

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 160**

51 Int. Cl.:

A01N 43/78 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2010 PCT/US2010/056760**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11060392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2010 E 10830880 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2498610**

54 Título: **Moduladores selectivos del receptor de la esfingosina 1 fosfato y métodos de síntesis quirál**

30 Prioridad:

18.11.2009 US 262474 P

13.11.2009 US 261301 P

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

20.06.2018

73 Titular/es:

CELGENE INTERNATIONAL II SÀRL (100.0%)

Rue des Moulins

2108 Couvet , CH

72 Inventor/es:

MARTINBOROUGH, ESTHER;

BOEHM, MARCUS, F.;

YEAGER, ADAM, RICHARD;

TAMIYA, JUNKO;

HUANG, LIMING;

BRAHMACHARY, ENUGURTHI;

MOORJANI, MANISHA;

TIMONY, GREGG, ALAN;

BROOKS, JENNIFER, L.;

PEACH, ROBERT;

SCOTT, FIONA, LORRAINE y

HANSON, MICHAEL, ALLEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 673 160 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

Moduladores selectivos del receptor de la esfingosina 1 fosfato y métodos de síntesis quirál

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a compuestos que son agonistas del receptor esfingosina 1-fosfato subtipo 1, a los métodos para sus síntesis y divulga métodos para su uso terapéutico y/o profiláctico.

10 **Antecedentes**

El receptor S1P₁/EDG₁ es un receptor acoplado a la proteína G (GPCR) y es un miembro de la familia del receptor del gen de diferenciación celular endotelial (EDG). Los ligandos endógenos de los receptores EDG incluyen lisofosfolípidos, tales como esfingosina-1-fosfato (S1P). Como todos los GPCR, la unión del receptor propaga señales de mensajeros secundarios mediante la activación de proteínas G (alfa, beta y gamma).

El desarrollo de agonistas y antagonistas de la molécula pequeña S1P₁ ha proporcionado pistas de algunos papeles fisiológicos del sistema de señalización de S1P₁/receptor de S1P. El agonismo del receptor S1P₁ altera el movimiento de los linfocitos, reteniéndolos en los ganglios linfáticos y en otros tejidos linfoides secundarios. Esto conduce a una linfopenia rápida y reversible, y se debe probablemente a la ligadura del receptor a las células endoteliales y linfáticas, y a los propios linfocitos (Rosen et al, Immunol. Rev., 195:160-177, 2003). Una valiosa consecuencia química de la retención de los linfocitos es su exclusión de la reactividad por inflamación y/o autoinmunitaria en tejidos periféricos.

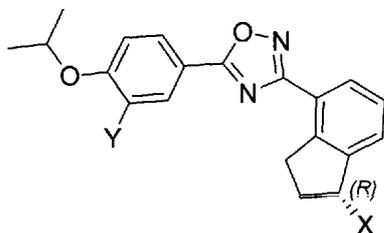
También se ha notificado que el agonismo de S1P₁ fomenta la supervivencia de precursores de oligodendrocitos (Miron et al, Ann. Neurol., 63:61-71,2008). Esta actividad, junto con la retención de linfocitos, sería de utilidad en el tratamiento de dolencias inflamatorias y autoinmunitarias del sistema nervioso central.

El documento WO 2009/151529 A1 es la técnica anterior de acuerdo con el Artículo 54(3) del EPC y describe compuestos heterocíclicos adaptados para actuar como agonistas del agonista SIP subtipo 1 (S1P1). El documento WO 2004/058149 A2 describe 1-(amino)indanos y (1,2-dihidro-3-amino)-benzofuranos, benzotiofenos e indoles como agonistas del receptor Edgl. También estos compuestos son activos en el receptor S1P1 y tiene por tanto actividades inmunosupresoras. El documento US 5 180 741 A describe ésteres pirentrinoideos que transportan un núcleo de indenilo y el uso de dichos compuestos como pesticidas.

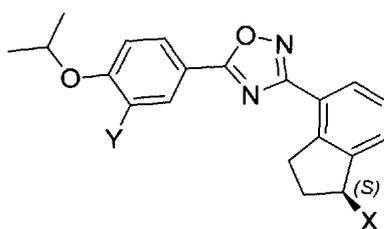
Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos heterocíclicos adaptados para actuar como agonistas del receptor S1P subtipo 1, S1P₁; a los métodos de preparación, y describe métodos de uso, tales como en el tratamiento de una patología mediada por la activación de S1P₁, o cuando la activación de S1P₁ está médicamente indicada.

La materia sujeto de la presente invención es un compuesto de Fórmula I-R o Fórmula I-S o una mezcla de los mismos en cualquier relación:



I-R

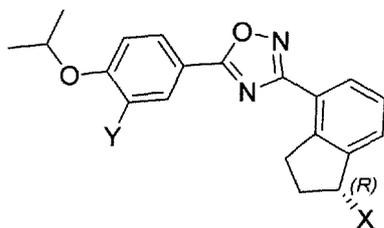


I-S

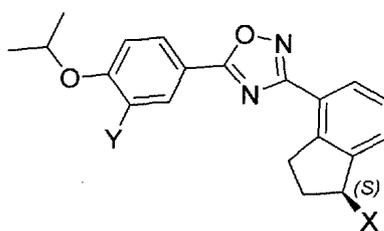
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que X es -NH₂, o -NHCH₂COOH, e Y es -CN.

Además, la composición anteriormente mencionada comprende un compuesto de la invención junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Para finalizar, la invención se refiere a un compuesto de Fórmula I-R o Fórmula I-S, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) a una frecuencia y durante una duración de tiempo suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al paciente,



I-R



I-S

10 en el que

X es NH_2 , $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, o $\text{-NHCH}_2\text{COOH}$, e
Y es -CN .

15 En determinadas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un excipiente adecuado.

20 En determinadas realizaciones se proporciona un método de uso de un compuesto inventivo que comprende la preparación de un medicamento.

25 En determinadas combinaciones se proporciona una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un segundo medicamento. En varias realizaciones, el segundo medicamento está médicamente indicado para el tratamiento de esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, síndrome de dificultad respiratoria aguda o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

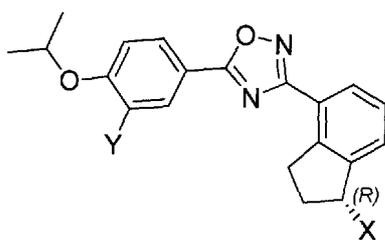
30 En determinadas realizaciones, se proporciona un método de activación o agonismo de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 que comprende poner en contacto el receptor subtipo 1 con un compuesto de la reivindicación 1. En diversas realizaciones, el compuesto de la reivindicación 1 activa o agoniza el receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 en un mayor grado en que el compuesto activa o agoniza un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 3.

35 En ciertas realizaciones, se proporciona un método de tratamiento de una patología en un paciente para el cual la activación o agonismo de un receptor S1P_1 está médicamente indicada. En varias realizaciones, la activación o agonismo selectivo de un receptor S1P_1 , tal como con respecto a un receptor S1P_3 , está médicamente indicada. En diversas realizaciones, la patología comprende esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, o síndrome de la dificultad respiratoria agua.

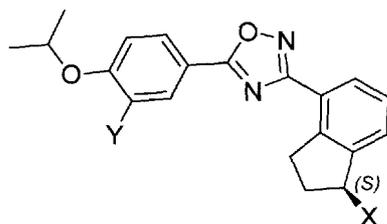
40 En determinadas realizaciones, se proporciona un método para la síntesis quiral de determinados compuestos incluidos los compuestos de la invención. En determinadas realizaciones diferentes, la invención proporciona determinados compuestos intermedios asociados con dichos métodos de síntesis quiral.

Descripción detallada de la invención

45 Ciertas realizaciones de la presente invención comprenden un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I-R o IS o una sal, un homólogo, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



I-R



I-S

5 X se define como antes. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención tienen la estructura de Fórmula **I-R** o una sal, éster, profármaco, homólogo, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. En otras realizaciones, los compuestos de la invención tienen la estructura de Fórmula **I-S** o una sal, éster, profármaco, homólogo, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

10 En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos que son prácticamente enantioméricamente puros.

En ciertas realizaciones la invención proporciona compuestos que tienen una CE_{50} como un agonista del receptor S1P subtipo 1 natural que es al menos diez veces más pequeño que la CE_{50} de dicho compuesto como un agonista de un receptor SIP subtipo 1 mutante que tiene una única mutación con respecto al receptor SIP subtipo 1 natural de tal manera que el resto de aminoácido 101° está cambiado de asparagina a alanina.

15 En ciertas realizaciones la invención proporciona compuestos que tienen una CE_{50} como un agonista del receptor S1P subtipo 1 natural que es al menos veinte veces más pequeño que la CE_{50} de dicho compuesto como un agonista de un receptor SIP subtipo 1 mutante que tiene una única mutación con respecto al receptor SIP subtipo 1 natural de tal manera que el resto de aminoácido 101° está cambiado de asparagina a alanina.

20 En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos que tienen un índice terapéutico de al menos 5 según se mide en ratas después de 5 o 14 días de dosificación de las ratas con el compuesto, donde el índice terapéutico se calcula como un cociente entre (i) la dosis más alta de dicho compuesto que consigue un aumento menor o igual al diez por ciento en la relación entre el peso del pulmón y el peso corporal terminal a la finalización de estos 5 o 14 días de dosificación, y (ii) la dosis de dicho compuesto que consigue un 50 % de linfopenia en ratas. En determinadas realizaciones, dicho índice terapéutico es al menos 10 y, en ciertas realizaciones, el índice terapéutico es al menos 20. En determinadas realizaciones, el índice terapéutico de un compuesto es al menos cinco veces mayor que el índice terapéutico del enantiómero de dicho compuesto.

25 En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos que tienen un índice terapéutico de al menos 5 según se mide en ratas después de 5 o 14 días de dosificación de las ratas con el compuesto, donde el índice terapéutico se calcula como un cociente entre (i) la dosis más alta de dicho compuesto que consigue un aumento menor o igual al diez por ciento en la relación entre el peso del pulmón y el peso corporal terminal a la finalización de estos 5 o 14 días de dosificación, y (ii) la dosis de dicho compuesto que consigue un 50 % de linfopenia en ratas. En determinadas realizaciones, dicho índice terapéutico es al menos 10 y, en ciertas realizaciones, el índice terapéutico es al menos 20. En determinadas realizaciones, el índice terapéutico de un compuesto es mayor que el índice terapéutico del enantiómero de dicho compuesto. En determinadas realizaciones, el índice terapéutico de un compuesto es al menos el 150 % del índice terapéutico del enantiómero de dicho compuesto.

30 En determinadas realizaciones, se proporciona un compuesto de la invención de Fórmula I en el que el compuesto tiene al menos un centro quiral y es prácticamente enantioméricamente puro.

35 En otras realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I de la invención y un excipiente adecuado.

40 En otras realizaciones, se proporciona una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un segundo medicamento. En otras realizaciones adicionales, se proporciona una combinación farmacéutica que

comprende un compuesto de la invención y un segundo medicamento en la que el segundo medicamento está médicamente indicado. para el tratamiento de esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

- 5 En determinadas realizaciones, se proporciona un método de uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento.

En determinadas realizaciones, se divulga un método de activación o agonismo de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 mediante el contacto del receptor subtipo 1 con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. En realizaciones adicionales, se proporciona un método de activación o agonismo de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 mediante el contacto del receptor subtipo 1 con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, en el que el compuesto activa o agoniza el receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 en un mayor grado en que el compuesto activa o agoniza un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 3. En realizaciones adicionales, se proporciona un método de activación o agonismo de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 mediante el contacto del receptor subtipo 1 con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, en el que el receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 se dispone en un mamífero vivo.

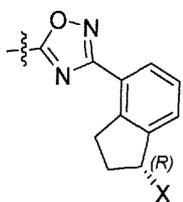
En determinadas realizaciones, se proporciona un método para el tratamiento de una patología en un paciente para el que la activación o agonismo de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicada, mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención al paciente con una frecuencia y una duración temporal suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al paciente. En realizaciones adicionales, se proporciona un método para el tratamiento de una patología en un paciente para el que la activación o agonismo de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicada, mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención al paciente con una frecuencia y una duración temporal suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al paciente, en el que la activación o agonismo selectivo de un receptor SIP subtipo 1 con respecto a otros subtipos del receptor SIP está médicamente indicada. En otras realizaciones adicionales, se proporciona un método para el tratamiento de una patología en un paciente para el que la activación o agonismo de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicada, mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención al paciente con una frecuencia y una duración temporal suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al paciente, en el que la patología comprende rechazo de órganos o tejido trasplantado; enfermedades de injerto contra hospedador producidas por trasplante; síndromes autoinmunitarios incluidos artritis reumatoide; síndrome de la dificultad respiratoria aguda; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; gripe; cáncer; eritematoso sistémico; tiroiditis de Hashimoto; tiroiditis linfocítica; esclerosis múltiple; miastenia grave; diabetes tipo I y tipo II; uveítis; uveítis posterior; uveítis asociada a la enfermedad de Behcet; síndrome de uveomeningitis; encefalomielitis alérgica; vasculopatía crónica por aloinjerto; enfermedades autoinmunitarias postinfecciosas incluyendo fiebre reumática y glomerulonefritis postinfecciosa; enfermedades de la piel inflamatorias e hiperproliferativas; manifestaciones cutáneas de trastornos mediados inmunológicamente; psoriasis; dermatitis atópica; osteomielitis; dermatitis de contacto; dermatitis eccematosa; dermatitis seborreica; liquen plano; pénfigo; pénfigo ampolloso; epidermolisis ampollosa; urticaria; angioedema; vasculitis; eritema; eosinofilia cutánea; acné; alopecia areata; queratoconjuntivitis; conjuntivitis vernal; queratitis; queratitis herpética; distrofia del epitelio corneal; leucoma corneal; pénfigo ocular; úlcera de Mooren; queratitis ulcerosa; escleritis; oftalmopatía de Graves; síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada; sarcoidosis; alergias al polen; enfermedad obstructiva reversible de las vías respiratorias; asma bronquial; asma alérgica; asma intrínseca; asma extrínseca; asma debida al polvo; asma crónica o inveterada; asma tardía, e hipersensibilidad de las vías respiratorias; bronquitis; úlceras gástricas; enfermedades isquémicas intestinales; enfermedades inflamatorias intestinales; enterocolitis necrosante; lesiones intestinales asociadas con quemaduras térmicas; enfermedades celíacas; proctitis; gastroenteritis eosinófila; mastocitosis; enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; lesión vascular producida por enfermedades isquémicas y trombosis; aterosclerosis; corazón graso; miocarditis; infarto cardiaco; arteriosclerosis; síndrome de aortitis; caquexia debida a enfermedad vírica; trombosis vascular; migraña; rinitis; nefropatía intersticial; nefropatía inducida por IgA; síndrome de Goodpasture; síndrome urémico-hemolítico; nefropatía diabética; glomeruloesclerosis; glomerulonefritis; miositis múltiple; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de Meniere; polineuritis; neuritis múltiple; mononeuritis; radiculopatía; hipertiroidismo; enfermedad de Basedow; tirotoxicosis; aplasia pura de glóbulos rojos; anemia aplásica; anemia hipoplásica; púrpura trombocitopénica idiopática; anemia hemolítica autoinmunitaria; agranulocitosis; anemia perniciosa; anemia megaloblástica; aneritroplasia; osteoporosis; sarcoidosis; pulmón fibroide; neumonía intersticial idiopática; dermatomiositis; leucoderma vulgar; ictiosis vulgar; sensibilidad fotoalérgica; linfoma cutáneo de linfocitos T; poliarteritis nodosa; corea de Huntington; corea de Sydenham; miocardosis; escleroderma; granuloma de Wegener; síndrome de Sjogren; adiposis; fascitis eosinofílica; lesiones de las encías, periodonto, hueso alveolar, sustancia ósea dental; alopecia masculina o alopecia senil; distrofia muscular; pioderma; síndrome de Sezary; insuficiencia adrenal crónica; enfermedad de Addison; lesión de isquemia por reperusión en órganos que se produce tras la conservación; choque por endotoxinas; colitis pseudomembranosa; colitis producida por fármacos o radiación; insuficiencia renal aguda isquémica; insuficiencia renal crónica; cáncer de pulmón; neoplasia de origen linfoide; linfocítica aguda o crónica; leucemias; linfoma; psoriasis; lesión pulmonar inflamatoria, enfisema pulmonar; cataratas; siderosis; retinitis pigmentosa; degeneración macular senil; cicatrización del vítreo; enfermedad inflamatoria del ojo; quemadura en la córnea por álcali; dermatitis con eritema; dermatitis herpetiforme; dermatitis cementada; gingivitis; periodontitis; septicemia; pancreatitis; carcinogénesis; metástasis de carcinoma; hipobaropatía; hepatitis

autoinmunitaria; cirrosis biliar primaria; colangitis esclerosante; resección hepática parcial; necrosis hepática aguda; cirrosis; cirrosis alcohólica; insuficiencia hepática; insuficiencia hepática fulminante; insuficiencia hepática de inicio tardía; insuficiencia hepática "aguda en la cronicidad". En otras realizaciones adicionales, la patología es uno o más de rechazo de órganos o tejido trasplantado; enfermedades de injerto contra hospedador producidas por trasplante; 5 síndromes autoinmunitarios incluidos artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave; alergias al polen; diabetes de tipo I; prevención de psoriasis; enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa, síndrome de la dificultad respiratoria aguda; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; gripe; enfermedades autoinmunitarias posteriores a infección incluida la fiebre reumática y la glomerulonefritis posterior a infección; y metástasis de carcinoma. En otras realizaciones adicionales, la patología es una de gripe, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, 10 síndrome de dificultad respiratoria aguda o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para el uso de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento adaptado para el tratamiento de un trastorno o patología en la que la activación o la inhibición de un receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicada. 15

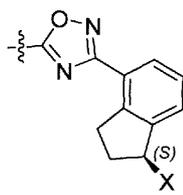
Se describe en el presente documento un método para la síntesis quiral de un compuesto que comprende un resto indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros del resto indano donde el compuesto está enantioméricamente enriquecido con respecto al carbono quiral. En dichas realizaciones, el método de la invención proporciona las etapas de (i) proporcionar un compuesto que comprende un resto indano donde el anillo de carbono del anillo de cinco miembros del resto indano donde se desea la sustitución quiral está oxo sustituido en dicho carbono; y (ii) hacer reaccionar dicho compuesto con un reactivo quiral seleccionado entre el grupo que consiste en una oxazaborolidina de Corey Bakshi Shibata y una sulfonamida quiral de la forma RS(=O)NH₂ donde R es un grupo voluminoso [por ejemplo t-butilo]. En ciertas realizaciones R es t-butilo, sec-butilo, isopropilo, ciclopropilo, adamantilo, alquilo C₃₋₆ ramificado, u opcionalmente cicloalquilo C₃₋₈ que forma puente. En determinadas de las mencionadas realizaciones, el reactivo quiral es una oxazaborolidina de Corey Bakshi Shibata y el compuesto que comprende un resto indano está enantioméricamente enriquecido con respecto a un enlace carbono-oxígeno en un anillo de carbono del anillo de cinco miembros del resto indano. En realizaciones adicionales, el reactivo quiral es (R)-(-)-(2)-metil-CBS-oxazaborolidina o (S)-(-)-(2)-metil-CBS-oxazaborolidina. 20 25

En determinadas de las mencionadas realizaciones, el compuesto que comprende un resto indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros del resto indano es un compuesto que comprende un resto oxadiazol-indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros del resto indano de Fórmula III-R o III-S: 30



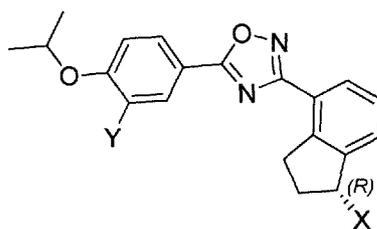
III-R

35

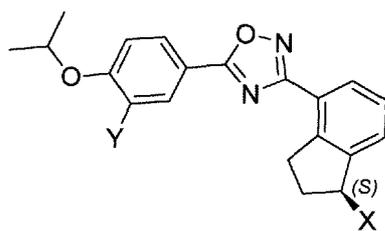


III-S

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un método para la síntesis quiral de la estructura de Fórmula I-R o I-S o una sal, éster, profármaco, homólogo, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo: 40



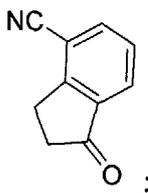
I-R

**I-S**

Donde X e Y son como se han definido anteriormente y donde el compuesto está enantioméricamente enriquecido con respecto al carbono quiral. En dichas realizaciones, el método de la invención proporciona las etapas de

5

(i) proporcionar el compuesto



10

y

(ii) hacer reaccionar dicho compuesto con un reactivo quiral seleccionado entre el grupo que consiste en una oxazaborolidina de Corey Bakshi Shibata y una sulfonamida quiral de la forma $RS(=O)NH_2$ donde R es un grupo voluminoso [por ejemplo t-butilo], alquilo ramificado o cicloalquilo]; y

15

(iii) formar un centro quiral en el carbono del resto indano previamente unido al grupo oxo ya sea haciendo reaccionar dicho compuesto con un agente reductor adecuado junto con el reactivo quiral en la etapa (ii) o bien hacer reaccionar el resultado de la reacción de dicho compuesto con un agente reductor adecuado.

En determinadas de las mencionadas realizaciones, el reactivo quiral es una oxazaborolidina de Corey Bakshi Shibata-y X es $-OR^m$. En realizaciones adicionales, el reactivo quiral es (R)-(-)-(2)-metil-CBS-oxazaborolidina o (S)-(-)-(2)-metil-CBS-oxazaborolidina.

20

En determinadas de las mencionadas realizaciones, el reactivo quiral es $RS(=O)NH_2$ donde R es alquilo o cicloalquilo ramificado y X es NR^1R^2 . En dichas realizaciones adicionales, el reactivo quiral es t-Bu-S(=O)NH₂.

25

En determinadas de las mencionadas realizaciones, un agente reductor adecuado incluye un borohidruro tal como BH_3-DMS o $NaBH_4$.

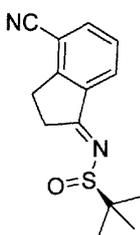
Las etapas adicionales para la preparación de dichos compuestos se pueden adaptar a partir de los métodos sintéticos divulgados en el presente documento que incluyen recristalización y otros procesos de purificación.

30

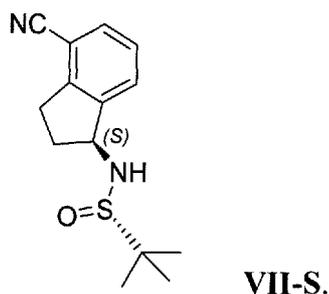
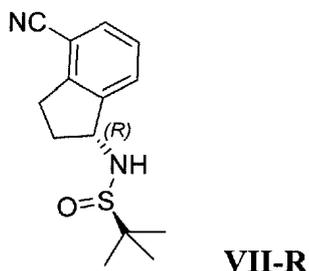
en otras determinadas realizaciones, la invención proporciona un método de sintetizar un compuesto quiral de la invención (i) proporcionando un compuesto que comprende un resto indano donde el anillo de carbono de cinco miembros del resto indano donde se desea la sustitución quiral está oxo sustituido en dicho carbono; (ii) hacer reaccionar dicho compuesto con un reactivo quiral seleccionado entre el grupo que consiste en una oxazaborolidina de Corey Bakshi Shibata y una sulfonamida quiral de la forma $RS(=O)NH_2$ donde R es un grupo voluminoso [por ejemplo t-butilo u otro alquilo o cicloalquilo ramificado]; y (iii) formar un centro quiral en el carbono del resto indano previamente unido al grupo oxo ya sea haciendo reaccionar dicho compuesto con un agente reductor adecuado junto con el reactivo quiral en la etapa (ii) o bien hacer reaccionar el resultado de la reacción de dicho compuesto con un agente reductor adecuado.

40

En determinadas realizaciones, el compuesto que comprende un resto indano proporcionado en la etapa (i) se pone en contacto con el reactivo quiral para formar en la etapa (ii) la Fórmula VI:

**VI.**

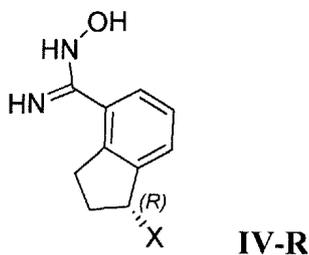
En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula **VII-R** o **VII-S** se forma en la etapa (iii):



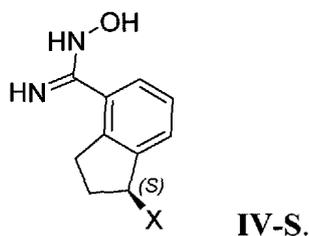
5

En determinadas realizaciones, el compuesto que comprende un resto indano en la etapa (i) tiene un sustituyente ciano en la posición 4 del anillo de indano.

- 10 En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de (iv) tratar el compuesto con un centro quiral en el carbono del este indano resultante de la etapa (iii) con una hidroxilamina o a clorhidrato de hidroxilamina para convertir el sustituyente ciano en una hidroxiamidina en la posición 4 del resto indano que tiene la Fórmula **IV-R** o **IV-S**:



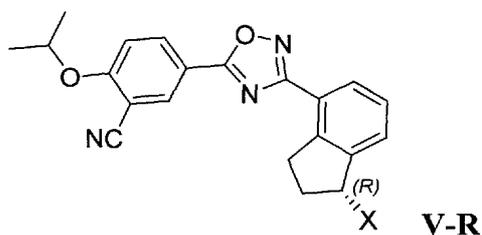
15

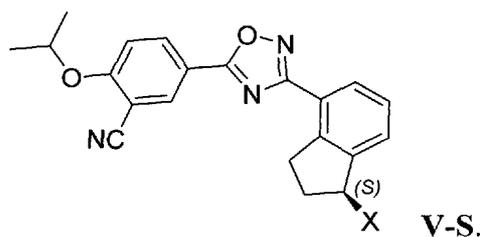


20

En realizaciones adicionales, la etapa (iv) se realiza en presencia de una base.

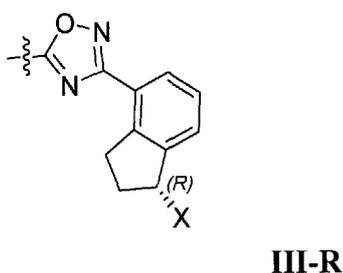
En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de (v) poner en contacto la Fórmula **IV-R** o **IV-S** con ácido benzoico sustituido y un reactivo de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula **V-R** o **V-S**:



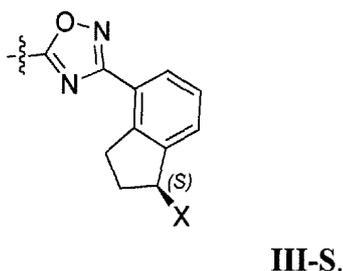


5 En realizaciones adicionales, el reactivo de acoplamiento utilizado en la etapa (v) es una mezcla que comprende hidroxibenzotriazol (HOBt) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). Otros reactivos de acoplamiento adecuados, por ejemplo, HOAt, HATU, HBTU, HOObt, se pueden usar en la reacción de la invención.

En determinadas realizaciones, el compuesto que comprende un resto indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros del resto indano es un compuesto de la Fórmula III-R o III-S:

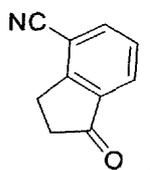


10



15 En determinadas realizaciones, la invención proporciona un compuesto que comprende un resto indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros del resto indano de la divulgación.

En determinadas realizaciones, el compuesto que comprende un resto indano donde el carbono del anillo del anillo de cinco miembros del resto indano donde se desea la sustitución quiral está oxo sustituido en dicho carbono



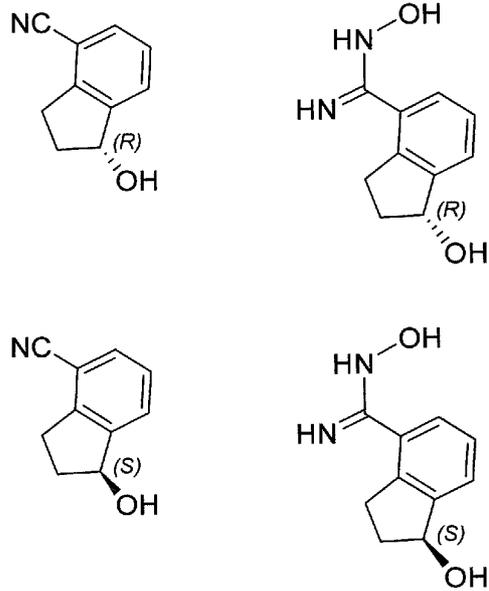
20

25 En determinadas de las mencionadas realizaciones, la invención proporciona un método para la síntesis quiral de un compuesto quiral que comprende un resto indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros del resto indano o un compuesto quiral que comprende un resto oxadiazol-indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros del resto indano donde el compuesto quiral tiene un enriquecimiento enantiomérico de al menos 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %.

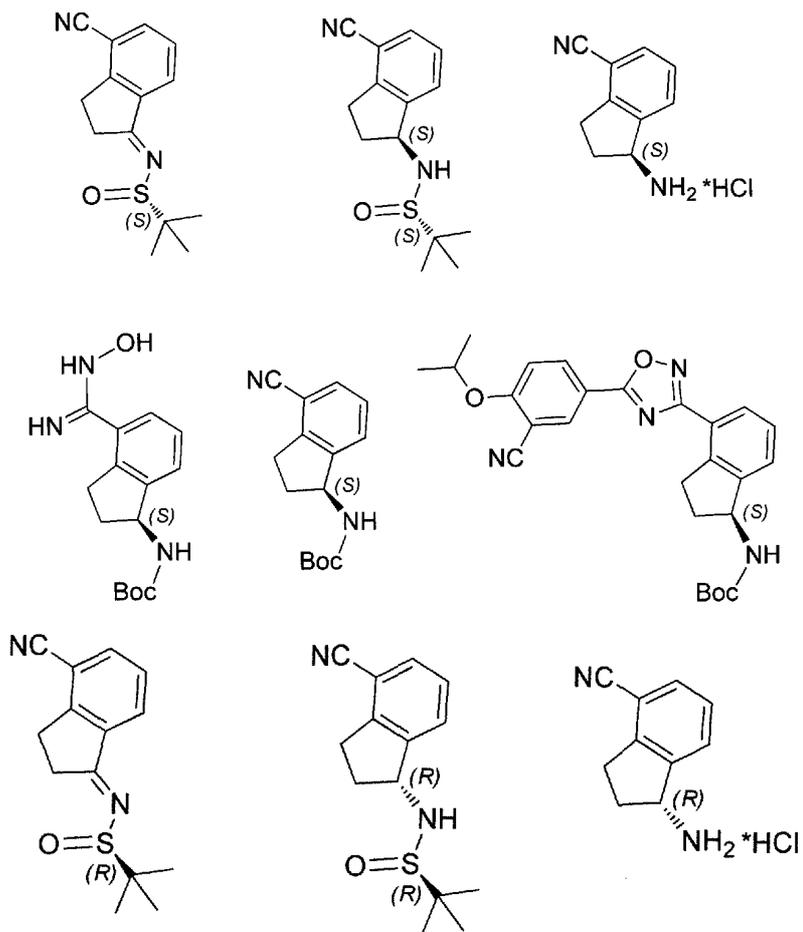
30 En determinadas de las mencionadas realizaciones, la invención proporciona un método para la síntesis de un compuesto quiral de la invención que tiene un enriquecimiento enantiomérico de al menos un 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %.

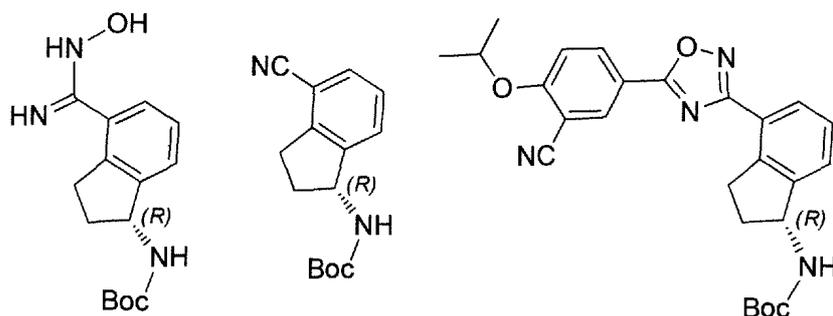
35 En determinadas realizaciones, la invención proporciona compuestos que pueden ser compuestos intermedios de los métodos descritos en el presente documento para la síntesis quiral. En ciertas de estas realizaciones, la invención proporciona uno o más de los siguientes compuestos:

35



En otras de dichas realizaciones, la invención proporciona uno o más de los siguientes compuestos:





5 En determinadas realizaciones, se proporciona un método para la síntesis de un compuesto que comprende un resto de indano que tiene un carbono quiral en el anillo de cinco miembros donde el compuesto está enantioméricamente enriquecido con respecto al átomo de carbono quiral. En determinadas realizaciones, se proporciona un método que comprende una etapa de proporcionar un compuesto de las estructuras descritas en el presente documento.

10 Los grupos protectores pueden convertir la funcionalidad química en inerte con respecto a condiciones de reacción específicas, y se pueden unir y eliminar de dicha funcionalidad en una molécula sin dañar sustancialmente el resto de la molécula. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con grupos protectores adecuados para su uso en los métodos sintéticos de la invención. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

15 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" o "una" y "el" o "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 Tal como se usa en el presente documento, "individuo" (como en el sujeto del tratamiento) significa tanto mamíferos como no mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos; primates no humanos, por ejemplo simios y monos; ganado bovino; caballos; ovejas; y cabras. Los animales que no son mamíferos incluyen, por ejemplo, peces y aves.

25 El término "S1P₁", como se usa en el presente documento, se refiere al subtipo 1 de un receptor de la esfingosina-1-fosfato, mientras que otros subtipos del receptor de la esfingosina-1-fosfato se denominan de la manera correspondiente, por ejemplo, el receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 3 se denomina "S1P₃".

30 Un "receptor", como es bien conocido en la técnica, es una entidad biomolecular que normalmente comprende una proteína que se une específicamente a una clase estructural de ligandos o a un único ligando natural en un organismo vivo, cuya unión hace que el receptor transduzca la señal de unión a otro tipo de acción biológica, tal como la señalización a una célula de que se ha producido el evento de unión, lo que hace que la célula altere su función de alguna forma. Un ejemplo de transducción es la unión al receptor de un ligando que ocasiona una alteración en la actividad de una "proteína G" en el citoplasma de una célula viva. Cualquier molécula, natural o no, que se une a un receptor y lo activa para la transducción de la señal, se denomina "agonista" o "activador".
35 Cualquier molécula, natural o no, que se une a un receptor, pero no provoca la transducción de la señal, y que puede bloquear la unión de un agonista y su transducción de la señal consecuente, se denomina "antagonista".

40 Un "compuesto S1P₁" o "agonista de S1P₁" o "activador de S1P₁" o "inhibidor de S1P₁" o "antagonista de S1P₁", que son los términos utilizados en el presente documento, se refieren a los compuestos que interactúan en cierta forma con el receptor S1P subtipo 1. Pueden ser agonistas o activadores, o pueden ser antagonistas o inhibidores. Un "compuesto S1P₁" de la invención puede tener una acción selectiva sobre el subtipo 1 de la familia de receptores SIP; por ejemplo un compuesto de la invención puede actuar a una concentración más baja sobre el subtipo 1 de la familia de receptores SIP que otros subtipos de la familia de receptores SIP; más específicamente, un "compuesto S1P₁" de la invención puede actuar de forma selectiva sobre los receptores de subtipo 1 en comparación con los receptores de subtipo 3, o "S1P₃".

45 En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención son agonistas ortostáticos. En otras determinadas realizaciones, los compuestos de la invención son agonistas alostéricos. Los agonistas de un receptor se pueden clasificar en ortoestéricos o alostéricos. Un agonista ortoestérico se une a un sitio del receptor que solapa significativamente con la unión del ligando natural y replica las interacciones clave del ligando natural con el receptor. Un agonista ortoestérico activará el receptor mediante un mecanismo molecular similar al del ligando natural, será competitivo por el ligando natural, y estará antagonizado de forma competitiva por agentes farmacológicos que sean antagonistas competitivos del ligando natural. Un agonista alostérico se une a un sitio del receptor que realiza algunas interacciones significativas que no son total o parcialmente solapantes con el ligando natural. Los agonistas alostéricos son agonistas verdaderos y no potenciadores alostéricos. Por consiguiente,
50 activan la señalización del receptor en solitario y sin necesidad de una concentración submáxima del ligando natural. Los agonistas alostéricos se pueden identificar cuando un agonista conocido por ser competitivo por el ligando
55

ortoestérico muestra antagonismo no competitivo. El sitio agonista alostérico también se puede cartografiar mediante mutagénesis del receptor. La introducción de mutaciones puntuales únicas en los receptores que retienen la activación del receptor por un agonista alostérico, aunque disminuyen o eliminan la señalización inducida por el agonista ortoestérico o viceversa, proporcionan evidencias formales en las interacciones de unión. Los agonistas ortoestéricos pueden desestabilizar la estructura y la conformación del GPCR, mientras que los agonistas alostéricos pueden tanto estabilizar como desestabilizar la estructura y la conformación del GPCR. Los agonistas alostéricos, debido a sus diferentes interacciones con el receptor, pueden ser farmacéuticamente útiles porque el sitio alostérico puede transmitir oportunidades adicionales de potencia agonista y selectividad dentro de una familia de subtipos de receptores relacionados que comparten un ligando ortoestérico similar. Además, el sitio alostérico puede requerir propiedades físicas y químicas muy diferentes de un agonista, en comparación con el ligando ortoestérico. Estas propiedades fisicoquímicas, que incluyen hidrofobicidad, aromaticidad, distribución de carga y solubilidad, también pueden proporcionar ventajas para generar agonistas de farmacocinética variable, biodisponibilidad oral, perfiles de distribución y metabólicos que facilitan el desarrollo de sustancias farmacéuticas eficaces.

"Prácticamente" como el término utilizado en el presente documento significa completamente o casi completamente; por ejemplo, una composición que está "prácticamente exenta" de un componente bien no tiene nada del componente o bien contiene una cantidad tan en nivel de traza que cualquier propiedad funcional relevante de la composición no se ve afectada por la presencia de la cantidad traza, o un compuesto es "prácticamente puro" si solamente contiene cantidades poco importantes en nivel de traza de las impurezas presentes.

Prácticamente enantioméricamente puro significa un nivel de enriquecimiento enantiomérico de un enantiómero con respecto al otro enantiómero de al menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 %.

"Tratar" o "tratamiento" dentro del significado del presente documento se refiere al alivio de síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o la inhibición de una evolución o empeoramiento adicionales de dichos síntomas, o la prevención o profilaxia de la enfermedad o trastorno.

La expresión "cantidad eficaz", cuando se utiliza para describir el uso de un compuesto de la invención para proporcionar una terapia a un paciente que padece un trastorno o patología mediada por un receptor de la esfingosina-1-fosfato del subtipo 1 se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención que es eficaz para unirse como agonista o como antagonista al receptor S1P₁ en los tejidos del individuo, en los que el S1P₁ está implicado en el trastorno, en el que dicha unión se produce en cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico beneficioso sobre el paciente. De forma análoga, tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz", o una "cantidad terapéuticamente eficaz", de un compuesto de la invención se refiere a una cantidad del compuesto que alivia, en todo o en parte, los síntomas asociados con el trastorno o dolencia, o detiene o ralentiza la evolución o empeoramiento adicional de dichos síntomas, o previene o proporciona profilaxia para el trastorno o dolencia. En particular, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado actuando como agonista de la actividad del receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 (S1P₁). Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales de los compuestos de la invención quedan superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Por ejemplo, en el contexto de tratar una patología mediada por la activación de S1P₁, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de S1P₁ de la invención es una cantidad suficiente para controlar la patología, mitigar la evolución de la patología, o aliviar los síntomas de la patología. Los ejemplos de patologías que se pueden tratar de esta forma incluyen esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

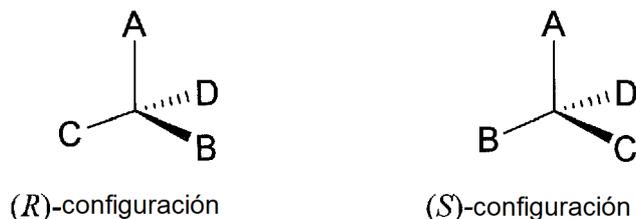
Las enfermedades, los trastornos y las dolencias que se pueden tratar mediante los compuestos de la invención incluyen rechazo de órganos o tejido trasplantados; enfermedades de injerto contra hospedador producidas por trasplante; síndromes autoinmunitarios incluidos artritis reumatoide; síndrome de la dificultad respiratoria aguda; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; gripe; cáncer; eritematoso sistémico; tiroiditis de Hashimoto; tiroiditis linfocítica; esclerosis múltiple; miastenia grave; diabetes tipo I y tipo II; uveítis; uveítis posterior; uveítis asociada a la enfermedad de Behcet; síndrome de uveomeningitis; encefalomielitis alérgica; vasculopatía crónica por aloinjerto; enfermedades autoinmunitarias posteriores a infección incluida la fiebre reumática y la glomerulonefritis posterior a infección; enfermedades de la piel inflamatorias e hiperproliferativas; manifestaciones cutáneas de trastornos mediados inmunológicamente; psoriasis; dermatitis atópica; osteomielitis; dermatitis de contacto; dermatitis eccematosa; dermatitis seborreica; liquen plano; pénfigo; pénfigo ampolloso; epidermolisis ampollosa; urticaria; angioedema; vasculitis; eritema; eosinofilia cutánea; acné; alopecia areata; queratoconjuntivitis; conjuntivitis vernal; queratitis; queratitis herpética; distrofia del epitelio corneal; leucoma corneal; pénfigo ocular; úlcera de Mooren; queratitis ulcerosa; escleritis; oftalmopatía de Graves; síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada; sarcoidosis; alergias al polen; enfermedad obstructiva reversible de las vías respiratorias; asma bronquial; asma alérgica; asma intrínseca; asma extrínseca; asma debida al polvo; asma crónica o inveterada; asma tardía, e hipersensibilidad de las vías respiratorias; bronquitis; úlceras gástricas; enfermedades isquémicas intestinales; enfermedades inflamatorias intestinales; enterocolitis necrosante; lesiones intestinales asociadas con quemaduras térmicas; enfermedades celíacas; proctitis; gastroenteritis eosinófila; mastocitosis; enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; lesión vascular producida por enfermedades isquémicas y trombosis; aterosclerosis; corazón graso; miocarditis; infarto cardiaco; arteriosclerosis; síndrome de aortitis; caquexia debida a enfermedad vírica; trombosis vascular; migraña; rinitis;

ecema; nefritis intersticial; nefropatía inducida por IgA; síndrome de Goodpasture; síndrome urémico-hemolítico; nefropatía diabética; glomeruloesclerosis; glomerulonefritis; miositis múltiple; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de Meniere; polineuritis; neuritis múltiple; mononeuritis; radiculopatía; hipertiroidismo; enfermedad de Basedow; tirotoxicosis; aplasia pura de glóbulos rojos; anemia aplásica; anemia hipoplásica; púrpura trombocitopénica idiopática; anemia hemolítica autoinmunitaria; agranulocitosis; anemia perniciosa; anemia megaloblástica; aneritroplasia; osteoporosis; sarcoidosis; pulmón fibroide; neumonía intersticial idiopática; dermatomiositis; leucoderma vulgar; ictiosis vulgar; sensibilidad fotoalérgica; linfoma cutáneo de linfocitos T; poliarteritis nodosa; corea de Huntington; corea de Sydenham; miocardosis; escleroderma; granuloma de Wegener; síndrome de Sjogren; adiposis; fascitis eosinofílica; lesiones de las encías, periodonto, hueso alveolar, sustancia ósea dental; alopecia masculina o alopecia senil; distrofia muscular; pioderma; síndrome de Sezary; insuficiencia adrenal crónica; enfermedad de Addison; lesión de isquemia por reperfusión en órganos que se produce tras la conservación; choque por endotoxinas; colitis pseudomembranosa; colitis producida por fármacos o radiación; insuficiencia renal aguda isquémica; insuficiencia renal crónica; cáncer de pulmón; neoplasia de origen linfoide; linfocítica aguda o crónica; leucemias; linfoma; psoriasis; lesión pulmonar inflamatoria, enfisema pulmonar; cataratas; siderosis; retinitis pigmentosa; degeneración macular senil; cicatrización del vítreo; enfermedad inflamatoria del ojo; quemadura en la córnea por álcali; dermatitis con eritema; dermatitis herpetiforme; dermatitis cementada; gingivitis; periodontitis; septicemia; pancreatitis; carcinogénesis; metástasis de carcinoma; hipobaropatía; hepatitis autoinmunitaria; cirrosis biliar primaria; colangitis esclerosante; resección hepática parcial; necrosis hepática aguda; cirrosis; cirrosis alcohólica; insuficiencia hepática; insuficiencia hepática fulminante; insuficiencia hepática de inicio tardía; insuficiencia hepática "aguda en la cronicidad". Las enfermedades y dolencias especialmente preferidas que se pueden tratar con compuestos de la invención comprenden el grupo que consiste en rechazo de órganos o tejido trasplantados; enfermedades de injerto contra hospedador producidas por trasplante; síndromes autoinmunitarios incluidos artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave; alergias al polen; diabetes de tipo I; prevención de psoriasis; enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa, síndrome de la dificultad respiratoria aguda; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; gripe; enfermedades autoinmunitarias posteriores a infección incluida la fiebre reumática y la glomerulonefritis posterior a infección; y metástasis de carcinoma.

Además, son también útiles los compuestos de Fórmula **I-R** o **I-S**, junto con uno o varios agentes inmunosupresores, para el tratamiento de enfermedades, trastornos y dolencias asociados con un sistema inmunitario activado y que se seleccionan entre la lista anteriormente mencionada. De acuerdo con una realización preferida de la invención, dicho agente inmunosupresor se selecciona entre el grupo que comprende o que consiste en ciclosporina, daclizumab, basiliximab, everolimus, tacrolimus (FK506), azatiopireno, leflunomida, 15-deoxispergualina, u otros fármacos inmunosupresores

Se pretenden todas las formas quirales, diastereómeras, racémicas de una estructura, a no ser que se indique específicamente una estereoquímica o forma isomérica concreta. Los compuestos usados en la presente invención pueden incluir isómeros ópticos enriquecidos o resueltos para todos o cada uno de los átomos asimétricos tal como resulta evidente de las representaciones gráficas, en cualquier grado de enriquecimiento. Tanto las mezclas racémicas como las diastereómeras, así como los isómeros ópticos individuales, se pueden sintetizar de tal forma que estén prácticamente exentos de sus socios enantioméricos o diastereómeros, y todos estos están comprendidos en el alcance de ciertas realizaciones de la invención.

Los isómeros resultantes de la presencia de un centro quiral comprenden un par de isómeros no superponibles que se denominan "enantiómeros". Los enantiómeros individuales de un compuesto puro son ópticamente activos, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. Los enantiómeros individuales se designan de acuerdo con el sistema *Cahn-Ingold-Prelog*. Una vez que se ha determinado el orden de prioridad de los cuatro grupos, la molécula se orienta de forma que el grupo con el orden inferior apunta lejos del observador. Después, si el orden descendente del resto de los grupos se realiza en sentido horario, la molécula se designa (R) y si el rango descendente de los otros grupos procede en el sentido antihorario, la molécula se designa (S). En los ejemplos, el orden *Cahn-Ingold-Prelog* es $A > B > C > D$. El átomo de ordenación inferior, D se orienta en sentido opuesto al observador.



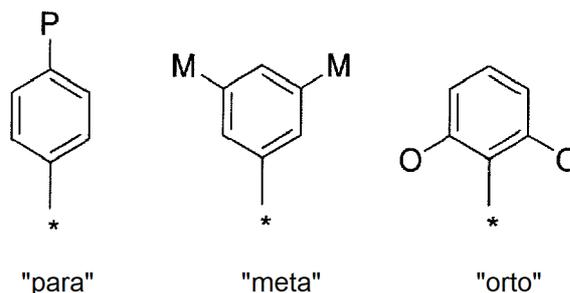
"Isómero óptico aislado" significa un compuesto que está prácticamente purificado del uno o varios isómeros ópticos correspondientes de la misma fórmula. Preferentemente, el isómero aislado tiene aproximadamente un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 % de pureza, incluso más preferentemente al menos un 98 % de pureza, lo más preferido al menos un 99 % de pureza, en peso.

Isomerismo rotacional

Se entiende que debido a las propiedades químicas (*es decir*, resonancia que conduce a un cierto carácter de doble enlace al enlace C-N) de rotación restringida alrededor del enlace de unión a amida (como se ilustra a continuación) es posible observar las especies de rotámeros individuales e incluso, en algunas circunstancias, aislar dichas especies, por ejemplo como se muestra a continuación. Se entiende además que determinados elementos estructurales, incluido el impedimento estérico o los sustituyentes del nitrógeno amida, pueden potenciar la estabilidad de un rotámero en la medida que se pueda aislar un compuesto tal cual, y existir de forma indefinida, como un rotámero estable individual. La presente invención incluye por tanto cualesquiera rotámeros estables posibles de los compuestos de la invención que son biológicamente activos para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o dolencia para los que pueda ser eficaz un compuesto de la invención descrito en el presente documento.

15 *Regioisomerismo*

Los compuestos preferidos de la presente invención tienen una disposición espacial concreta de los sustituyentes de los anillos aromáticos, relativa a la relación entre la estructura y la actividad demostrada por la clase de compuestos. Frecuentemente, dicha disposición de sustituciones se denota por un sistema de numeración; sin embargo, frecuentemente los sistemas de numeración no son coherentes entre diferentes sistemas de anillos. En sistemas aromáticos de seis miembros, las disposiciones espaciales se especifican mediante la nomenclatura común "para" en la sustitución 1,4, "meta" en la sustitución 1,3 y "orto" en la sustitución 1,2 como se muestra a continuación.



Todas las estructuras abarcadas en una reivindicación son "químicamente factibles", lo que significa que la estructura representada por cualquier combinación o subcombinación de sustituyentes opcionales citada en las reivindicaciones tiene una existencia físicamente capaz con al menos cierta estabilidad como se puede determinar por las leyes de la química estructural y mediante experimentación. Las estructuras que no son químicamente factibles no están incluidas dentro de un conjunto de compuestos reivindicado.

Los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene", "compuesto de", son elementos abiertos tal como se usan en el presente documento, y no impiden la existencia de elementos o componentes adicionales. En un elemento de una reivindicación, el uso de formas "que comprende", "que incluye", "que tiene", o "compuesto de" significa que cualquiera elemento que esté comprendido, tenido, incluido o compuesto, no es necesariamente el único elemento abarcado por el sujeto de la cláusula que contiene dicho término.

Una "sal" como es bien conocido en la técnica, incluye un compuesto orgánico tal como un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, o una amina, en forma iónica, en combinación con un contraión. Por ejemplo, los ácidos en su forma aniónica pueden formar sales con cationes tales como cationes de metales, por ejemplo peroxodisulfato de sodio, potasio y similares; con sales de amonio tales como NH_4^+ o los cationes de diversas aminas, incluidas las sales de tetraalquilamonio tales como sales de tetrametilamonio y sales de alquilamonio tales como sales de trometamina, u otros cationes tales como trimetilsulfonio, y similares. Una sal "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" es una sal formada a partir de un ion que se ha autorizado para consumo humano y por lo general no es tóxico, tal como una sal de cloruro o una sal de sodio. Un "ion híbrido" es una sal interna tal como la que se puede formar en una molécula que tiene al menos dos grupos ionizables, uno que forma un anión y el otro que forma un catión, que sirven para equilibrarse entre sí. Por ejemplo, aminoácidos tales como glicina pueden existir en forma de ion híbrido. Un "ion híbrido" es una sal dentro del significado del presente documento. Los compuestos de la presente invención pueden tomar la forma de sales. El término "sales" abarca sales de adición de ácidos libres o bases libres que son compuestos de la invención. Las sales pueden ser "sales farmacéuticamente aceptables". La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que tienen perfiles de toxicidad comprendidos en un

intervalo que aborda la utilidad en aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, las sales farmacéuticamente inaceptables pueden tener propiedades tales como una elevada cristalinidad, que tienen utilidad en la práctica de la presente invención, tal como, por ejemplo, utilidad en el proceso de síntesis, purificación o formulación de los compuestos de la invención.

5 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas se pueden preparar a partir de un ácido inorgánico o un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico, y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados pueden seleccionarse entre
10 ácidos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y las clases sulfónicas de los ácidos orgánicos, los ejemplos de los cuales incluyen ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxi benzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, trifluorometanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, alginico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y ácido galacturónico.
15 Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente inaceptables incluyen, por ejemplo, percloratos y tetrafluoroboratos.

Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, sales metálicas incluyendo álcalis metálicos, sales de metales alcalinotérreos y de metales de transición, tales como, por ejemplo, calcio, magnesio, potasio, sodio y cinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas fabricadas a partir de aminas básicas tales como, por ejemplo, *N,N'*-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (*N*-metilglucamina) y procaína. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente no aceptables incluyen sales de litio y sales de cianato. Aunque las sales farmacéuticamente no aceptables generalmente no se utilizan como medicamentos,
25 dichas sales pueden ser útiles, por ejemplo como intermedios en la síntesis de compuestos, por ejemplo en su purificación mediante recristalización. Todas estas sales se pueden preparar por medios convencionales a partir del correspondiente compuesto haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o base adecuados con el compuesto. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de adición de ácidos y/o sales de adición de bases orgánicas o inorgánicas no tóxicas, véase, por ejemplo, Lit et al., Salt Selection for Basic Drugs (1986), Int J. Pharm., 33, 201-217, que se ha incorporado por referencia al presente documento
30

Los ejemplos no limitantes de sales potenciales de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, clorhidrato, citrato, glicolato, fumarato, malato, tartrato, mesilato, esilato, cinamato, isetionato, sulfato, fosfato, difosfato, nitrato, bromhidrato, yodhidrato, succinato, formiato, acetato, dicloroacetato, lactato, p-toluenosulfonato, pamidato, pidolato, pamoato, salicilato, 4-aminosalicilato, benzoato, 4-acetamido benzoato, glutamato, aspartato, glicolato, adipato, alginato, ascorbato, besilato, alcanforato, alcanforsulfonato, camsilato, caprato, caproato, ciclamato, laurilsulfato, edisilato, gentisato, galactarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, oxoglutarato, hipurato, lactobionato, malonato, maleato, mandalato, napsilato, napadisilato, oxalato, oleato, sebacato, estearato, succinato, tiocianato, undecilenato y xinafoato.
35

Un "hidrato" es un compuesto que existe en una composición con moléculas de agua. La composición puede incluir agua en cantidades estequiométricas, tal como un monohidrato o un dihidrato, o puede incluir agua en cantidades aleatorias. Tal como se utiliza el término en el presente documento, un "hidrato" se refiere a una forma sólida, es decir, un compuesto en solución acuosa, que aunque puede estar hidratado, no es un hidrato tal como se utiliza el término en el presente documento.
40

Un "homólogo" de un compuesto de la invención es un compuesto donde uno más átomos del compuesto se han sustituido por un isótopo de dicho átomo. Por ejemplo, los homólogos incluyen compuestos con deuterio en lugar de algunos átomos de hidrógeno del compuesto tales como los compuestos de la invención en que los grupos metilo del resto isopropoxi de Fórmulas I-R y I-S están completa o parcialmente deuterados (por ejemplo, $(D_3C)_2C-O-$). Las sustituciones isotópicas que se pueden realizar en la formación de homólogos de la invención incluyen átomos no radioactivos (estables) tales como deuterio y carbono 13, así como átomos radioactivos (inestables) tales como tritio, carbono 14, yodo 123, yodo 125, etc.
50

Un "solvato" tiene una composición similar salvo que un disolvente distinto al agua sustituye el agua. Por ejemplo, metanol o etanol puede formar un "alcoholato", que, de nuevo, puede ser estequiométrico o no estequiométrico. Tal como se utiliza el término en el presente documento, un "solvato" se refiere a una forma sólida, es decir, un compuesto en solución en un disolvente, que aunque puede estar solvatado, no es un solvato tal como se utiliza el término en el presente documento.
55

Un "profármaco" como es bien conocido en la técnica es una sustancia que se puede administrar a un paciente donde la sustancia se convierte in vivo por acción de las sustancias bioquímicas del organismo del paciente, tales como enzimas, en el principio farmacéuticamente activo. Los ejemplos de profármacos incluyen ésteres de grupos de ácidos carboxílicos, que pueden hidrolizarse mediante las esterases endógenas que se encuentran en el torrente sanguíneo de seres humanos y otros mamíferos.
60
65

Cualquier compuesto que se puede convertir *in vivo* en el principio activo mediante transformaciones químicas o bioquímicas como profármaco. Los profármacos de los compuestos reivindicados están comprendidos en esta invención.

5 Algunos ejemplos de profármacos comprendidos en el alcance de la presente invención incluyen:

i. Si el compuesto contiene un grupo hidroxilo, el grupo hidroxilo puede estar modificado para formar un éster, carbonato, o carbamato. Los ejemplos incluyen acetato, pivalato, carbonatos de metilo y etilo, y dimetilcarbamato. El éster también se puede derivar de aminoácidos tales como glicina, serina, o lisina.

10 ii. Si el compuesto contiene un grupo amina, el grupo amina puede estar modificado para formar un amida. Los ejemplos incluyen acetamida o derivatización con aminoácidos tales como glicina, serina, o lisina.

Ciertos compuestos de la invención y sus sales pueden existir en más de una forma cristalina y la presente invención incluye cada forma cristalina y mezclas de las mismas. Además, los compuestos de la presente invención pueden existir en formas tanto no solvatadas como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua para formar hidratos o aductos con alcoholes tales como alcanoles C₁₋₄, y similares. Además, los compuestos de la presente invención se pueden aislar asociados con moléculas de disolvente por cristalización a partir de la evaporación de un disolvente apropiado. Dichos disolventes incluyen, aunque no de forma limitativa, tolueno, tetrahidrofurano, dioxano, dimetilformamida, acetonitrilo, acetatos tales como acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de propilo y acetato de isopropilo, éteres tales como dietil éter, y etil éter, alcoholes, tales como metanol, etanol, 1-butanol o 2-butanol, 1-propanol o 2-propanol, pentanol, y dimetilsulfóxido. En general, se considera que una representación del compuesto por su estructura o su nombre abarca el compuesto en cualquier forma (por ejemplo, por sí mismo, como hidrato, solvato, o cualquier forma en una mezcla).

25

COMPOSICIONES Y TRATAMIENTOS DE COMBINACIÓN

Los compuestos S1P₁, sus sales farmacéuticamente aceptables o los ésteres hidrolizables de la presente invención se pueden combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar composiciones farmacéuticas útiles para tratar las dolencias o trastornos biológicos indicados en el presente documento en especies de mamíferos y, más preferentemente, en los seres humanos. El vehículo concreto utilizado en estas composiciones farmacéuticas puede variar dependiendo del tipo de administración deseada (por ejemplo, intravenosa, oral, tópica, por supositorio, o parenteral).

35 Al preparar las composiciones en formas farmacéuticas líquidas orales (por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones), se pueden emplear medios farmacéuticos típicos, tal como agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. De forma análoga, cuando se preparan formas farmacéuticas sólidas orales (por ejemplo, polvos, comprimidos y cápsulas), se pueden emplear vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares.

40

Otro aspecto de una realización de la invención proporciona composiciones de los compuestos de la invención, solos o junto con otro inhibidor de S1P₁ u otro tipo de agente terapéutico, o ambos. Como se define en el presente documento, los compuestos de la invención incluyen estereoisómeros, tautómeros, solvatos, hidratos, sales, incluidas sales farmacéuticamente aceptables, y mezclas de los mismos. Las composiciones que contienen un compuesto de la invención se pueden preparar por técnicas convencionales, por ejemplo como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a ed., 1995, que se ha incorporado por referencia al presente documento. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo cápsulas, comprimidos, aerosoles, soluciones, suspensiones o aplicaciones tópicas.

50

Las composiciones típicas incluyen un compuesto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede ser un vehículo o un diluyente. Por ejemplo, el principio activo normalmente se mezclará con un vehículo o se diluye con un vehículo, o se encierra dentro de un vehículo que puede estar en forma de ampolla, cápsula, sobrecito, papel u otro recipiente. Cuando el principio activo se mezcla con un vehículo, o cuando el vehículo sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido, o líquido que actúa como un vehículo, excipiente, o medio para el principio activo. El principio activo se puede adsorber sobre un vehículo sólido granular, por ejemplo contenido en un sobrecito. Algunos ejemplos de vehículos adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, gelatina, lactosa, terra alba, sacarosa, dextrina, carbonato de magnesio, azúcar, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, ácido esteárico o alquil éteres inferiores de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, polioxietileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. De forma análoga, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

65

Las formulaciones se pueden mezclar con agentes auxiliares que no reaccionan de forma perjudicial con los

principios activos. Dichos aditivos pueden incluir agentes mojantes, agentes emulsionantes y de suspensión, sal para alterar la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes, agentes conservantes, agentes edulcorantes, o agentes aromatizantes. Las composiciones también se pueden esterilizar si se desea.

5 La vía de administración puede ser cualquier vía que transporte eficazmente el principio activo de la invención que inhiba la actividad enzimática de la quinasa de adhesión local hasta el sitio de acción adecuado o deseado, tal como oral, nasal, pulmonar, bucal, subdérmica, intradérmica, transdérmica o parenteral, por ejemplo, rectal, de depósito, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal, solución oftálmica o una pomada, siendo preferida la vía oral.

10 Para administración parenteral, el vehículo comprenderá normalmente agua estéril, aunque también se pueden incluir otros ingredientes que ayuden a la solubilidad o actúen como conservantes. Además, también se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso, se pueden emplear vehículos líquidos adecuados, agentes de suspensión y similares.

15 Para la administración tópica, los compuestos de la presente invención se pueden formular usando bases hidratantes blandas, tales como pomadas o cremas.

20 Si se usa un vehículo sólido para la administración oral, la preparación se puede comprimir, introducirse en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o aglomerado o puede estar en la forma de comprimidos gruesos o comprimidos masticables. Si se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en la forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda o líquido inyectable estéril tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.

25 Las formas farmacéuticas inyectables incluyen por lo general suspensiones acuosas o suspensiones oleosas que se pueden preparar usando un agente dispersante o humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de solución o en forma de una suspensión, que se prepara con un disolvente o diluyente. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer y o una solución salina acuosa isotónica. Como alternativa, pueden emplearse aceites estériles como disolventes o medios de suspensión. Preferentemente, el aceite o ácido graso es no volátil, incluidos aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono, di o triglicéridos.

35 Para la inyección, la formulación también puede ser un polvo adecuado para reconstitución con una solución adecuada, como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de estos incluyen, aunque no de forma limitativa, polvos secados mediante liofilización, secado rotativo o mediante pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados, o particulados. Para la inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Los compuestos se pueden formular para su administración parenteral mediante inyección, tal como mediante inyección de bolo o infusión continua. Una forma farmacéutica unitaria para inyección puede ser en ampollas o recipientes multidosis.

40 Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica. Por lo tanto, las formulaciones también se pueden formular para la liberación controlada o para la liberación lenta.

45 Las composiciones contempladas por la presente invención pueden incluir, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o se pueden administrar en una forma de liberación extendida para proporcionar un almacenamiento prolongado y/o un efecto de administración. Por lo tanto, las formulaciones se pueden comprimir en aglomerados o cilindros e implantarse por vía intramuscular o subcutánea como inyecciones de depósito. Dichos implantes pueden utilizar materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables, por ejemplo, poliláctido-poliglicólido. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos).

50 Para la administración nasal, la preparación puede contener un compuesto de la invención que inhibe la actividad enzimática de la quinasa de adhesión local, disuelto o suspendido en un vehículo líquido, preferentemente un vehículo acuoso, para aplicación en aerosol. El vehículo puede contener aditivos tales como agentes solubilizantes, por ejemplo, propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabenos.

55 Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas las soluciones o suspensiones inyectables, preferentemente soluciones acuosas con el compuesto activo disuelto en aceite de ricino polihidroxilado.

60 Las formas farmacéuticas se pueden administrar diariamente, o más de una vez al día, tal como dos veces o tres veces al día. Como alternativa, las formas farmacéuticas se pueden administrar con menos frecuencia que diariamente, tal como en días alternos, o semanalmente, si así lo aconseja el médico responsable del tratamiento.

65 Una realización de la invención abarca profármacos de un compuesto de la invención que tras su administración experimentan conversión química por procesos metabólicos u otros procesos fisiológicos antes de convertirse en

sustancias farmacológicamente activas. La conversión por procesos metabólicos u otros procesos fisiológicos incluye, aunque no de forma limitativa, transformación química enzimática (por ejemplo, específicamente catalizada por enzimas) y no enzimática (por ejemplo, inducida por ácido o base de forma general o específica) del profármaco en la sustancia farmacológicamente activa. En general, dichos profármacos serán derivados funcionales de un compuesto de la invención que se convierte fácilmente *in vivo* en un compuesto de la invención. Se describen procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados de profármaco adecuados, por ejemplo, en *Design of Prodrugs*, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

En otra realización, se proporcionan métodos para fabricar una composición de un compuesto descrito en el presente documento que incluyen la formulación de un compuesto de la invención con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración oral. En algunas de dichas realizaciones, los métodos pueden incluir además la etapa de formular la composición en un comprimido o cápsula. En otras realizaciones, el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración parenteral. En algunas de dichas realizaciones, los métodos incluyen además la etapa de liofilizar la composición para formar una preparación liofilizada.

Los compuestos de la invención se pueden usar terapéuticamente junto con i) uno o más inhibidores de S1P₁ adicionales y/o ii) uno o más tipos adicionales de inhibidores de proteína quinasa y/o uno o más tipos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden administrar por vía oral en la misma forma farmacéutica, en una forma farmacéutica oral separada (por ejemplo, secuencialmente o no secuencialmente) o mediante inyección junta o por separado (por ejemplo, secuencialmente o no secuencialmente).

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona combinaciones, que comprenden:

- a) un compuesto de la invención tal como se describe en el presente documento; y
- b) uno o más compuestos que comprenden:

- i) otros compuestos de la presente invención,

- ii) otros medicamentos adaptados para el tratamiento de una patología para la que la activación de S1P₁ está médicamente indicada, por ejemplo esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

Las combinaciones de la invención incluyen mezclas de compuestos de (a) y (b) en una formulación individual y compuestos de (a) y (b) como formulaciones independientes. Algunas combinaciones de la invención se pueden envasar como formulaciones independientes en un kit. En algunas realizaciones, dos o más compuestos de (b) se formulan conjuntamente mientras que un compuesto de la invención se formula por separado.

Las dosificaciones y formulaciones para el resto de agentes a utilizar, cuando sea aplicable, se definirán en la última edición *Physicians' Desk Reference*, incorporado por referencia en el presente documento.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En determinadas realizaciones, la presente invención abarca compuestos biodisponibles que agonizan específicamente S1P₁ sin unión (S1P₂, S1P₃ y S1P₄), o tienen una especificidad significativa respecto (S1P₅), otros receptores EDG. Se puede usar un agonista de S1P₁ selectivo para tratar enfermedades con una respuesta autoinmunitaria hiperactiva, respuesta inmunitaria hiperactiva, angiogénesis o componentes inflamatorios, pero que no se limita a dichas condiciones. Los agonistas de S1P₁ selectivos tienen ventajas respecto de las terapias actuales aumentando la ventana terapéutica debido a la toxicidad reducida por implicación de otros receptores de EDG.

En determinadas realizaciones, la presente invención abarca compuestos que se unen con alta afinidad y especificidad con el receptor de S1P₁ de forma agonista. Tras ligadura del receptor S1P₁ con un agonista, la señalización procede a través de G_{ai}, que inhibe la generación de AMPc mediante adenilato ciclasa.

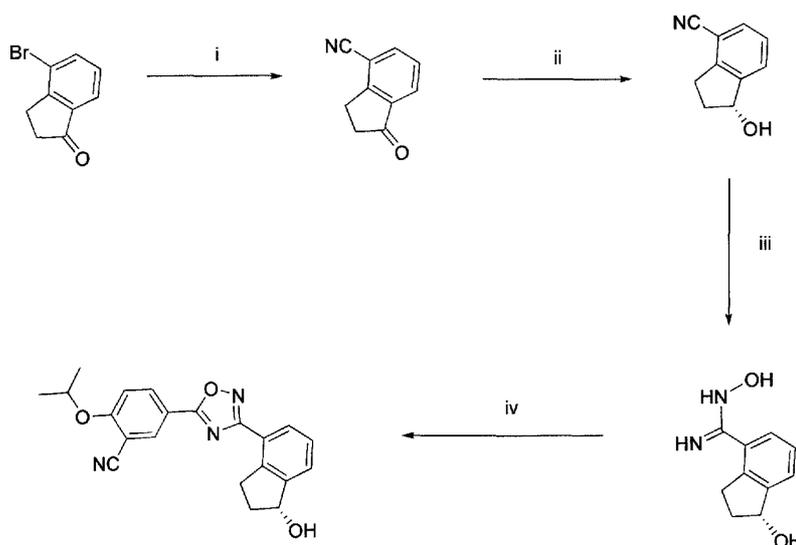
En determinadas realizaciones, se describe en el presente documento un método para activar o agonizar (es decir, tener un efecto agonista, actuar como agonista) un subtipo del receptor esfingosina-1-fosfato, tal como S1P₁ con un compuesto de la invención. El método implica poner en contacto el receptor con una concentración adecuada de un compuesto de la invención para conseguir la activación del receptor. El contacto puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo al realizar un ensayo para determinar la actividad de activación del receptor de S1P de un compuesto de la invención que se somete a experimentación relacionada con la presentación para la aprobación normativa.

En determinadas realizaciones, el método para activar un receptor de S1P, tal como S1P₁ puede llevarse a cabo también *in vivo*, es decir, dentro del organismo vivo de un mamífero, tal como un paciente humano o animal de ensayo. El compuesto inventivo se puede suministrar al organismo vivo mediante una de las rutas como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, por vía oral, o se puede proporcionar localmente dentro de los tejidos vivos, por ejemplo por inyección de un tumor dentro del organismo. En presencia del compuesto de la invención, tiene lugar la activación del receptor, y su efecto se puede estudiar.

Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de una patología en un paciente para el que la activación de un receptor de SIP, tal como S1P₁ está médicamente indicada, en la que el paciente recibe el compuesto de la invención en una dosis, a una frecuencia, y durante un periodo, para producir un efecto beneficioso sobre el paciente. El compuesto de la invención se puede administrar por cualquier medio adecuado, cuyos ejemplos se describen anteriormente.

PREPARACIÓN DE CIERTAS REALIZACIONES

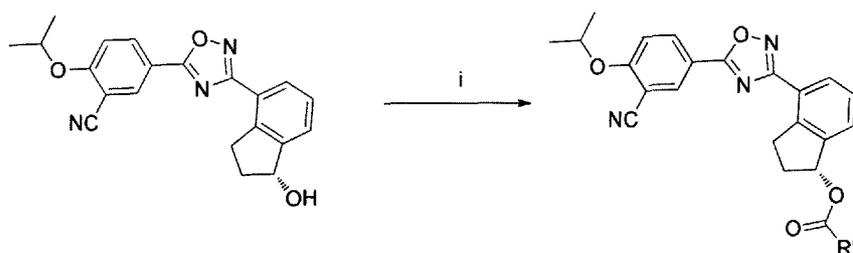
Esquema 1:



10 Reactivos: (i) Zn(CN)₂, Pd(PPh₃)₄, NMP; (ii) (S)-(-)-2-metil-CBS-oxazaborolidina, BH₃-DMS, tolueno; (iii) NH₂OH·HCl, Na₂CO₃ o TEA, EtOH; (iv) HOBt, EDC, ácido benzoico sustituido, DMF.

El enantiómero (S) se preparó de la misma forma detallada en el *Esquema 1* usando (R)-(+)-2-metil-CBS-oxazaborolidina en la etapa (ii). El material racémico se puede preparar de la misma forma detallada en el *Esquema 1* usando NaBH₄ en (ii).

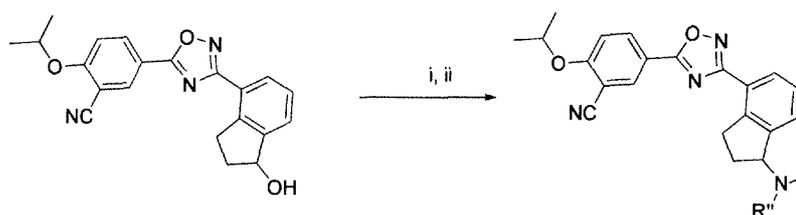
Esquema 2:



Reactivos: (i) Piridina, R'''-COCl, DCM.

20 El enantiómero (S) y el material racémico se pueden preparar de la misma forma detallada en el *Esquema 2* usando los materiales de partida adecuados.

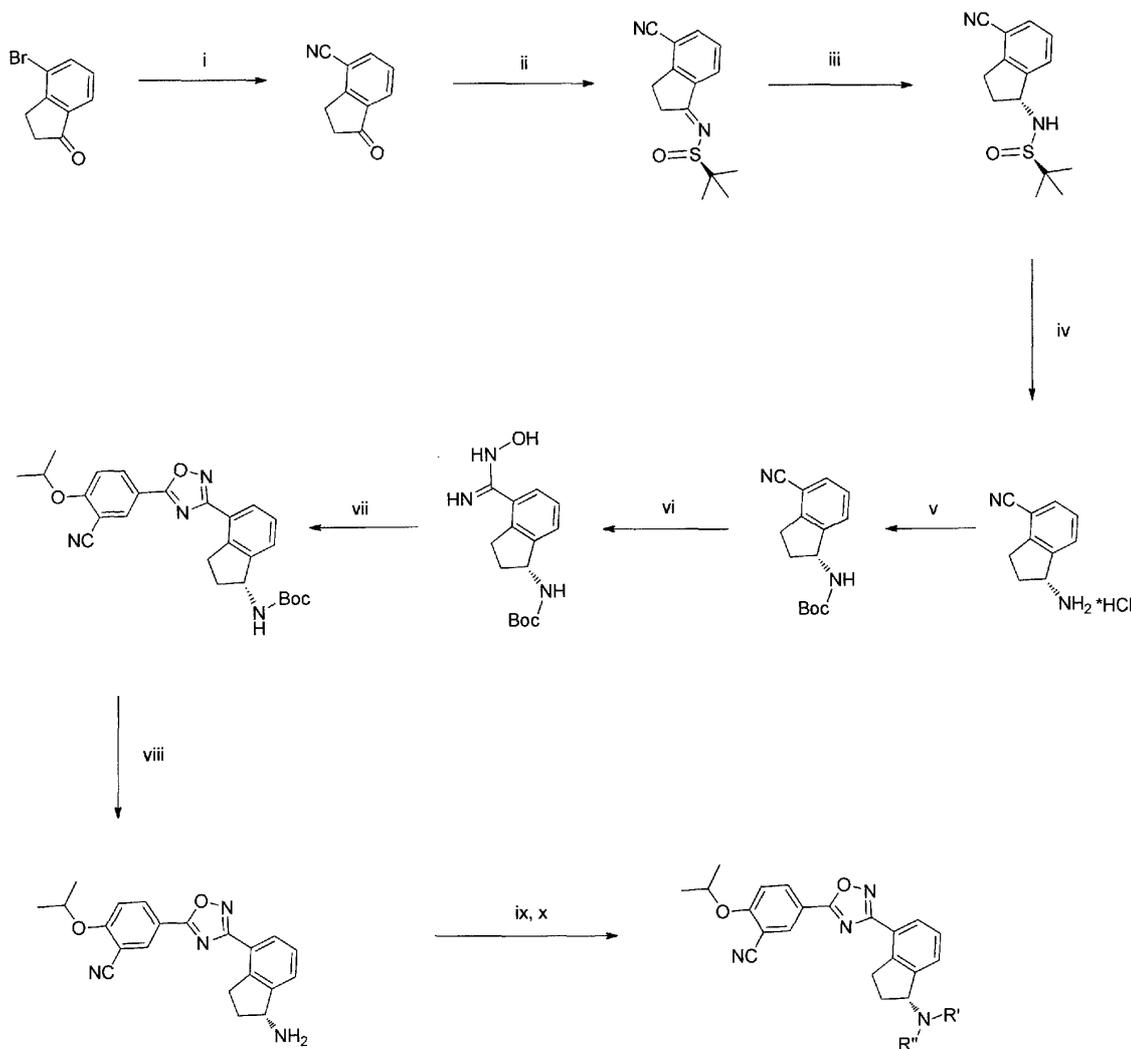
Esquema 3:



Reactivos: (i) (a) MsCl, piridina; (b) TsCl, piridina; (c) NsCl, piridina; (d) SOCl₂, DCM; (e) SOCl₂, piridina, DCM; (f) NaN₃, PPh₃, CBr₄; (ii) (a) DIEA, DMA, HNR'R"; (b) DIEA, NaBr o NaI, DMA, HNR'R".

Se puede preparar material enantioméricamente enriquecido de la misma forma detallada en el *Esquema 3* usando los indanoles (R)- o (S).

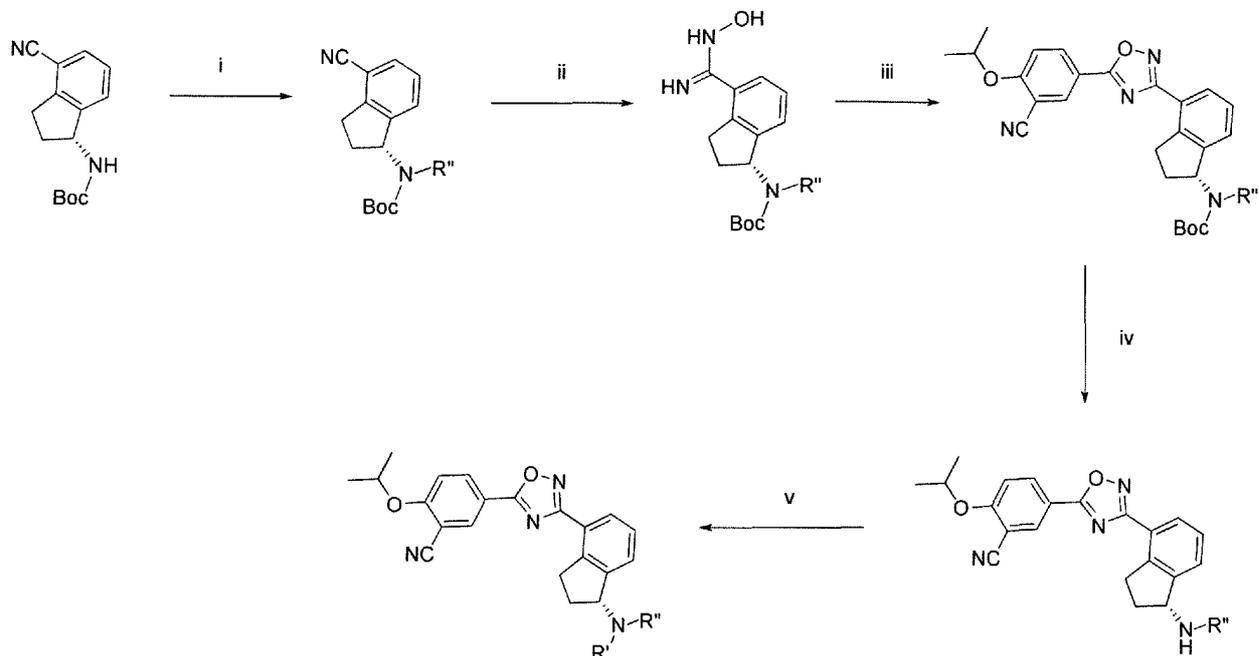
Esquema 4:



Reactivos: (i) Zn(CN)₂, Pd(PPh₃)₄, NMP; (ii) (R)-2-metilpropano-2-sulfinamida, Ti(OEt)₄, tolueno; (iii) NaBH₄, THF; (iv) HCl 4 M en dioxano, MeOH; (v) Boc₂O, TEA, DCM; (vi) NH₂OH HCl, TEA, EtOH; (vii) HOBt, EDC, ácido benzoico sustituido, DMF (viii) HCl 4 M en dioxano; (ix) (a) R¹-LG o Rⁿ-LG, donde LG representa un grupo saliente, K₂CO₃, CH₃CN; (b) R¹-CO₂H o R²-CO₂H, HOBt, EDC, DMF o R¹-COCl o R²-COCl, TEA, DCM; (c) R¹-SO₂Cl o R³-SO₂Cl, TEA, DCM (d) R²-CHO, HOAc, NaBH₄ o NaCNBH₃ o Na(OAc)₃BH, MeOH; (e) R¹-OCOCI o R²-OCOCI, DIEA, DMF; (f) HN(R⁵R⁵), CDI, TEA, DCM; (g) H₂NSO₂NH₂, Δ, dioxano; (h) dimetiloirano, Δ, EtOH; (x) (a) Si R¹ o Rⁿ = H, entonces las reacciones (ix)(a-d) se pueden llevar a cabo; (b) Si R¹ o Rⁿ contiene un éster entonces (i) hidrólisis de NaOH, EtOH o (ii) reducción NaBH₄, MeOH se puede llevar a cabo; (c) Si R¹ o Rⁿ contiene un ácido, entonces los acoplamiento HN(R⁵R⁵), HOBt, EDC, DMF se pueden llevar a cabo; (d) Si R¹ o Rⁿ contiene un alqueno activado adecuado, entonces las adiciones de Michael HN(R⁵R⁵), DMF se puede llevar a cabo.

El enantiómero (S) se preparó de la misma forma detallada en el *Esquema 4* usando (S)-2-metilpropano-2-sulfinamida en la etapa (ii).

Esquema 5:



Reactivos: (i) NaH, DMF, y R"-haluro; (ii) NH₂OH·HCl o Na₂CO₃, TEA, EtOH; (iii) HOBt, EDC, ácido benzoico sustituido, DMF; (iv) HCl 4 M en dioxano; (v) (a) R'-LG, TEA, DCM; (b) R¹-SO₂Cl o R³-SO₂Cl, TEA, DCM; (c) R¹-COCl o R²-COCl, TEA, DCM o R¹-CO₂H o R²-CO₂H, HOBt, EDC, DMF o R¹-COCl o R²-COCl, TEA, DCM; (d) R²-CHO, HOAc, NaBH₄ o NaCNBH₃ o Na(OAc)₃BH, MeOH;

- (a) Si R' o R" contiene un éster entonces (i) hidrólisis de NaOH, EtOH o (ii) reducción NaBH₄, MeOH se puede llevar a cabo;
- (b) Si R' o R" contiene un ácido, entonces, los acoplamientos H(R⁵R⁵), HOBt, EDC, DMF se pueden llevar a cabo;
- (c) Si R' o R" contiene un alqueno activado adecuadamente, entonces se pueden llevar a cabo las adiciones de Michael HN(R⁵R⁵)DMF.

El enantiómero (S) se preparó de la misma forma detallada en el Esquema 5 a partir de 4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-icarbamato de (S)-*tert*-butilo.

Ejemplos

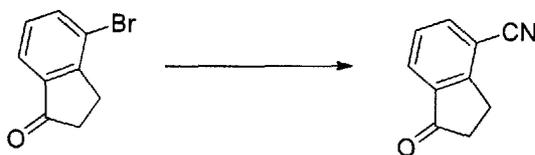
Métodos generales

RMN ¹H (400 MHz) y RMN ¹³C (100 MHz) se obtuvieron en solución de deuteriocloroformo (CDCl₃), deuteriometanol (CD₃OD) o dimetilsulfóxido -D₆ (DMSO). Los espectros de RMN se procesaron usando Mestrec 5.3.0 y 6.0.1. Los picos RMN ¹³C que se indican entre corchetes son dos rotámeros del mismo átomo de carbono. Los espectros de masas (LCMS) se obtuvieron usando un sistema de HPLC Agilent 1100/6110 HPLC equipado con un Thompson ODS-A, 100A, columna de 5 μ (50 X 4,6 mm) usando agua con 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil A, y acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico como fase móvil B. el gradiente era 20-100 % con fase móvil B durante 2,5 min mantenido a continuación a 100 % durante 2,5 min. El caudal era de 1 ml/min. A menos que se indique otra cosa, los datos de LCMS proporcionados utilizan este método. Para los compuestos más hidrófobos, se usó el siguiente gradiente, denotado como *Método 1*: 40-95 % durante 0,5 min, mantener al 95 % durante 8,5 min, a continuación retornar al 40 % durante 2 min, con un caudal de 1 ml/min. Los compuestos finales se comprobaron para determinar la pureza usando *Método 2*: 5 % durante 1 min, 5-95 % durante 9 min, después mantener al 95 % durante 5 min, con un caudal de 1 ml/min. Se determinó el exceso enantiomérico mediante integración de los picos que se separaron en una columna Chiralpak AD-H, de 250 x 4,6 mm, con un tamaño de partículas de 5 μm. Caudal de 1 ml/min y una fase móvil isocrática. A menos que se indique otra cosa, los datos quirales proporcionados utilizan este método. Como alternativa, las separaciones quirales se realizaron en las siguientes condiciones, denotadas como *Método quiral 1*: columna Chiralpak AY-H, de 250 x 4,6 mm, con un tamaño de partículas de 5 μm. Caudal de 1 ml/min y una fase móvil isocrática. *Método quiral 2*: Chiralcel OZ-3, 250 x 4,6, con un tamaño de partículas de 3 μm a un caudal de 0,75 ml/min. La piridina, diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), y tolueno usados en los procedimientos eran de Aldrich Los frascos Sure-Seal se mantuvieron bajo nitrógeno (N₂). Todas las reacciones se agitaron magnéticamente y las temperaturas eran las temperaturas de reacción externas. Las cromatografías se

realizaron usando un sistema de purificación Combiflash Rf (Teledyne Isco) equipado con gel de sílice en columnas Rediseep (Teledyne Isco) (SiO₂). Las purificaciones por HPLC preparativa se realizaron en un sistema Varian ProStar/PrepStar usando agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,05 % como fase móvil A, y acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,05 % como fase móvil B. El gradiente fue 10-80 % con la fase móvil B durante 12 min, mantener a 80 % durante 2 min, y después volver al 10 % durante 2 min con un caudal de 22 ml/min. Se han utilizado otros métodos similares a estos. Las fracciones se recogieron usando un recopilador de fracciones Varian Prostar y se evaporaron usando una bomba de vacío Savant SpeedVac Plus. Los compuestos con centros salinos presuntamente eran la sal del ácido trifluoroacético (TFA). El calentamiento con microondas se realizó usando un reactor de microondas Biotage Initiator equipado con recipientes de microondas Biotage. Se usan las siguientes abreviaturas: acetato de etilo (EA), trietilamina (TEA), dietil amina (DEA), hidroxibenzotriazol (HOBt), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), isopropanol (IPA), dimetilformamida (DMF), dimetil acetamida (DMA). Norit es carbón activo.

Procedimientos experimentales

1-oxo-2, 3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo (INT-1)



A una solución agitada de 4-bromo-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (100,0 g, 0,48 mol) en 150 ml de 1-metil-2-pirrolidina (NMP) se añadió cianuro de cinc (111,8 g, 0,95 mol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio [Pd(PPh₃)₄] (2,75 g, 0,024 mol). La solución se desgasificó con N₂ y la mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante 7 h. Después de la refrigeración, la mezcla de reacción se vertió en agua enfriada con hielo (3,5 l). El compuesto y sales inorgánicas de Zn precipitaron. El sólido se recogió y se repartió entre DCM (3 X 100 ml) y agua. Las capas orgánicas se filtraron para retirar las sales de Zn, y el filtrado se concentró y se cristalizó a partir de una mezcla 4:1 de EtOH y MeOH (400 ml) para dar 45,5 g (60 %) de 1-oxo-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo **INT-1** en forma de un sólido de color amarillo claro. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₁₀H₇NO: 157,2; encontrado 158,1 [M+H]⁺, t_R = 2,67 min. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,00 - 7,90 (m, 1H), 7,86 (dd, J = 7,5, 1,1, 1H), 7,50 (t, J = 7,6, 1H), 3,40 - 3,19 (m, 2H), 2,90 - 2,61 (m, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 204,70, 157,90, 138,38, 137,88, 128,44, 128,28, 116,31, 111,70, 36,01, 25,49.

(S)-1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo (INT-2)



A un matraz de 3-bocas con un termómetro interno y un embudo de adición se añadió una solución de (R)-(+)-2-metil-CBS-oxazaborolidina en tolueno (3,0 ml) y complejo de borano con sulfuro de dimetilo (300 µl). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, a continuación se diluyó con DCM (25 ml). Se añadió complejo de borano-sulfuro de dimetilo (6,0 ml) y, tras agitar durante 5 min, la reacción se enfrió a -20 °C. Se añadió 1-Oxo-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo **INT-1** (4,7 g, 30 mmol) en DCM (25 ml) gota a gota mediante embudo de adición durante 20 min manteniendo a la vez la reacción a -20 ± 5 °C. La reacción se agitó durante 1 h, a continuación se inactivó mediante la adición gota a gota de MeOH (20 ml). Después cesó la evolución de hidrógeno, se añadió MeOH (30 ml) y se retiró calentando a presión atmosférica. Se añadió MeOH (50 ml) y se eliminó calentando dos veces. Todo el disolvente se evaporó para dar un sólido que se recrystalizó en EA (9 ml) y hexano (22 ml). El compuesto se filtró y se lavó con 5:1 de hexano/EA (30 ml) para proporcionar 3,73 g (78 %) de (S)-1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo **INT-2** en forma de un polvo de color blanco. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₁₀H₉NO: 159,1; encontrado 160,1 [M+H]⁺, t_R = 2,39 min. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,62 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,32 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 5,28 (d, J = 4,1 Hz, 1H), 3,23 (ddd, J = 17,0, 8,7, 4,4 Hz, 1H), 3,04 - 2,90 (m, 1H), 2,64 - 2,51 (m, 1H), 2,00 (dddd, J = 13,4, 8,7, 7,1, 5,7 Hz, 1H), 1,91 (d, J = 5,4 Hz, 1H). HPLC quiral: (S)-1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo se eluyó en 20 % de IPA en hexano: >99,9 % ee, t_R = 7,42 min. El enantiómero (R) se obtuvo de una forma análoga utilizando (S)-(-)-2-metil-CBS-oxazaborolidina. t_R para el enantiómero (R) = 6,79 min.

(+/-) 1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo



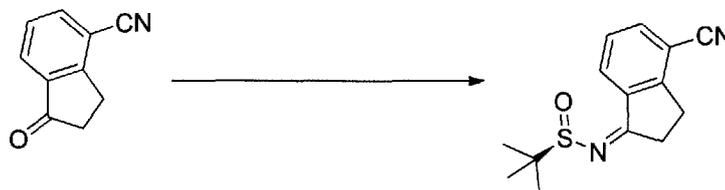
A una suspensión agitada de 1-oxo-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo (1,2 g, 7,64 mmol) y gel de sílice (catalítico) en EtOH a 0 °C se añadió NaBH₄ (237,2 mg, 7,64 mmol). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró a presión reducida, y el producto se purificó por cromatografía (50 % EA/hexano) para proporcionar 1,02 g (82,3 %) de 1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo en forma de un sólido de color blanco. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₁₀H₉NO; 159,18; encontrado 160,1 [M+H]⁺, t_R = 2,39 min.

(S)-N,1-dihidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carboximidamida (**INT-3**)



A clorhidrato de hidroxilamina (0,87 g, 12,5 mmol) y carbonato sódico (1,32 g, 12,5 mmol) en EtOH (20 ml) se añadió (S)-1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo **INT-2** (1,59 g, 10 mmol) en una porción y la solución se calentó a reflujo. Después de 16 h, la reacción se enfrió y se filtró para eliminar los sólidos. El EtOH se retiró y el compuesto se purificó por cromatografía (MeOH / DCM) para dar 1,74 g (90 %) de (S)-N,1-dihidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carboximidamida **INT-3** en forma de una espuma de color blanco. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₁₀H₁₂N₂O₂: 192,1; encontrado: 193,1 [M+H]⁺, t_R = 0,56 min. RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ 10,30 (s, 1H), 9,97 (s, 1H), 7,72 - 7,58 (m, 1H), 7,46 - 7,37 (m, 2H), 5,22 (t, J = 6,5, 1H), 3,17 - 3,03 (m, 1H), 2,99 - 2,83 (m, 1H), 2,49 (dddd, J = 11,4, 8,0, 7,0, 4,4, 1H), 2,02 - 1,88 (m, 1H). (R)-N,1-dihidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carboximidamida se prepara de una forma análoga a partir de (R)-1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo.

(R)-N-(4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-ilideno)-2-metilpropano-2-sulfinamida (**INT-4**)



A 1-oxo-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo **INT-1** (42,5 g, 0,27 mol) y (R)-2-metilpropano-2-sulfinamida (36,0 g, 0,30 mol) en tolueno (530 ml) se añadió tetraetóxido de titanio (84,1 ml, 92,5 g, 0,40 mol) y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 12 h en atmósfera de N₂. La (R)-N-(4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-ilideno)-2-metilpropano-2-sulfinamida **INT-4** bruta se usó directamente en el siguiente experimento. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₁₄H₁₆N₂OS: 260,3; encontrado 261,1 [M+H]⁺, t_R = 3,19 min.

(R)-N-((R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)-2-metilpropano-2-sulfinamida (**INT-5**)



A un matraz que contiene la suspensión bruta de (R)-N-(4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-ilideno)-2-metilpropano-2-sulfinamida **INT-4** en N₂ se añadió THF (1,0 l) y la mezcla de reacción se enfrió a -78 °C. Se añadió borohidruro sódico (40,9 g, 1,08 mol) en porciones durante 30 min. (La temperatura interna no aumentó durante la adición). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 30 min., se extrajo parcialmente del baño durante 30 min, después se calentó a 0 °C durante 1 h. La mezcla de reacción a 0 °C se introdujo en un baño de hielo y se detuvo rápidamente con salmuera (100 ml) seguido de una solución acuosa saturada de tartrato de potasio (420 ml) y las sales de Ti precipitaron. La mezcla de reacción se diluyó con EA (1,5 l) y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Las capas orgánicas se decantaron y se lavaron sucesivamente con una solución acuosa saturada de NH₄Cl, agua, y salmuera. Las capas orgánicas se secan con MgSO₄ y se filtraron a través de una capa de MgSO₄. El filtrado se concentró para producir 52,9 g de (R)-N-((R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)-2-metilpropano-2-sulfinamida **INT-5** bruta en forma de un aceite de color pardo, que se usó directamente en la siguiente etapa. LCMS-ESI (m/z)

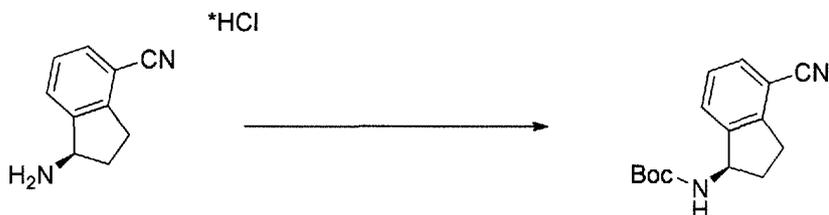
calculado para $C_{14}H_{18}N_2OS$: 262,3; encontrado 263,1 $[M+H]^+$, $t_R = 2,99$ min. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,89 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,56 (t, $J = 6,8$, 1H), 7,36 (t, $J = 7,7$, 1H), 4,97 (c, $J = 7,5$, 1H), 3,50 (d, $J = 7,6$, 1H), 3,22 (ddd, $J = 16,9$, 8,8, 3,9, 1H), 3,01 (dt, $J = 22,4$, 6,9, 1H), 2,70 - 2,53 (m, 1H), 2,15 - 1,95 (m, 1H), 1,33 - 1,20 (m, 9H).

5 (R)-1-amino-2, 3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbonitrilo (**INT-6**)



10 A la (R)-N-((R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-2-metilpropano-2-sulfonamida **INT-5** bruta (52,9 g, 0,20 mol) en MeOH (200 ml) se añadió HCl 4 N en dioxano (152,0 ml, 0,60 mol) y la suspensión de color amarillo resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción en bruto se diluyó con MeOH (500 ml) y se filtró para retirar algunos subproductos de Ti. El filtrado se concentró y el sólido resultante se mantuvo a reflujo en acetonitrilo (500 ml). El sólido de color blanco resultante se recogió para producir 13,0 g (31 % en 3 etapas) de la sal de HCl de (R)-1-amino-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbonitrilo **INT-6**. LCMS-ESI (m/z) calculado para $C_{10}H_{10}N_2$: 158,2; encontrado 142,0 $[M-NH_2]^+$, $t_R = 0,84$ min. RMN 1H (400 MHz, DMSO) δ 8,61 (s, 3H), 7,96 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,83 (d, $J = 7,5$, 1H), 7,52 (t, $J = 7,7$, 1H), 4,80 (s, 1H), 3,23 (ddd, $J = 16,6$, 8,7, 5,2, 1H), 3,05 (ddd, $J = 16,6$, 8,6, 6,3, 1H), 2,62 - 2,51 (m, 1H), 2,15 - 2,01 (m, 1H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 148,09, 141,15, 132,48, 130,32, 127,89, 117,27, 108,05, 54,36, 39,08, 29,64. La base libre se puede preparar por extracción con $NaHCO_3$ 1 N y DCM. LCMS-ESI (m/z) calculado para $C_{10}H_{10}N_2$: 158,2; encontrado 142,0 $[M-NH_2]^+$, $t_R = 0,83$ min. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,52 - 7,38 (m, 2H), 7,23 (dd, $J = 17,4$, 9,8, 1H), 4,3 (t, $J = 7,6$, 1H), 3,11 (ddd, $J = 16,8$, 8,7, 3,2, 1H), 2,89 (dt, $J = 16,9$, 8,5, 1H), 2,53 (dddd, $J = 12,8$, 8,1, 7,3, 3,2, 1H), 1,70 (dtd, $J = 12,8$, 8,8, 8,0, 1H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 150,16, 146,67, 130,19, 128,74, 127,38, 117,77, 107,42, 56,86, 38,86, 29,14. HPLC quiral: (R)-1-amino-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbonitrilo se eluyó usando 5 % de EtOH en hexanos, más 0,05 % de TEA: 95 % de e.e., $t_R = 23,02$ min. El enantiómero (S) **INT-7** se preparó de forma análoga usando (S)-2-metilpropano-2-sulfonamida. t_R para el enantiómero (S) = 20,17 min.

(R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbamato de terc-butilo (**INT-8**)



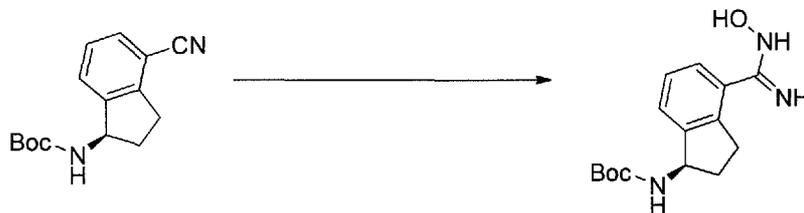
30 Al HCl de (R)-1-amino-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbonitrilo **INT-6** (11,6 g, 59,6 mmol) en DCM (100 ml) a 0 °C se añadió TEA (12,0 ml, 131,0 mmol). A la solución resultante se añadió una solución de Boc anhídrido (14,3 g, 65,6 mmol) en DCM (30 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se lavó con salmuera, y las capas orgánicas se secaron con $MgSO_4$ y se filtraron. Se añadió más DCM hasta un volumen total de 250 ml y se añadió Norit (4,5 g). El producto se calentó a reflujo durante 15 min y la mezcla en caliente se filtró a través de una capa de celite / sílice. El filtrado se concentró y se recristalizó en EA (50 ml) y hexano (150 ml) para producir 12,93 g (84 %) de (R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbamato de terc-butilo **INT-8** en forma de un sólido de color blanquecino. LCMS-ESI (m/z) calculado para $C_{15}H_{18}N_2O_2$: 258,3; encontrado 281,1 $[M+Na]^+$, $t_R = 3,45$ min. Análisis elemental determinado para $C_{15}H_{18}N_2O_2$: C calculado = 69,74 %; encontrado = 69,98 %. H calculado = 7,02 %; encontrado = 7,14 %. N calculado = 10,84 %; encontrado = 10,89 %. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,64 - 7,49 (m, 2H), 7,34 (dt, $J = 7,7$, 3,8, 1H), 5,36 - 5,20 (m, 1H), 4,78 (d, $J = 6,8$, 1H), 3,20 (ddd, $J = 16,9$, 8,9, 3,3, 1H), 3,02 (dt, $J = 25,4$, 8,4, 1H), 2,82 - 2,53 (m, 1H), 1,88 (dc, $J = 13,2$, 8,6, 1H), 1,55 - 1,44 (m, 9H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 155,52, 146,68, 146,32, 130,89, 128,70, 127,63, 117,51, 107,76, 77,98, 55,09, 31,88, 29,11, 28,19. HPLC quiral: (R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbamato de terc-butilo se eluyó usando 2,5 % EtOH en hexanos: >99,9 % ee, $t_R = 19,36$ min. El enantiómero (S) **INT-9** se preparó de una forma análoga usando HCl de (S)-1-amino-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbonitrilo. t_R para el enantiómero (S) = 28,98 min.

Procedimiento general 3. Preparación de Oximas de indano amida

50 A (R)- o (S)- 4-ciano-2,3-dihidro-1H-indeno-1-il)-4-carbamato de terc-butilo (1 equiv.) en EtOH (0,56 M) se añadió clorhidrato de hidroxilamina (3 equiv.) y TEA (3 equiv.) y la mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante 1-2 h. Las oximas de amida solubles orgánicas se aislaron mediante eliminación del disolvente y se repartieron entre agua y DCM. Las oximas de amida solubles en agua se sometieron a cromatografía o se usaron directamente en la

ciclación. Las oximas de amida puras se pueden obtener por recristalización en disolventes alcohólicos.

(*R*)-4-(*N*-hidroxicarbamimidoil)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo (INT-10)



5

Se preparó usando el *Procedimiento General 3*. A (*R*)-4-ciano-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo **INT-8** (15,0 g, 58,2 mmol) en EtOH (100 ml) se añadió clorhidrato de hidroxilamina (12,1 g, 174,2 mmol) y TEA (17,6 ml, 174,2 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante 2 h. Los disolventes se retiraron y el sólido de color blanco resultante se repartió entre agua y DCM. Las capas orgánicas se secaron con Na₂SO₄, se concentraron, y se recristalizaron en isopropanol (50 ml) para proporcionar 14,4 g (85 %) de (*R*)-4-(*N*-hidroxicarbamimidoil)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo **INT-10** como un sólido cristalino blanco. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₁₅H₂₁N₃O₃: 291,4; encontrado 292,1 [M+H]⁺, t_R = 2,04 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ 9,53 (s, 1H), 7,38 - 7,32 (m, 1H), 7,32 - 7,12 (m, 3H), 5,68 (s, 2H), 4,97 (c, J = 8,5, 1H), 3,07 (ddd, J = 16,6, 8,7, 2,6, 1H), 2,86 (dt, J = 16,8, 8,4, 1H), 2,30 (ddd, J = 12,6, 7,6, 3,6, 1H), 1,75 (dc, J = 12,3, 9,0, 1H), 1,44 (s, 9H).

10

15

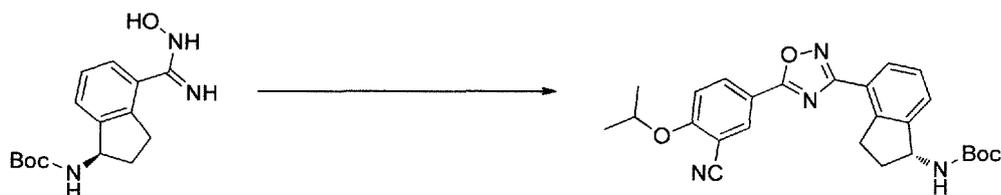
Procedimiento general 4. Ciclación de oxadiazol aminas de indano

Una solución del ácido adecuado (1 equiv.), HOBt (1,3 equiv.), y EDC (1,3 equiv.) en DMF (0,08 M en ácido) se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de N₂. Tras la formación completa del complejo de HOBt-ácido (1-3 h), la (*R*)- o (*S*)-oxima de amida (1,1 equiv.) se añadió a la mezcla. Después de la formación completa del compuesto intermedio acoplado (aprox. 0,5-2 h), la mezcla se calentó a 75-95 °C hasta que la ciclación fue completa (8-12 h). La mezcla de reacción se diluyó con una solución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con EA. Los extractos orgánicos combinados se secaron, se concentraron, y, o bien se purificaron por cromatografía (EA/hexanos) o se tomaron directamente. El oxadiazol se trató con HCl (5N en dioxano, 5 equiv.) a 50-60 °C durante 0,5-6 h. La mezcla de reacción podría extraerse (DCM /NaHCO₃), o la sal de HCl resultante se concentró, se suspendió en Et₂O, y se recogió. Las aminas de indano puras se pueden obtener por recristalización en disolventes alcohólicos o por cromatografía.

20

25

(*R*)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo (**INT-12**)



Se preparó usando el *Procedimiento General 4*. A una solución de ácido 3-ciano-4-isopropoxibenzoico (7,74 g, 37,7 mmol) en DMF (50 ml) se añadió HOBt (6,02 g, 44,6 mmol) y EDC (8,53 g, 44,6 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 2 h hasta la formación completa del complejo de HOBt-ácido. (*R*)-4-(*N*-hidroxicarbamimidoil)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo **INT-10** (10,0 g, 34,3 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h hasta la formación de **INT-11**, (*R*)-4-(*N*-(3-ciano-4-isopropoxibenziloxi) carbamimidoil)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo. La mezcla se repartió entre EA y NaHCO₃ y la capa orgánica se recogió y se secó con MgSO₄. **INT-11** (16,3 g, 34,0 mmol) se redisolvió en DMF (50 ml) y la mezcla se calentó a 95 °C durante 12 h. La reacción se diluyó con NaHCO₃ (200 ml) y se extrajo con EA (3 X 50 ml). La capa orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida para producir 12,8 g (81 %) de (*R*)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo **INT-12** en forma de un sólido de color pardo claro y se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₂₆H₂₈N₄O₄: 460,5; encontrado 483,2 [M+Na]⁺, t_R = 4,25 min. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,43 (d, J = 2,1, 1H), 8,34 (dd, J = 8,9, 2,2, 1H), 8,09 (d, J = 7,6, 1H), 7,51 (d, J = 7,5, 1H), 7,39 (t, J = 7,6, 1H), 7,12 (d, J = 9,0, 1H), 5,28 (d, J = 8,2, 1H), 4,80 (sept., J = 6,0, 1H), 3,47 (ddd, J = 17,4, 8,9, 3,5, 1H), 3,27 - 3,03 (m, 1H), 2,68 (d, J = 8,7, 1H), 1,87 (td, J = 16,7, 8,5, 1H), 1,53 - 1,43 (m, 15H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 173,00, 168,82, 162,70, 155,68, 145,31, 142,96, 134,05, 133,83, 128,25, 127,21, 126,79, 123,09, 116,78, 115,24, 113,52, 103,87, 79,52, 72,70, 55,72, 33,86, 31,47, 28,39, 21,70. HPLC quiral: (*R*)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo se eluyó usando 20 % de *i*-PrOH en hexanos: >99,9 % ee, t_R = 13,33 min. El enantiómero (*S*) **INT-13** se preparó de forma análoga usando (*S*)-4-ciano-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo usando los *Procedimientos Generales 3* y *4* (t_R para el enantiómero (*S*) = 16,31 min).

35

40

45

50

Clorhidrato de (R)-5-(3-(1-amino-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo (Compuesto 49)



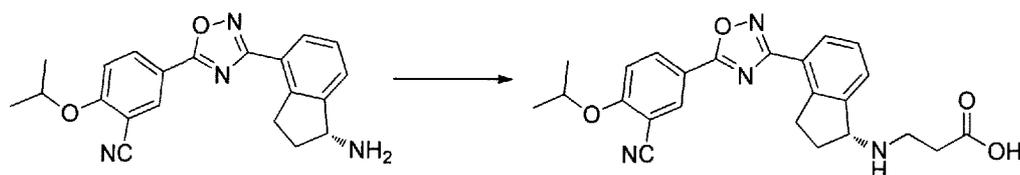
5 A (R)- 4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo (12,8 g, 27,8 mmol) en dioxano (200 ml) se añadió HCl 4 N en dioxano (69 ml). La solución se calentó a 55 °C durante 1 h, y el producto precipitó. Dioxano se retiró y el sólido resultante se suspendió en éter y se recogió. El material se
 10 recristalizó en MeOH (200 ml) para producir 8,11 g (81 %) de (R)-5-(3-(1-amino-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo **49** como la sal de HCl. LCMS-ESI (m/z): calculado para: C₂₁H₂₀N₄O₂: 360,4; encontrado 383,2 [M+Na]⁺, t_R = 2,49 min. Se determinó el análisis elemental y los espectros de RMN para C₂₁H₂₁N₄O₂Cl * 0,5 H₂O; C calculado = 62,14 %; encontrado = 62,25 %. H calculado = 5,46 %; encontrado = 5,30 %. N calculado = 13,80 %; encontrado = 13,84 %. Cl calculado = 8,73 %; encontrado = 8,34 %. RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ 8,71 (s, 3H), 8,49 (d, J = 2,3, 1H), 8,39 (dd, J = 9,0, 2,3, 1H), 8,11 (d, J = 7,6, 1H), 7,91 (d, J = 7,6, 1H),
 15 7,55 (t, J = 8,5, 2H), 4,97 (sept., J = 6,1, 1H), 4,80 (s, 1H), 3,47 (ddd, J = 17,4, 8,7, 5,3, 1H), 3,23 (ddd, J = 17,4, 8,6, 6,4, 1H), 2,55 (ddd, J = 13,7, 8,3, 3,2, 1H), 2,22 - 1,97 (m, 1H), 1,38 (d, J = 6,0, 6H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 173,28, 167,98, 162,53, 143,69, 141,29, 134,59, 133,80, 128,93, 128,11, 127,55, 122,72, 115,87, 115,24, 114,91, 102,46, 72,54, 54,38, 31,51, 29,91, 21,47. HPLC quiral de la base libre: (R)-5-(3-(1-amino-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxi benzonitrilo se eluyó usando 15 % de *i*-PrOH en hexanos más 0,3 % de DEA: > 99,9 % ee, t_R = 30,80 min. (S)-5-(3-(1-amino-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxi-benzonitrilo **50** se preparó de una forma análoga a partir de (S)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo: >99,9 % ee, t_R para el enantiómero (S) = 28,58 min.

Procedimiento general 6. Preparación de indanos ácidos

25 A la solución de (R)- o (S)-amina de indano (1 equiv.) en CH₃CN (0,1 M) se añadió K₂CO₃ (3 equiv.) y los ésteres de bromo metilo (1 equiv.) o los metil ésteres de mesilato (1 equiv.). La reacción se calentó a 80 °C durante 30 min hasta que se completó la reacción. El disolvente se evaporó, y los residuos se repartieron entre EA y agua. La capa orgánica se recogió, se secó con MgSO₄, y se purificó por cromatografía (MeOH/DCM con 0,025 % de TEA) para dar el metil éster de indano en forma de un sólido de color blanco. El metil éster de indano se disolvió en EtOH (0,03 M) y se añadió una solución acuosa de NaOH (11,8 M). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a 40 °C. El material en bruto se purificó por HPLC preparativa.

Los compuestos **61** y **62** se prepararon usando el Procedimiento General 6.

35 ácido (R)-3-((4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)amino)propanoico (Compuesto **62**) (comparativo)



40 Se preparó usando el Procedimiento General 6. A la solución de (R)-5-(3-(1-amino-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo **49** (90,0 mg, 0,25 mmol) y K₂CO₃ (103,5 mg, 0,75 mmol) se añadió 3-bromopropanoato de metilo (41,8 mg, 0,25 mmol). La reacción se calentó a 80 °C durante 30 min y se repitió cuatro veces a 80 °C durante 30 min con adición de más 3-bromopropanoato de metilo (41,8 mg, 0,25 mmol) cada vez. El disolvente se evaporó, y los residuos se repartieron entre EA y agua. La capa orgánica se recogió, se secó con MgSO₄, y se purificó por cromatografía (MeOH/ DCM con 0,025 % de TEA) para dar 71 mg (63 %) de (R)-3-((4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)amino)propanoato de metilo en forma de un sólido. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₂₅H₂₆N₄O₄: 446,5; encontrado 447,2 [M+H]⁺, t_R = 2,61 min. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,40 (d, J = 2,1, 1H), 8,31 (dd, J = 8,9, 2,2, 1H), 8,04 (d, J = 7,6, 1H), 7,49 (d, J = 7,5, 1H), 7,35 (t, J = 7,6, 1H), 7,09 (d, J = 9,0, 1 H), 4,77 (dt, J = 12,2, 6,1, 1H), 4,31 (t, J = 6,8, 1H), 3,73 - 3,58 (m, 3H), 3,43 (ddd, J = 17,4, 8,7, 4,6, 1H), 3,24 - 3,08 (m, 1H), 3,04 - 2,85 (m, 2H), 2,56 (t, J = 6,5, 2H), 2,47 (dtd, J = 12,8, 8,4, 4,7, 1H), 1,99 - 1,82 (m, 1H), 1,54 - 1,32 (m, 6H).

55 A (R)-3-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino) propanoato de metilo (71,0 mg, 0,16 mmol) en EtOH (5 ml) se añadió una solución acuosa de NaOH (1,9 ml, 1M). La solución se agitó a

40 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo (10 ml) y se neutralizó a pH 7 con HCl 1 M. La solución se repartió entre DCM y H₂O. La capa orgánica se recogió, se secó al vacío, y se purificó por HPLC preparativa para dar 29,7 mg (31 %) de ácido (R)-3-((4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)amino)propanoico 62. LCMS-ESI (m/z): calculado para: C₂₄H₂₄N₄O₄, 432,5; [M+H]⁺ encontrado 433,20, t_R = 2,51 min. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,46 (d, J = 2,1, 1H), 8,45 - 8,40 (m, 1H), 8,29 - 8,23 (m, 1H), 7,82 - 7,73 (m, 1H), 7,60 - 7,52 (m, 1H), 7,45 (d, J = 9,0, 1H), 5,06 - 4,92 (m, 2H), 3,69 - 3,52 (m, 1H), 3,51 - 3,37 (m, 1H), 3,26 (s, 2H), 2,75 - 2,58 (m, 1H), 2,56 - 2,46 (m, 2H), 2,44 - 2,29 (m, 1H), 1,46 (d, J = 6,0, 6H).

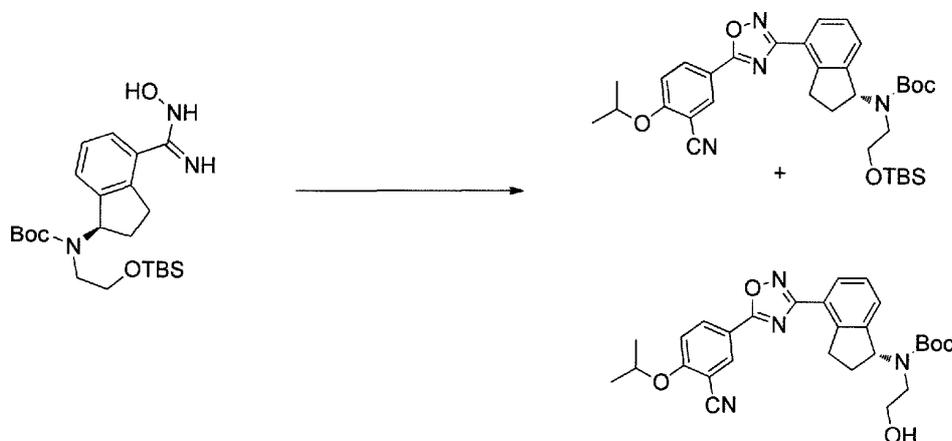
Los compuestos **85** y **86** se prepararon usando los *Procedimientos Generales* 9, 3, y 4 secuencialmente.

(R)-2-(terc-butildimetilsililoxi)etil(4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)carbamato de terc-butilo (INT-16)



Se preparó usando el *Procedimiento General* 9. A un matraz secado a la llama en atmósfera de N₂ se añadió (R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilcarbamato de terc-butilo **INT-8** (8,3 g, 32,1 mmol) en DMF anhidra (240 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió hidruro sódico (3,8 g, 60 % en aceite, 160,6 mmol) en porciones. Después de agitar a 0 °C durante 2,75 h, se añadió (2-bromoetoxi)(terc-butil)dimetilsilano (16,9 ml, 70,7 mmol). El baño de hielo se retiró después de 5 min y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 1,5 h, la mezcla de reacción se inactivó mediante adición lenta de una solución sat. de NaHCO₃ a 0 °C. una vez que se completó la evolución del gas, la reacción se extrajo con EA. Las capas orgánicas se lavaron con agua y salmuera, se secaron con MgSO₄ y se concentraron. El producto se purificó por cromatografía (EA / hexanos) para proporcionar 10,76 g (80 %) de (R)-2-(terc-butildimetilsililoxi)etil(4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)carbamato de terc-butilo **INT-16** en forma de un aceite incoloro. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₂₃H₃₆N₂O₃Si: 416,6; encontrado 317,2 [M-Boc]⁺ y 439,0 [M+Na]⁺, t_R = 4,04 min (Método 1). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,46 (d, J = 7,6, 1H), 7,38- 7,32 (m, 1H), 7,33 - 7,18 (m, 1H), 5,69 (s, 0,5 H), 5,19 (s, 0,5 H), 3,70 (ddd, J = 48,8, 26,6, 22,9, 1,5 H), 3,50 - 3,37 (m, 1H), 3,17 (ddd, J = 16,7, 9,4, 2,2, 2H), 2,93 (m, 1,5 H), 2,45 (s, 1H), 2,21 (dd, J = 24,5, 14,5, 1H), 1,56 - 1,37 (s a, 4,5H), 1,22 (s a, 4,5H), 0,87 - 0,74 (m, 9H), -0,04 (dd, J = 26,6, 8,2, 6H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 155,03, 146,55, 145,54, 131,16, 130,76, [128,11, 127,03], 117,58, 109,20, 79,88, [63,93, 61,88], [61,44, 60,34], [49,73, 46,76], 30,30, 29,70, 28,44, 28,12, [25,87, 25,62], -5,43. (S)-2-(terc-butildimetilsililoxi)etil(4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)carbamato de terc-butilo **INT-17** se preparó de una forma análoga usando **INT-9**.

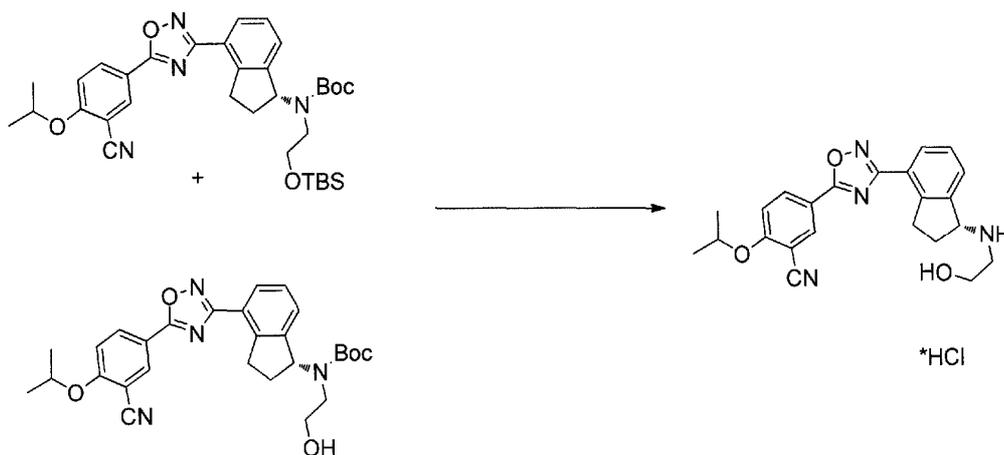
(R)-2-(terc-butildimetilsililoxi)etil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)carbamato de terc-butilo y (R)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-il) (2-hidroxetil) carbamato de terc-butilo (compuesto comparativo)



Se preparó usando el *Procedimiento General* 4. A una solución de ácido 3-ciano-4-isopropoxibenzoico (4,5 g, 21,9 mmol) en DMF anhidra (100 ml) se añadió HOBt (5,4 g, 40,0 mmol) y EDC (5,6 g, 29,6 mmol). Después de 1 h, (R)-2-(terc-butildimetilsililoxi)etil (4-(N-hidroxycarbamimidoyl)-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)carbamato de terc-butilo **INT-18** (11,8 g, 26,3 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El análisis de LCMS mostró la conversión completa al intermedio, (R)- 2-(terc-butildimetilsililoxi) etil (4-(N-(3-ciano-4-

isopropoxibenzoíloxi) carbamimidóil)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)carbamato de terc-butilo **INT-20**. Después, la mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con EA (250 ml). NaHCO₃ (250 ml) y agua (350 ml) se añadieron hasta que todos los sólidos se disolvieron. La mezcla se extrajo con EA y las capas orgánicas se lavaron sucesivamente con agua y salmuera. Las capas orgánicas se secaron con MgSO₄ y se concentraron para producir 15,3 g de una mezcla de (*R*)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il) carbamato de terc-butilo **INT-21**, y el material correspondiente sin el grupo protector TBS, (*R*)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il) (2-hidroxi)etil) carbamato de terc-butilo **INT-22**. La mezcla era un aceite de color pardo, que podría utilizarse directamente sin purificación adicional o purificarse por cromatografía (EA/hexano). **INT-21**: LCMS-ESI (m/z) calculado para C₃₄H₄₆N₄O₅Si: 618,8; encontrado 519,2 [M-Boc]⁺ y 641,3 [M+Na]⁺, t_R = 7,30 min (Método 1). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,43 (d, J = 2,1, 1H), 8,34 (dd, J = 8,9, 2,2, 1H), 8,07 (d, J = 8,1, 1H), 7,46 - 7,26 (m, 2H), 7,12 (d, J = 9,0, 1H), 5,85 (s, 0,5H), 5,37 (s, 0,5H), 4,80 (dt, J = 12,2, 6,1, 1H), 3,92 - 3,32 (m, 3,5 H), 3,17 (s, 2H), 2,95 (s, 0,5 H), 2,62 - 2,39 (m, 1H), 2,38 - 2,05 (m, 1H), 1,53 (s, 4,5H), 1,48 (d, J = 6,1, 6H), 1,33 - 1,27 (m, 4,5H), 0,94 - 0,77 (m, 9H), 0,01 (d, J = 20,9, 6H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) δ 173,02, 169,00, 162,75, [156,22, 155,52], [145,18, 144,12], [143,39, 142,76], 134,16, 133,89, 128,20, [128,01,127,85], [127,04, 126,90], 126,43, 123,31,116,93, 115,30, 113,55, 103,96, [79,95, 79,68], 72,73, 67,61,63,42, [61,91,61,77], 60,99, 46,11,31,78, [30,47, 29,87], [28,55, 28,26], 25,93, 21,75, 18,30, 0,00, -5,37. **INT-22**: LCMS-ESI calculado para C₂₈H₃₂N₄O₅: 504,6; encontrado 527,2 [M+Na]⁺, t_R = 2,65 min (Método 1). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,36 (d, J = 2,1, 1H), 8,27 (dd, J = 8,9, 2,2, 1H), 8,03 (d, J = 7,2, 1H), 7,35 - 7,26 (m, 2H), 7,06 (d, J = 9,0, 1H), 5,44 (s, 1H), 4,73 (dt, J = 12,2, 6,1, 1H), 3,64 (s, 2H), 3,44 (ddd, J = 17,5, 9,5, 3,2, 2H), 3,11 (dt, J = 17,4, 8,6, 3H), 2,54 - 2,38 (m, 1H), 2,04 (td, J = 17,6, 8,8, 1H), 1,50 - 1,24 (m, 15H). (*S*)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)carbamato de terc-butilo **INT-23** y (*S*)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)(2-hidroxi)etil) carbamato de terc-butilo **INT-24** se fabricaron de una forma análoga.

(*R*)-5-(3-(1-(2-hidroxi)etilamino)-2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo (**Compuesto 85**) (comparativo)

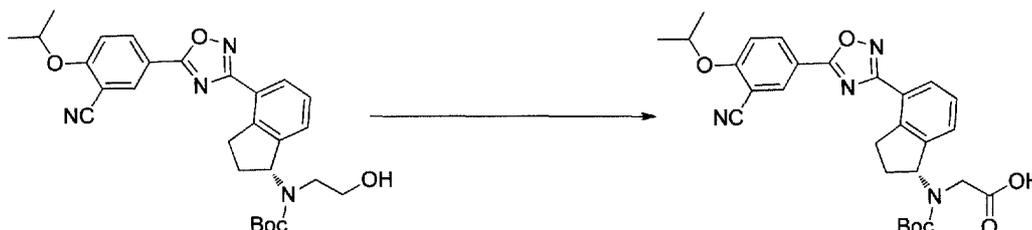


A una solución de (*R*)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)carbamato de terc-butilo **INT-21** y (*R*)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il) (2-hidroxi)etil) carbamato de terc-butilo **INT-22** (13,9 g, 27,5 mmol) en dioxano (70 ml) a 0 °C se añadió HCl 4 N en dioxano (68,8 g, 275,4 mmol). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y a continuación se calentó a 50 °C durante 1 h. La suspensión resultante se enfrió a temperatura ambiente y se añadió Et₂O (75 ml). El precipitado se recogió por filtración, se lavó con Et₂O y se secó para producir 10,5 g de un sólido de color blanquecino. La sal de HCl se recristalizó en MeOH (165 ml) para producir 5,98 g (rendimiento global del 56 % a partir de (*R*)-2-(*tert*-butildimetilsililoxi)etil(4-ciano-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il) carbamato de terc-butilo) de (*R*)-5-(3-(1-(2-hidroxi)etilamino)-2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo **85** en forma de un sólido de color blanco. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₂₃H₂₄N₄O₃: 404,5; encontrado 405,4 [M+H]⁺, t_R = 2,44 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ 9,25 (s, 2H), 8,53 (d, J = 2,3, 1H), 8,42 (dd, J = 9,0, 2,3, 1H), 8,17 (d, J = 7,7, 1H), 7,97 (d, J = 7,6, 1H), 7,63 - 7,50 (m, 2H), 5,28 (t, J = 5,0, 1H), 4,99 (sept., J = 6,1, 1H), 4,92 (s, 1H), 3,72 (c, J = 5,2, 2H), 3,57 - 3,43 (m, 1H), 3,27 (ddd, J = 17,6, 9,1, 5,0, 1H), 3,15-2,85 (m, J = 24,2, 2H), 2,53 (dtd, J = 9,0, 5,5, 5,3, 3,6, 1H), 2,30 (ddd, J = 13,4, 8,9, 4,6, 1H), 1,39 (d, J = 6,0, 6H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) δ 173,25, 167,86, 162,47, 144,56, 139,13, 134,53, 133,77, 129,30, 128,93, 127,45, 122,83, 115,79, 115,15, 114,84, 102,40, 72,46, 61,04, 56,51,46,38, 31,53, 27,74, 21,37. Análisis elemental para C₂₃H₂₅N₄O₃Cl: C calculado = 62,65 %; encontrado = 62,73 %; H calculado = 5,71 %; encontrado = 5,60 %; N calculado = 12,71 %; encontrado = 12,64 %; Cl calculado = 8,04 %; encontrado = 8,16 %. HPLC quiral de la base libre: (*R*)-5-(3-(1-(2-hidroxi)etilamino)-2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo se eluyó usando el 10 % de *i*-PrOH en hexanos más 0,3 % de DEA: >99,9 % ee, t_R = 37,72 min. (*S*)-5-(3-(1-(2-hidroxi)etilamino)-2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) -2-isopropoxi

benzonitrilo **86** se obtuvo de forma análoga a partir de (S)--2-(*terc*-butildimetilsililoxi)etil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)carbamato de *terc*-butilo **INT-23** y (S)-*terc*-butil 4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il) (2-hidroxi)etil) carbamato de *terc*-butilo **INT-24**: >99,9 % ee, t_R para el enantiómero (S) = 35,86 min.

5

Ácido (R)-2-(*terc*-butoxicarbonil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)amino)acético (**INT-25**)



10

(R)--4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il) (2-hidroxi)etil) carbamato de *terc*-butilo **INT-22** (4,8 g, 9,5 mmol) se disolvió en CH₃CN (48 ml) y tampón fosfato de sodio 0,67 M pH 6,7 (38 ml). A la mezcla de reacción se añadió TEMPO (0,10 g, 0,67 mmol) y la reacción se calentó a 35 °C. Se añadieron simultáneamente clorito de sodio (1,72 g, 19 mmol) en agua (9,5 ml) e hipoclorito de sodio (0,28 ml, 0,19 mmol) en agua (5,70 ml) gota a gota a partir de embudos de adición separados durante 1 hora. Después de la adición, la reacción se calentó a 35 °C durante una hora más. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió agua (80 ml), y el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8,5 con NaOH 2,0 N (12 ml). La reacción se inactivó vertiéndola en una solución enfriada con hielo de sulfito de sodio (2,9 g en 50 ml de agua) y la temperatura se mantuvo por debajo de 20 °C. Después de agitar durante 30 min a temperatura ambiente, se añadió Et₂O (50 ml) y la capa orgánica se separó y descartó. La capa acuosa se acidificó con HCl 1,0 N (55 ml) a pH 3,0 y se extrajo con EA (3 x 100 ml). La capa orgánica se secó con MgSO₄ y se filtró para dar 4,9 g (>99 %) de ácido (R)-2-(*terc*-butoxicarbonil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)amino)acético **INT-25** en forma de una espuma de color blanco. LCMS-ESI (m/z) calculado para C₂₈H₃₀N₄O₆: 518,2; encontrado 541,2 [M+Na]⁺, t_R = 3,97 min. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,33 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 8,24 (dd, *J* = 8,9, 2,2 Hz, 1H), 8,08 - 7,94 (m, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,41 - 7,22 (m, 2H), 7,03 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 5,85 (t, *J* = 7,9 Hz, 0,6H), 5,51 (t, *J* = 7,8 Hz, 0,4H), 4,70 (sept., *J* = 6,2 Hz, 1H), 3,88 (d, *J* = 17,1 Hz, 0,4H), 3,69 (d, *J* = 18,0 Hz, 0,6H), 3,56 (d, *J* = 17,2 Hz, 0,4H), 3,43 (d, *J* = 18,0 Hz, 0,6H), 3,40 - 3,25 (m, 1H), 3,07 (dt, *J* = 17,3, 8,5 Hz, 1H), 2,53 - 2,38 (m, 1H), 1,93 - 1,77 (m, 1H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (d, *J* = 6,1 Hz, 6H).

15

20

25

30 Procedimiento general 10. Formación de amida (comparativo)

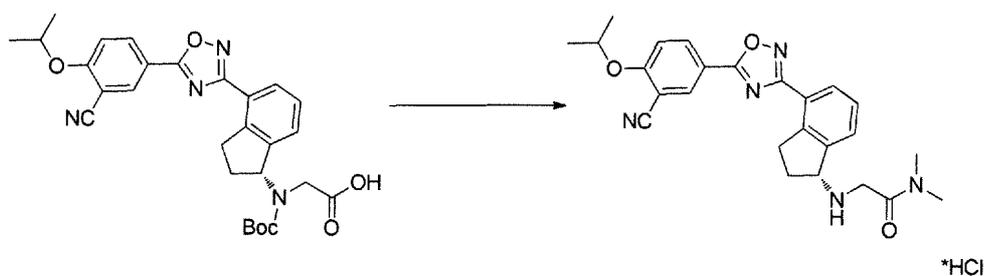
al aminoácido de (R)- o (S)-indano protegido con boc (1 equivalente) en DMF (2 M) se añadió HOBt (3 equiv.) y EDC (3 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió la amina (3 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h hasta que se completó. El producto protegido con Boc se precipitó fuera del agua o se extrajo (DCM /5 % de MeOH) y se secó con MgSO₄. El sólido se disolvió en HCl 4 M en dioxano y la mezcla se calentó a 50 °C. Después de 1 h, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo sólido se purificó por recristalización o HPLC preparativa.

35

El compuesto **90** se preparó usando el Procedimiento General 10.

40

Clorhidrato de (R)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)amino)-*N,N*-dimetilacetamida (Compuesto **90**)



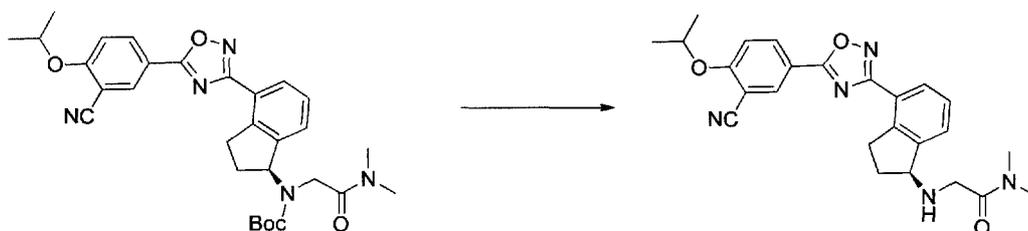
45

Se preparó usando el Procedimiento General 10. A 4,9 g de ácido (9,5 mmol) de (R)-2-(*terc*-butoxicarbonil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)amino)acético **INT-25** en DMF (20 ml) se añadió HOBt (4,4 g, 28,5 mmol) y EDC (5,5 g, 28,5 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió dimetilamina (2,0 N en THF, 14,25 ml, 28,5 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (300 ml) y el precipitado se filtró. El sólido se lavó

50

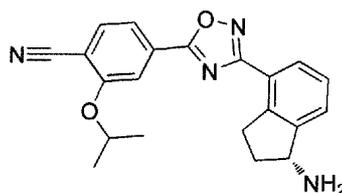
vigorosamente con agua (200 ml). El sólido se disolvió en DCM con 5 % de MeOH, se secó con MgSO_4 y se filtró. Se añadió HCl 4M en dioxano y la mezcla se calentó a 50 °C. Después de 1 h, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo sólido se recrystalizó en una mezcla de 120 ml de MeOH / 120 ml de Et_2O / 70 ml hexano/ 10 ml de IPA para proporcionar 3,37 g (74 %) de clorhidrato de (R)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino) -N,N-dimetilacetamida **90** en forma de un polvo de color blanco. LCMS-ESI (m/z) calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3$: 445,5; encontrado 446,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_{\text{R}} = 2,52$ min. Análisis elemental de $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_3\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C calculado = 60,05 %; encontrado = 59,68 %; H calculado = 6,05 %; encontrado = 6,45 %; N calculado = 14,01 %; encontrado = 13,91 %; Cl calculado = 7,09; encontrado = 6,98 %. RMN^1H (400 MHz, DMSO) δ 9,44 (s, 2H), 8,53 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 8,41 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,96 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,62 - 7,52 (m, 2H), 5,05 - 4,92 (m, 1H), 4,88 (dd, $J = 7,0, 4,2$ Hz, 1H), 4,11 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H), 4,02 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 3,51 (ddd, $J = 17,2, 8,2, 6,6$ Hz, 1H), 3,25 (ddd, $J = 17,4, 8,8, 5,0$ Hz, 1H), 2,97 (s, 3H), 2,91 (s, 3H), 2,60 - 2,51 (m, 1H), 2,33 (dq, $J = 9,0, 4,9$ Hz, 1H), 1,39 (d, $J = 6,0$ Hz, 6H). RMN^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 173,33, 167,95, 164,97, 162,56, 144,68, 139,16, 134,61, 133,85, 129,43, 128,70, 127,63, 122,90, 115,87, 115,24, 114,92, 102,48, 72,54, 61,28, 44,84, 35,77, 34,98, 31,52, 27,68, 21,45. HPLC quiral de la base libre: (R)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino) -N,N-dimetilacetamida se eluyó usando 15 % de *i*-PrOH en hexanos más 0,3 % de DEA: 98,5 % de e.e., $t_{\text{R}} = 41,19$ min. Se puede obtener (S)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-N,N-dimetil-acetamida **91** de forma análoga a partir de ácido (S)-2-(*tert*-butoxicarbonil(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)acético. t_{R} para el enantiómero (S) = 34,35 min. Se describe a continuación una ruta alternativa.

(S)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-N,N-dimetilacetamida (Compuesto **91**) (comparativo)



A una solución de (S)-4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-il(2-(dimetilamino)-2-oxoetil) carbamato de *tert*-butilo en bruto (2,36 g, 4,33 mmol) en dioxano (5 ml) se añadió HCl 4 N en dioxano (10 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró y a continuación se suspendió en Et_2O . El sólido resultante se filtró y se secó para obtener 2,3 g (78,4 %) de la sal de HCl de (S)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-N,N-dimetil acetamida **91** que era un 95 % pura. El material se puede recrystalizar de forma adicional a partir de isopropanol. LCMS-ESI (m/z) calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3$: 445,51; encontrado 446,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_{\text{R}} = 2,55$ min. RMN^1H y ^{13}C para $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_3\text{Cl}$: (400 MHz, DMSO) δ 9,46 (s, 2H), 8,53 (d, $J = 2,3$, 1H), 8,42 (dd, $J = 9,0, 2,3$, 1H), 8,17 (d, $J = 7,6$, 1H), 7,97 (d, $J = 7,6$, 1H), 7,67 - 7,51 (m, 2H), 4,99 (sept., $J = 6,1$, 1H), 4,90 (s, 1H), 4,12 (d, $J = 16,0$, 1H), 4,04 (d, $J = 16,0$, 1H), 3,59 - 3,44 (m, 1H), 3,30 - 3,11 (m, 1H), 2,97 (s, 3H), 2,91 (s, 3H), 2,60-2,51 (m, 1H), 2,34 (s, 1H), 1,39 (d, $J = 6,0$, 6H). RMN^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 173,30, 167,95, 164,93, 162,54, 144,69, 139,17, 134,61, 133,83, 129,39, 128,77, 127,58, 122,86, 115,87, 115,23, 114,92, 102,47, 72,54, 61,26, 44,73, 35,77, 34,99, 31,54, 27,61, 21,45. HPLC quiral de la base libre: (S)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-N,N-dimetil-acetamida se eluyó usando 15 % de isopropanol en hexanos, más 0,3 % de DEA: > 99,9 % ee, $t_{\text{R}} = 34,35$ min. Se puede obtener (R)-2-(4-(5-(3-ciano-4-isopropoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-N,N-dimetil acetamida **90** de forma análoga a partir de (R)-4-ciano-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilcarbamato de *tert*-butilo. t_{R} para el enantiómero (R) = 41,19 min.

(R)-4-(3-(1-amino-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxi benzonitrilo (Compuesto **98**)

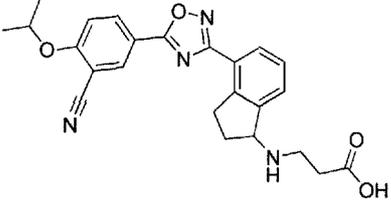
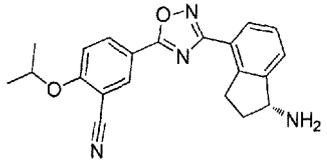
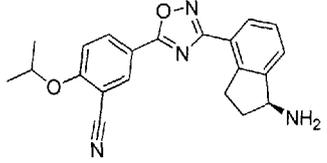
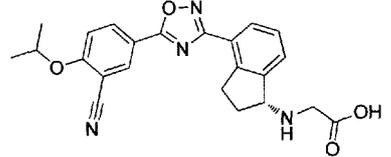
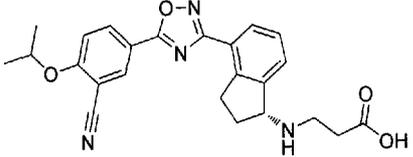
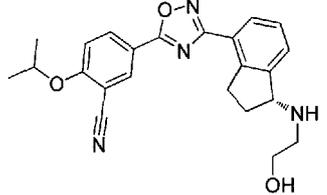
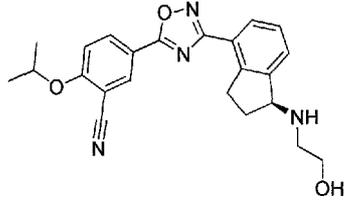
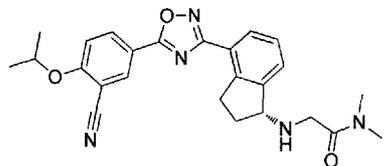


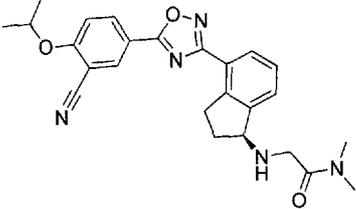
Se preparó a partir de ácido 4-ciano-3-isopropoxibenzoico utilizando el *Procedimiento General 4*. LCMS-ESI (m/z) calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: 360,4; encontrado 344,1 $[\text{M}-\text{NH}_2]^+$, $t_{\text{R}} = 2,52$ min.

Los compuestos seleccionados y sus correspondientes datos analíticos se muestran en la *Tabla 1*, donde los datos de LCMS se recogieron usando el Método 2 (véanse los Métodos generales). Se determinó la pureza enantiomérica

de los compuestos intermedios clave y los compuestos finales seleccionados, y para el resto de los compuestos se infirió de la síntesis.

TABLA 1

ESTRUCTURA	NÚMERO DE COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN LCMS (min)	QUIRALIDAD DEL CARBONO DEL INDANO
	38	6,51	<i>Mezcla racémica</i>
	49	6,29	<i>R</i>
	50	6,42	<i>S</i>
	61	6,63	<i>R</i>
	62	6,56	<i>R</i>
	85	6,30	<i>R</i>
	86	6,41	<i>S</i>
	90	6,58	<i>R</i>

	91	6,56	S
---	-----------	------	---

Ensayos biológicos

Procedimientos de ensayo

5

Generación de la inhibición mediada por S1P₁ del ensayo indicador de AMPc

Un plásmido de expresión en mamífero que contiene S1P₁/EDG1 clonado en pcDNA3.1 se adquirió del Missouri S&T cDNA Resource Centre. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de S1P₁/EDG1 humanos se publicaron en H1a y Maciag (J Biol Chem, 265(1990), 9308-9313). S1P₁/pcDNA3.1 se transfectó en la línea de células CRE-bla CHO K1 (Invitrogen), y los clones monocelulares estables se seleccionaron usando técnicas convencionales. La expresión del receptor S1P₁/EDG1 funcional se confirmó mediante FACS de la superficie celular con un anticuerpo dirigido contra S1P₁ (R&D Systems, clon 218713) y la inhibición de AMPc inducida por forskolina mediada por S1P.

15 *Ensayo indicador de S1P₁ CRE-bla CHOK1 - caracterización de agonistas de S1P₁*

Se sembraron las células en 384 pocillos de paredes negras/placas de fondo claro a 10⁴ células/pocillo/19,5 µl de medio de ensayo (DMEM-exento de fenol, carbón activo al 0,5 %/suero desprovisto de dextrano, glutamina 2 mM, NEAA 0,1 mM, Na-Piruvato 1 mM, Hepes 25 mM) y se incubaron durante 18 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se generaron curvas de respuesta a la dosis (10 puntos) en HEPES 10 mM, Pluronic F127 al 0,1 %, en presencia de forskolina. Se trataron las células con 0,5 µl de compuesto en presencia de 2 µM de Forskolina durante 4 h a 37 °C. Se preparó sustrato fluorescente de β-lactamasa basado en FRET (LiveBLAzer™-FRET B/G Loading Kit CC4-AM; Invitrogen) de acuerdo con las directrices del fabricante, y se incubó con las células durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se leyeron a Ex:410/Em:458 y Ex:410/Em:522, y se determinó la relación de respuesta. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal para determinar la CE50 para la inhibición de AMPc inducido por forskolina.

Especificidad respecto de otros receptores S1P

30 Para evaluar la especificidad del compuesto sobre otros receptores S1P, se usaron las siguientes líneas de células: S1P₂ CRE-bla CHOK1, S1P₃-Gα15 NFAT-bla HEK293T (Invitrogen), S1P₄-bla TANGO U2OS (Invitrogen), S1P₅-bla TANGO U2OS (Invitrogen). Se utilizó el mismo ensayo configurado para S1P₁ pero sin forskolina. Los ensayos con S1P₄ y S1P₅ se realizaron en medio FreeStyle Expression (Invitrogen). Las células S1P₅ se incubaron durante 48 h antes del tratamiento con el compuesto.

35 *Actividad de S1P₁ indicada*

40 Los datos de actividad de agonistas de S1P₁ seleccionados se muestran en la *Tabla 2*. El intervalo de actividad se representa de la siguiente forma: ++++ representa actividad agonista <0,05 nM. +++ representa actividad agonista entre 0,05 y 0,50 nM, y ++ representa actividad agonista entre 0,50-5,00 nM, y + representa actividad agonista > 5,00 nM. N/A representa no disponible.

TABLA 2

NÚMERO DE COMPUESTO	ACTIVIDAD DE S1P ₁
49	+++
50	+++
61	++++
85	+++
86	+++
90	+++
91	+++

NÚMERO DE COMPUESTO	ACTIVIDAD DE S1P ₁

Mutagénesis de S1P₁

Se llevó a cabo la mutagénesis de cambio rápido con ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene) usando S1P₁/pcDNA3.1 (Missouri S&T cDNA Resource Centre) como molde. Los cebadores fueron los siguientes:

	Secuencia del cebador
R120A/E121A Directo	CCAGTGGTTTCTGGCGGCAGGGAGTATGTTTGT GGCC
R120A/E121A Inverso	GGCCACAAACATACTCCCTGCCGCCAGAAACC ACTGG
N101A Directo	CTACACAGCTGCCCTGCTCTTGCTGGGGC
N101A Inverso	GCCCCAGACAAGAGCAGGGCAGCTGTGTAG

- 5 Las condiciones de la PCR fueron 15 ciclos con los siguientes parámetros: 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 68 °C durante 60 s. Se verificaron las secuencias de todas las construcciones.

ERK1/2 fosforilado en ensayo Western en células

- 10 Se transfectaron células CHOK1 usando Fugene (Roche). Se seleccionaron combinados mixtos que se expresaban de forma estable con 2 mg/ ml de G418. La expresión del receptor S1P₁/EDG1 funcional se confirmó mediante FACS de la superficie celular con un anticuerpo dirigido contra S1P₁ (R&D Systems, clon 218713). Se sembraron combinados estables a 40.000 células/pocillo en una bandeja de 96 pocillos de fondo transparente y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 18 h. Las células se sembraron privadas de suero en medio FreeStyle 293 (Invitrogen)
- 15 durante 4-6 h, a continuación se incubaron durante 5 min con una respuesta a la dosis de compuesto, por duplicado. se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % durante 20 min, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % en PBS (lavados de 4x 5 min) y se bloquearon durante 1 h en tampón de bloqueo Odyssey (LICOR). Todas las incubaciones fueron a temperatura ambiente. Se incubaron las células durante 18 h a 4 °C en Rabbit anti-Phospho-ERK1/2 (Cell Signaling n.º 4377) y Mouse anti-ERK1/2 (Cell Signaling n.º 9107) diluidos ambos 1:800 en tampón de bloqueo Odyssey. Las placas se lavaron con Tween-20 al 0,1 % en PBS y a continuación se incubaron con tampón de bloqueo Odyssey que contenía anticuerpo de cabra marcado con IRDye 680 dirigido contra anticuerpo de conejo (n.º 926-32221; diluido 1/500) y anticuerpo de cabra marcado con IRDye 800CW dirigido contra anticuerpo de ratón (n.º 926-32210; diluido 1/1000). se lavaron las placas con Tween-20 al 0,1 % en PBS, se retiró todo el líquido de los pocillos y se analizaron las placas usando un analizador LICOR Odyssey. La señal fosfo-ERK1/2 se normalizó a la señal ERK1/2. Se analizaron los datos mediante regresión no lineal utilizando GraphPad Prism para determinar la CE₅₀ de la unión.
- 20
- 25

Los resultados del análisis de mutagénesis se muestran en la *Tabla 3*.

30

Tabla 3

Variante de S1P ₁	Cambio de veces en la CE ₅₀ en comparación con S1P ₁ natural	
	Compuesto 50	Compuesto 38
R120A/E121A	2	11
N101A	32	2

Conclusiones del análisis de la mutagénesis S1P₁

- 35 Includidos en esta invención están los agonistas de S1P₁ que se unen potencialmente al receptor S1P₁ en diferentes sitios. Por ejemplo, los compuestos **50** y **38** son agonistas de S1P₁ que inducen la fosforilación de ERK1/2 (*Tabla 3*). La mutación de S1P₁ para producir S1P₁ R120A/E121A no tiene influencia sobre la unión del compuesto **50**, pero disminuye la unión del compuesto **38**. En contraste, la mutación de S1P₁ para producir N101A no tiene efecto sobre la unión del compuesto **38** pero reduce la unión del compuesto **50**. Para finalizar, La mutación de W269L elimina la unión de ambos compuestos.
- 40

Ensayos in vivo

Determinación de la biodisponibilidad oral absoluta en ratas.

- 45 Se llevaron a cabo todos los estudios farmacocinéticos en ratas Sprague-Dawley hembras sin ayunar (Simonsen Laboratories o Harlan Laboratories). Se alojaron las ratas en una instalación acreditada por la ALAAC y la investigación recibió la aprobación del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) para las instalaciones. Se aclimataron los animales al laboratorio durante al menos 48 h antes del inicio de los experimentos.
- 50 Se formularon los compuestos en DMSO al 5 %/Tween 20 al 5 % y agua purificada al 90 % (infusión intravenosa) o

DMSO al 5 % /Tween 20 al 5 % y HCl 0,1 N al 90 % (sonda oral). La concentración de las soluciones de dosificación se verificó mediante HPLC-UV. Para la dosificación intravenosa, se administraron los compuestos mediante una bomba de infusión en la vena yugular durante un minuto a animales sujetos manualmente (n=4 ratas/compuesto). Las dosis intravenosas fueron de 0,8 para una mezcla 1:1 (racémica) de **85** y **86**, y 0,3 y 0,3 mg/kg para los compuestos **49** y **50**, respectivamente. La dosificación oral fue mediante sonda usando una aguja de sonda de acero inoxidable normalizada (n=2-4 ratas/compuesto). Las dosis de solución oral fueron de 0,3, 2 y 2 mg/kg para los compuestos **85**, **49** y **50**, respectivamente. Para ambas vías de administración, se recogió la sangre en ocho puntos temporales tras la dosificación con la extracción de la muestra final 24 h después de la dosis. Se transfirieron alícuotas de las muestras de sangre a una placa de polipropileno de 96 pocillo y se congelaron a -20 °C hasta el análisis.

Después de descongelar las muestras de sangre a temperatura ambiente, se añadieron 5 µl de DMSO a cada pocillo. Se precipitaron las proteínas añadiendo 150 µl de acetonitrilo que contenía 200 nM de patrón interno (4-hidroxi-3-(alfa-iminobencil)-1-metil-6-fenilpirindin-2-(1H)-ona) y ácido fórmico al 0,1 %. Las placas se mezclaron durante 1 min en un agitador con placas para facilitar la precipitación de las proteínas y a continuación se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min para aglomerar las proteínas. El sobrenadante se transfirió a una placa limpia y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min para aglomerar cualquier material sólido restante antes del análisis LC/MS/MS. Se prepararon patrones de la curva patrón de calibración enriqueciendo 5 µl de solución madre de compuesto en DMSO en sangre de rata con EDTA recogida recientemente. Se incluyó una curva patrón de ocho puntos que abarca un intervalo de 5 nM a 10.000 nM con cada ciclo bioanalítico. Los patrones se procesaron de forma idéntica a las muestras farmacocinéticas de ratas.

Las concentraciones de las muestras farmacocinéticas de ratas se determinaron usando a método HPLC-LC/MS/MS normalizado con respecto a la curva patrón de ocho puntos. El sistema consistió en un inyector Leap CTC Pal, HPLC Agilent 1200 con bomba binaria acoplada a un Applied Biosystems 3200 QTrap. Los compuestos se sometieron a cromatografía en una Phenomenex Synergy Fusion RP 20x2 mm 2 µm Mercury Cartridge con Security Guard. Se usó un método de gradiente con fase móvil A que consiste en ácido fórmico al 0,1 % en agua y fase móvil B que consiste en ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo, a caudales variables comprendidos entre 0,7 y 0,8 ml/min. Los iones se generaron en el modo de ionización positiva usando una interfase de ionización por electronebulización (ESI). Se desarrollaron métodos de vigilancia de reacción múltiple (MRM) específicos de cada compuesto. El nebulizador calentado se configuró a 325 °C con una corriente de nebulizador de 4,8 µA. Se usaron energías de colisión para generar un intervalo de iones derivados entre 29 y 39 V. Los cocientes de las áreas de picos obtenidas en MRM de las transiciones de masa específicas de cada compuesto se utilizaron para la cuantificación. El límite de cuantificación del método era normalmente 5 nM. Los datos se recogieron y se analizaron usando el software Analyst versión 1.4.2.

Los datos de concentración en sangre frente al tiempo se analizaron usando métodos no compartimentados (Win-Nonlin versión 5.2; modelo 200 para dosificación oral y modelo 202 para infusión intravenosa). La biodisponibilidad oral absoluta (%) se calculó usando la siguiente expresión: $(ABC \text{ oral} \times \text{Dosis IV}) / (ABC \text{ IV} \times \text{Dosis oral}) \times 100$.

Linfopenia

En ratones: Ratones C57BL6 hembras (Simonsen Laboratories, Gilroy CA) se alojaron en una instalación ALAAC acreditada, y la investigación recibió la aprobación del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de la instalación. Los animales se aclimataron al laboratorio durante al menos 5 días antes de iniciar los experimentos. Los ratones (n=3/compuesto/punto temporal) recibieron la dosis mediante sonda nasogástrica con 1 mg/kg de compuesto formulado en un vehículo que consiste en DMSO al 5 %/Tween20 al 5 % y HCl 0,1 N al 90 %. Los ratones de control se dosificaron PO con el vehículo. Las muestras de sangre completa terminal se recogieron de ratones anestesiados con isoflurano mediante punción cardiaca en EDTA. La sangre completa se incubó con anticuerpo de rata dirigido contra CD16/CD32 de ratón (Mouse BD Fc Block, n.º 553141), PE-anticuerpo de rata dirigido contra CD45R/B220 de ratón (BD n.º 553089), APC-Cy7-anticuerpo de rata dirigido contra CD8a (BD n.º 557654) de ratón, y Alexa Fluor647-anticuerpo de rata dirigido contra CD4 (BD n.º 557681) de ratón durante 30 min sobre hielo. Los glóbulos rojos se lisaron usando tampón BD Pharm Lyse Lysing (n.º 555899) y los glóbulos blancos se analizaron por FACS. La linfopenia se expresó como el % de glóbulos blancos que eran linfocitos T positivos para CD4 o CD8. La respuesta de linfopenia global durante 24 h se estimó calculando el área bajo la curva de efecto (ABCE) usando la regla trapezoidal lineal.

En ratas: Ratas hembras (Simonsen Laboratories, Gilroy CA) se alojaron en una instalación ALAAC acreditada, y la investigación recibió la aprobación del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de la instalación. Los animales se aclimataron al laboratorio durante al menos 5 días antes de iniciar los experimentos. Las ratas (n=3/compuesto/punto temporal) recibieron la dosis mediante sonda nasogástrica con 1 mg/kg de compuesto formulado en un vehículo que consiste en DMSO al 5 %/Tween20 al 5 % y HCl 0,1 N al 90 %. Las ratas de control se dosificaron PO con el vehículo. La sangre completa se recogió de ratones anestesiados con isoflurano mediante el seno retroorbital, y las muestras terminales se recogieron mediante punción cardiaca en EDTA. La sangre completa se incubó con anticuerpo de ratón dirigido contra CD32 de rata (BD n.º 550271), PE-anticuerpo de ratón dirigido contra CD45R/B220 de rata (BD n.º 554881), PECy5-anticuerpo de ratón dirigido contra CD4 de rata (BD n.º

554839), y APC-anticuerpo de ratón dirigido contra CD8a de rata (eBioscience n.º 17-0084) durante 30 minutos sobre hielo. Los glóbulos rojos se lisaron usando tampón BD Pharm Lyse Lysing (n.º 555899) y los glóbulos blancos se analizaron con un BD FACSAarray. La linfopenia se expresó como el % de glóbulos blancos que eran linfocitos T positivos para CD4 o CD8. La respuesta de linfopenia global durante 24 h se estimó calculando el área bajo la curva de efecto (ABCE) usando la regla trapezoidal lineal.

Evaluación del índice terapéutico en ratas

10 Todos los estudios se llevaron a cabo en ratas Sprague-Dawley machos y hembras sin ayunar (Simonsen Laboratories). Se alojaron las ratas en una instalación acreditada por la AAALAC y la investigación recibió la aprobación del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) para las instalaciones. Los animales se aclimataron al laboratorio durante al menos 5 días antes de iniciar los experimentos.

15 Los compuestos relacionados en la Tabla 6 se formularon como suspensiones en un vehículo consistente en carboximetilcelulosa al 0,5 % (Acros Organics) en agua purificada (el pH se ajustó a 2,2 con ácido clorhídrico). La misma formulación se utilizó para la linfopenia en ratas y en los estudios toxicológicos descritos a continuación. La concentración de cada compuesto en suspensión se verificó para que esté en el intervalo de ± 10 % de la concentración diana según HPLC-UV.

20 Antes de realizar los estudios toxicológicos, se puede determinar el efecto de tres a cinco dosis diarias de cada compuesto sobre los recuentos de linfocitos T periféricos en ratas hembras (véase las mediciones de linfopenia en ratas anteriores). En estos estudios de linfopenia, las muestras de sangre se recogieron en EDTA en intervalos después de la última dosis del estudio. Los tiempos de recogida no fueron idénticos para cada estudio, sin embargo, todos los estudios incluyeron una muestra recogida 24 horas después de la última dosis. Los datos de linfopenia se
25 utilizaron como un biomarcador para seleccionar dosis con la misma actividad farmacológica para el siguiente estudio de toxicología. La dosis baja del estudio de toxicología era la dosis de cada compuesto que dio como resultado una reducción del 50 % en el recuento de linfocitos T 24 h después de la última dosis en el estudio de linfopenia con respecto a las ratas tratadas con vehículo. La dosis alta en el estudio de toxicología representó un incremento de ≥ 20 veces sobre la dosis baja.

30 En los estudios de toxicología, tres ratas macho y tres ratas hembra por grupo se asignaron a grupos de dosificación usando aleatorización basada en el peso corporal. Un grupo de control en cada estudio recibe vehículo. Todos los animales recibieron dosis por vía oral mediante sonda nasogástrica durante 5 o 14 días consecutivos a un volumen de dosis de 5 ml/kg/día. Los animales se observaron diariamente para cualesquiera manifestaciones de efectos
35 adversos. Veinticuatro horas después de la última dosis del estudio, las ratas se anestesiaron con isoflurano y se extrajo una muestra sangre final mediante punción intracardiaca para la evaluación de la hematología y química clínica (IDEXX Laboratories, Sacramento, CA). Se recogieron los pulmones con la tráquea, se pesaron, y posteriormente se prepararon para histología por perfusión con formalina tamponada neutra al 10 % mediante la tráquea. Los pulmones internamente fijados se conservaron posteriormente en formalina tamponada neutra al 10 %
40 y se enviaron para examen histológico (IDEXX).

Se estimó la dosis de cada compuesto que da como resultado un aumento del 10 % en la relación de peso entre el pulmón y el cuerpo final, para cada compuesto, mediante interpolación lineal. Seguidamente, se estimó el índice terapéutico como la relación entre la dosis que produce un aumento del 10 % en el peso del pulmón que produce un
45 agotamiento del 50 % de los linfocitos T.

Descripción del modelo de la colitis de Crohn TNBS en ratas

50 Ratas Sprague-Dawley machos (180-200 g) se aclimataron durante siete días y a continuación se asignaron 8 ratas por grupo de manera que cada grupo tenía aproximadamente el mismo peso medio. Veinticuatro horas antes del inicio de la enfermedad, las ratas se privaron de alimento. Las ratas se anestesiaron y se pesaron, a continuación, una solución de TNBS 80 mg/kg (50 % TNBS: 50 % 200 etanol sin agua) se instilaron en el colon mediante una
55 aguja de alimentación 20 g introducida en el ano. Las ratas se mantuvieron cabeza abajo hasta la recuperación de la anestesia. La dosificación oral diaria se inició 2 h después de la instilación de TNBS durante seis días. Prednisolona sirvió como control positivo y se administró por vía oral a diario a 10 mg/kg. Los pesos corporales se controlaron diariamente y, 24 horas después de la última dosis, todos los grupos se finalizaron. El colon se retiró, se limpió el material fecal y se estudiaron para determinar cambios principales incluidas estenosis, adhesiones y úlceras. Se registró la longitud del colon, el peso de los 2 cm distales, y el grosor de la pared. La administración oral de 1 mg/kg de Compuesto 85 redujo el acortamiento del colon inducido por TNBS desde el 31 % en las ratas enfermas al 15 %.

Descripción del modelo de gripe A H1N1 en ratones

60 Machos C57B1/6 (6-8 semanas de edad) se aclimataron durante siete días y a continuación se asignaron 5-8 ratones por grupo de manera que cada grupo tiene aproximadamente el mismo peso medio. Los ratones se infectaron con 10^4 UFP de virus de la gripe A adaptada para ratón (A/WSN/33) mediante la vía intratraqueal. Después, los ratones se trataron con 0,2-1,5 mg/kg de compuesto p.o. 1 h después de la infección. Cuarenta y ocho

- horas después de la infección, los ratones se sometieron a eutanasia por dislocación cervical y se recogió el líquido de lavado broncoalveolar. El análisis cuantitativo de citoquinas se puede realizar mediante ELISA. En algunos experimentos, llevó a cabo la perfusión de cuerpo entero, y los pulmones se recogieron para recuento celular de células inflamatorias. Se realizaron estudios de longevidad por infección con $3-10 \times 10^4$ UFP de virus de la gripe A adaptada para ratón durante 14 días. La administración intratraqueal de 0,5 mg/kg de Compuesto 85, 1 h después de la infección por el virus suprimió el infiltrado celular en los pulmones en un 40 %.

Datos comparativos

- 10 Los datos comparativos para S1P₁-S1P₅ se muestran en la *Tabla 4*. Los valores de agonista (CE₅₀) se notifican en nM.

TABLA 4

NÚMERO DE COMPUESTO	S1P ₁	S1P ₂	S1P ₃	S1P ₄	S1P ₅
49	0,17	1080	8945	9034	20,11
50	0,19	7717	8914	7866	44,55
85	0,16	5690	4501	1610	15,06
86	0,16	9559	9938	4192	55,20
90	0,13	6662	8816	>10000	12,90
91	0,09	>10000	>10000	>10000	15,23

- 15 Los datos de PK y linfopenia comparativos se muestran en la *Tabla 5*.

TABLA 5

Número de compuesto	Rata -Solución de biodisponibilidad oral	Linfopenia de ratón (AUEC)
49	93 %	1762
50	91 %	1632
85	69 %	1425
86	N/A	1342
90	N/A	1486
91	N/A	1408

- 20 La *Tabla 6* muestra el índice terapéutico (TI) obtenido después de 5 o 14 días en los estudios de toxicología en ratas para los compuestos seleccionados. La producción de dosis que aumenta un 10 % en la relación pulmón a peso corporal se interpoló de pulmón a peso corporal frente a dosis. La respuesta a la linfopenia se midió 24 horas después de la última dosis de un régimen de múltiples dosis en los días 3-5.

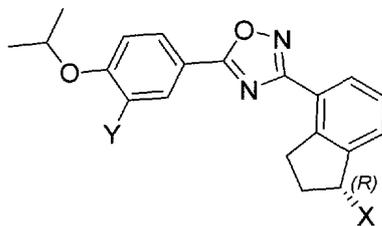
TABLA 6

Número de compuesto	La dosis da como resultado un aumento del 10 % en el peso del pulmón (mg/kg)	La dosis produce un 50 % de linfopenia (mg/kg)	TI 5 días	TI 14 días
49	0,2	0,10	N/A	2
50	2,0	0,10	N/A	20
85	2,8	0,15	N/A	14
86	2,7	0,15	N/A	18
90	5,5	0,40	N/A	14
91	0,3	0,30	N/A	1

25

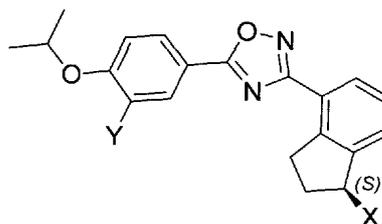
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I-R o de Fórmula I-S o una mezcla de los mismos en cualquier relación:



I-R

5



I-S

10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,
en el que

X es -NH₂ o -NHCH₂COOH, y
Y es -CN.

15 2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que X es NH₂.

3. El compuesto de la reivindicación 1 en el que X es -NHCH₂COOH.

20 4. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto es una mezcla racémica de Fórmula I-R y Fórmula I-S.

5. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto está enriquecido en la Fórmula I-R en comparación con la Fórmula I-S.

25 6. El compuesto de la reivindicación 5 en donde el compuesto es una forma prácticamente enantioméricamente pura de la Fórmula I-R.

7. El compuesto de la reivindicación 6 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-R con respecto a la Fórmula I-S es al menos del 95 %.

30 8. El compuesto de la reivindicación 6 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-R con respecto a la Fórmula I-S es al menos del 99 %.

35 9. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto está enriquecido en la Fórmula I-S en comparación con la Fórmula I-R.

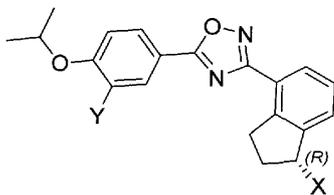
10. El compuesto de la reivindicación 9 en donde el compuesto está en una forma prácticamente enantioméricamente pura de la Fórmula I-S.

40 11. El compuesto de la reivindicación 10 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-S con respecto a la Fórmula I-R es al menos del 95 %.

12. El compuesto de la reivindicación 10 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-S con respecto a la Fórmula I-R es al menos del 99 %.

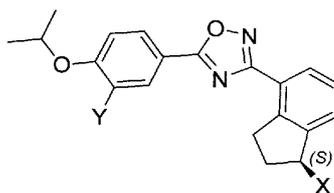
45 13. Una composición que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

14. Un compuesto de Fórmula I-R o de Fórmula I-S, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) a una frecuencia y durante un lapso de tiempo suficientes para proporcionar un efecto beneficioso al paciente,



I-R

5



I-S

en las que

10

X es $-NH_2$, $-NHCH_2CH_2OH$ o $NHCH_2COOH$, e
Y es $-CN$.

15. El compuesto para el uso de la reivindicación 14 en el que X es $-NH_2$.

15

16. El compuesto para el uso de la reivindicación 14 en el que X es $-NHCH_2CH_2OH$.

17. El compuesto para el uso de la reivindicación 14 en el que X es $NHCH_2COOH$.

20

18. El compuesto para el uso de la reivindicación 14 en donde el compuesto es una mezcla racémica de Fórmula I-R y Fórmula I-S.

19. El compuesto para el uso de la reivindicación 14 en donde el compuesto está enriquecido en la Fórmula I-R en comparación con la Fórmula I-S.

25

20. El compuesto para el uso de la reivindicación 19 en donde el compuesto es una forma prácticamente enantioméricamente pura de Fórmula I-R.

21. El compuesto para el uso de la reivindicación 20 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-R con respecto a la Fórmula I-S es al menos del 95 %.

30

22. El compuesto para el uso de la reivindicación 20 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-R con respecto a la Fórmula I-S es al menos del 99 %.

35

23. El compuesto para el uso de la reivindicación 14 en donde el compuesto está enriquecido en la Fórmula I-S en comparación con la Fórmula I-R.

24. El compuesto para el uso de la reivindicación 23 en donde el compuesto es una forma prácticamente enantioméricamente pura de Fórmula I-S.

40

25. El compuesto para el uso de la reivindicación 24 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-S con respecto a la Fórmula I-R es al menos del 95 %.

26. El compuesto para el uso de la reivindicación 24 en el que el nivel de enriquecimiento de la Fórmula I-S con respecto a la Fórmula I-R es al menos del 99 %.

45

27. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14-26 en donde la IBD es colitis ulcerosa.

28. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14-26 en donde la IBD es la enfermedad de Crohn.

50