-alil-3-metil-pirazol (4,2 g) en forma de un jarabe. RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3): δ 6,00-5,88 (1H, m), 5,35 (1H, s), 5,23-5,04 (2H, m), 4,56 (2H, dd, $J = 3,6$ Hz, 1,5 Hz), 3,47 (2H, s a) 2,15 (3H, s).

b. Síntesis de 1*H*-6-hidroxi-4-isopropil-1-alil-3-metilpirazolo[3,4-*b*]piridina

Se añadió acetato de etilisobutirilo (10,5 g, 66,5 mmol) a una solución de 5-amino-1-alil-3-metilpirazol (9,00 g, 65,7 mmol) en ácido propiónico y se calentó hasta el reflujo durante 20 h. Tras enfriar se añadió acetato de etilo (80 ml) y se calentó hasta el reflujo durante 1 h. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna usando metanol al 5 % en DCM, dando 1*H*-6-hidroxi-4-isopropil-1-alil-3-metilpirazolo[3,4-*b*]piridina en forma de cristales incoloros (1,1 g, 7 %). RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 6,16 (1H, s), 6,06-5,97 (1H, m), 5,30-5,22 (2H, m), 4,95 (2H, dd, $J = 3,6$ Hz, 1,5 Hz), 3,31-3,27 (1H, m), 2,52 (3H, s), 1,31 (6H, d, $J = 7$ Hz).

Ejemplo de referencia 2

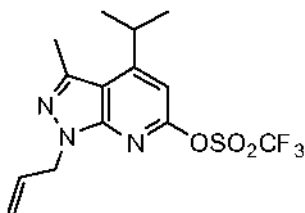
Síntesis de 2,6-dicloropiridil-4-isocianato



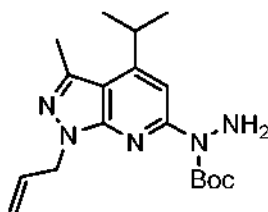
a) Síntesis de 2,6-dicloropiridin-4-carbonilazida

Se añadió difenilfosforilazida (DPPA) (5 ml, 23,2 mmol) a una solución de ácido 2,6-dicloroisocotínico (4,05 g, 21 mmol) y trietilamina (3,8 ml, 27,5 mmol) en acetato de etilo (40 ml) a 0-5 °C, y se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo para la dilución y se lavó la capa orgánica con agua. Se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose el producto en bruto de 2,6-dicloropiridin-4-carbonilazida (7,08 g). Se disolvió en acetato de etilo y se trató con carbón activado. Tras la filtración y la evaporación se obtuvo 2,6-dicloropiridin-4-carbonilazida (4,57 g) en forma de cristales incoloros. Se disolvió la 2,6-dicloropiridin-4-carbonilazida (4,21 g) que se obtuvo del procedimiento anterior en tolueno seco (40 ml) y se calentó la solución durante 4 h a 100 °C, dando 2,6-dicloropiridil-4-isocianato. Se almacenó en forma de una solución a 0 °C.

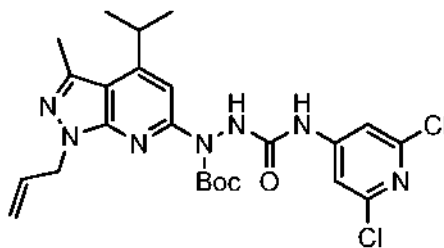
Síntesis del Compuesto 1 [no reivindicado]



- 5 Se añadió trietilamina (2,17 ml, 3,0 equiv, 15,57 mmol) a una solución de 1H-6-hidroxi-4-isopropil-1-allyl-3-metilpirazolo[3,4-*b*]piridina (1,20 g, 5,19 mmol) en diclorometano (30 ml) y se enfrió hasta -10 °C. Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (1,30 ml, 7,78 mmol, 1,5 equiv) a esta solución fría gota a gota. Se agitó la solución durante 45 minutos o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se inactivó la reacción con agua y se extrajo con diclorometano (3 x 10 ml). Se concentró la mezcla, se secó y se purificó mediante
- 10 cromatografía en columna (Hexano/Acetato de etilo 10:1), dando 1,32 g del producto deseado en forma de un aceite amarillo en un rendimiento del 70 %. RMN de ¹H 300 MHz (CDCl₃): δ 6,75 (1H, s), 6,06-5,95 (1H, m), 5,29-5,22 (2H, m), 4,95 (2H, dd, *J* = 3,0 Hz, 1,5 Hz), 3,65-3,60 (1H, m), 2,69 (3H, s) y 1,38 (6H, d, *J* = 6,6 Hz).



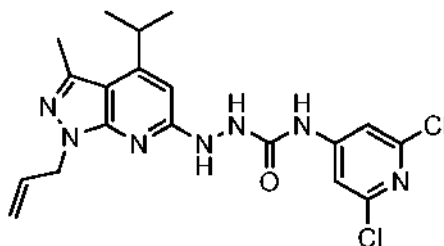
- 15 Se colocaron el compuesto anterior (200 mg, 0,551 mmol), *t*-butil-carbazato (87 mg, 0,661 mmol, 1,2 equiv), carbonato de cesio secado en horno (431 mg, 1,322 mmol, 2,4 equiv), Xantphos (15 % mol, 48 mg, 0,082 mmol) y Pd₂(dba)₃ (5 % mol, 26 mg, 0,0276 mmol) en un matraz secado al horno en atmósfera de nitrógeno. Se disolvió esta mezcla de reacción en dioxano desgasificado seco y se calentó a 65 °C durante 12 h o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se concentró el material y se sometió a cromatografía en columna
- 20 (Hexanos/Acetato de etilo 3:1), dando 133 mg del derivado de hidrazina deseado en un rendimiento del 70 %. RMN de ¹H 300 MHz (CDCl₃) δ 7,34 (1H, s), 6,01 (1H, m), 5,22 (1H, m), 5,16 (1H, m), 4,97 (2H, d, *J* = 6 Hz), 4,34 (2H, s a), 3,59 (1H, m), 2,65 (3H, s), 1,55 (9H, s), 1,34 (3H, s) 1,36 (3H, s).



- 25 Se añadió una solución de 2,6-dicloro-piridil-4-isocianato (2,0 equiv, 1,3 ml, 0,771 mmol) en tolueno al derivado de hidrazina anterior (133 mg, 0,385 mmol) en THF (5 ml) y se agitó durante 12 h o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se concentró la reacción en bruto, se purificó mediante cromatografía en columna
- 30 (Hexanos/Acetato de etilo 2:1 a 1:1), proporcionando el producto deseado en forma de un sólido amarillo. (193 mg, rendimiento del 94 %). RMN de ¹H 300 MHz (CDCl₃) δ 9,56 (1H, s a), 7,44 (2H, s), 7,25 (1H, s), 7,10 (1H, s a) 6,10-5,97 (1H, m), 5,24 (1H, dd, *J* = 7,5 Hz, 1,5 Hz), 5,01 (1H, dd, *J* = 7,5 Hz, 1,5 Hz), 4,98-4,95 (2H, m), 3,69-3,60 (1H, m), 2,70 (3H, s), 1,55 (9H, s), 1,40 (6H, d, *J* = 7 Hz).

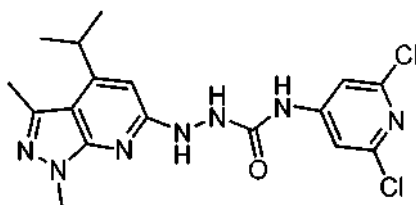
35

Síntesis del Compuesto 1



- 5 Se añadió ácido clorhídrico (2 M en éter, 5 ml, 10 mmol) a una solución del compuesto de Boc anterior (500 mg, 0,94 mmol) en dietiléter (10 ml) a 0 °C, se agitó la reacción durante 12 h a temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción, se diluyó con DCM (20 ml), se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (15 ml), se secó y se concentró, proporcionando el producto en bruto (424 mg). Se aisló el producto puro (Compuesto 1) tras la purificación usando TLC preparativa (EtOAc al 30 % en hexanos) en forma de un sólido blanco (140 mg, rendimiento del 34 %). RMN de ¹H 300 MHz (CDCl₃+CD₃OD) δ 7,41 (2H, s), 6,38 (1H, s(1 H, m), 5,07-4,97 (2H, m), 4,77 (2H, d, J = 6 Hz), 3,41-3,29 (1 H, m), 2,51 (3H, s), 1,24 (6H, d, J = 7 Hz), EM (m/z MH⁺) 434,2.

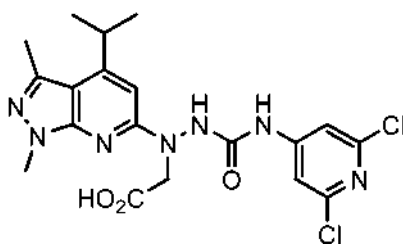
N-(1H-4-isopropil-1,3-dimetilpirazolo[3,4-b]piridin-6-il)amino-N'-(2,6-dicloropiridin-4-il)-urea (JTE013)



- 15 El compuesto del título anterior se preparó como se ha publicado en la bibliografía (documento WO 01/98301)

Síntesis del Compuesto 2

- 20 Se añadió bromoacetato de *tert*-butilo (500 mg, 2,60 mmol) a una solución de N-(1H-4-isopropil-1,3-dimetilpirazolo[3,4-b]piridin-6-il)amino-N'-(2,6-dicloropiridin-4-il)-urea (125 mg, 0,306 mmol) en DME seco (1 ml), y se calentó la mezcla de reacción durante una noche a 100 °C. A continuación, se diluyó con DCM (20 ml) y se lavó con solución acuosa de NaHCO₃ (1 x 10 ml) seguido de agua (2 x 10 ml). Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (MeOH al 5 %/CH₂Cl₂), dando el producto puro deseado en forma de un sólido blanco (25 mg). RMN de ¹H 300 MHz (CD₃OD) δ 7,58 (2H, s), 6,78 (1 H, s), 4,87 (2H, s a), 3,99 (3H, s), 3,65 (1 H, m), 2,81 (3H, s), 1,50 (9H, s), 1,37 (6H, d, J = 6,6 Hz), EM (m/e) 523 (MH⁺).

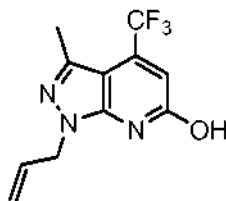


- 35 Se añadió el *t*-butiléster anterior (15 mg, 0,028 mmol) disuelto en DCM (1 ml) a una solución de ácido trifluorometanosulfónico (15 mg, 0,10 mmol) en DCM seco (3 ml) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 h

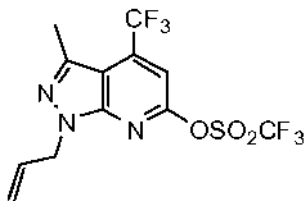
a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, según lo indicado mediante TLC, se añadieron NaHCO_3 (9 mg) y MeOH (0,5 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 15 min. Se concentró la mezcla de reacción al vacío, se evaporó junto con DCM y se trituró con hexanos, obteniéndose el producto deseado (Compuesto 2) en forma de un sólido de color marrón (25 mg, contiene compuesto al 34 % y triflato de sodio al 66 %). RMN de ^1H 300 MHz (CD_3OD) δ 7,58 (2H, s), 6,78 (1H, s), 5,49 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), 4,00 (3H, s), 3,44-3,57 (1H, m), 2,82 (3H, s), 1,37 (6H, d, $J = 6,6$ Hz), EM (m/z MH $^+$) 466,2.

Síntesis del Compuesto 5 [no reivindicado]

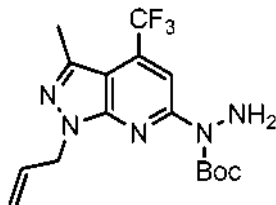
Síntesis de 1*H*-6-hidroxi-4-trifluorometil-1-alil-3-metilpirazolo[3,4-*b*]piridina



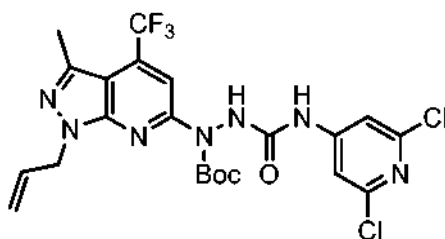
Se añadió etil-4,4,4-trifluoroacetoacetato (5,6 g, 30 mmol) en ácido propiónico (10 ml) a una solución de 5-amino-1-alil-3-metilpirazol (4,2 g, 30 mmol) en ácido propiónico y se calentó (150 °C) hasta el reflujo durante 23 h. Tras enfriar se añadió acetato de etilo (40 ml) y se calentó hasta el reflujo durante 1 h. En enfriamiento lento se depositaron los cristales del compuesto deseado, que se filtraron, se lavaron con acetato de etilo y se secaron a presión reducida. Así pues, se obtuvo 1*H*-6-hidroxi-4-trifluorometil-1-alil-3-metilpirazolo[3,4-*b*]piridina (5,1 g, 66 %) en forma de cristales blancos, RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 6,63 (1H, s), 6,07-5,94 (1H, m), 5,29-5,23 (2H, m), 4,96 (2H, dd, $J = 3,0$ Hz, 1,5 Hz), 2,51 (3H, s) y 1,85 (1H, s a).



Se añadió trietilamina (1,77 g, 2,42 ml, 3,0 equiv, 17,52 mmol) a una solución de 1*H*-6-hidroxi-4-trifluorometil-1-alil-3-metilpirazolo[3,4-*b*]piridina (1,50 g, 5,84 mmol) en diclorometano (30 ml) y se enfrió hasta -10 °C. Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (1,48 ml, 2,47 g, 8,75 mmol, 3,0 equiv) a esta solución fría. Se agitó la solución a esta temperatura durante 45 minutos o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se inactivó la reacción con agua y se extrajo con diclorometano (3 x 10 ml). Se concentró la capa orgánica, se secó y se purificó mediante cromatografía en columna (Hexano/Acetato de etilo 10:1), dando 2,15 g del producto deseado en forma de un aceite amarillo. Rendimiento del 96 %. RMN de ^1H 600 MHz (CDCl_3) δ 6,60 (1H, s), 6,03 (1H, m), 5,30 (2H, m), 4,98 (2H, dd, $J = 6,0$ Hz, 1,5 Hz), 2,49 (3H, s).

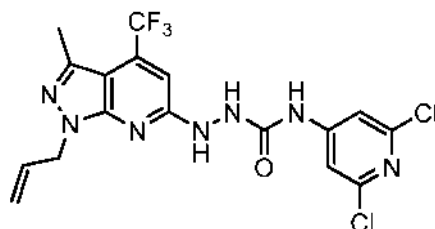


Se colocaron el compuesto anterior (215 mg, 0,553 mmol), t-butil-carbazato (88 mg, 0,664 mmol, 1,2 equiv), carbonato de cesio secado al horno (432 mg, 1,327 mmol, 2,4 equiv), Xantphos (15 % mol, 48 mg, 0,083 mmol) y $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (5 % mol, 25 mg, 0,0276 mmol) en un matraz seco en atmósfera de nitrógeno. Se disolvió esta mezcla de reacción en dioxano desgasificado seco y se calentó a 65 °C durante 12 h o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se concentró la mezcla de reacción y se sometió el material directamente a cromatografía en columna (Hexanos/Acetato de etilo 3:1), dando 85 mg del producto deseado en un rendimiento del 42 %. RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 7,93 (1 H, s), 6,04 (1 H, m), 5,24 (2H, m), 5,02 (2H, dd, $J = 6,0$ Hz, 1,5 Hz), 4,91 (2H, s a) 2,59 (3H, s), 1,58 (9H, s).



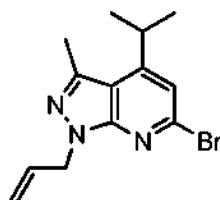
5 Se añadió una solución de 2,6-dicloro-piridil-4-isocianato (~2,0 equiv, 1,0 ml, 0,458 mmol) en tolueno a una solución de del derivado de hidrazina anterior (85 mg, 0,229 mmol) en THF (5 ml) a 0-5 °C. Se agitó la solución durante 12 h o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se concentró la reacción y se purificó directamente mediante cromatografía en columna (Hexanos/ Acetato de etilo 2:1 a 1:1), proporcionando 122 mg del producto de Boc deseado en un rendimiento del 95 %. RMN de ¹H 600 MHz (CDCl₃) δ 8,75 (1H, s a), 8,06 (1H, s a), 7,72 (1H, s), 7,32 (2H, s), 6,01 (1H, m), 5,24 (2H, d *J* = 5,6 Hz, 2,5 Hz), 5,00 (2H, d, *J* = 5,4 Hz), 2,64 (3H, s), 1,57 (9H, s).

5.

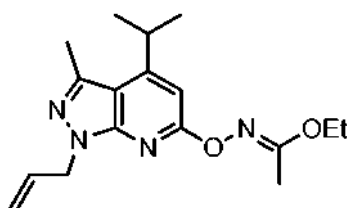


10 Se añadió ácido clorhídrico (sol 2 M en éter, 1,0 ml, 2 mmol) a una solución del derivado de Boc anterior (44 mg, 0,095 mmol) en diclorometano seco (5 ml) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 12 h a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó el compuesto cristalino así obtenido con isopropiléter y se secó en un horno de vacío. Se aisló el Compuesto 5 en forma de un sólido incoloro (26 mg, rendimiento del 72 %). RMN de ¹H 300 MHz (CD₃OD) δ 7,60 (2H, s), 6,93 (1H, s), 5,97-5,88 (1H, m), 5,08-4,92 (2H, m), 4,91-4,88 (2H, m), 2,49 (3H, s), EM (m/e MH⁺) 460.

20 Síntesis del Compuesto 6 [no reivindicado]

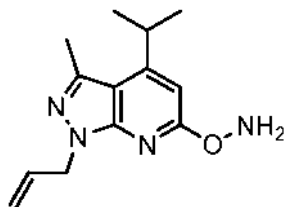


25 Se añadió POBr₃ (365 mg, 1,29 mmol) a una solución de 1*H*-6-hidroxi-4-isopropil-1-alil-3-metilpirazolo[3,4-*b*]piridina (200 mg, 0,86 mmol) en anisol (1 ml). Se calentó la mezcla de reacción durante 3 h a 130 °C. Una vez completada la reacción según lo indicado mediante TLC, se diluyó la mezcla de reacción con tolueno (10 ml). Se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (10 ml), seguido de solución acuosa saturada de NaCl (10 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. Se evaporó la sustancia filtrada a presión reducida y se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna usando acetato de etilo al 10 %/hexanos como eluyente. El producto deseado (Compuesto 6) se obtuvo en forma de un aceite amarillo (108 mg, rendimiento: 42 %). RMN de ¹H 300 MHz (CDCl₃) δ 7,03 (1H, s), 6,15 (1H, m), 5,22-5,16 (2H, m), 5,02 (2H, dd, *J* = 6,0 Hz, 1,5 Hz), 3,62-3,45 (1H, m), 2,62 (3H, s), 1,38 (6H, d, *J* = 6,0 Hz).



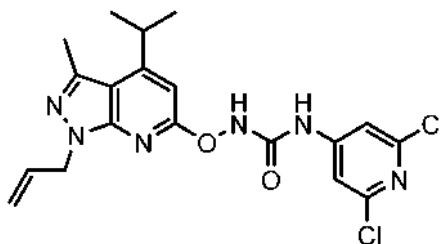
35 Se añadió *tert*-butóxido de potasio (solución 1 M, 1 ml) a una solución de etil-*N*-hidroxiacetimidato (105 mg, 102 mmol) en DMF seca (1 ml) a 0 °C y se agitó durante 2,5 h. Se añadió cuidadosamente el compuesto de bromo anterior (100 mg, 0,34 mmol) disuelto en DMF (1 ml) a 0 °C y se siguió agitando durante 12 h a temperatura

ambiente. Se inactivó la mezcla de reacción con agua (5 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (EtOAc al 20 %/Hexanos), dando derivado de acetohidroxamato en forma de un aceite incoloro (80 mg, rendimiento: 74 %). RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 6,91(1H, s), 5,99 (1H, m), 5,23-5,17 (2H, m), 4,97 (2H, dd, J = 6,0 Hz, 1,5 Hz), 4,28 (2H, c), 3,56 (1H, m), 2,63 (3H, s), 2,19 (3H, s), 1,39-1,33 (9H, m).



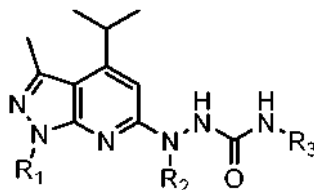
Se añadió ácido sulfúrico (0,01 ml) a una solución del compuesto de acetohidroxamato anterior (80 mg, 0,25 mmol) en metanol (4 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 2,5 h a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción según lo indicado mediante TLC, se neutralizó con Na_2CO_3 (108 mg), se añadió agua (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron a presión reducida. La amina en bruto (60 mg, rendimiento: 96 %) se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 6,55 (2H, s a), 6,49 (1H, s), 6,08-5,97 (1H, m), 5,23-5,16 (2H, m), 4,96 (2H, dd, J = 6,0 Hz, 1,5 Hz), 3,52-3,47 (1H, m), 2,62 (3H, s), 1,33 (6H, d, J = 7,0 Hz).

Síntesis del Compuesto 6



Se añadió una solución de 2,6-dicloro-piridil-4-isocianato (~2,0 equiv, 1,1 ml, 0,48 mmol) en tolueno a la amina en bruto anterior (60 mg, 0,24 mmol) en THF seco (4 ml) a 0 °C. Se agitó la solución durante 12 h o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se aisló el Compuesto 6 deseado mediante cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) en forma de un sólido blanco (70 mg, rendimiento: 66 %). RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 8,67 (1H, s), 7,72 (1H, s), 7,48 (2H, s), 6,63 (1H, s), 5,99-5,94 (1H, m), 5,21-5,13 (2H, m), 4,94 (2H, dd, J = 5,0 Hz, 1,5 Hz), 3,60-3,56 (1H, m), 2,65 (3H, s), 1,38 (6H, d, J = 7 Hz), EM (m/e MH^+) 435.

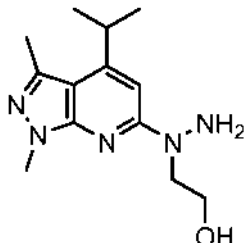
Usando los métodos anteriores también se pueden preparar los siguientes compuestos. A continuación se muestra el método de síntesis para el compuesto 9.



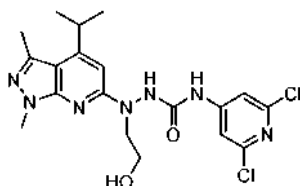
Compuesto:	R_1	R_2	R_3
N.º 9	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ OH	2,6-dicloropiridina sustituida en 4
N.º 20	-CH ₃	-CH ₂ CO ₂ H	3,5-bis-trifluorometilfenilo sustituido en 1
N.º 22	-Me	-CH ₂ CO ₂ H	2,4-bis-trifluorometilfenilo sustituido en 1
N.º 24	-Me	-CH ₂ CO ₂ H	5-trifluorometil-2-piridona sustituida en 3
N.º 26	-Me	-CH ₂ CO ₂ H	3,5-diclorofenilo sustituido en 1

N-(2,6-Dicloropiridin-4-il)-2-(2-hidroxietil)-2-(4-isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazina-1-carboxamida (Compuesto 9):

2-(1-(4-Isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazinil)etan-1-ol:

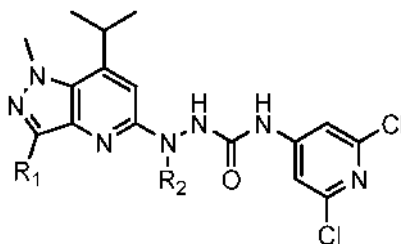


Se añadió 2-hidrazinoetanol (5,1 ml, 149,25 mmol) a una solución de 1*H*-6-bromo-4-isopropil-1,3-dimetilpirazolo[3,4-*b*]piridina (2,0 g, 7,46 mmol) en etanol (10 ml) y se calentó a reflujo durante una noche. Tras enfriar, se agitó durante cuatro horas en un baño de hielo. Se filtró el material en bruto y se trituró el sólido obtenido con una solución acuosa de etanol al 50 % (5 ml), se filtró y se secó a presión reducida a 60 °C, dando 2-(1-(4-isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazinil)etan-1-ol en forma de un sólido blanco, 1,3 g (4,94 mmol, rendimiento del 66 %). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,76 (s, 1 H), 4,92 (s a, 2H), 4,20-3,96 (m, 2H), 3,94-3,86 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,52-3,45 (m, 2H), 2,58 (s, 3H), 1,25 (d, 6H, *J* = 6,6 Hz).



Se disolvió 2,6-dicloropiridin-4-carbonilazida (1,0 g, 4,61 mmol) en tolueno (10 ml) y se agitó la solución durante 4 h a 100 °C. Tras enfriar hasta 0-5 °C se añadió una solución de 2-(1-(4-isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazinil)etan-1-ol (750 mg, 2,85 mmol) en THF (10 ml) y se agitó durante 18 horas a TA. Tras concentrar, se purificó el material en bruto mediante cromatografía en columna usando elución en gradiente (metanol del 0 al 20 %/DCM), dando *N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-2-(2-hidroxietil)-2-(4-isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazina-1-carboxamida en forma de un sólido blanco, 624 mg (1,38 mmol, rendimiento del 30 %). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 9,28 (s a, 1H), 7,47 (s, 2H), 6,70 (s a, 1H), 6,58 (s, 1H), 4,70-4,50 (m, 1H), 4,30-4,20 (m, 1H), 4,08-3,98 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,53-3,46 (m, 2H), 2,92-2,70 (m, 1H), 2,60 (s, 3H), 1,32 (d, 6H, *J* = 6,6 Hz). HRMS (IEN): masa calculada para C₁₉H₂₃Cl₂N₇O₂ [M+H]⁺, 452,1290 encontrada, 452,1480.

Los Compuestos 27-33 se pueden preparar como se expone y se desvela en la solicitud de patente publicada WO2011041287A1. A continuación, se describe la síntesis de los Compuestos 27 y 33. Estos comprenden la estructura:



y consisten en:

Compuesto	R1	R2
N.º 28	-CH ₃	-CH ₂ CO ₂ H
N. 30	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ OH

Preparación del Compuesto Bn-A-6

Se añadió HCl 6 M (10 ml) a una solución del Compuesto A-6 (3 g, 9,5 mmol) en THF (50 ml). Se agitó la reacción a TA durante 1 h, se inactivó con NaHCO_3 (ac.), se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó con anhídrido Na_2SO_4 y se concentró, dando el Compuesto A-6-1. Se añadió NaH (760 mg, 19 mmol) al Compuesto A-6-1 en THF (50 ml), se agitó la solución a 60 °C durante 2 h. Se enfrió la solución hasta 0 °C y BnBr (3,23 g, 19 mmol). Se calentó la solución hasta TA y se agitó durante una noche. Se añadió agua (20 ml) y se extrajo la solución con acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó con anhídrido Na_2SO_4 y se concentró, dando el Compuesto Bn-A-6 (2,7 g, rendimiento del 90 %).

Preparación del Compuesto A-7

Se añadió ácido *m*-Cloroperbenzoico (MCPBA, 3,7 g, 16,7 mmol) a una solución del Compuesto Bn-A-6 (2,7 g, 8,4 mmol) en CHCl_3 (30 ml) a 0 °C. Se calentó la solución hasta el reflujo a 90 °C durante 3 h. Se inactivó la solución con NaHCO_3 (ac.) y se extrajo con DCM. Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó con anhídrido Na_2SO_4 y se concentró, dando el Compuesto en bruto A-7 (3 g).

Preparación del Compuesto A-8

Se añadió POCl_3 (5 ml) a una solución del Compuesto A-7 (3 g, 8,8 mmol) en tolueno (30 ml). Se agitó la solución a 90 °C durante 3 h, luego se concentró y se inactivó con NaHCO_3 (ac.), se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó con anhídrido Na_2SO_4 y se concentró, dando el Compuesto A-8 (800 mg, rendimiento del 25 %).

Preparación del Compuesto A-9

Se agitó una solución del Compuesto A-8 (250 mg, 0,7 mmol) y NH_2NH_2 (ac.) en EtOH (1 ml) a 120 °C durante 12 h en un microondas CEM. Se enfrió la solución y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó con anhídrido Na_2SO_4 y se concentró, dando el Compuesto A-9 en bruto (200 mg).

Preparación del Compuesto A-10

Se añadió 2,6-dicloro-4-isocianato-piridina (Compuesto C, 160 mg, 0,85 mmol) a una solución del Compuesto A-9 (200 mg, 0,56 mmol) en THF (5 ml). Se agitó la solución a TA durante 30 min. Se añadió metanol y se filtró el sólido resultante. Se concentró la sustancia filtrada y se purificó el Compuesto A-10 mediante TLC preparativa (100 mg, rendimiento del 33 %).

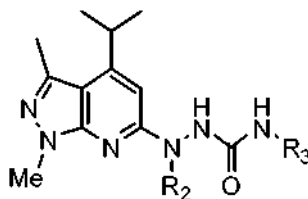
Preparación del Compuesto 33

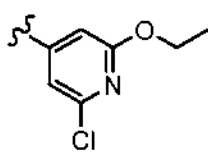
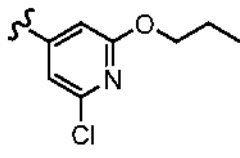
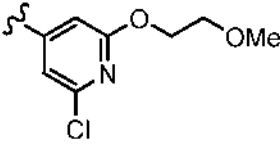
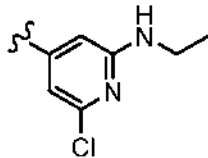
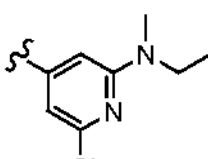
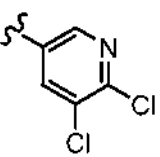
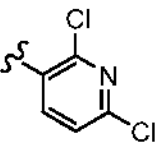
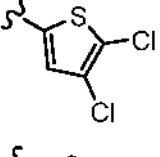
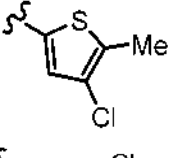
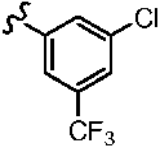
Se añadió yoduro de trimetilsililo (0,5 ml) lentamente a una solución de A-10 (100 mg, 0,18 mmol) en diclorometano. Se agitó la solución a TA durante 30 min, se inactivó con NaHCO_3 (ac.) y se extrajo con DCM. Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó con anhídrido Na_2SO_4 y se concentró, dando el Compuesto 33 (40 mg, rendimiento del 48 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,68 (1H, a), 7,55 (1H, a), 7,40 (2H, s), 7,00 (1H, s), 6,71 (1H, s), 4,18 (3H, s), 3,62-3,55 (1H, m), 3,56 (2H, $J = 5,6$ Hz, t), 3,04 (2H, $J = 6,4$ Hz, t), 2,00-1,98 (2H, m), 1,36 (6H, $J = 6,4$ Hz, d); EM(IEN): 452 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

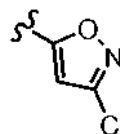
Preparación del Compuesto 27

Se añadió reactivo de Burgess (80 mg, 0,33 mmol) a una solución de 33 (50 mg, 0,11 mmol) en THF (4 ml). Se agitó la solución a TA durante una noche. Se calentó la reacción hasta 60 °C durante 1 h y luego se concentró la solución y se purificó mediante HPLC preparativa, dando el Compuesto 27 (2 mg).

Usando los métodos anteriores también se pueden preparar los siguientes compuestos (los métodos se muestran debajo de la tabla).



Compuesto:	R ₂	R ₃
N.º 35	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 36	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 37	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 38	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 39	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 40	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 41	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 42	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 43	-CH ₂ CH ₂ OH	
N.º 44	-CH ₂ CH ₂ OH	

Compuesto: R₂R₃N.º 45 -CH₂CH₂OHMétodos generales para la síntesis de los Compuestos 34-45

Procedimiento general para convertir ácido en isocianato.

5

Método A

Se disolvió el ácido apropiado (1,0 equiv, 0,5 mmol) en acetato de etilo recién destilado (5 ml) y se enfrió la solución hasta 0 °C. A esta solución se añadió trietilamina (1,3 equiv, 0,65 mmol, 0,09 ml), seguido de difenilfosforilazida (1,1 equiv, 0,55 mmol, 0,12 ml). Se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Luego, se inactivó con agua y se extrajo (2 x 25 ml) con acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua (20 ml), seguido de salmuera (20 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró hasta la mitad del volumen. Se añadió tolueno (10 ml) y se retiró acetato de etilo restante con la temperatura interna del baño de agua del rotavapor no superior a 35 °C. A continuación, se calentó la solución de tolueno (10 ml, 0,5 mmol) a reflujo durante 3-4 h y se controló mediante TLC para determinar su finalización. Se enfrió la solución hasta temperatura ambiente y se usó directamente para la siguiente reacción.

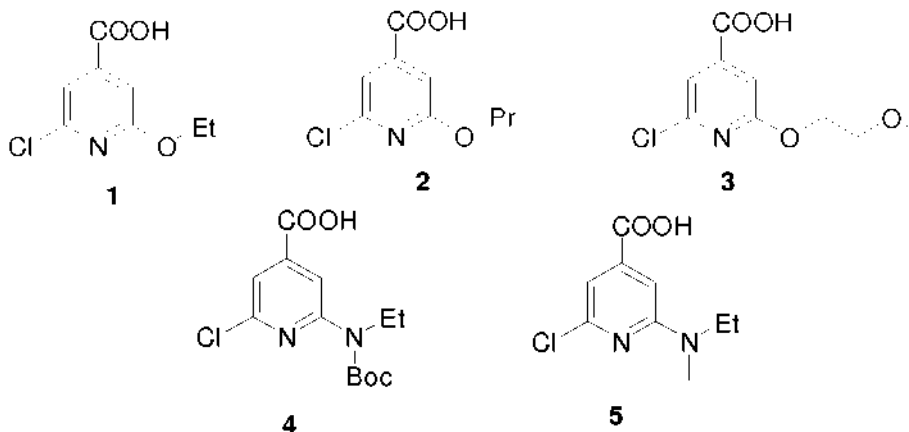
15

Método B

Se disolvió el ácido apropiado (1,0 equiv, 0,5 mmol) en THF seco (5 ml) con 2 gotas de DMF seca. A esta solución se añadió cloruro de oxalilo (1,3 equiv, 0,65 mmol, 0,06 ml) gota a gota. Se agitó la solución durante 1 h a TA y se controló mediante TLC para determinar su finalización. Se añadió azidotrimetilsilano (2,0 equiv, 1,0 mmol, 0,13 ml), se agitó durante 2 h y se controló mediante TLC para determinar su finalización. Se inactivó la reacción con agua, se concentró y se diluyó con acetato de etilo (20 ml). Se lavó la capa orgánica con agua (20 ml) y salmuera (20 ml), se secó y se concentró hasta la mitad del volumen. Se añadió tolueno (10 ml) y se retiró el acetato de etilo restante con la temperatura interna del baño de agua del rotavapor no superior a 35 °C. A continuación, se sometió la solución de tolueno (10 ml, 0,5 mmol) a reflujo durante 3-4 h y se controló mediante TLC para determinar su finalización. Se enfrió la solución hasta la temperatura ambiente y se usó directamente para la siguiente reacción.

25

30 Preparación de síntesis de los Ácidos 1 a 5

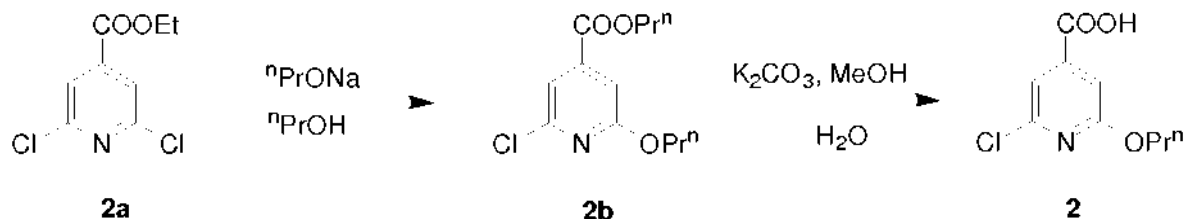


35 Síntesis del Ácido 1

La síntesis del ácido 1 está publicada en la bibliografía (solicitud de patente internacional n.º 2012042433, 5 de abril de 2012, Didiuk, Mary Theresa *et al.* "Preparation of pyrazolospiroketone acetyl-CoA carboxylase").

40

Síntesis del Ácido 2



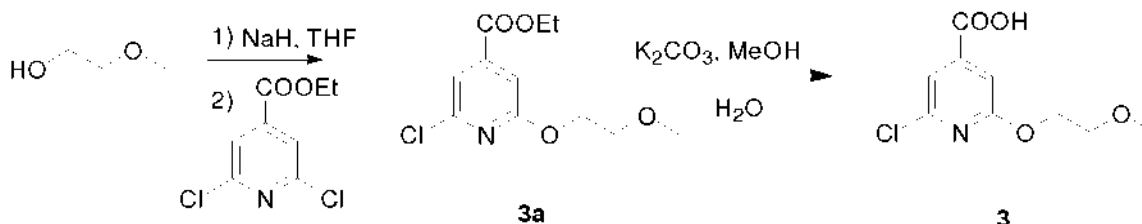
5 Preparación del Compuesto intermedio 2b:

A una solución del Compuesto 2a (1,5 g, 6,84 mmol) en *n*-propanol (10 ml) se añadió ⁿPrONa de sodio (3,4 ml, 2 M), y se agitó a 50 °C durante 48 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se diluyó con hielo (10 g) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se secaron los extractos combinados sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando (1,4 g, 79 %) del Compuesto 2b. RMN de ¹H (300 Hz, CDCl₃) δ 7,41 (s, 1 H), 7,20 (s, 1 H), 4,22-4,35 (m, 4 H), 1,75-1,82 (m, 4 H), 0,99-1,15 (m, 6 H).

Preparación del Ácido 2:

A una solución del Compuesto 2b (1,48 g, 5,75 mmol) en metanol (15 ml) y agua (7 ml) se añadió carbonato de potasio (1,6 g, 11,59 mmol) y se agitó a TA durante 16 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se diluyó con agua (15 ml), se acidificó con KHSO₄, se filtró el sólido y se secó (2,910 mg, 74 %). RMN de ¹H (300 Hz, CDCl₃) δ 8,21 (s, 1 H), 7,44 (s, 1 H), 7,24 (s, 1 H), 4,28 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H), 1,76-1,83 (m, 2 H), 1,01 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H).

20 Síntesis del Ácido 3



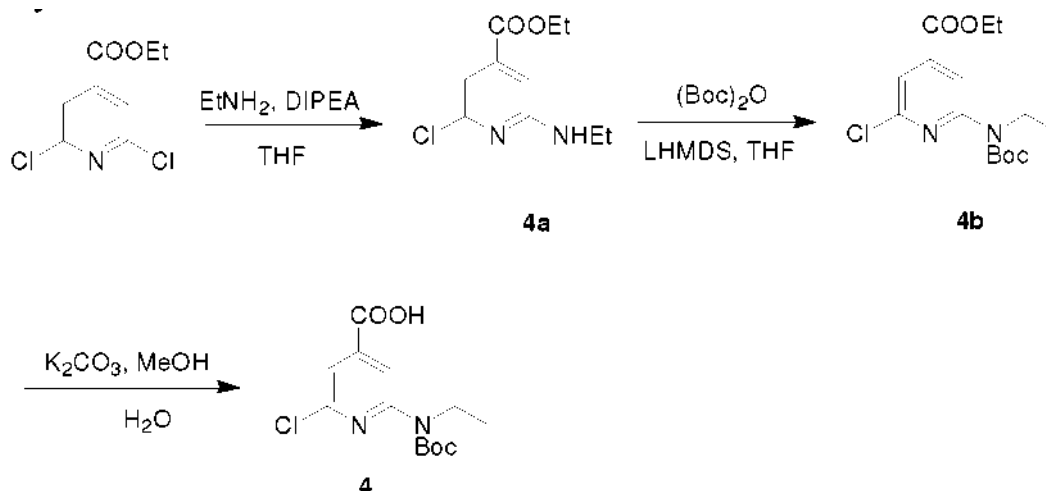
Preparación del Compuesto intermedio 3a:

A una solución de hidruro de sodio (115 mg, 4,79 mmol, 1,05 equiv) en THF seco (10 ml), se añadió gota a gota 2-metoxietanol a 0 °C y se agitó durante 30 minutos. Se añadió esta solución a 2,6-dicloroisonicotinato de etilo (1,0 g, 4,57 mmol, 1,0 equiv) en THF seco (5 ml) a temperatura ambiente, y luego se calentó a 50 °C durante una noche. Se neutralizó la reacción mediante la adición de HCl 2 N (2,5 ml, 5 mmol). Se eliminó el disolvente, se añadió agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se secaron los extractos combinados sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando 3a. (600 mg, 51 %) RMN de ¹H (MeOD): δ 7,42 (s, 1H), 7,22 (s, 1H), 4,46-4,35 (m, 4H), 3,75 (m, 2H), 3,40 (s, 3H), 1,40 (t, 3H).

Preparación del Ácido 3:

A una solución del Compuesto 3a (600 mg, 2,31 mmol) en metanol (10 ml) y agua (4 ml) se añadió carbonato de potasio (635 mg, 4,6 mmol) y se agitó a TA durante 16 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se diluyó con agua (10 ml), se acidificó con KHSO₄ y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se secaron los extractos combinados sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando 3 (320 mg, 59 %). RMN de ¹H (MeOD): δ 7,41 (s, 1 H), 7,22 (s, 1 H), 4,45 (t, 2H), 3,74 (t, 2H), 3,40 (s, 3H).

Síntesis de Ácido 4



5 Preparación de Compuesto intermedio 4a:

En una solución del Compuesto 2a (2,5 g, 10,9 mmol), se calentaron etilamina (5,45 ml, 2 M) y DIPEA (2 ml) en THF (20 ml) en un tubo cerrado herméticamente a 75 °C durante 16 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se diluyó con agua (15 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml). Se secaron los extractos combinados sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando el compuesto en bruto. Además, la purificación mediante cromatografía en columna usando una columna de gel de sílice proporcionó el Compuesto 4a deseado (450 mg, 17 %) RMN de ¹H (300 Hz, CDCl₃) δ 7,08 (s, 1 H), 6,80 (s, 1 H), 4,40 (c, J = 7,2, 14,3 Hz, 2 H), 3,31 (c, J = 7,2, 14,1 Hz, 2 H), 1,39 (t, J = 6,9 Hz, 3 H), 1,24 (t, J = 6,9 Hz, 3 H).

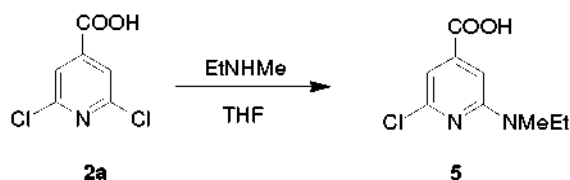
15 Preparación del Compuesto intermedio 4b:

A una solución del Compuesto 4a (400 mg, 1,68 mmol) en THF (5 ml) a -10 °C se añadió LHMDS (2 ml, 1 M) lentamente en gotas. Tras 30 min se añadió (Boc)₂O (440 mg, 2,01 mmol) en THF, y se llevó lentamente a TA y se agitó durante 30 min. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se diluyó con solución saturada de NH₄Cl (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se secaron los extractos combinados sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando (1,4 g, 79 %) del Compuesto 4b. RMN de ¹H (300 Hz, CDCl₃) δ 8,19 (s, 1 H), 7,52 (s, 1 H), 4,40 (c, J = 7,2, 14,4 Hz, 2 H), 4,00 (c, J = 7,2, 14,1 Hz, 2 H), 1,54 (s, 9 H), 1,37 (t, J = 6,9 Hz, 3 H), 1,23 (t, J = 6,9 Hz, 3 H).

25 Preparación del Ácido 4:

A una solución del Compuesto 4b (1,00 g, 2,95 mmol), en metanol (12 ml) y agua (3 ml), se añadió carbonato de potasio (800 mg, 5,79 mmol), y se agitó a TA durante 16 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se diluyó con agua (15 ml), se acidificó con KHSO₄, se filtró el sólido y se secó, obteniéndose el Compuesto 4 deseado (910 mg, 74 %). RMN de ¹H (300 Hz, CDCl₃) δ 8,31 (s, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 4,02 (c, J = 7,2, 14,2 Hz, 2 H), 1,55 (s, 9 H), 1,25 (t, J = 7,2 Hz, 3 H).

Síntesis del Ácido 5

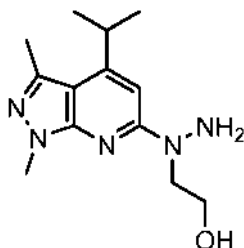


Preparación del Ácido 5:

En una solución del Compuesto 2a (1,0 g, 5,20 mmol), se calentaron N-etilmetilamina (1,5 g, 25,42 mmol) en agua (3 ml) hasta el refluxo durante 48 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida. Triturando con IPE y hexano se proporcionó el Compuesto 5 deseado (300 mg, 27 %). RMN de ¹H (300 Hz, CDCl₃) δ 11,90 (s, 1 H), 7,04 (s, 1 H), 6,97 (s, 1 H), 3,59 (c, J = 6,9, 14,4 Hz, 2 H), 4,00 (s, 3 H), 1,17 (t, J = 6,9 Hz, 3 H).

Procedimiento general para la reacción del siguiente derivado de pirazolopiridina con isocyanatos.

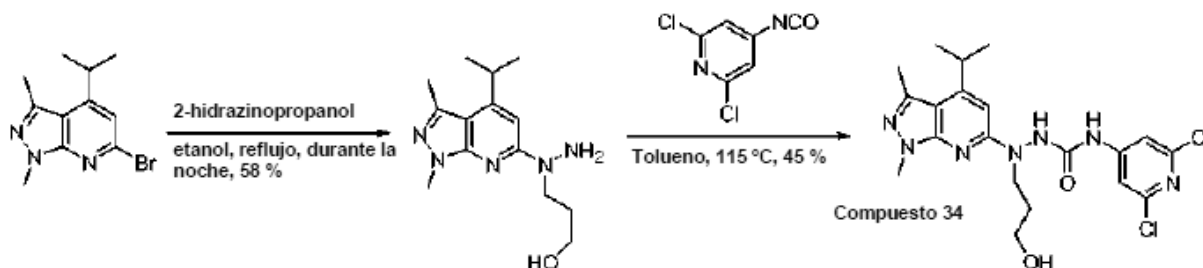
2-(1-(4-Isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazinil)etan-1-ol:



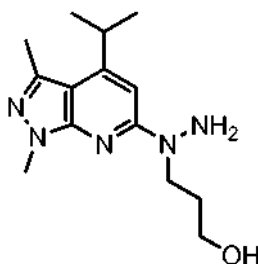
Se agitó una solución de derivado de hidrazina (100 mg, 0,38 mmol) en THF seco (10 ml) a temperatura ambiente, a la que se añadió una solución del isocianato apropiado (~1,3 equiv, 0,5 mmol) en tolueno (10 ml) gota a gota, y se agitó durante 12 h o hasta que se hubo completado según el control de TLC. Se concentró la reacción en bruto y se purificó mediante cromatografía de columna usando diclorometano/acetato de etilo 1:1 como el eluyente, dando el producto deseado.

Síntesis del Compuesto 34 [no reivindicado]

N-(2,6-Dicloropiridin-4-il)-2-(2-hidroxipropil)-2-(4-isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazina-1-carboxamida (Compuesto 34):



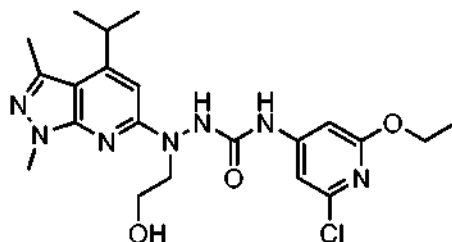
2-(1-(4-Isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazinil)propan-1-ol



Se añadió 2-hidrazinopropanol (3,35 g, 37,2 mmol) a una solución de 1*H*-6-bromo-4-isopropil-1,3-dimetil-pirazolo[3,4-*b*]piridina (500 mg, 1,87 mmol) en etanol (2,5 ml) y se calentó a reflujo durante una noche. Tras enfriar, se agitó durante 4 h en un baño de hielo. Se filtró el material en bruto y se trituro el sólido obtenido con una solución acuosa de etanol al 50 % (5 ml), se filtró y se secó a presión reducida a 60 °C, dando 2-(1-(4-isopropil-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-6-il)hidrazinil)propan-1-ol en forma de un sólido blanco, B-2 (300 mg, rendimiento del 58 %).

RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 6,89 (1H, s), 4,95 (2H, s a), 4,28 (1H, s a), 3,99 (2H, m), 3,85 (3H, s), 3,58 (2H, t), 3,48 (1H, m), 2,57 (3H, s), 1,93 (2H, m), 1,33 (3H, s), 1,31 (3H, s).

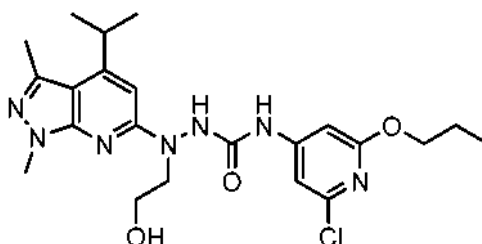
Compuesto 35



- 5 Método A (75 mg, 43 %, 3 etapas) RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 8,91 (1H, s), 7,06 (1H, s), 6,85 (1H, s), 6,65 (1H, s), 6,60 (1H, s), 4,45 (1H, s a), 4,30 (2H, ct), 4,16 (2H, m), 3,90 (3H, s), 3,51 (2H, m), 2,80 (1H, s a), 2,60 (3H, s), 1,31 (6H, m), 1,29 (3H, m). IEN+(M+H) m/z = 462,1.

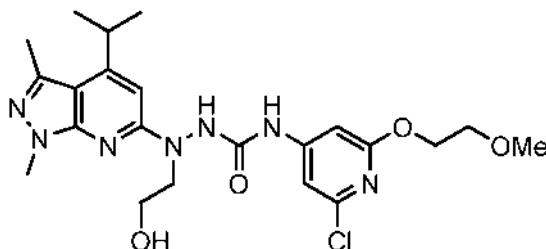
Compuesto 36

10



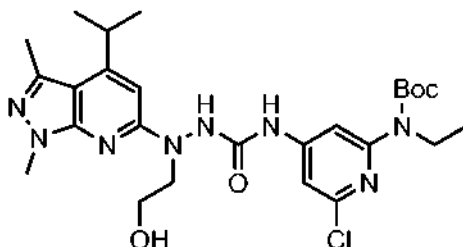
- 15 Método A (80 mg, 45 %, 3 etapas) RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 8,99 (1H, s), 7,05 (1H, s), 6,87 (1H, s), 6,81 (1H, s), 6,60 (1H, s), 4,45 (1H, s a), 4,160 (2H, t), 4,10 (2H, m), 3,87 (3H, s), 3,48 (2H, m), 3,20 (1H, s a), 2,59 (3H, s), 1,75 (2H, m), 1,30 (6H, d), 0,97 (3H, t). IEN+(M+H) m/z = 476,1.

Compuesto 37



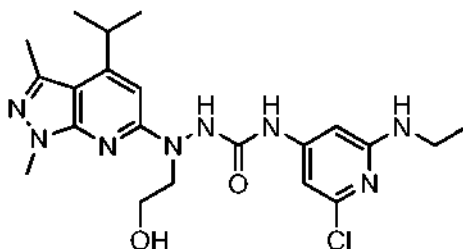
- 20 Método A (80 mg, 44 %, 3 etapas) RMN de ^1H 400 MHz (CDCl_3) δ 8,91 (1H, s), 7,11 (1H, s), 6,89 (1H, s), 6,62 (1H, s), 6,58 (1H, s), 4,55 (1H, s a), 4,51 (2H, m), 4,09 (2H, m), 3,91 (3H, s), 3,67 (2H, m), 3,49 (2H, m), 3,39 (3H, s), 2,71 (1H, s a), 2,59 (3H, s), 1,30 (6H, d). IEN+(M+H) m/z = 492,1.

25 Compuesto 38-Boc



- 30 Método A (120 mg, 56 %, 3 etapas) RMN de ^1H 400 MHz (CDCl_3) δ 8,96 (1H, s), 7,58 (2H, d), 6,81 (1H, s a), 6,62 (1H, s), 4,49 (1H, s a), 4,17-4,06 (2H, m a), 3,96 (2H, m), 3,91 (3H, s), 3,48 (2H, m), 3,03 (1H, s a), 2,62 (3H, s), 1,48 (9H, s), 1,30 (6H, d), 1,17 (3H, t). IEN+(M+H) m/z = 561,2.

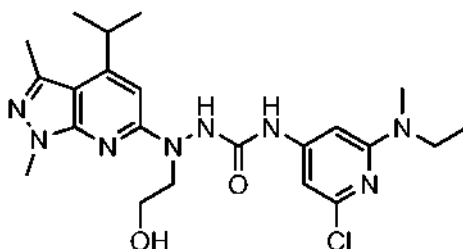
Compuesto 38 – Sal HCl



- 5 Se disolvió el derivado de Boc anterior en diclorometano (1 ml) enfriado hasta 0-5 °C en un baño de hielo y se añadió solución de HCl 2 M en éter (1 ml) y se agitó durante una noche. Se filtró el sólido obtenido, se secó en un horno de vacío, proporcionando 60 mg de la sal clorhidrato. RMN de ^1H 400 MHz (MeOD- d_4) δ 7,31 (1H, s), 6,99 (1H, s), 6,71 (1H, s a), 4,49 (1H, s a), 4,09-3,99 (2H, m a) 3,96 (2H, m), 3,93 (3H, s), 3,67 (1H, m), 3,53 (2H, m), 3,38 (2H, m), 2,64 (3H, s), 1,32 (6H, d) 1,12 (3H, t). IEN+(M+H) m/z = 461,1.

10

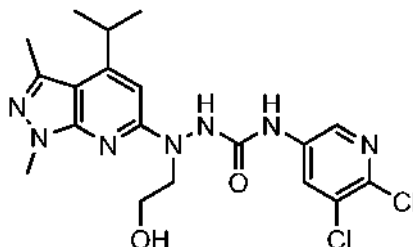
Compuesto 39



- 15 Método A (110 mg, 61 %, 3 etapas) RMN de ^1H 400 MHz (DMSO) δ 9,47 (1H, s), 8,96 (1H, s a), 6,88 (1H, s a), 6,61 (1H, s), 6,49 (1H, s), 5,38, 4,73 (1H, s a), 4,17-3,86 (2H, m a) 3,80 (3H, s), 3,80-3,71 (2H, m a), 3,45 (2H, m), 2,89 (3H, s), 2,50 (3H, s), 1,23, (6H, d), 1,03 (3H, t). IEN+(M+H) m/z = 475,1.

20

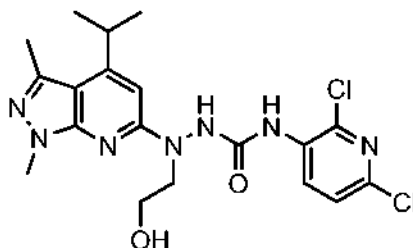
Compuesto 40



- 25 Método B (55 mg, 32 %, 3 etapas) RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 9,08 (1 H, s), 8,35 (1H, s), 8,23 (1H, s), 6,70 (1H, s), 6,61 (1H, s), 4,49 (1H, s a), 4,17-4,06 (2H, m a), 3,91 (3H, s), 3,49 (2H, m), 3,11 (1H, s a), 2,60 (3H, s), 1,30 (6H, d). IEN+(M+H) m/z = 452,1.

25

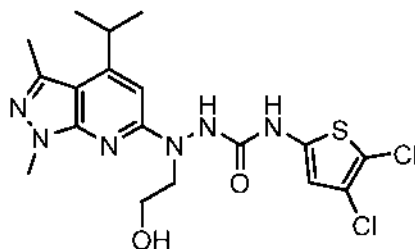
Compuesto 41



30

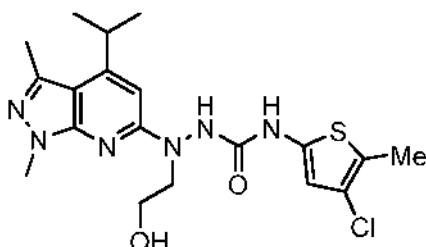
- Método A (95 mg, 55 %, 3 etapas) RMN de ^1H 400 MHz (CDCl_3) δ 9,08 (1 H, s), 8,36 (1H, d), 8,22 (1H, d), 6,71 (1H, s a), 6,62 (1H, s), 4,29 (1H, s a), 4,2-4,17 (2H, m a) 3,96 (2H, m), 3,451 (2H, m), 3,12 (1H, s a), 2,60 (3H, s), 1,32 (6H, d). IEN+(M+H) m/z = 452,1.

Compuesto 42



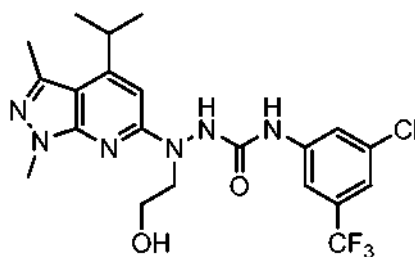
- 5 Método A (45 mg, 26 %, 3 etapas) RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ 9,54 (1H, s), 6,81 (1H, s a), 6,60 (1H, s), 6,25 (1H, s), 4,45 (1H, s a), 4,11-4,08 (2H, m a), 3,84 (3H, s), 3,49 (2H, m), 2,89 (1H, s a), 2,60 (3H, s), 1,30 (6H, d). IEN+(M+H) m/z = 457,0.

Compuesto 43



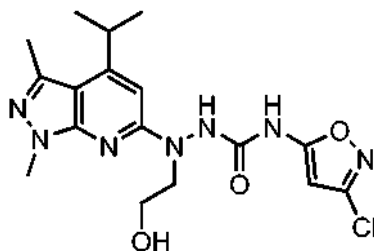
- 10
15 Método B (90 mg, 54 %, 3 etapas) RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3 + MeOD-4) δ 6,49 (1H, s a), 6,21 (1H, s), 4,19-4,06 (2H, m a), 3,83 (3H, s), 3,48-3,38 (2H, m a), 3,35 (1H, m), 2,47 (3H, s), 2,16 (3H, s), 1,19 (6H, d). IEN+(M+H) m/z = 437,1.

Compuesto 44



- 20 Método A (110 mg, 60 %, 3 etapas) RMN de ^1H 300 MHz (CDCl_3 + MeOD-4) δ 9,18 (1H, s), 7,76 (1H, s), 7,61 (1H, s), 7,19 (1H, s), 6,59 (1H, s), 4,43 (1H, s a), 4,07-3,92 (2H, m a), 3,85 (3H, s), 3,60-3,48 (2H, m), 2,54 (3H, s), 1,27 (6H, d). IEN+(M+H) m/z = 485,1.

Compuesto 45



- 25
30 Método B (90 mg, 58 %, 3 etapas) RMN de ^1H 400 MHz (CDCl_3 + MeOD-4) δ 6,50 (1H, s a), 6,22 (1H, s), 4,34 (1H, s a), 4,17-4,06 (2H, m a), 3,82 (3H, s), 3,43 (2H, m), 2,52 (3H, s), 1,26 (6H, d). IEN+(M+H) m/z = 408,1.

AFINIDADES DE UNIÓN IN VITRO

Se ensayó una serie de compuestos expuestos anteriormente de acuerdo con la presente invención para determinar la afinidad de unión por los receptores S1P₂ y S1P₅ (véase más adelante). Las determinaciones del porcentaje de inhibición de antagonista se obtuvieron ensayando compuestos de muestra y haciendo referencia a los pocillos de control (CE₈₀) para cada perfil (GPCR), que evaluaba la unión a receptores S1P₂ y S1P₅. Las muestras se procesaron usando un solo protocolo de ensayo de adición. El diseño del protocolo es el siguiente.

I. Solución madre maestra

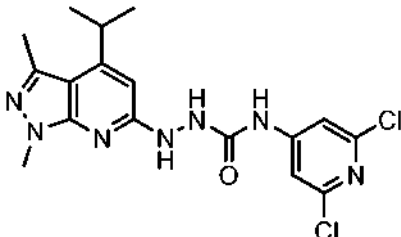
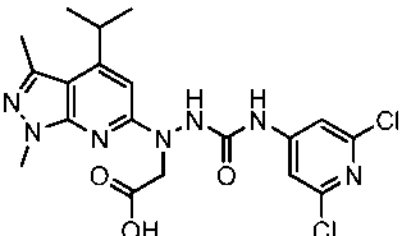
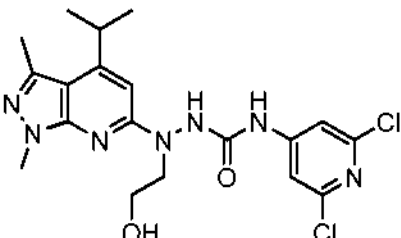
A menos que se especifique otra cosa, los compuestos de muestra se diluyeron en DMSO anhidro al 100 %, incluyendo todas las diluciones. Los compuestos se ensayaron como la sal citrato (1 equivalente por molécula). Si el compuesto de muestra se proporciona en un disolvente diferente, todas las diluciones de la solución madre maestra se realizan en el disolvente especificado. Todos los pocillos de control contenían concentraciones finales de disolvente idénticas a las de los pocillos del compuesto de muestra.

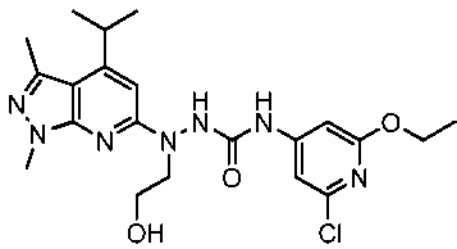
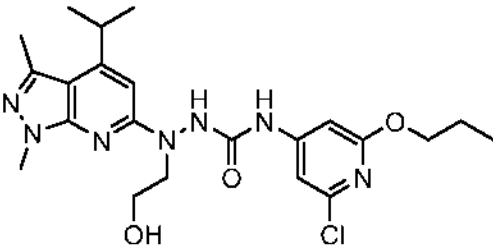
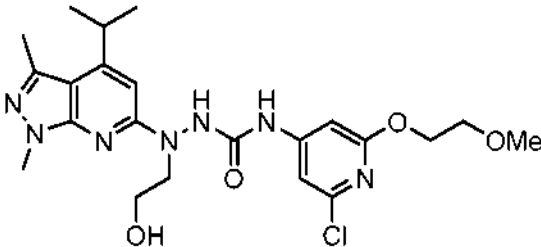
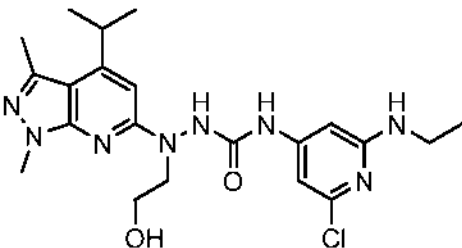
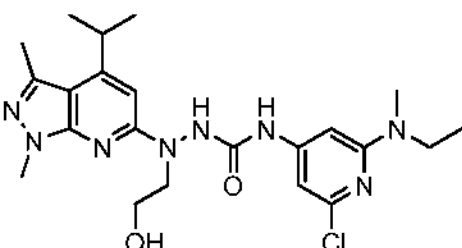
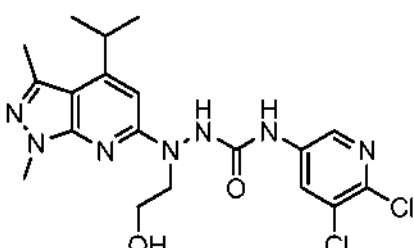
II. Ensayo de placa de los compuestos

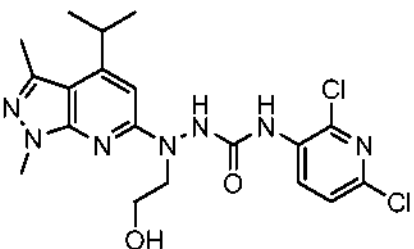
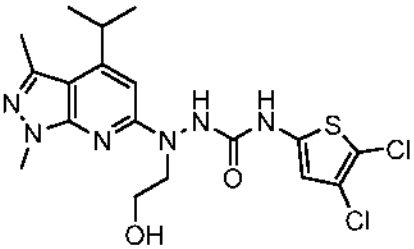
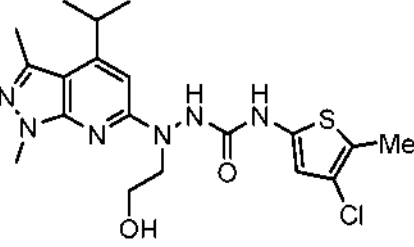
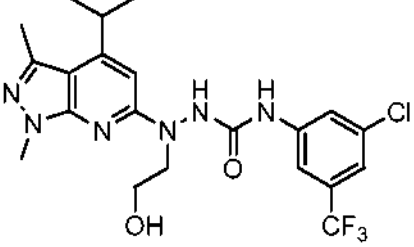
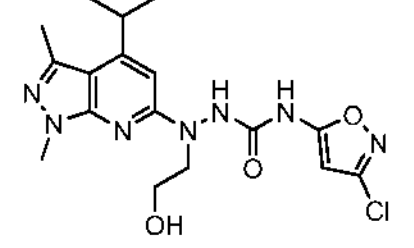
Se transfirieron los compuestos de muestra de una solución madre maestra a una placa hija que se usó en el ensayo. Se diluyó cada compuesto de muestra en un tampón de ensayo (1 x HBSS con HEPES 20 mM, Probenecid 2,5 mM y BSA de ácido graso libre al 0,4 %) a una concentración apropiada, obteniéndose las concentraciones finales especificadas.

III. Formato del ensayo de antagonistas

Usando los valores de CE₈₀ que se determinaron en tiempo real, se estimularon todos los compuestos de muestra preincubados y se compararon los antagonistas de referencia (si procede) con los valores de CE₈₀ del agonista de referencia. Estos se leyeron durante 180 segundos usando el FLIPR^{TETRA} (este ensayo añadió agonista de referencia a los respectivos pocillos, después se recogieron las mediciones de fluorescencia para calcular los valores de CI₅₀). Se sometieron todas las placas a correcciones basales apropiadas. Una vez que se procesaron las correcciones basales, se exportaron los valores máximos de fluorescencia y se manipularon los datos para calcular el porcentaje de activación, el porcentaje de inhibición y Z'. Los resultados están en la siguiente tabla, y muestran que estos compuestos se unen inesperadamente a los receptores tanto S1P₂ como S1P₅.

Compuesto	Estructura	CI ₅₀ de S1P ₂	CI ₅₀ de S1P ₅
JTE013		11 nM	1,3 nM
2.		11 nM	3,2 nM
9.		7,0 nM	20,9 nM

Compuesto	Estructura	Cl ₅₀ de S1P ₂	Cl ₅₀ de S1P ₅
35.		29 nM	13 nM
36.		10 nM	33 nM
37.		160 nM	>10 μM
38.		4 nM	4,6 nM
39.		19 nM	40 nM
40.		300 nM	>10 μM

Compuesto	Estructura	Cl ₅₀ de S1P ₂ >10 µM	Cl ₅₀ de S1P ₅ >10 µM
41.			
42.		64 nM	290 nM
43.		360 nM	>10 µM
44.		120 nM	74 nM
45.		>10 µM	>10 µM

Sumario de ADME-Tox *in vitro*

Para obtener información adicional sobre la unión a proteínas y el metabolismo de JTE013 y del Compuesto 1 y del Compuesto 2 se realizaron estudios de unión a proteínas plasmáticas y aclaramiento intrínseco microsomal *in vitro*. Los resultados se presentan a continuación.

Tabla 5. Sumario de unión a proteínas plasmáticas

Compuesto	Concentración de ensayo	Especie	Fracción media unida (%)
Warfarina	5 nM	ratón	92,1
Propanolol	5 nM	ratón	87,4
Compuesto 1	5 nM	ratón	99,9
Compuesto 2	5 nM	ratón	77,0

Compuesto	Concentración de ensayo	Especie	Fracción media unida (%)
JTE013	5 nM	ratón	99,7

Tabla 6. Sumario de aclaramiento intrínseco microsomal

Compuesto	Conc. de ensayo (μM)	Especie	Clint ^a dependiente de NADPH (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)	T1/2 ^b dependiente de NADPH (min)	Clint ^a libre de NADPH (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)	T1/2 ^b libre de NADPH (min)
Verapamilo	1	ratón	398	5,8	9	>180
Warfarina	1	ratón	15	157	10	>180
Compuesto 1	1	ratón	1.172	2	48	48
Compuesto 2	1	ratón	20	113	9	>180
JTE013	1	ratón	770	3,0	22	105

^aAclaramiento intrínseco microsomal^bSemivida

El verapamilo es un control metabolizado, mientras que la warfarina es un control no metabolizado.

- 5 A la luz del estudio toxicológico inicial de ADME *in vitro* con el uso de la unión a proteínas plasmáticas y el aclaramiento intrínseco microsomal, es evidente que el control conocido JTE013 y el Compuesto 1 se comportan de manera muy similar en ambos ensayos, mientras que el Compuesto 2 fue mucho más estable en microsomas hepáticos y resultó tener menor unión a proteínas plasmáticas. Para aclarar más las propiedades de estas moléculas, se estudió el aclaramiento de los compuestos tras la inyección intravenosa en ratones. El Compuesto 1
- 10 había mejorado sustancialmente la farmacocinética, frente a JTE013, que resultó ser mejor que el Compuesto 2 (véase el área bajo las curvas). Con una mayor potencia para la unión a los receptores y mayores niveles en plasma del fármaco tras 2 h, cabría esperar una mayor eficacia *in vivo* para el Compuesto 1. Cabe mencionar las diferencias entre el metabolismo *in vivo* y la farmacocinética de los tres compuestos. La fuerte unión a proteínas del Compuesto 1 debe compensar el metabolismo en el hígado. El grupo carboxilo libre del Compuesto 2 puede conducir a la
- 15 glucoronilación y la excreción más rápida de lo que podría sugerir el estudio del metabolismo *in vitro*, o que la disminución de la unión a la proteína es perjudicial.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los agonistas del receptor de S1P anteriormente enumerados pueden comprender agentes farmacológicos adicionales usados en el tratamiento de trastornos relacionados con la permeabilidad vascular y la apoptosis de las células endoteliales vasculares. Los agentes farmacológicos adicionales adecuados incluyen, por ejemplo, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, hormonas, fármacos antiinflamatorios esteroideos (por ejemplo, prednisona, corticosteroides y similares), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, AINE, aspirina, paracetamol y similares); y combinaciones que comprenden uno o más de los agentes farmacológicos adicionales anteriores.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Así pues, los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para la administración por inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o de la nariz) o administración oral, bucal, parenteral o rectal.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados mediante medios conocidos en la técnica con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato cálcico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio); y combinaciones que comprenden uno o más de los excipientes anteriores. Los comprimidos se pueden recubrir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichos preparados líquidos se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); conservantes (por ejemplo, metil- o propil-*p*-hidroxi-benzoatos o ácido sórbico); y combinaciones que comprenden uno o más de los aditivos anteriores. Los preparados también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado.

Los preparados para la administración oral pueden formularse adecuadamente para dar una liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados mediante técnicas conocidas en la materia. Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, di-cloro-difluorometano, tri-clorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

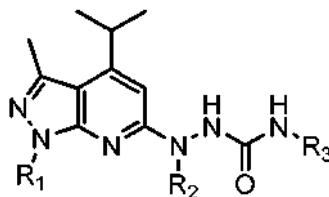
Los compuestos también pueden formularse para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también pueden formularse como un preparado de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así pues, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Por tanto, en el presente documento se contempla que los compuestos antagonistas selectivos del receptor S1P₂ de la presente invención pueden formularse como las composiciones descritas anteriormente en cantidades farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de trastornos oculares angiogénicos, enfermedades oculares neoplásicas y ceguera, así como para el tratamiento de trastornos fibróticos de las enfermedades pulmonares, renales, hepáticas y cutáneas mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente aceptable de las mismas en una cualquiera de una serie de las composiciones vehículo descritas anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 (S1P₂) de fórmula:



en la que R₁ es -CH₃, R₂ es -CH₂CO₂H o -CH₂CH₂OH, y R₃ es 2,6-dicloropiridina sustituida en 4, 2-cloro-6-hidroxietil-piridina sustituida en 4, 2-cloro-6-hidroxipropil-piridina sustituida en 4, 2-(aminoetil)-6-cloro-piridina sustituida en 4, 2-(aminoetilmetil)-6-cloro-piridina sustituida en 4, 2,3-dicloro-tiofeno sustituido en 5 y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables.

2. El antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 de la reivindicación 1, en el que R₁ es -CH₃, R₂ es -CH₂CH₂OH y R₃ es 2,6-dicloropiridina sustituida en 4 y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables.

3. El antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 de la reivindicación 1, en el que R₁ es -CH₃, R₂ es -CH₂CH₂OH, R₃ es 2-cloro-6-hidroxietil-piridina sustituida en 4 y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables.

4. El antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 de la reivindicación 1, en el que R₁ es -CH₃, R₂ es -CH₂CH₂OH, R₃ es 2-cloro-6-hidroxipropil-piridina sustituida en 4 y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables.

5. Una composición farmacéutica que comprende el antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 de cualquier reivindicación anterior en combinación con uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables.

6. Una composición farmacéutica que comprende el antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con un agente farmacológico adicional seleccionado del grupo que consiste en agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, hormonas, fármacos antiinflamatorios esteroideos, prednisona, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), aspirina, paracetamol y sus mezclas.

7. Una composición farmacéutica que comprende el antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables formulados para la administración por inhalación, por insuflación, por vía oral, bucal, parenteral o rectal.

8. Una composición farmacéutica que comprende el antagonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 2 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con uno o más excipientes fisiológicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en agentes aglutinantes; cargas, lubricantes; disgregantes; agentes humectantes; y combinaciones de los mismos.

9. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en terapia.

10. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de enfermedades pulmonares, renales, hepáticas y cutáneas fibróticas.

11. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad ocular neoplásica.

12. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la inhibición de la angiogénesis anómala en el ojo.

13. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la prevención de la ceguera en el ojo.