(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 731 837**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/225 (2006.01)
C07D 295/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013** **E 17173397 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 3243511**

(54) Título: **Profármacos de fumarato de monometilo (MMF)**

(30) Prioridad:

21.12.2012 EP 12008575
27.09.2013 EP 13186500
05.12.2013 EP 13005673

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2019

(73) Titular/es:

RATIOPHARM GMBH (100.0%)
Graf-Arco-Strasse 3
89079 Ulm, DE

(72) Inventor/es:

ALBRECHT, WOLFGANG;
SELIG, ROLAND;
GUSERLE, RICHARD;
MAIER, ANNEMARIE y
RABE, SEBASTIAN

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 731 837 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

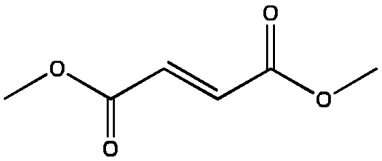
Profármacos de fumarato de monometilo (MMF)

La presente invención se refiere a compuestos novedosos para su uso como medicamento. En particular, la presente invención se refiere a profármacos novedosos de fumarato de monometilo (MMF) adecuados como medicamento, preferiblemente en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple y psoriasis.

Antecedentes de la invención

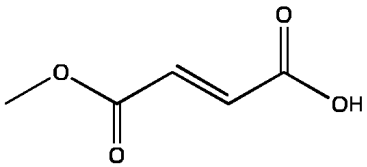
El fumarato de dimetilo (DMF) es un agente terapéutico oral del que se ha informado que reduce el rechazo que se produce a menudo en relación con el trasplante de órganos (reacción de huésped contra injerto). Además, el DMF está aprobado por ser adecuado como medicamento para el tratamiento o la prevención de una variedad de enfermedades. Por ejemplo, se propone DMF en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la esclerosis múltiple. Además, se sugiere que el DMF es un agente farmacéutico activo adecuado en el tratamiento de la psoriasis.

El DMF se caracteriza por la siguiente fórmula química (1):



Fórmula (1)

Cuando se toma por vía oral, se notifica que el DMF se hidroliza, por ejemplo, por el ambiente ácido del estómago o por las esterasas en el intestino para dar fumarato de monometilo (MMF). El MMF puede considerarse como un metabolito del DMF y puede caracterizarse por la siguiente fórmula química (2):



Fórmula (2)

Se notifica que los mecanismos de acción del DMF o su metabolito el MMF incluyen la inhibición de la traslocación nuclear inducida por citocina del factor nuclear kappa B (NF-κB), la apoptosis de células T estimuladas y la producción aumentada de las citocinas IL-4 e IL-5 de TH2 en células T estimuladas, mientras que se supone que la generación de la citocina interferón gamma (IFN-γ) de TH1 no resulta afectada. Se describe que el DMF activa el factor de transcripción Nrf2 (factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2), que se une a elementos de respuesta antioxidante en los promotores de genes protectores tales como NADPH-quinona-oxidorreductasa-1 (NQO1) y hemo-oxigenasa-1. Por tanto, esto eleva en última instancia los niveles del importante antioxidante intracelular, glutatión (véase Albrecht P. *et al.*, Journal of Neuroinflammation 2012, 9:163).

Además, se alega que el tratamiento de animales o cultivos primarios de células del SNC con DMF o MMF dio como resultado niveles nucleares aumentados de Nrf2 activo, con la posterior regulación por incremento de genes diana antioxidantes canónicos. El tratamiento con DMF o MMF aumentó el potencial redox celular, el glutatión, los niveles de ATP y el potencial de la membrana mitocondrial de manera dependiente de la concentración. El tratamiento de astrocitos o neuronas con DMF o MMF también mejoró significativamente la viabilidad celular tras la exposición oxidativa tóxica de manera dependiente de la concentración. Este efecto sobre la viabilidad se perdió en células en las que el Nrf2 se había reducido o eliminado. Estos datos sugieren que el DMF y el MMF son citoprotectores para neuronas y astrocitos frente a la lesión y la pérdida celulares inducidas por estrés oxidativo, potencialmente por medio de regulación por incremento de una respuesta antioxidante dependiente de Nrf2. Por tanto, en resumen, se indica que el DMF y el MMF *in vivo* muestran aproximadamente la misma eficacia, en particular sobre el factor de transcripción Nrf2.

Tal como se mencionó anteriormente, el DMF se hidroliza bastante rápidamente para dar fumarato de monometilo (MMF) cuando se toma por vía oral, por ejemplo, por el ambiente acuoso ácido del estómago o por las esterasas en el intestino (delgado). Por tanto, se liberan cantidades significativas de MMF en un corto periodo de tiempo. En principio se esperaba que una hidrólisis tan rápida proporcionara un alto nivel de MMF en el plasma en un corto periodo de tiempo.

Sin embargo, se ha encontrado que podría no alcanzarse un alto nivel de MMF en plasma. Por ejemplo, el organismo podría no ser capaz de transferir toda la cantidad de MMF a los sitios del cuerpo donde tiene lugar la acción farmacológica.

Adicionalmente, se notifica que el DMF tiene que administrarse en cantidades bastante altas y que el agente farmacéutico activo a menudo muestra efectos secundarios indeseables, tales como sofoco, y especialmente síntomas relacionados con el tracto gastrointestinal tales como irritación del estómago y diarrea.

El documento WO 2010/022177 A2 (Xenoport Inc. [US]) se refiere a profármacos de hidrogenofumarato de metilo de fórmula específica, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos profármacos de hidrogenofumarato de metilo y a composiciones farmacéuticas de los mismos para tratar enfermedades tales como psoriasis, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino y artritis.

Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos medicamentos, preferiblemente en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple y psoriasis. Los medicamentos deben poder aplicarse en dosis apropiadas y no deben producir efectos secundarios indeseables significativos.

Por tanto, un objeto de la presente invención era superar los inconvenientes del principio activo comercializado mencionado anteriormente, DMF.

Un objeto era desarrollar un compuesto para usarse como medicamento para las enfermedades mencionadas anteriormente, en el que dicho compuesto muestra propiedades farmacocinéticas ventajosas.

Además, deben proporcionarse compuestos que se hidrolicen dentro del cuerpo humano para dar MMF más lentamente que DMF (o alternativamente en condiciones *in vitro* respectivas).

Además, el compuesto preferiblemente debe producir pocos efectos secundarios indeseables.

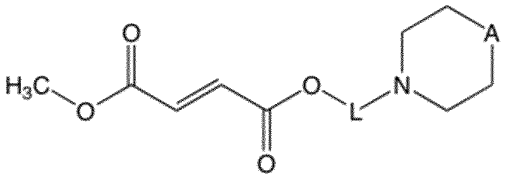
Adicionalmente, un objeto de la presente invención era proporcionar compuestos que puedan usarse en el tratamiento de la fase temprana de una enfermedad autoinmunitaria, en particular de esclerosis múltiple, de manera que pueda retrasarse el avance de la enfermedad.

Sumario de la invención

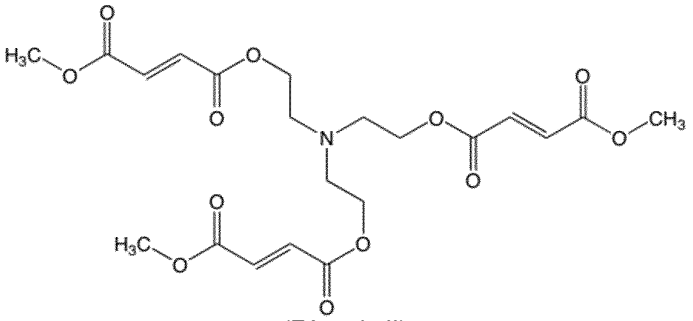
Según la presente invención, los objetivos anteriores se logran mediante los compuestos específicos descritos en el presente documento por las fórmulas (II) a (III) o mezclas de los mismos para su uso como medicamento. Dichos compuestos, que pueden considerarse preferiblemente como profármacos de MMF, pueden usarse como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple y psoriasis.

En general, un profármaco puede considerarse como una sustancia que se administra a un sujeto (preferiblemente un ser humano) en una forma farmacológicamente inactiva o farmacológicamente menos que completamente activa, y que se convierte posteriormente en el cuerpo del sujeto en un fármaco activo, preferiblemente a través de los procesos metabólicos que se producen en el cuerpo del sujeto. Dicho de otro modo, un profármaco habitualmente sirve como un tipo de “precursor” del fármaco deseado.

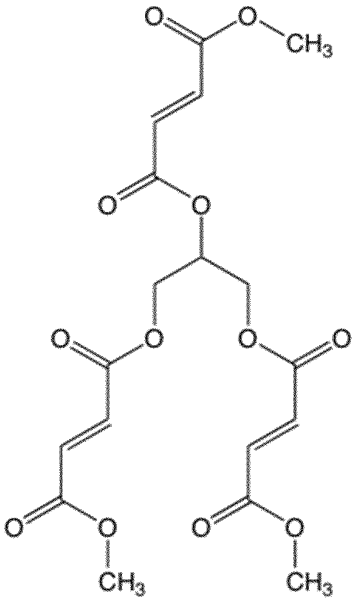
Por tanto, el objeto de la presente invención es un compuesto según una cualquiera de las siguientes fórmulas (II) a (III) o mezclas de las mismas para su uso como medicamento:



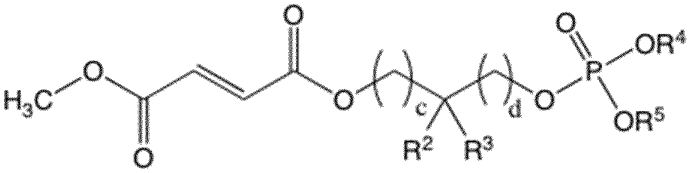
Fórmula (I),



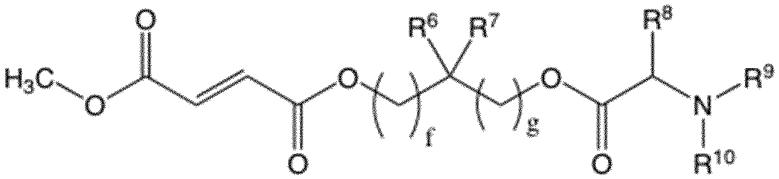
(Fórmula II)



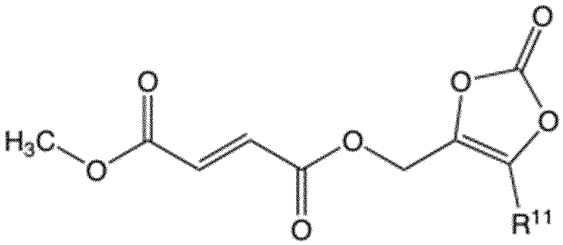
Fórmula (III),



Fórmula (IV),



Fórmula (V)



Fórmula (VI)

en las que

L es un grupo alcanodiílo con de 1 a 6 átomos de carbono

A es SO, SO_2 o NR^1, y

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente un residuo orgánico, y

c y d son independientemente un número entero de desde 0 hasta 3,

f y g son independientemente un número entero de desde 0 hasta 3 con la condición de que tanto f como g no pueden ser 0.

Los compuestos según las fórmulas (I), y (IV) a (VI) se muestran con fines ilustrativos.

Se encontró que los compuestos de la presente invención muestran propiedades farmacéuticas y/o farmacocinéticas superiores. En particular, los compuestos muestran una tasa de hidrólisis ventajosa de manera que puede aplicarse la dosis apropiada del compuesto al paciente.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos inventivos.

Otro objeto de la presente invención es el procedimiento para producir un compuesto según la presente invención haciendo reaccionar una forma activada de fumarato de monometilo con una sustancia que comprende al menos un grupo hidroxilo.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de esta invención, el compuesto para su uso como medicamento se refiere a las fórmulas (II) a (III) anteriores. Además, estos compuestos pueden referirse a sales, hidratos, solvatos, polimorfos, estereoisómeros farmacéuticamente aceptables y mezclas de los mismos.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, puede usarse un solo compuesto según una cualquiera de las fórmulas (II) a (III) como medicamento. En una realización alternativa de la presente invención puede usarse una combinación de cualquiera de los compuestos según las fórmulas (II) a (III) como medicamento.

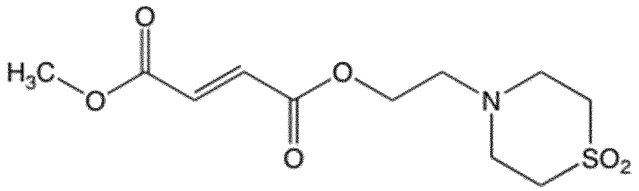
Lo mismo se aplica a la composición farmacéutica que comprende el/los compuesto(s) que se representan por las fórmulas (II) a (III).

En un compuesto según la fórmula (I) L es un grupo alcanodiílo con de 1 a 6 átomos de carbono o alternativamente 2, 3 o 4 átomos de carbono.

Los grupos alcanodiílo con de 1 a 6 átomos de carbono comprenden grupos alcanodiílo lineales y ramificados con de 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos para los grupos alcanodiílo con de 1 a 6 átomos de carbono son $-CH_2-$, $-(CH_2)_2$, $-CH(CH_3)-$, $-(CH_2)_3-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_2CH(CH_3)-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_3)(CH_2)_2-$, $-CH(C_2H_5)CH_2-$, $-CH_2CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2CH_2-$, $-CH_2C(CH_3)_2-$, $-CH(CH_3)CH(CH_3)$, $-CH(C_3H_7)-$, $-(CH_2)_5$, $-(CH_2)_3CH(CH_3)$, $-(CH_2)_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CHCH_3(CH_2)_2-$, $-CH_2C(CH_3)_2CH_2-$, $-(CH_2)_2C(CH_3)_2-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_4CH(CH_3)-$, $-(CH_2)_3CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CHCH_3(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_3C(CH_3)_2-$ y $-(CH_2)_2C(CH_3)_2CH_2-$.

En una realización preferida, L es un grupo alcanodiílo lineal con de 1 a 6 átomos de carbono, preferiblemente con 2, 3 o 4 átomos de carbono, más preferiblemente con 2 o 4 átomos de carbono, en particular con 2 carbonos átomos.

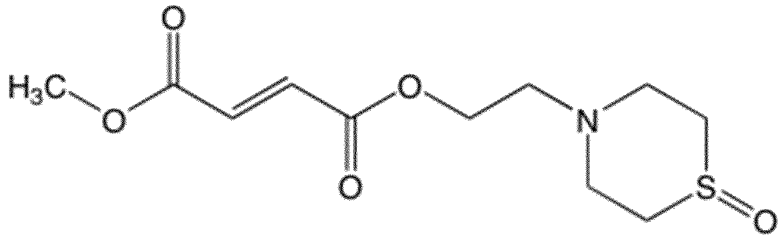
En una realización particularmente preferida, en la fórmula (I), L puede ser $-(CH_2)_2-$ y A puede ser SO_2 y por tanto el compuesto correspondiente puede representarse por la siguiente fórmula (Ia)



Fórmula (Ia)

En una realización particularmente preferida, en la fórmula (I), L puede ser $–(CH_2)_2-$ y A puede ser SO y por tanto el

compuesto correspondiente puede representarse por la siguiente fórmula (Ia')



Fórmula (Ia')

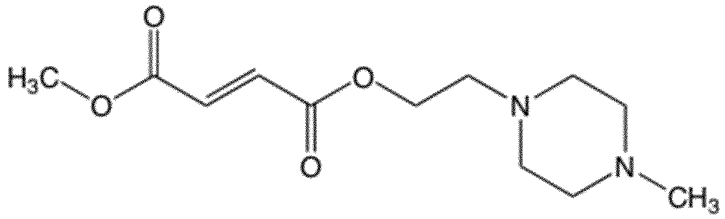
En la fórmula (I), R^1 puede ser alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo cíclico con de 3 a 6 átomos de carbono.

Alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono puede incluir, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, sec-pentilo, y hexilo.

Alquilo cíclico con de 3 a 6 átomos de carbono puede incluir por ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

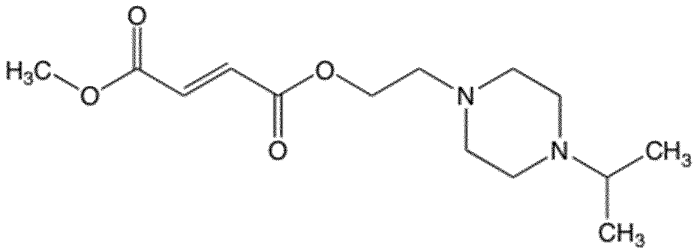
Se prefiere que en la fórmula (I), R^1 pueda ser alquilo con de 1 a 4 átomos de carbono o cicloalquilo con 3, 5 o 6 átomos de carbono, más preferiblemente alquilo con de 1 a 3 átomos de carbono.

En una realización particularmente preferida, en la fórmula (I), L puede ser $-(CH_2)_2-$ y A puede ser NR^1, siendo R^1 metilo y por tanto el compuesto correspondiente puede representarse por la siguiente fórmula (Ib)



Fórmula (Ib)

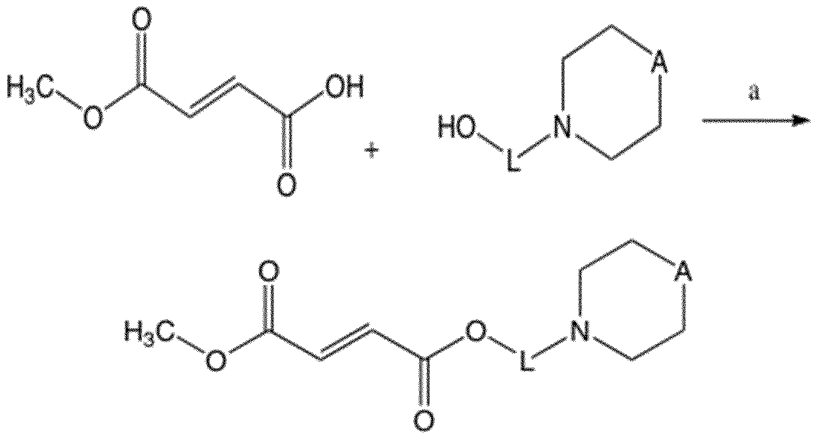
En una realización particularmente preferida alternativa, en la fórmula (I), L puede ser $-(CH_2)_2-$ y A puede ser NR^1, siendo R^1 isopropilo y por tanto el compuesto correspondiente puede representarse por la siguiente fórmula (Ic)



Fórmula (Ic)

El compuesto según la fórmula (I) puede comprender preferiblemente las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Los ácidos que se usan para preparar las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables son preferiblemente aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, acetato, lactato, citrato, (D,L)- y L-tartrato, (D,L)- y L-malato, bitartrato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, sacarato y benzoato. Una sal preferida es el clorhidrato o diclorhidrato correspondiente de un compuesto según la fórmula (I).

Un compuesto según la fórmula (I) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta:



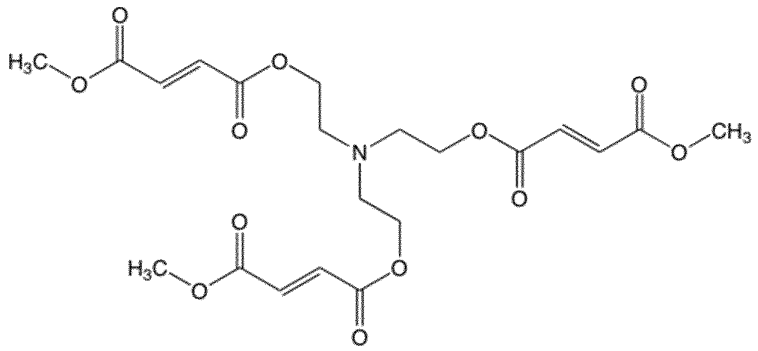
Fórmula (I)

Preferiblemente, en la etapa a, el MMF y el alcohol alquílico de 4-alquil-piperazin-1-ilo o alcohol alquílico de tiomorfolin-4-ilo oxidado pueden someterse a una esterificación en un disolvente orgánico en presencia de un agente de acoplamiento. Un agente de acoplamiento es preferiblemente una sustancia que en general facilita la formación de un éster o una amida. El agente de acoplamiento reacciona con un grupo carboxilo formando un producto intermedio reactivo que posteriormente se hace reaccionar adicionalmente con un alcohol o una amina para formar el producto final, es decir un éster o una amida. Se notifica que los agentes de acoplamiento pueden usarse en caso de que uno o ambos de los eductos porten además un grupo que sea lábil en medio ácido o alcalino, puesto que la reacción se lleva a cabo en condiciones neutras. Los agentes de acoplamiento adecuados pueden ser, por ejemplo, DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), EDC (clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida), CDI (carbonildiimidazol), preferiblemente EDC en combinación con DMAP (4-(dimetilamino)piridina).

Un disolvente orgánico adecuado puede ser por ejemplo diclorometano, cloroformo, dioxano, tetrahidrofurano, acetonitrilo y dimetilformamida.

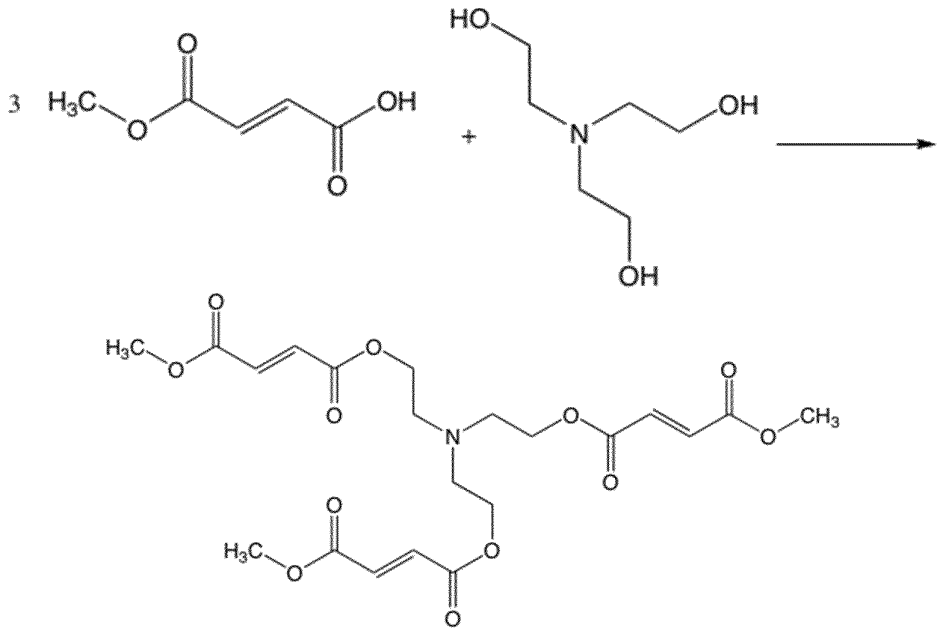
Alternativamente, el MMF puede hacerse reaccionar preferiblemente con cloruro de tionilo o cloruro de oxanilo, preferiblemente cloruro de oxanilo, para formar el cloruro de ácido correspondiente. Posteriormente, el cloruro de ácido correspondiente puede someterse a una reacción con alcohol alquílico de 4-alquil-piperazin-1-ilo o alcohol alquílico de tiomorfolin-4-ilo oxidado preferiblemente en un disolvente orgánico, tal como dioxano, tetrahidrofurano, cloroformo o diclorometano. Además, la reacción del cloruro de ácido con alcohol alquílico de 4-alquil-piperazin-1-ilo o alcohol alquílico de tiomorfolin-4-ilo oxidado se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un compuesto alcalino auxiliar. Compuestos alcalinos adecuados son por ejemplo piridina y aminas, tales como trietilamina y diisopropiletilamina, preferiblemente trietilamina.

Un compuesto adicional según la presente invención se representa por la fórmula (II)



Fórmula (II)

Un compuesto según la fórmula (II) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta:

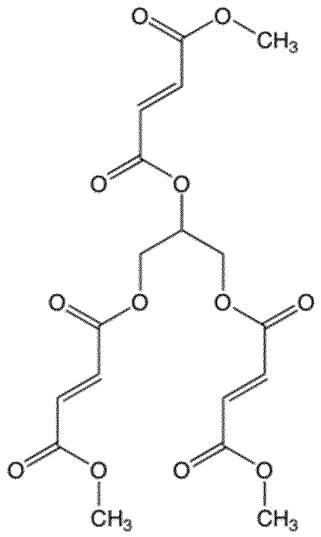


Fórmula (II)

El compuesto según la fórmula (II) puede sintetizarse de manera preferible sustancialmente del mismo modo que se describió anteriormente con respecto a la síntesis de la fórmula (I). Por tanto, un compuesto según la fórmula (II) puede obtenerse mediante una esterificación de una cantidad equivalente de MMF con trietanolamina (tris-(2-hidroxietil)amina) en presencia de un agente de acoplamiento. Alternativamente, el MMF puede convertirse primero en el cloruro de ácido correspondiente antes de conducirse a una reacción con la trietanolamina (tris-(2-hidroxietil)amina). En general, pueden aplicarse preferiblemente las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente para la síntesis de la fórmula (I).

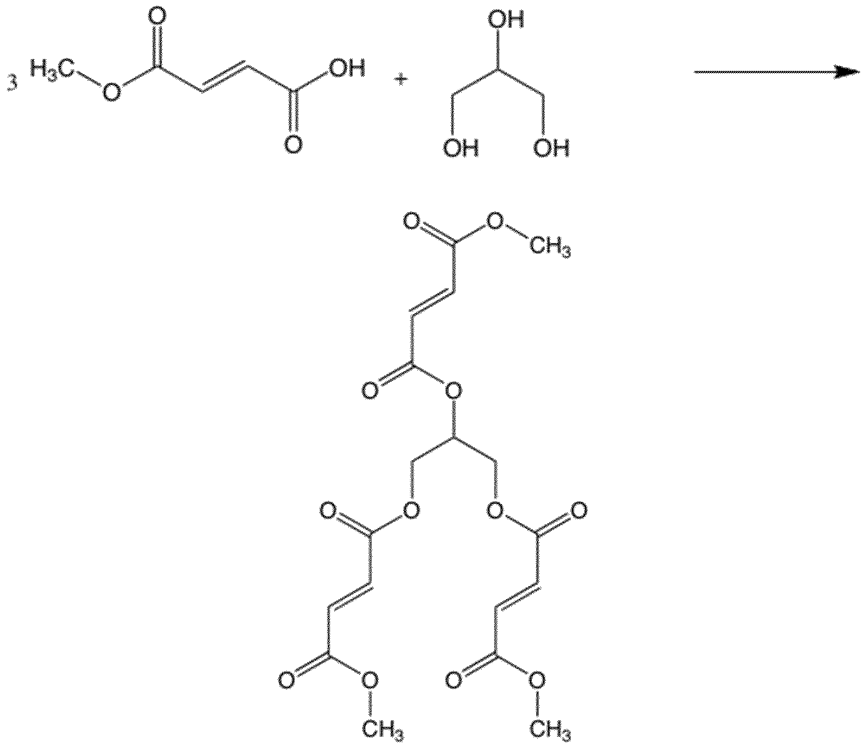
Un compuesto según la fórmula (II) puede estar presente preferiblemente en forma de una sal de adición de ácido. Ejemplos para sales adecuadas comprenden las mencionadas anteriormente con respecto a la fórmula (I). En una realización preferida, un compuesto según la fórmula (II) está presente en forma de su clorhidrato.

Un compuesto adicional según la presente invención se representa por la fórmula (III)



Fórmula (III)

Un compuesto según la fórmula (III) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta:



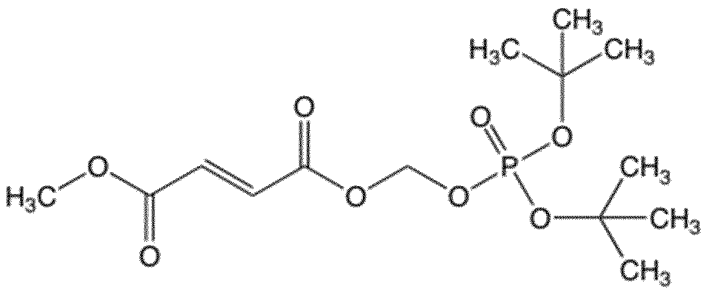
Fórmula (III)

El compuesto según la fórmula (III) puede sintetizarse de manera preferible sustancialmente del mismo modo que se describió anteriormente con respecto a la síntesis de la fórmula (I). Por tanto, un compuesto según la fórmula (III) puede obtenerse mediante una esterificación de una cantidad equivalente de MMF con glicerol (1,2,3-trihidroxipropano) en presencia de un agente de acoplamiento. Alternativamente, el MMF puede convertirse primero en el cloruro de ácido correspondiente antes de conducirse a una reacción con el glicerol (1,2,3-trihidroxipropano). En general, pueden aplicarse preferiblemente las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente para la síntesis de la fórmula (I).

R^2 y R^3 en la fórmula (IV) son independientemente hidrógeno, alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo cíclico con de 3 a 6 átomos de carbono. En una realización más preferida, R^2 y R^3 pueden ser independientemente hidrógeno, metilo y etilo, más preferiblemente hidrógeno o metilo. Se prefiere particularmente que R^2 y R^3 sean ambos hidrógeno, o que uno de R^2 y R^3 sea metilo mientras que el otro sea hidrógeno. Además, se prefiere que la cadena principal que une el MMF con el fosfato no tenga más de 3 átomos de carbono. Además, se prefiere que c y d puedan ser independientemente 0 o 1; más preferiblemente que c y d sean ambos 0.

Se prefiere que R^4 y R^5 en la fórmula (IV) puedan ser independientemente hidrógeno o alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente alquilo con de 1 a 5 átomos de carbono, incluso más preferiblemente alquilo con de 1 a 4 átomos de carbono, en particular terc-butilo. Se prefiere adicionalmente que R^4 y R^5 sean idénticos.

En una realización particularmente preferida, en la fórmula (IV), c y d pueden ser 0, R^2 y R^3 pueden ser hidrógeno y etilo y R^4 y R^5 pueden ser terc-butilo y por tanto el compuesto correspondiente puede representarse por la siguiente fórmula (IVa)

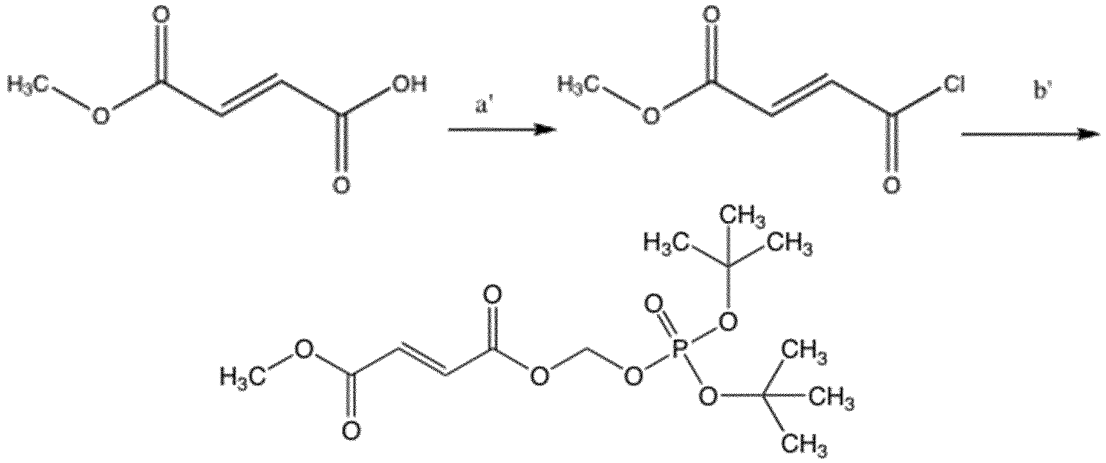


Fórmula (IVa)

En caso de que en la fórmula (IV) R^4 y/o R^5 sean hidrógeno, se prefiere que el compuesto según la fórmula (IV)

pueda referirse al compuesto en forma del ácido libre, así como a sus sales, hidratos, solvatos, polimorfos farmacéuticamente aceptables y mezclas de los mismos. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse mediante reacción, preferiblemente con una base inorgánica. De ese modo, uno o ambos del/de los átomo(s) de hidrógeno de fosfato del compuesto pueden reemplazarse por un átomo de metal, por ejemplo, sodio. Alternativamente, la sal puede formarse junto con una dialquilamina o una trialquilamina, preferiblemente una trialquilamina. Ejemplos de trialquilaminas comprenden dietilmetilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, dietilisopropilamina. Se prefiere particularmente trietilamina.

Un compuesto según la fórmula (IVa) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta:



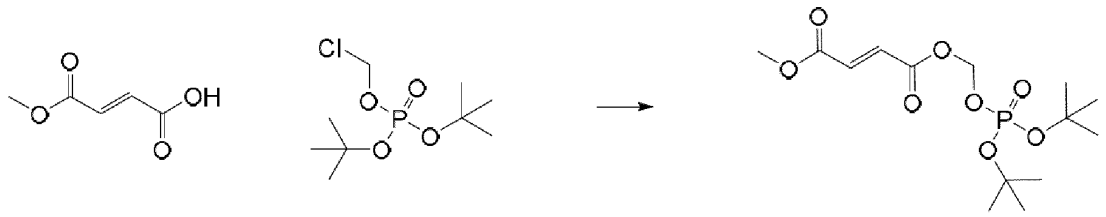
Fórmula (IVa)

En la etapa a', MMF puede hacerse reaccionar preferiblemente con cloruro de tionilo o cloruro de oxanilo, preferiblemente cloruro de oxanilo, para formar el cloruro de ácido correspondiente. La formación del cloruro de ácido se realiza preferiblemente en las condiciones mencionadas anteriormente.

Este cloruro de ácido se somete a una reacción con OCR^2R^3 (en el presente caso, $R^2 = R^3$ = hidrógeno) en la etapa b'.

En la etapa c', el producto resultante de la etapa b' puede hacerse reaccionar con un diéster de fosfato (en el presente caso $R^4 = R^5$ = terc-butilo) para dar un compuesto según la fórmula (IVa).

Alternativamente, un compuesto según la fórmula (IVa) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta



Fórmula (IVa)

Se hicieron reaccionar preferiblemente MMF y clorometil-fosfato de di-terc-butilo en un disolvente tal como dimetilformamida para dar el compuesto según la fórmula (Iva). La reacción se realiza preferiblemente a una temperatura de desde 0ºC hasta 40ºC, más preferiblemente a temperatura ambiente (23ºC). Adicionalmente, la reacción se realiza preferiblemente en presencia de un compuesto alcalino, más preferiblemente un compuesto alcalino inorgánico, incluso más preferiblemente un carbonato alcalino o alcalinotérreo, en particular carbonato de cesio.

R^6, R^7, R^9 y R^{10} en la fórmula (V) pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo cíclico con de 3 a 6 átomos de carbono, y R^3 puede ser hidrógeno, alquilo cíclico con de 3 a 6 átomos de carbono o alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono, en los que el alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono puede estar sustituido, y en los que uno de R^9 y R^{10} junto con R^8 pertenecen opcionalmente a un anillo heteroalifático de 5 o 6 miembros.

Alquilo y alquilo cíclico corresponden a la definición descrita anteriormente.

En caso de que R^8 sea un alquilo sustituido con de 1 a 6 átomos de carbono, los sustituyentes pueden seleccionarse preferiblemente de uno o más de los siguientes sustituyentes: halógeno, nitro, nitrilo, urea, fenilo, aldehído, sulfato, amino, NH-C(NH)NH_2, carboxamida, ácido carboxílico, hidroxilo, imidazol, indol, mercapto, metiltio, fenilo, hidroxifenilo. Son especialmente preferidos uno o más de los siguientes sustituyentes: amino, NH-C(NH)NH_2, carboxamida, ácido carboxílico, hidroxilo, imidazol, indol, mercapto, metiltio, fenilo, hidroxifenilo.

En una realización particularmente preferida R^8 puede ser $-CH_2-C_6H_5$.

En una realización preferida de la invención, uno de R^9 y R^{10} en la fórmula (V) es hidrógeno y el otro de R^9 y R^{10} y además R^8 son alquilo, en los que R^9 y R^8 o R^{10} y R^8 pertenecen opcionalmente a un anillo heteroalifático de 5 o 6 miembros.

En una realización adicional preferida de la invención, R^9 y R^{10} son ambos hidrógeno y R^8 puede ser preferiblemente hidrógeno, alquilo con de 1 a 3 átomos de carbono o alquilo con de 1 a 4 átomos de carbono sustituido con uno o más sustituyentes tal como se describió anteriormente. Se prefiere particularmente que R^8 pueda ser $-CH_3$.

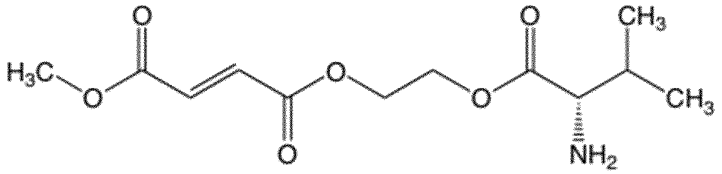
El compuesto según la fórmula (V) puede representar un fumarato de monometilo que está acoplado por medio de un grupo de unión a un aminoácido. El grupo de unión puede representarse por

$$-(CH_2)_f-CR^6R^7-(CH_2)_g-.$$

En una realización adicional preferida, R^6 y R^7 pueden ser de manera preferible independientemente hidrógeno o alquilo con 1 o 2 átomos de carbono. Se prefiere que R^6 y R^7 sean ambos hidrógeno o alternativamente que uno de R^6 y R^7 sea hidrógeno y el otro de R^6 y R^7 sea metilo. Además, se prefiere que la cadena principal del grupo de unión que conecta el fumarato de monometilo con el aminoácido no tenga más de cuatro átomos de carbono.

En una realización preferida, uno de f y g pueden ser preferiblemente 0. Preferiblemente g es 0.

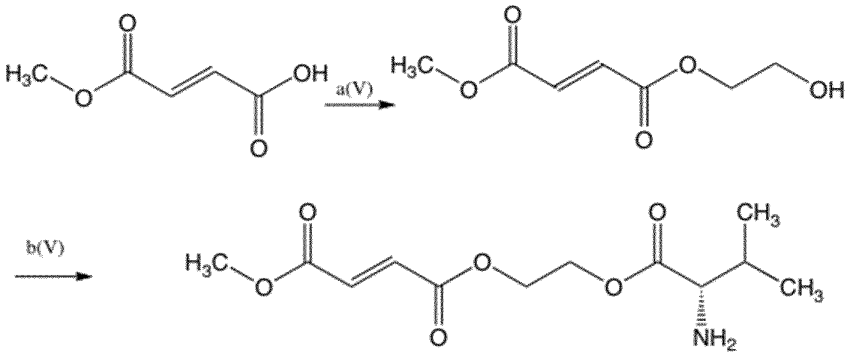
En una realización particularmente preferida, en la fórmula (V), el grupo de unión puede ser etilo y R^8 puede ser isopropilo y R^9 y R^{10} pueden ser hidrógeno y por tanto el compuesto correspondiente puede representarse por la siguiente fórmula (Va)



Fórmula (Va)

Un compuesto según la fórmula (Va) puede estar presente preferiblemente en forma de una sal de adición de ácido. Ejemplos para sales adecuadas comprenden las mencionadas anteriormente con respecto a la fórmula (I). En una realización preferida, un compuesto según la fórmula (Va) está presente en forma de su clorhidrato.

Un compuesto según la fórmula (Va) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta:

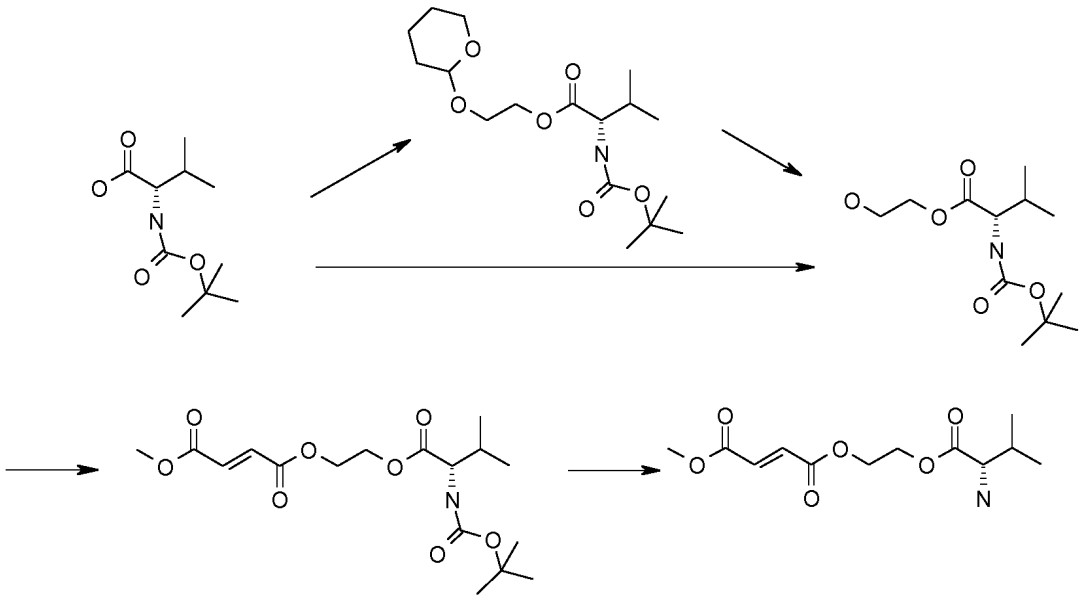


Fórmula (Va)

En la etapa a(V), el MMF puede someterse preferiblemente a una reacción con etilenglicol. En la etapa b(V), el producto resultante de la etapa a(V) puede hacerse reaccionar con el grupo hidroxilo del grupo carboxilo de un aminoácido. En una realización preferida, cualquier grupo hidroxilo o amino adicional del aminoácido puede protegerse preferiblemente, más preferiblemente protegerse con Boc, antes de la etapa de reacción b(V) y

desprotegerse tras la etapa de reacción b(V).

Alternativamente, un compuesto según la fórmula (Va) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta alternativa:



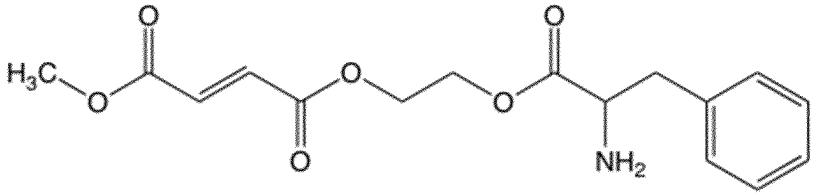
Fórmula (Va).

Un aminoácido cuyo grupo amina está protegido con Boc se acopla con etilenglicol o un etilenglicol protegido, tal como THP-etilenglicol, en presencia de un agente de acoplamiento y un disolvente tal como se mencionó anteriormente. Además, si es necesario, se retira el grupo de protección del etilenglicol.

En una segunda etapa, el producto que resulta de la primera etapa se acopla con MMF. Esta reacción se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un agente de acoplamiento y un disolvente tal como se mencionó anteriormente.

Además, se retira el grupo de protección Boc de la amina y se obtiene el producto según la fórmula (Va).

En una realización alternativa particularmente preferida, el grupo de unión en la fórmula (V) puede ser etilo y R^8 puede ser $-CH_2-C_6H_5$ y R^9 y R^{10} pueden ser hidrógeno y por tanto el compuesto correspondiente puede representarse por la siguiente fórmula (Vb)

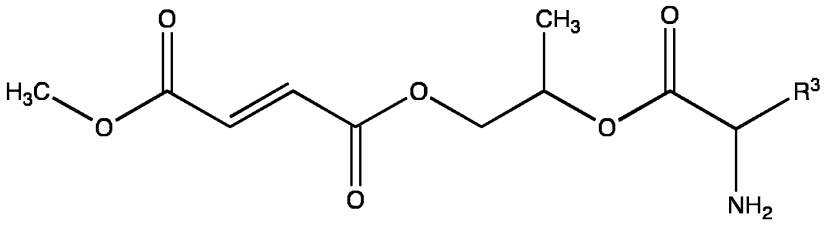


Fórmula (Vb)

Un compuesto según la fórmula (Vb) puede estar presente preferiblemente en forma de una sal de adición de ácido. Ejemplos para sales adecuadas comprenden las mencionadas anteriormente con respecto a la fórmula (I). En una realización preferida, un compuesto según la fórmula (Vb) está presente en forma de su clorhidrato.

Un compuesto según la fórmula (Vb) puede sintetizarse preferiblemente de manera similar a un compuesto según la fórmula (Va), en la que en la etapa b(V) se usa el aminoácido correspondiente o aminoácido protegido con Boc.

Una realización preferida de la invención es un componente que puede representarse por la siguiente fórmula (Vc):



Fórmula (Vc)

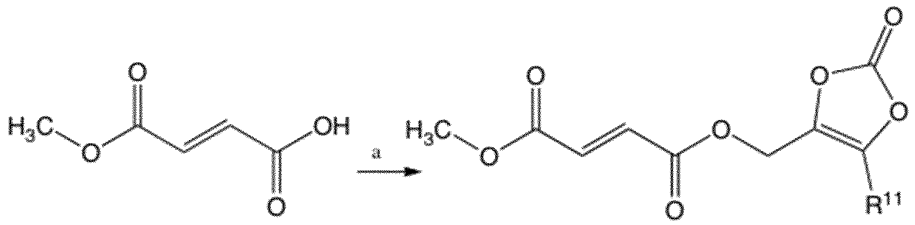
Un compuesto según la fórmula (Vc) puede sintetizarse preferiblemente de manera similar a un compuesto según la fórmula (Va), en la que en la etapa a(V) se usa propilenglicol y en la etapa b(V) el aminoácido correspondiente o el aminoácido protegido con Boc.

Un compuesto según la fórmula (Vc) puede estar presente preferiblemente en forma de una sal de adición de ácido. Ejemplos para sales adecuadas comprenden las mencionadas anteriormente con respecto a la fórmula (I). En una realización preferida, un compuesto según la fórmula (Vc) está presente en forma de su clorhidrato.

Los compuestos anteriores según la fórmula V muestran excelentes propiedades farmacocinéticas. El MMF se forma mediante hidrólisis. Un subproducto adicional es un aminoácido, que puede absorberse adicionalmente por el organismo del paciente o alternativamente dicho aminoácido puede excretarse fácilmente. En cualquier caso, no se espera que dicha sustancia dañe el organismo del paciente.

En la fórmula (VI), R^{11} puede ser preferiblemente hidrógeno, alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo cíclico con de 3 a 6 átomos de carbono, alquenilo con de 2 a 6 átomos de carbono, halógeno, ciano, hidroxilo, amino, carboxilo, mercapto, arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los siguientes sustituyentes: metilo, terc-butilo, hidroxilo, metoxilo, halógeno, nitro, nitrilo, amina, carboxamida. Se prefiere más que R^{11} pueda ser hidrógeno, alquilo con 1 o 2 átomos de carbono, halógeno, ciano, amino o hidroxilo. En particular, se prefiere que R^{11} sea hidrógeno, hidroxilo o metilo, especialmente metilo.

Un compuesto según la fórmula (VI) puede sintetizarse preferiblemente por medio de la siguiente ruta:

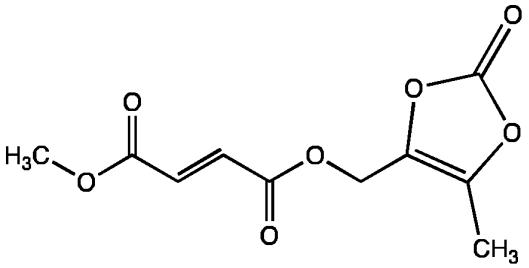


Fórmula (VIa)

En la etapa a, el MMF puede hacerse reaccionar con el grupo hidroxilo de la 4-hidroximetil-1,3-dioxol-2-ona sustituida con R^{11} en la posición 5 en presencia de un agente de acoplamiento y las condiciones correspondientes tal como se describió anteriormente.

En una realización preferida, el MMF puede transformarse en el cloruro de ácido correspondiente antes de reaccionar con el grupo hidroxilo del derivado de 4-hidroximetil-dioxol-2-ona anterior.

En una realización particularmente preferida, R^{11} es metilo y el compuesto correspondiente se representa por la siguiente fórmula (VIa).



Fórmula (VIa)

El compuesto según la fórmula (VIa) puede sintetizarse haciendo reaccionar 4,5-dimetil-1,3-dioxol-2-ona con NBS para dar 4-(bromometil)-5-metil-1,3-dioxol-2-ona. La 4-(bromometil)-5-metil-1,3-dioxol-2-ona se somete

adicionalmente a una reacción con MMF en condiciones alcalinas para formar un compuesto según la fórmula (VIa).

En una realización preferida, los compuestos inventivos son para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias.

Las enfermedades sistémicas no solo afectan a órganos individuales. Al contrario, se sabe que estas enfermedades afectan a varios órganos y tejidos o incluso a todo el cuerpo.

Las personas que tienen una enfermedad autoinmunitaria habitualmente padecen que su sistema inmunitario ataca por error a las propias células de su organismo y por tanto responden incorrectamente a sustancias presentes normalmente en el cuerpo.

Una inflamación puede definirse como la respuesta del cuerpo a la aparición de estímulos dañinos que pueden dar como resultado dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y pérdida de función del órgano afectado.

Es posible que algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente no puedan asignarse en un solo grupo de los grupos mencionados anteriormente, puesto que muestran los síntomas de más de uno de ellos.

En una realización adicional preferida, el compuesto inventivo es para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple y psoriasis, preferiblemente esclerosis múltiple. Los compuestos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento de los siguientes tipos de esclerosis múltiple: con recaída-remisión, primaria-progresiva, secundaria-progresiva y progresiva-remisión. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se usan en el tratamiento de la esclerosis múltiple con recaída-remisión.

Además, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la presente invención, es decir, una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una de las fórmulas (II) a (III) o una mezcla de las mismas y opcionalmente excipientes farmacéuticos.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende

(i) de 0,01 a 10 mmol, más preferiblemente de 0,05 a 5 mmol, todavía más preferiblemente de 0,25 a 3,5 mmol y de manera particularmente preferible de 0,5 a 2,5 mmol de un compuesto según la presente invención;

(ii) excipiente(s) farmacéutico(s).

En una realización adicional preferida, la presente composición puede comprender uno o más excipientes adicionales, preferiblemente excipientes farmacéuticos tal como se describe en la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y/o en la Farmacopea de los EE.UU. (USP).

Ejemplos de excipientes farmacéuticos son portadores, aglutinantes, cargas, disgregantes, agentes de absorción, deslizantes y/o lubricantes.

En una realización, los excipientes se eligen de manera que la formulación resultante sea una formulación resistente al jugo gástrico. En dicha realización, la formulación de la presente invención no muestra liberación significativa del fármaco en condiciones ácidas. En particular, la liberación de fármaco *in vitro* tras 2 horas es de menos del 10%, preferiblemente del 0 al 9,9%, más preferiblemente del 0 al 5%, todavía más preferiblemente del 0,001 al 3%, medida según la USP, aparato II, paletas, HCl 0,1 N, 37ºC, 50 rpm.

En una realización alternativa, los excipientes se eligen de manera que la formulación resultante sea una formulación de liberación inmediata. Preferiblemente, la formulación de liberación inmediata no comprende un recubrimiento frente al jugo gástrico. En dicha realización, la liberación de fármaco *in vitro* tras 15 min puede ser del 60 al 100%, preferiblemente del 70 al 99,9%, más preferiblemente del 75 al 99,9, medida según la USP, aparato II, paletas, HCl 0,1 N, 37ºC, 50 rpm.

En una realización alternativa, los excipientes se eligen de manera que la formulación resultante sea una formulación de liberación sostenida. En dicha realización, la liberación de fármaco *in vitro* tras 2 horas puede ser del 0 al 50%, tras 4 horas del 10 al 70%, tras 6 horas del 20 al 90%, en la que las primeras horas se miden según la USP, aparato II, paletas, HCl 0,1 N, 37ºC, 50 rpm y las siguientes horas se miden según la USP, aparato II, paletas, pH 6,8, 37ºC, 50 rpm.

La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada para administración oral, preferiblemente en forma de un comprimido o cápsula, en particular en forma de un comprimido.

Se prefiere adicionalmente que el comprimido se recubra con un recubrimiento de película. Alternativamente, la cápsula también puede estar recubierta.

En la presente invención, son posibles los siguientes tres tipos de recubrimientos de película

- recubrimiento de película sin afectar a la liberación del principio activo,

- recubrimientos de película resistentes al jugo gástrico,

- recubrimientos de película de acción retardada.

En general, los recubrimientos de película pueden prepararse mediante el uso de agentes de formación de película tales como ceras, derivados de celulosa, poli(met)acrilato, polivinilpirrolidona, acetato-ftalato de polivinilo y/o goma laca o cauchos naturales tales como carragenano.

Se prefiere que el presente comprimido se recubra con un recubrimiento de película resistente al jugo gástrico. Alternativamente, puede usarse una cápsula que comprende un recubrimiento de película resistente al jugo gástrico.

El recubrimiento de película resistente al jugo gástrico preferiblemente es un recubrimiento de película que es estable en el intervalo de pH de aproximadamente 0,7 a 3,0, que se supone que es el valor de pH del jugo gástrico humano encontrado en el estómago. Sin embargo, en un entorno con un valor de pH de 5 a 9, que se supone que está presente en el intestino (delgado) del cuerpo humano, el recubrimiento de película resistente al jugo gástrico se disuelve preferiblemente y el fármaco puede liberarse.

El recubrimiento de película resistente al jugo gástrico (denominado también a menudo recubrimiento entérico) puede comprender agentes de formación de película que son por ejemplo grasas, ácidos grasos, ceras, alginatos, goma laca, acetato-ftalato de polivinilo, derivados de celulosa tales como carboximetiletilcelulosa, acetato-succinato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-trimelitato de celulosa, y copolímeros de ácido metacrílico tales como copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo-ácido metacrílico, Eudragits (por ejemplo Eudragit® L30D, Eudragit® L, ,Eudragit® S).

El recubrimiento está preferiblemente libre de principio activo. Se prefiere adicionalmente que el grosor del recubrimiento sea habitualmente de 10 μm a 2 mm, preferiblemente de desde 50 hasta 500 μm.

El recubrimiento preferido puede comprender un agente de formación de película y uno o más de los siguientes: lubricante, tensioactivo, deslizante, pigmento y agua.

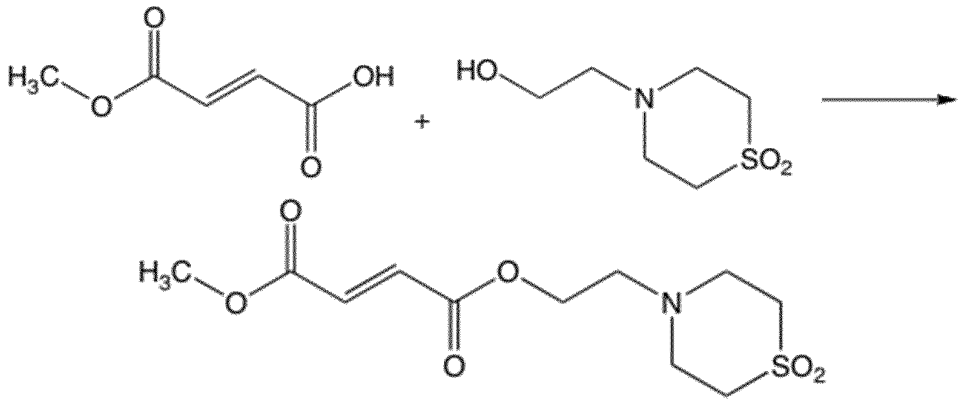
El recubrimiento preferido según una realización de la presente invención puede comprender, junto con el agente de formación de película, por ejemplo, ácido esteárico como lubricante para plastificar y disolver el polímero, laurilsulfato de sodio como tensioactivo para humectar y dispersar, talco como deslizante, óxido de hierro amarillo y/u óxido de titanio como pigmento(s) y opcionalmente agua purificada.

En una realización preferida, la composición farmacéutica puede administrarse de una a tres veces al día, preferiblemente dos o tres veces al día, más preferiblemente dos veces al día.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

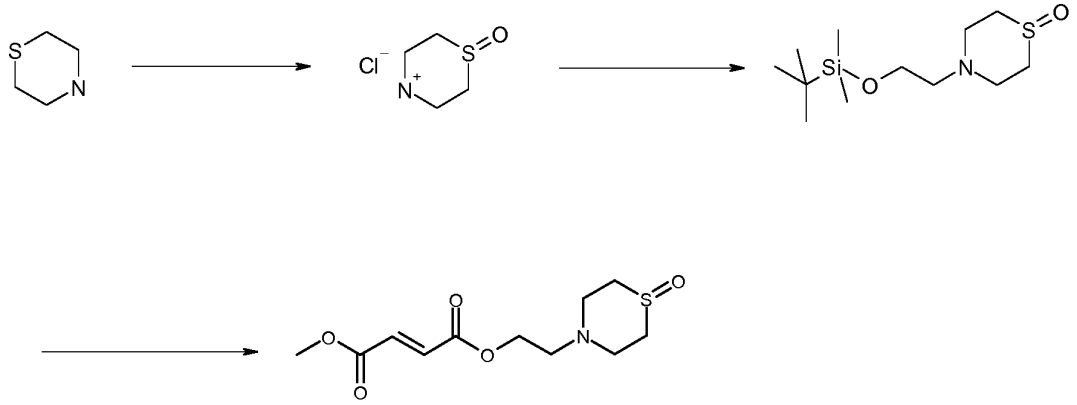
Ejemplos

Ejemplo de referencia 1a: Síntesis del éster metílico de éster 2-(1,1-dioxo-1-lambda*6*-tiomorfolin-4-il)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico



A una suspensión agitada de fumarato de monometilo (1,5 g; 11,5 mmol) en diclorometano seco (30 ml) se le añadieron sucesivamente clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilamonopropil)carbodiimida (2,4 g; 12,7 mmol), 4-(2-hidroxietil)-1,1-dioxo-1-lambda*6*-tiomorfolina (2,3 g; 11,3 mmol) y DMAP (140 mg; 1,2 mmol) a 0ºC. Se dejó que la suspensión se calentara hasta temperatura ambiente (23ºC) y se continuó la agitación durante la noche (durante 14 horas). Se diluyó la mezcla con diclorometano adicional (50 ml), se lavó con agua (2 x 70 ml) y se secó con sulfato de sodio. Tras la retirada del disolvente, se purificó el producto en bruto resultante por medio de cromatografía en gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/n-hexano 2:1). Rendimiento: 1,5 g (5,1 mmol; 45%)

Ejemplo de referencia 1a': Síntesis del éster metílico de éster 2-[2-etanosulfinil-etil)-metil-amino]-etílico del ácido (E)-2-butenodioico



Se disolvió tiomorfolina (10 g; 96,9 mmol) en diclorometano seco (350 ml), se enfrió hasta 0ºC y se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (23,3 g; 107 mmol) disuelto en diclorometano (100 ml) gota a gota por medio de un embudo de goteo (15 min). Tras la adición completa, se dejó que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 18 h.

Se concentró la disolución transparente a presión reducida hasta un volumen de 100 ml y se lavó con salmuera (50 ml), HCl acuoso (1 N; 50 ml) y bicarbonato de sodio saturado (100 ml). Se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para lograr un sólido blanco.

Se resolvió el sólido blanco (22 g) en etanol (150 ml), se enfrió hasta 0ºC y se añadió peryodato de sodio (27 g; 127 mmol) en porciones. Se dejó que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 5 d.

Se concentró la suspensión blanca a presión reducida hasta la mitad de su volumen y después se diluyó con agua (300 ml). Se extrajo la mezcla con diclorometano (3 x 300 ml), se lavaron los extractos orgánicos con agua (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida. Se suspendió el producto en bruto en n-hexano (150 ml) y se trató con ultrasonidos. Se separaron los sólidos por filtración, se lavaron con n-hexano y se secaron a presión reducida para producir 21 g de sulfóxido protegido con Boc.

Se diluyó el material en bruto en diclorometano (170 ml) y se enfrió hasta 0ºC tras añadirse ácido trifluoroacético (50 ml). Se dejó que la disolución se calentara hasta temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 18 h. Se concentró la suspensión formada a presión reducida para lograr un sólido incoloro. Se resolvió la sal de TFA en metanol (80 ml) y después se añadió HCl (4 N en dioxano; 50 ml) con agitación a temperatura ambiente. Se agitó la suspensión blanca formada durante 1 h, se filtró, se lavó con diclorometano y se secó a vacío durante 1 h para producir clorhidrato de 1-óxido de tiomorfolina (11,3 g; 72,6 mmol; 75%) como cristales incoloros.

Se suspendió el clorhidrato de 1-óxido de tiomorfolina (4 g; 25,7 mmol) en acetonitrilo (127 ml) tras añadirse base de Hünig (diisopropiletilamina; 13,1 ml; 77,8 mmol) y se sonicó la suspensión resultante hasta la disolución completa.

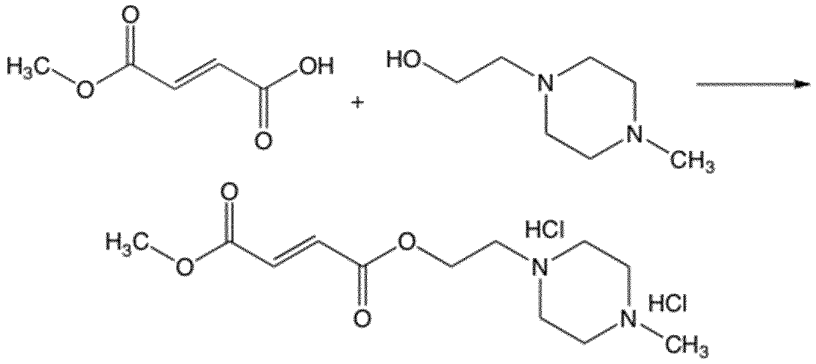
Se añadió (2-brometoxi)-terc-butil-dimetilsilano (7,2 ml; 34,7 mmol) y se agitó la disolución transparente a 80ºC durante el fin de semana (70 h).

Se concentró la disolución marrón a presión reducida hasta un 5º de su volumen y después se añadieron acetato de etilo (150 ml) y agua (100 ml). Se separaron las fases, se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (150 ml) y se lavaron todos los extractos orgánicos recogidos con agua (100 ml) y salmuera (70 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por medio de cromatografía en gel de sílice (diclorometano: metanol; 95:5) para producir 1-óxido de 4-[2-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-etil]-tiomorfolina (4,5 g; 16,2 mmol; 63%) como un aceite amarillento.

Se disolvió el 1-óxido de 4-[2-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-etil]-tiomorfolina (1,07 g; 3,8 mmol) en THF (10 ml) a temperatura ambiente y después se añadió fluoruro de tetrabutilamonio hidratado (1,82 g; 5,8 mmol). Se agitó la disolución durante 4 h a temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida para producir el alcohol en bruto como un aceite amarillo.

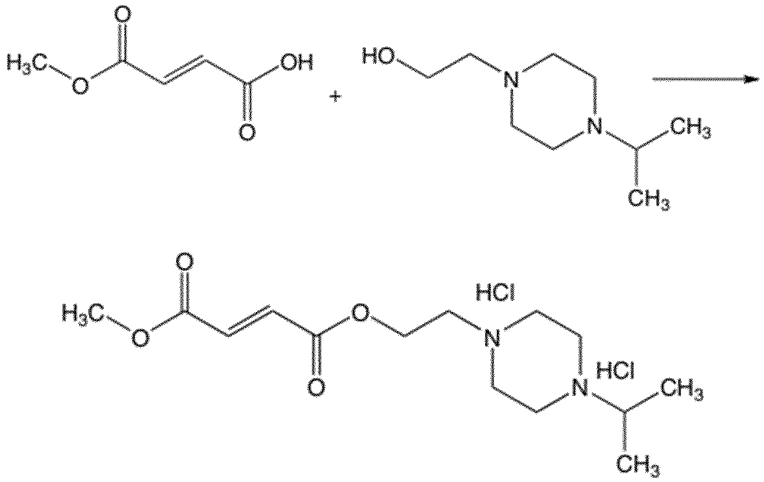
Se suspendió fumarato de monometilo (MMF) (0,5 g; 3,8 mmol) en diclorometano seco (10 ml) a 0ºC y se añadió clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (0,81 g; 4,2 mmol). Se agitó la mezcla durante 2 min y se añadió alcohol en bruto disuelto en diclorometano (2,5 ml) a 0ºC seguido por DMAP (50 mg). Se dejó que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente y se continuó la agitación durante la noche. Se diluyó la mezcla marrón con diclorometano adicional (60 ml), se lavó dos veces con agua (2 x 40 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por medio de cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo + 5% de trietilamina) para obtener éster 2-(1-oxo-1-lambda*4*-tiomorfolin-4-il)-etílico de éster metílico del ácido (E)-2-butenodioico (290 mg; 11 mmol; 27,4%) como un sólido incoloro.

Ejemplo de referencia 1b: Síntesis de clorhidrato de 2-(4-metil-piperazin-1-il)etilo de éster metílico del ácido (E)-2-butenodioico



A una suspensión agitada de fumarato de monometilo (1 eq.) en diclorometano seco se le añadieron sucesivamente clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilaminopropil)carbodiimida (1,1 eq.), 1-(2-hidroxietil)-4-metilpiperazina (0,98 eq.) y DMAP (0,1 eq.) a 0ºC. Se dejó que la suspensión se calentara hasta temperatura ambiente (23ºC) y se continuó la agitación durante la noche (durante 14 horas). Se diluyó la mezcla con diclorometano adicional, se lavó con agua y se secó con sulfato de sodio. Se trató la disolución marrón con HCl (3M en butanol; 4 eq.) y se recogió el producto por medio de filtración.

Ejemplo de referencia 1c: Síntesis de clorhidrato de 2-(4-isopropil-piperazin-1-il)etilo de éster metílico del ácido (E)-2-butenodioico

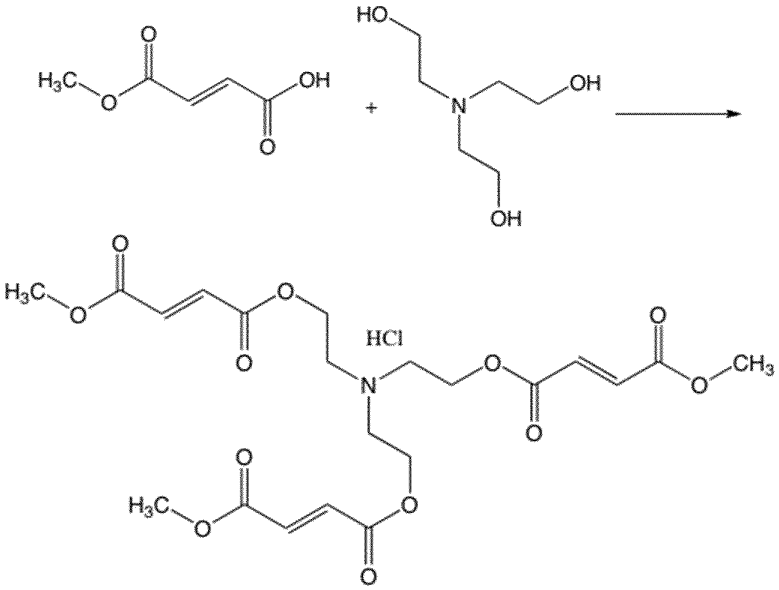


A una suspensión agitada de fumarato de monometilo (1,5 g; 11,5 mmol) en diclorometano seco (30 ml) se le añadieron sucesivamente clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilamonopropil)carbodiimida (2,4 g; 12,7 mmol), 1-(2-hidroxietil)4-isopropilpiperazina (1,8 g; 10,4 mmol) y DMAP (140 mg; 1,2 mmol) a 0ºC. Se dejó que la suspensión se calentara hasta temperatura ambiente (23ºC) y se continuó la agitación durante la noche (durante 14 horas). Se diluyó la mezcla con diclorometano adicional (50 ml), se lavó con agua (2 x 70 ml) y se secó con sulfato de sodio. Se sometió el producto en bruto a una corta cromatografía en gel de sílice (eluyente: acetato de etilo) con el fin de

repartir las impurezas polares. Se disolvió el residuo amarillo restante en diclorometano (25 ml) y se trató con HCl (3 M en butanol; 10 ml) y se recogió el producto por medio de filtración.

Rendimiento: 814 mg (2,3 mmol; 20%)

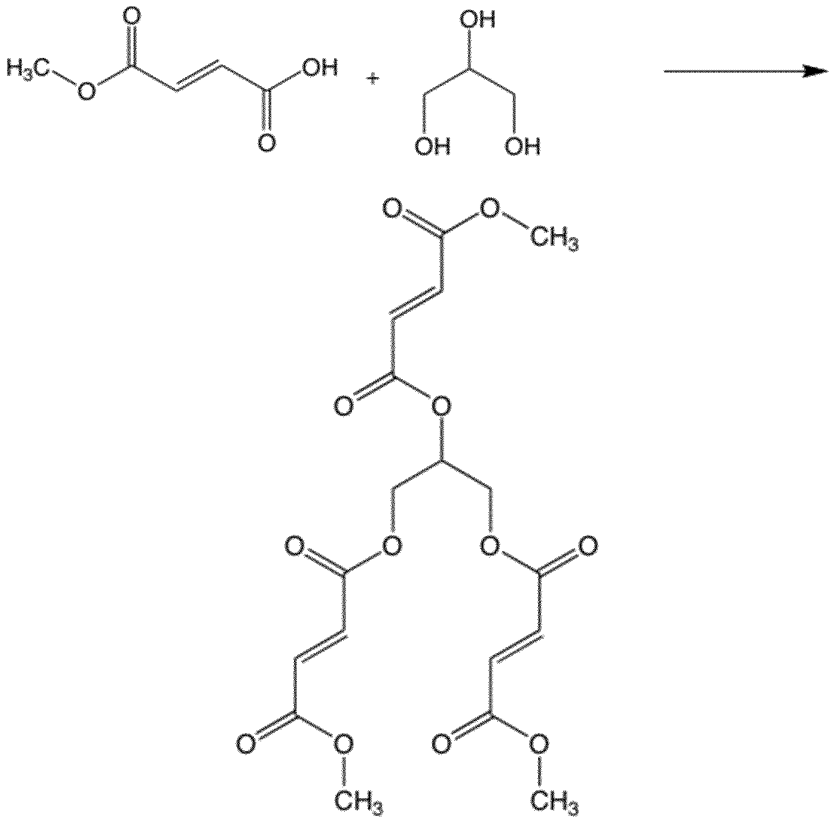
Ejemplo 2: Síntesis de clorhidrato de tris-[2-(E)-3-metoxicarbonilacriloiloxi)-etil] amina



A una suspensión agitada de fumarato de monometilo (4,6 g; 35,2 mmol) en diclorometano seco (100 ml) se le añadieron sucesivamente clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilamonopropil)carbodiimida (6,7 g; 35,2 mmol), tris-(2-hidroxietil)amina) (1,5 g; 10,1 mmol) y DMAP (123 mg; 1 mmol) a 0ºC. Se dejó que la suspensión se calentara hasta temperatura ambiente (23ºC) y se continuó la agitación durante la noche (durante 14 horas). Se diluyó la mezcla con diclorometano adicional (50 ml), se lavó con agua (2 x 70 ml) y se secó con sulfato de sodio. Se purificó el producto en bruto resultante por medio de cromatografía en gel de sílice (eluyente: metilo terc-butil éter/n-hexano 1:1). Se disolvió la amina libre en una mezcla de dietil éter seco/diclorometano (3:1; 20 ml) y después se añadió HCl (4 M en dioxano; 3 ml) y se recogió el producto precipitado por medio de filtración.

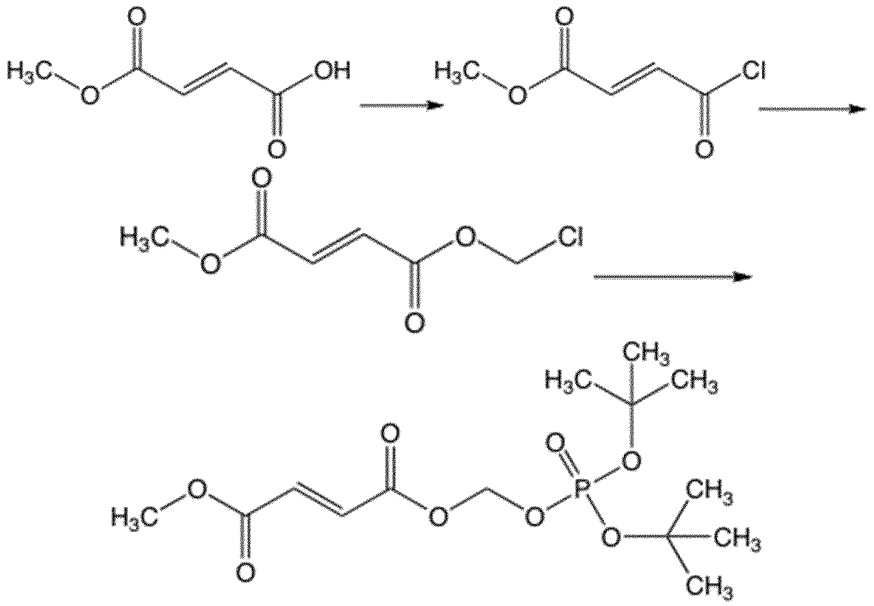
Rendimiento: 1,02 g (2,0 mmol; 20%)

Ejemplo 3: Síntesis de éster metílico de éster 2,3-bis-(€-3-metoxicarbonil-acriloiloxi)-propílico del ácido (E)-2-butenodioico



Se disolvieron glicerol (0,25 g, 2,71 mmol), fumarato de monometilo (1,4 g, 10,9 mmol), clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilamonopropil)carbodiimida (2,081 g, 10,9 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP; 0,02 g, 0,1 mmol) en diclorometano seco (20 ml). Se mantuvo la mezcla de reacción con agitación continua a temperatura ambiente (23ºC) durante 16 horas. Se lavó la fase orgánica tres veces con agua (3 x 20 ml), se lavó la fase acuosa con diclorometano (40 ml) y se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se sometió el producto oleoso parduzco/naranja a cromatografía en columna (eluyente: acetato de etilo/n-hexano 1:1) y se obtuvo el producto como un sólido incoloro.

Ejemplo de referencia 4a: Síntesis de éster metílico de éster di-terc-butoxi-fosforiloximetílico del ácido (E)-2-butenodioico



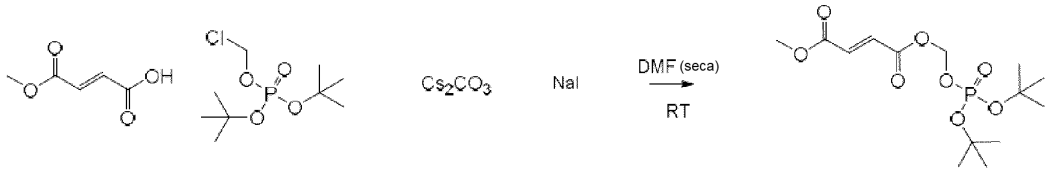
Se secó todo el equipo de vidrio a 110ºC durante la noche. Se suspendió fumarato de monometilo (3,56 g) en 40 ml de diclorometano y se colocó en un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 ml, equipado con un embudo de

adición, una columna de destilación Vigreux y un termómetro. Se calentó la disolución hasta 40ºC. Se añadió cloruro de tionilo (7,8 ml) en el plazo de una hora a través de un embudo de adición, de modo que pudiera observarse la formación de gas. Se destiló lentamente el diclorometano a 40ºC y se sometió la mezcla a reflujo a 60-65ºC hasta que se detuvo la formación de gas y no pudieron observarse sólidos en la mezcla ligeramente amarilla. Se separó por destilación el cloruro de tionilo en exceso a presión reducida (pe.: 41ºC/vacío interno) y se destiló cloruro de metil-fumaroílo a presión reducida a aproximadamente 32ºC/bomba de aceite. Rendimiento: 1,61 g (39,7%) pf.: 12-13ºC.

Bajo atmósfera de N_2, se añadió formaldehído (22 mmol) gota a gota a una mezcla agitada de cloruro de metil-fumaroílo (éster metílico del ácido (E)-3-clorocarbonil-acrílico) (20 mmol) y cantidades catalíticas de $ZnCl_2$ a -20ºC. Tras la adición del acetaldehído, se agitó la mezcla durante otra hora a -20ºC. Una vez finalizado, se disolvió el material en bruto en éter de petróleo, y se eluyó a través de una columna de sílice (gel de sílice 60 H, 6x8 cm) con succión. La disolución eluida se filtró, se evaporó, y se aisló el producto, fumarato de clorometil-metilo, mediante destilación a vacío.

Bajo atmósfera de N_2, se añadió trietilamina (25 mmol) gota a gota a una disolución de fosfato de di-terc-butilo (20 mmol) y fumarato de clorometil-metilo (20 mmol) en DMF seca (10 ml). Se calentó la mezcla de reacción hasta 70ºC durante 4 h y entonces se filtró el precipitado y se lavó con acetato de etilo. Se repartió el filtrado entre agua y acetato de etilo y se lavó la fase acuosa con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica combinada con agua, disolución acuosa de $NaHCO_3$ al 5% y con salmuera. Tras secarse sobre sulfato de magnesio, se evaporó el disolvente orgánico para producir el producto en bruto.

Ejemplo de referencia 4a': Síntesis de éster metílico de éster di-terc-butoxi-fosforiloximetílico del ácido (E)-2-butenodioico



Se suspendieron los eductos en dimetilformamida y se agitaron durante 12 horas a temperatura ambiente (23ºC). Se concentró la mezcla y se extrajo con metil terc-butil éter y tampón fosfato. Se retiró el disolvente y se purificó el producto en bruto mediante HPLC.

HPLC preparativa: 75 MeOH, Kromasil 100A 10 μ, 250x50 mm

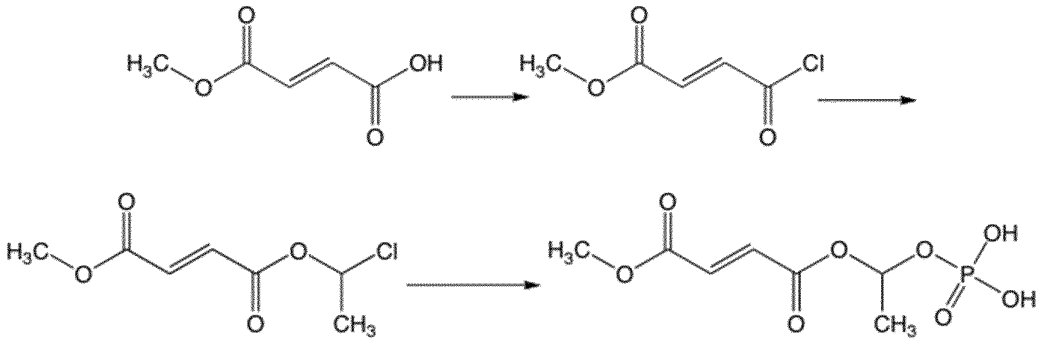
HPLC analítica: 75 MeOH, Kromasil 100A 10 μ 250x4 mm

Alternat. NP HPLC Prep/Anal:

Kromasil NP 60A 10 μ, 50 DCM 50 CAN

Rendimiento: 47%

Ejemplo de referencia 4b: Síntesis de éster 1-fosfonooxi-etílico de éster metílico del ácido (E)-2-butenodioico



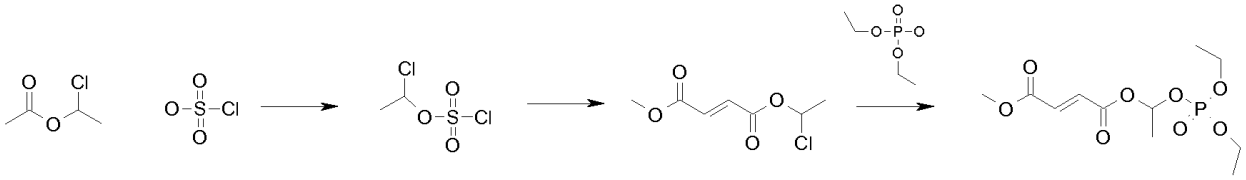
Se secó todo el equipo de vidrio a 110ºC durante la noche. Se suspendió fumarato de monometilo (3,56 g) en 40 ml de diclorometano y se colocó en un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 ml, equipado con un embudo de adición, una columna de destilación Vigreux y un termómetro. Se calentó la disolución hasta 40ºC. Se añadió cloruro de tionilo (7,8 ml) en el plazo de una hora a través de un embudo de adición, de modo que pudiera observarse la

formación de gas. Se destiló lentamente el diclorometano a 40ºC y se sometió la mezcla a reflujo a 60-65ºC hasta que se detuvo la formación de gas y no pudieron observarse sólidos en la mezcla ligeramente amarilla. Se separó por destilación el cloruro de tionilo en exceso a presión reducida (pe.: 41ºC/vacío interno) y se destiló cloruro de metil-fumaroílo a presión reducida a aproximadamente 32ºC/bomba de aceite. Rendimiento: 1,61 g (39,7%) pf.: 12-13ºC.

Bajo atmósfera de N_2, se añadió acetaldehído helado (22 mmol) gota a gota a una mezcla agitada de cloruro de metil-fumaroílo (éster metílico del ácido (E)-3-clorocarbonil-acrílico) (20 mmol) y cantidades catalíticas de $ZnCl_2$ a -20ºC. Tras la adición del acetaldehído, se agitó la mezcla durante otra hora a -20ºC. Una vez finalizado, se disolvió el material en bruto en éter de petróleo, y se eluyó a través de una columna de sílice (gel de sílice 60 H, 6x8 cm) con succión. La disolución eluida se filtró, se evaporó y se aisló el producto, fumarato de 1-cloroetil-metilo, mediante destilación a vacío.

Bajo atmósfera de N_2, se añadió trietilamina (25 mmol) gota a gota a una disolución de fosfato de dietilo (20 mmol) y fumarato de 1-cloroetil-etilo (20 mmol) en DMF seca (10 ml). Se calentó la mezcla de reacción hasta 70ºC durante 4 h y entonces se filtró el precipitado y se lavó con acetato de etilo. Se repartió el filtrado entre agua y acetato de etilo y se lavó la fase acuosa con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica combinada con agua, disolución acuosa de $NaHCO_3$ al 5% y con salmuera. Tras haberse secado sobre sulfato de magnesio, se evaporó el disolvente orgánico para producir el producto oleoso, fumarato de 1-(dietoxifosforiloxi)etil-metilo. Se calentó una mezcla de 6 ml ácido acético y 6 ml agua hasta 70ºC y se añadió una disolución del fumarato de 1-(dietoxifosforiloxi)etil-metilo obtenido (10 mmol) en 10 ml de metil terc-butil éter. Tras agitar la mezcla durante 2 horas, se evaporó el metil terc-butil éter a presión reducida (300 mbar). Se enfrió la suspensión restante hasta 10ºC y se separó por filtración el precipitado, se lavó con acetona fría y se secó durante la noche para obtener el producto.

Síntesis alternativa:

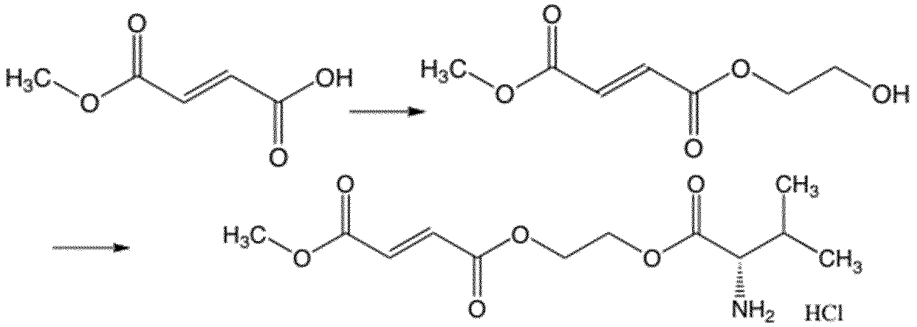


A éster 1-cloro-etílico del ácido acético (54 g) se le añadió ácido clorosulfúrico (47 g) gota a gota a 0ºC con agitación. Se retiró el HCl que se desprendió mediante flujo de argón constante. Se calentó lentamente la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora a esta temperatura. Se evaporó la mezcla de reacción durante la noche y se destiló el producto después a hasta 90ºC para producir 30 g del producto como un aceite incoloro (44%).

Se suspendieron fumarato de monometilo, hidrogenocarbonato de sodio (5 eq.) y sulfato de tetrabutilamonio (0,1 eq.) en 126 ml de H_2O y 95 ml de diclorometano. Se añadió éster 1-cloro-etílico del ácido clorosulfúrico (1,2 eq.) gota a gota con agitación vigorosa, se continuó la agitación durante la noche. Tras la extracción con TBME, se purificó el producto en bruto mediante HPLC (99,5% de diclorometano, 0,5% de acetonitrilo; Kromasil NP, 250x50mm, 60A 10 μ) para obtener el producto puro con rendimiento del 46%.

Se suspendieron fosfato de dietilo (1 eq.), trietilamina (1,7 eq.), yoduro de sodio (0,01 eq.) y éster metílico de éster 1-cloroetílico del ácido (E)-2-butenodioico en acetonitrilo. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 días a 55ºC. Se evaporó el disolvente y se purificó el producto en bruto mediante HPLC (98,75% de diclorometano, 1,25% de metanol; Kromasil NP, 250x50, 60A 10 μ) para producir el producto con rendimiento del 71%.

Ejemplo de referencia 5a: Síntesis de clorhidrato de éster metílico de éster 2-((S)-2-amino-3-metil-butiriloxi)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico

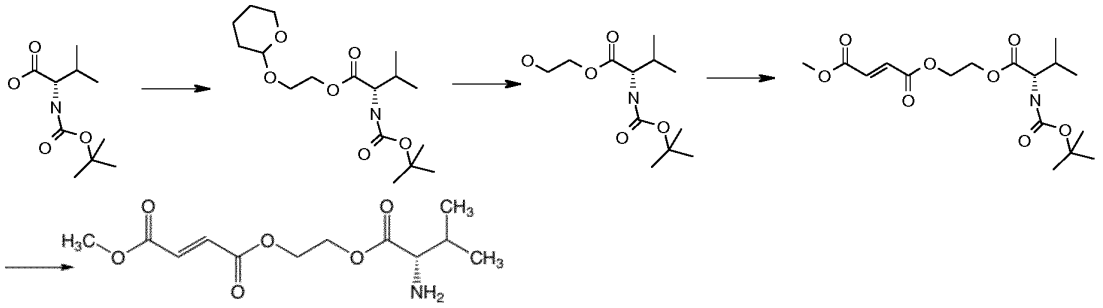


Se disolvieron fumarato de monometilo, etilenglicol (5 eq.), EDC (2 eq.) y DMAP (0,01 eq.) en acetonitrilo. Se agitó la mezcla de reacción durante 4 horas. Se extrajo el producto con acetato de etilo/tampón fosfato pH 7,0. Se purificó el producto en bruto mediante HPLC para obtener el producto con un rendimiento del 35%.

A éster metílico de éster 2-hidroxi-etílico del ácido (E)-2-butenodioico, EDC (3 eq.), DMAP (0,01 eq.) y valina protegida con Boc se le añadió acetonitrilo. Se agitó la mezcla de reacción durante 12 horas a temperatura ambiente. Se extrajo el producto con acetato de etilo/tampón fosfato pH 7,0. Se purificó el producto en bruto mediante HPLC para producir el producto con un rendimiento del 85%.

Se disolvieron 440 mg de éster metílico de éster 2-((S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiriloxi)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico en ácido acético:cloroformo 70:30. Se agitó la mezcla de reacción durante 4 días. Se evaporó el disolvente y se purificó la sal de acetato por medio de HPLC ((Kromasil, 10 μ, 100A; 50% de metanol, 0,1% de acético trifluoracético). Se disolvió el trifluoroacetato obtenido en HCl 0,1 N y se evaporó para producir el clorhidrato con un rendimiento de > 95%.

Síntesis alternativa para éster metílico de éster 2-((S)-2-amino-3-metil-butiriloxi)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico



Se disolvió t-BOC-L-valina (2 g) en diclorometano seco (50 ml). Se añadieron DMAP (0,19 g) y THP-etilenglicol (5,71 ml) bajo nitrógeno. Se añadió EDC (2,62 g) a temperatura ambiente y se agitó la reacción durante 16 h a temperatura ambiente. Se añadió agua (80 ml) a la mezcla de reacción, se separó la fase orgánica y se evaporó a 40ºC. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna (dietil éter/n-hexano (1/2 v/v) (la visualización del producto en CCF se realizó con disolución de $KMnO_4$) para producir el producto con un rendimiento del 22%.

Se cargaron éster 2-(tetrahidro-piran-2-iloxi)-etílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butírico (542 mg) y metanol (6 ml) en un RBF de 50 ml. Se añadió ácido p-toluenosulfónico (31 mg) y se agitó la mezcla resultante a TA bajo argón durante 1 h 15. Se controló la conversión mediante HPLC. Se concentró la mezcla a presión reducida. Se recogió el residuo con 50 ml de diclorometano y 25 ml de disolución saturada de bicarbonato de sodio. Tras la decantación, se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida produciendo el producto como un aceite incoloro (394 mg).

Bajo atmósfera de argón, se disolvieron 454 mg (1,7 mmol) de éster 2-hidroxietílico del ácido (S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butírico en 6 ml de diclorometano. Tras la adición de 271 mg (2,1 mmol) de fumarato de monometilo y 11 mg (0,1 mmol) de DMAP, se colocó el matraz en un baño de hielo. Se añadieron 433 mg de EDC, disueltos en 3 ml de diclorometano, gota a gota en el plazo de 5 min, se retiró el baño de hielo y se agitó la mezcla durante 16 h a TA. Se diluyó la mezcla de reacción con 30 ml de diclorometano y se extinguió la reacción mediante la adición de 20 ml de agua. Se retiró la fase orgánica, se lavó con 20 ml de agua y 20 ml de bicarbonato de sodio saturado y se secó sobre sulfato de sodio. Se retiró el disolvente a vacío y el producto, éster metílico de éster 2-((S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiriloxi)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico, se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; disolvente: 250 ml de diclorometano/metanol (99/1 con el 0,25% de trietilamina) seguido por 200 ml de diclorometano/metanol (98/2 con el 0,25% de trietilamina).

Rendimiento: 282 mg (43,5%)

Pureza química (HPLC, λ = 200 nm): el 98,7%

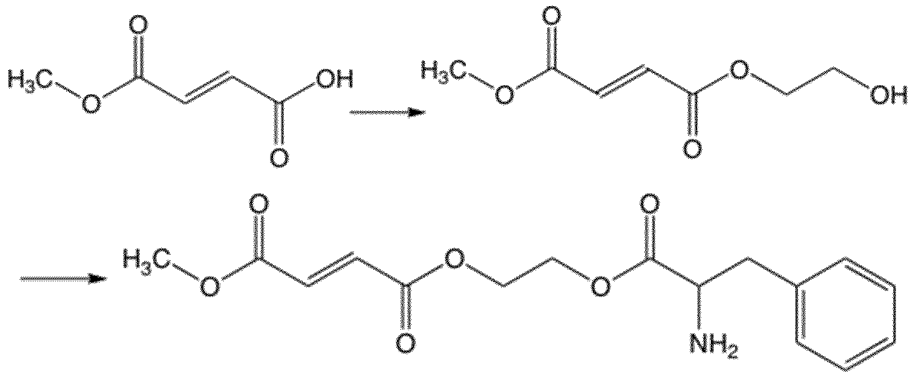
Bajo atmósfera de argón, se disolvieron 280 mg (0,7 mmol) de éster metílico de éster 2-((S)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiriloxi)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico en 5 ml de diclorometano y se colocó el matraz en un baño de hielo. Mientras se agitaba, se añadieron 0,57 ml de ácido trifluoroacético gota a gota. Una vez finalizado, se retiró el baño de hielo y se agitó la mezcla durante 16 h a temperatura ambiente. Se colocó de nuevo el matraz en un baño de hielo, se añadieron 10 ml de bicarbonato de sodio saturado, se separó la fase orgánica y de nuevo se lavó con 10 ml de bicarbonato de sodio saturado. Se retiró el disolvente y se disolvió el residuo en 30 ml de acetato de etilo, se lavó con 15 ml bicarbonato de sodio saturado y 15 ml de salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. Tras retirar el disolvente, se obtuvo el producto como un aceite amarillento.

Rendimiento: 185 mg (90,3%)

Pureza química (HPLC, λ = 200 nm): el 93,3%

La síntesis de la sal de HCl del compuesto correspondiente (clorhidrato de éster metílico de éster 2-((S)-2-amino-3-metil-butiriloxi)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico) puede realizarse tal como se describió anteriormente.

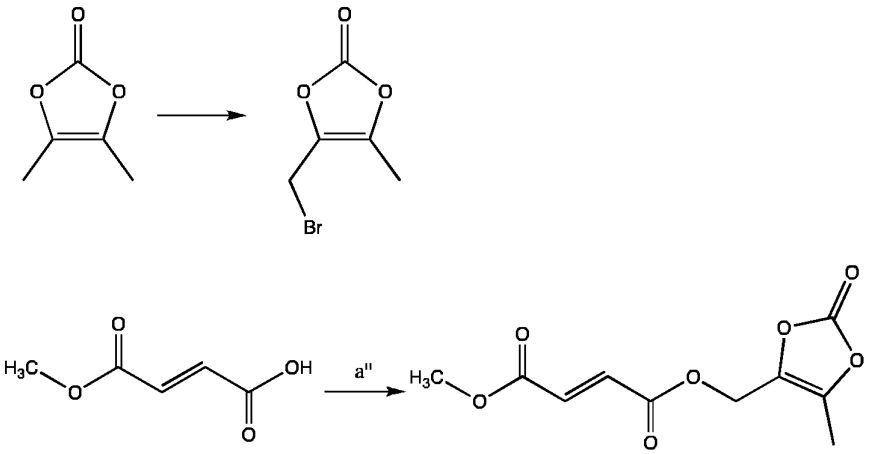
Ejemplo de referencia 5b: Síntesis de éster metílico de éster 2-(2-amino-3-fenilpropanoiloxi)-etílico del ácido (E)-2-butenodioico



A una disolución agitada de oxirano (1 eq.) en acetonitrilo anhidro, se le añadieron fumarato de monometilo (1 eq.) y una cantidad catalítica de bromuro de terc-butilamonio (0,03 eq.). Entonces se sometió a reflujo la disolución resultante durante la noche. Cuando se había agotado todo el material de partida, se evaporó el disolvente y se disolvió la mezcla de reacción en agua y entonces se extrajo con cloroformo y se secó sobre sulfato de magnesio. Tras la filtración, se evaporó la disolución a presión reducida para dar el producto, fumarato de 2-hidroxietilmetil (éster metílico de éster 2-hidroxietílico del ácido 2-butenodioico).

Se mezclaron entre sí fumarato de 2-hidroxietil-metilo (ácido 2-butenodioico, 2-hidroxietilo, fenilalanina protegida con Boc) (353 mg, 1,1 eq.), DMAP (1,1 eq.) y clorhidrato de N-etil-N'-(3-metilamonopropil)carbodiimida (1,1 eq.) y se agitaron en dimetilformamida anhidra durante 5 horas. Una vez finalizada la reacción, se evaporó la DMF a presión reducida y se purificó el residuo usando cromatografía en columna ultrarrápida. El compuesto protegido con Boc obtenido se resolvió en diclorometano y se añadió ácido trifluoroacético gota a gota a 0ºC. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara hasta 23ºC y una vez finalizada la reacción, se neutralizó el ácido trifluoracético obtenido con disolución acuosa de Na_2CO_3. Además, se añadió diclorometano y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo adicionalmente tres veces con acetato de etilo. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de magnesio y se evaporó el disolvente a presión reducida para producir el producto en forma de su base libre.

Ejemplo de referencia 6: Síntesis de éster 5-metil-2-oxo-[1,3]dioxol-4-il-metílico de éster metílico del ácido (E)-2-butenodioico



Se agitó una mezcla de 4,5-dimetil-1,3-dioxol-2-ona (6 g; 52,6 mmol), N-bromosuccinimida (NBS; 9,36 g; 52,6 mmol) y peróxido de benzoilo (0,36 g; 1,5 mmol) en 80 ml de CCl_4 a 77ºC durante 1 h. Tras enfriar hasta 23ºC, se trató la disolución con disolución acuosa de $NaHCO_3$ (20 ml) y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa tres veces

con diclorometano (3 x 40 ml), se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio y se evaporaron todos los disolventes a presión reducida para obtener 4-(bromometil)-5-metil-1,3-dioxol-2-ona en bruto.

Bajo atmósfera de N_2, se agitó una mezcla de fumarato de monometilo (2 g; 15,4 mmol), 4-(bromometil)-5-metil-1,3-dioxol-2-ona (7 g), K_2CO_3 (2,1 g; 15,4 mmol) y yoduro de sodio (2,3 g; 15,4 mmol) en DMF anhidra (8 ml) durante 15 h a 23ºC. Se extinguió la mezcla con agua (25 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica con agua (30 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por medio de cromatografía en gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/n-hexano 3:1).

Rendimiento: 1,85 g (7,6 mmol; 50%)

Ejemplo 7: Investigación y comparación de la cinética de liberación de MMF de los diferentes compuestos de la presente invención y DMF durante la incubación en fluido intestinal de cerdo enano

1. Materiales

1.1. Compuestos de prueba

Los compuestos de la presente invención se sintetizaron tal como se describió anteriormente.

1.2. Fluido intestinal

Se prepararon muestras de fluido intestinal en CiToxLAB Scantox A/S. Las muestras se tomaron de 1 cerdo enano Göttingen SPF hembra de la reserva habitual de CiToxLAB Scantox A/S, obtenido originalmente de Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, DK-4261 Dalmose, Dinamarca. El cerdo enano tenía 10 meses de edad y el peso corporal era de 21 kg. El cerdo enano se identificó mediante un número individual marcado en el pabellón auditivo de una oreja (el número del animal se documentó en los datos sin procesar).

Se dejó en ayunas al cerdo enano durante aproximadamente 28 horas antes de la toma de muestra del fluido intestinal. En el día de la toma de muestra, se pesó el cerdo enano y se anestesió mediante una inyección intramuscular en el cuello o en la pata trasera izquierda (aproximadamente 0,3 ml por kg de peso corporal) de una mezcla de Zoletil 50 Vet., Virbac, Francia (125 mg de tiletamina y 125 mg de zolazepam), Rompun Vet., Bayer, Alemania (20 mg de xilazina/ml, 6,5 ml), Ketaminol Vet., Veterinaria AG, Suiza (100 mg de ketamina/ml, 1,5 ml) y Metadon DAK, Nycomed Danmark, Dinamarca (10 mg de metadona/ml, 2,5 ml).

Se obtuvo fluido intestinal mediante lavado de un segmento de yeyuno, que medía 30,2 cm, con solución salina. El fluido intestinal junto con la solución salina usada para el lavado se colocó en tubos de centrífuga. Todas las muestras se congelaron a -70ºC y se llevaron en hielo seco al promotor para el uso adicional.

2. Métodos analíticos

2.1. Cuantificación de MMF mediante CL-EM

2.1.1. Instrumentos analíticos

Instrumento:	Sistema de UPLC Acquity acoplado con un detector TQ (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo)
<u>Método de UPLC:</u>	
Columna:	Fenomenex Kinetex C18, 100A, 2,6 μm (150 x 4,6 mm)
flujo:	0,4 ml/min
desdoblamiento:	aproximadamente 100 μl/min para EM
temperatura	30ºC
sistema de disolventes (isocrático):	
Disolvente A	25% de agua con ácido acético al 0,1%
Disolvente B	75% de metanol con ácido acético al 0,1%
tiempo de parada:	6 min

temperatura del inyector automático:	8ºC
volumen de inyección:	4 µl
tiempo de retención:	MMF: 4,3 min
	MEF: 4,7 min

Espectrometría de masas

software:	Masslynx 4.1
modo de detección:	electropulverización/iones negativos (ESP -)
voltaje capilar:	2,3 kV
temperatura de la fuente:	100ºC
temperatura de desolvatación:	450ºC
voltaje de cono:	18 V
gas de desolvatación:	N_2, 650 L/h
gas de cono:	N_2, 20 L/h
gas de colisión:	argón, aproximadamente. 3,3* 10^{-3} mbar
energía de colisión:	11 eV
MRM [m/z]:	128,94 > 85,03, permanencia de fumarato de monometilo: 200 ms
	142,99 > 99,06, permanencia de fumarato de monoetilo (ISTD): 200 ms

2.1.2. Disoluciones madre y de calibración

Se prepararon disoluciones madre (SS), de trabajo (WS) y de calibración del analito fumarato de monometilo (MMF) y del patrón interno (ISTD) fumarato de monoetilo (MEF) tal como se describe a continuación.

SS_{MMF}: En un matraz volumétrico de 10 ml, se disolvieron 6,5 mg de MMF (lote: MKRJ0642V / Aldrich) en metanol y se enrasó (c = 650 µg/ml)

SS_{ISTD}: En un matraz volumétrico de 100 ml, se disolvieron 10 mg de MEF (lote: STBC5219V / Aldrich) en metanol y se enrasó (c = 100 µg/ml)

WS_{ISTD}: Se transfirieron 100 µl de SSISTD a un matraz volumétrico de 10 ml y se enrasó con acetonitrilo (c = 1.000 ng/ml);

Se prepararon disoluciones de calibración mediante dilución en serie de SS_{MMF}; se usó como matriz fluido diluido del intestino delgado (diluido a 1/20 v/v con KH_2PO_4 50 mM, pH 6,8; (dil IF). El esquema de dilución se facilita a continuación:

disolución de calibración	Preparación		Concentración	
			[ng/ml]	[µM]
cal6500	8 µl de SS_{MMF}	+ 792 µl de dil IF	6.500	50
cal3250	50 µl de cal6500	+ 50 µl de dil IF	3250	25
cal650	20 µl de cal6500	+ 180 µl de dil IF	650	5,0
cal 325	50 µl de cal650	+ 50 µl de dil IF	325	2,5
cal65	10 µl de cal650	+ 90 µl de dil IF	65	0,5

2.1.3. Preparación de la muestra

Se mezclaron 50 µl de muestra (disolución de calibración o muestra de un experimento de incubación con profármacos de MMF) con 50 µl de WS_{ISTD}, 20 µl de ácido fórmico y 100 µl de acetonitrilo. Se agitó con vórtex esta

mezcla durante 15 s y se centrifugó (13.000 rpm, 3 min). A continuación, se sometieron 4 µl del sobrenadante a análisis mediante CL-EM.

2.2. Experimentos de incubación con DMF (referencia) y compuestos de la invención

2.2.1. Disoluciones madre

Se prepararon disoluciones madre en DMSO o en DMSO con 10% (v/v) con agua. Las concentraciones en las disoluciones madre fueron 5,00, 2,50 y 1,67 mmol para los compuestos con uno, dos y tres equivalentes molares de MMF. Los ejemplos 1a, 1a', 1b, 1c, 4a, 5a y 6 son ejemplos de referencia.

Compuesto	PM	Peso de la muestra [mg]	disuelto en	Concentración [mg / ml]	[mmol]
DMF	144,13	7,21	10 ml de DMSO	0,721	5,00
Ejemplo 1a	291,33	7,28	5 ml de DMSO	1,456	5,00
Ejemplo 1a '	275,33	6,89	5ml de DMSO	1,378	5,00
Ejemplo 1b	329,22	8,23	5 ml de DMSO	1,646	5,00
Ejemplo 1c	357,27	8,93	5 ml de DMSO	1,786	5,00
Ejemplo 2	521,91	4,35	5 ml de DMSO	0,87	1,67
Ejemplo 3	428,35	3,57	5 ml de DMSO	0,714	1,67
Ejemplo 4a	352,32	8,81	5 ml de DMSO	1,762	5,00
Ejemplo 5a	309,75	7,74	5 ml de DMSO	1,548	5,00
Ejemplo 6	242,19	6,05	5 ml DMSO	1,21	5,00

2.2.2. Experimento de incubación

En un vial de vidrio de HPLC, se mezclaron 8 µl de disolución madre con 792 µl de dil IF y se agitó la mezcla (250 rpm) en un baño de agua (T = 37ºC).

Inmediatamente tras el mezclado, así como a t = 15 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min, se retiraron 50 µl y se prepararon para análisis de CL-EM tal como se describe en el capítulo 2.1.3. Se continuó con las incubaciones y en caso de que el resultado del análisis de 120 min indicara la presencia de MMF-profármaco intacto restante, se tomaron muestras adicionales (t = 360 o 420 min y a 1,260 o 1,320 min) y se analizaron.

3. Resultados

3.1. Calibración del método analítico

Cada disolución de calibración se analizó dos veces. El segundo análisis se llevó a cabo aproximadamente 18 h después del almacenamiento de la muestra en el inyector automático, que se enfrió hasta 8ºC. Los resultados demuestran que la razón del área de pico permanece esencialmente sin cambios entre los análisis primero y segundo.

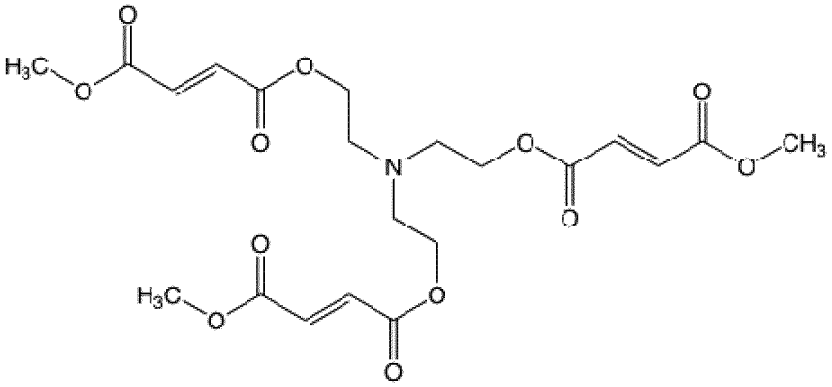
Los pares de datos de la razón concentración/área de pico se sometieron a análisis de regresión con una ponderación 1/x y se usó la ecuación de calibración resultante para cuantificar el contenido de MMF en las muestras de incubación.

patrón de calibración	concentración nominal [ng/ml]	Análisis	área/área (ISTD)	media	DER
cal6500	6.500	1er análisis	3,569	3,567	0,07
		2º análisis	3,564		
cal3250	3.250	1er análisis	1,710	1,681	1,73
		2º análisis	1,652		
cal650	650	1er análisis	0,348	0,347	0,29
		2º análisis	0,346		
cal325	325	1er análisis	0,174	0,169	2,96
		2º análisis	0,164		
cal65	65	1er análisis	0,036	0,035	2,86
		2º análisis	0,034		
cal0	0	1er análisis	0,000	0,000	0,00
		2º análisis	0,000		

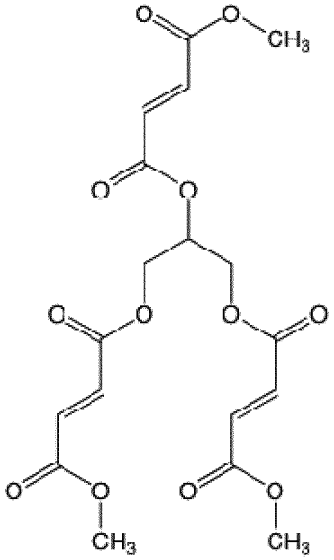
Tal como puede observarse a partir de las figuras 2 a 3, los compuestos inventivos según las fórmulas (II) a (III) muestran una hidrólisis deseable significativamente más lenta para MMF que para DMF.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto según una cualquiera de las siguientes fórmulas (II) a (III) o mezclas de los mismos para su uso como medicamento:



Fórmula (II), o



Fórmula (III).

2. Compuesto según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias, preferiblemente para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple o la psoriasis.

3. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1.

4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, que comprende

(i) de 0,01 a 10 mmol de un compuesto según la reivindicación 1 y

(ii) opcionalmente excipientes farmacéuticos.

5. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 3 o 4, en la que la liberación de fármaco *in vitro* tras 2 horas es de menos del 10%, medida según la USP, aparato II, paletas, HCl 0,1 N, 37ºC, 50 rpm.

Figura 1

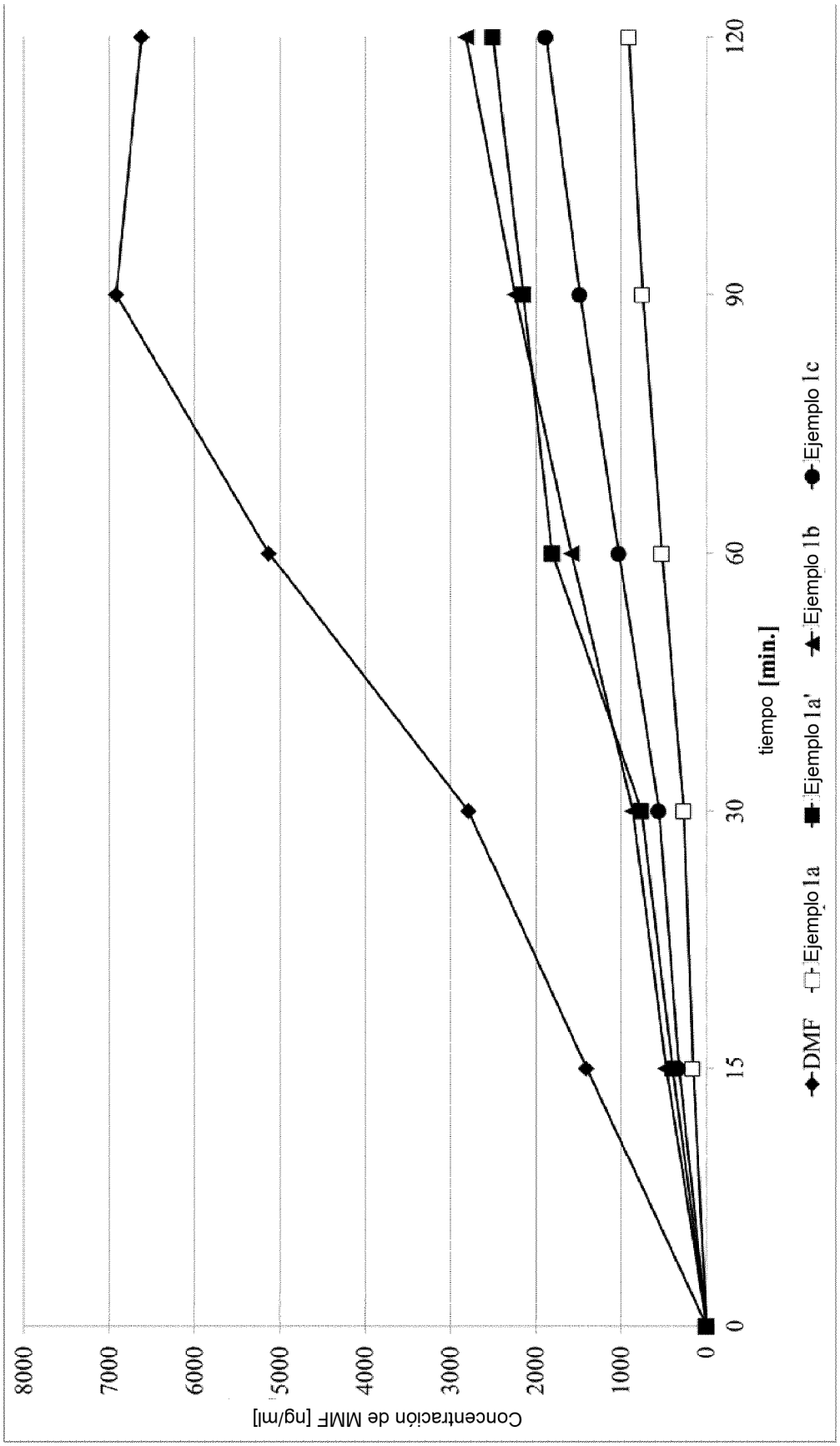

Concentración de MMF [ng/ml]
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
15
30
60
90
120
tiempo [min.]
DMF
Ejemplo 1a
Ejemplo 1a'
Ejemplo 1b
Ejemplo 1c

Figura 2

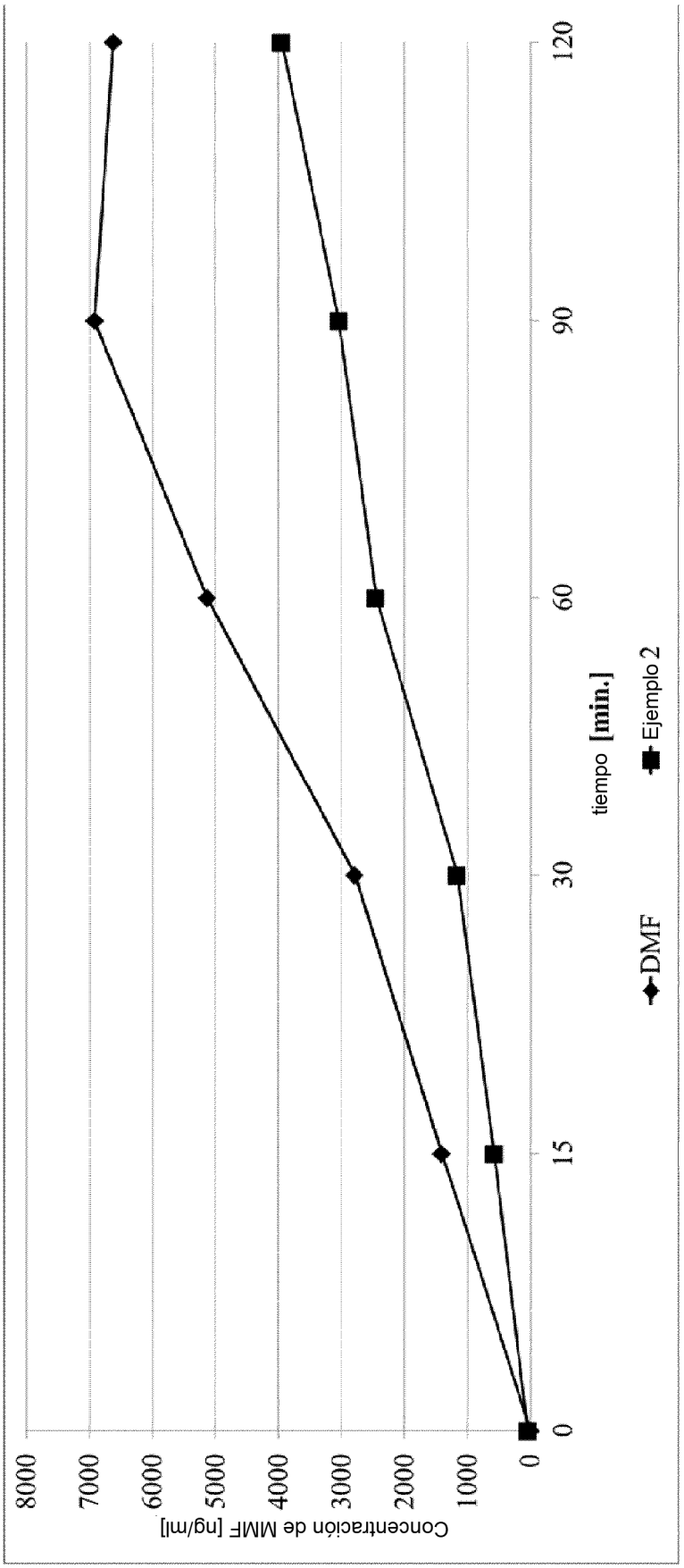

Concentración de MMF [ng/ml]
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
15
30
60
90
120
tiempo [min.]
DMF
Ejemplo 2

Figura 3

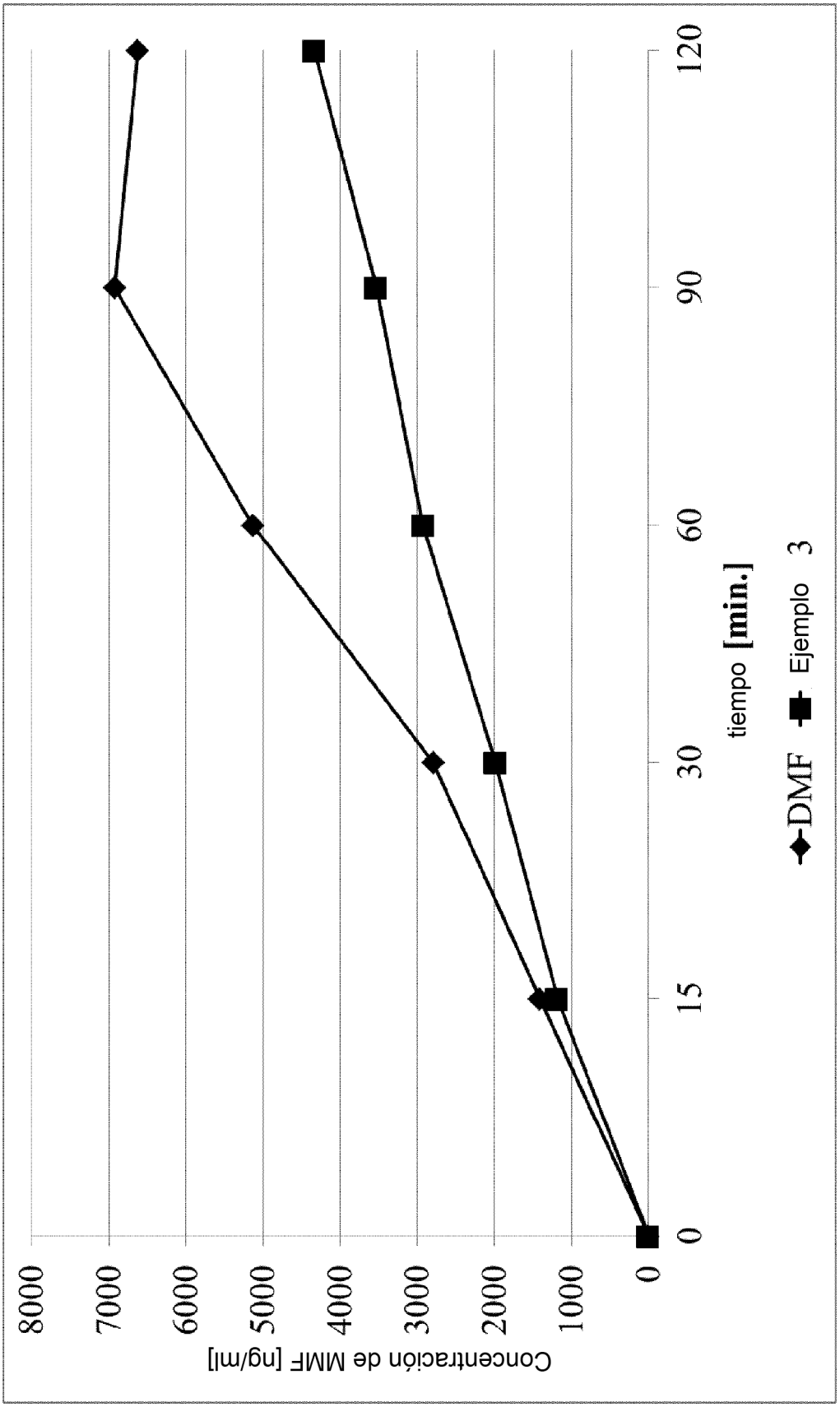

Concentración de MMF [ng/ml]
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
15
30
60
90
120
tiempo [min.]
DMF
Ejemplo 3

Figura 4

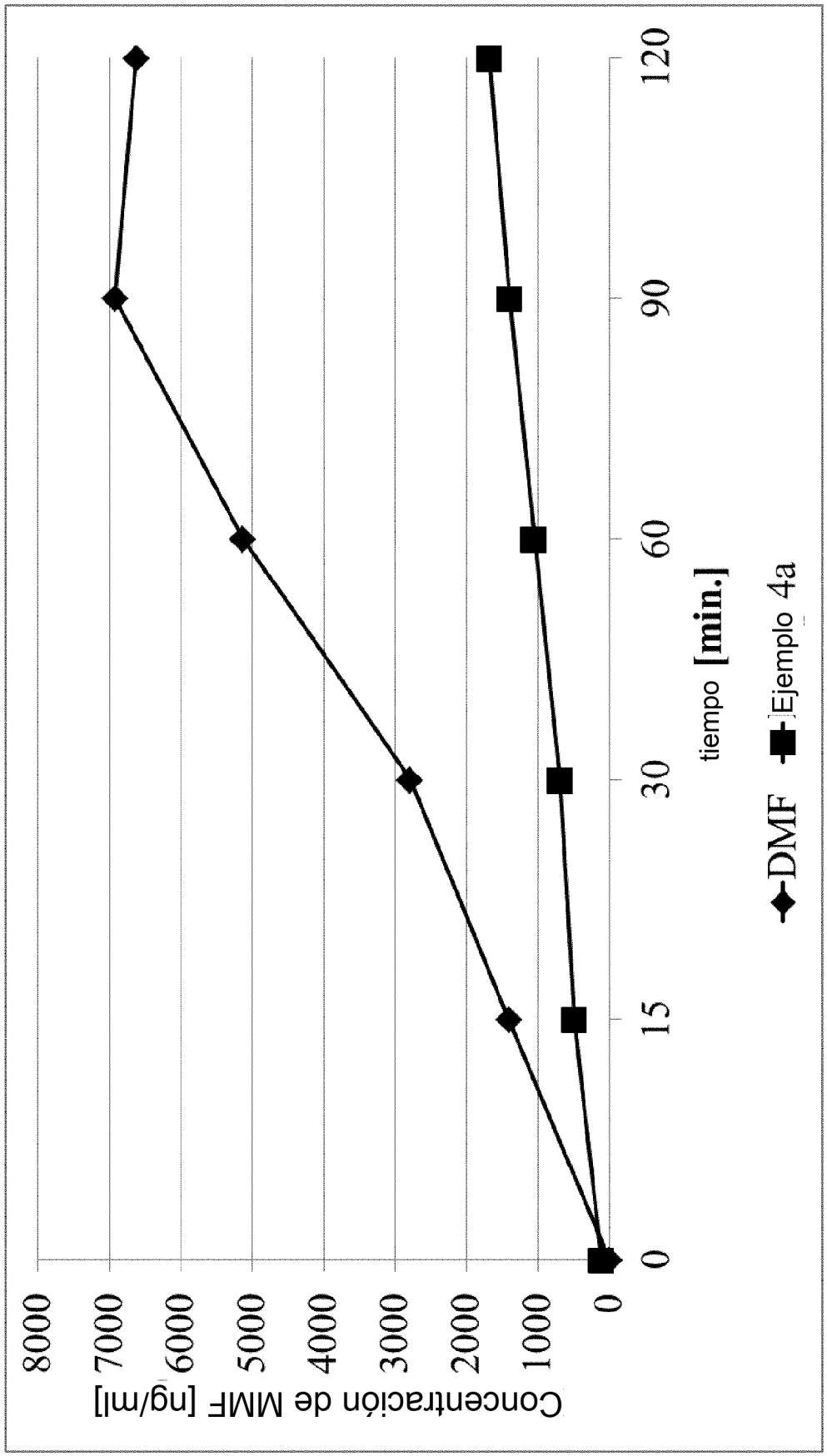

Concentración de MMF [ng/ml]
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
15
30
60
90
120
tiempo [min.]
DMF
Ejemplo 4a

Figura 5

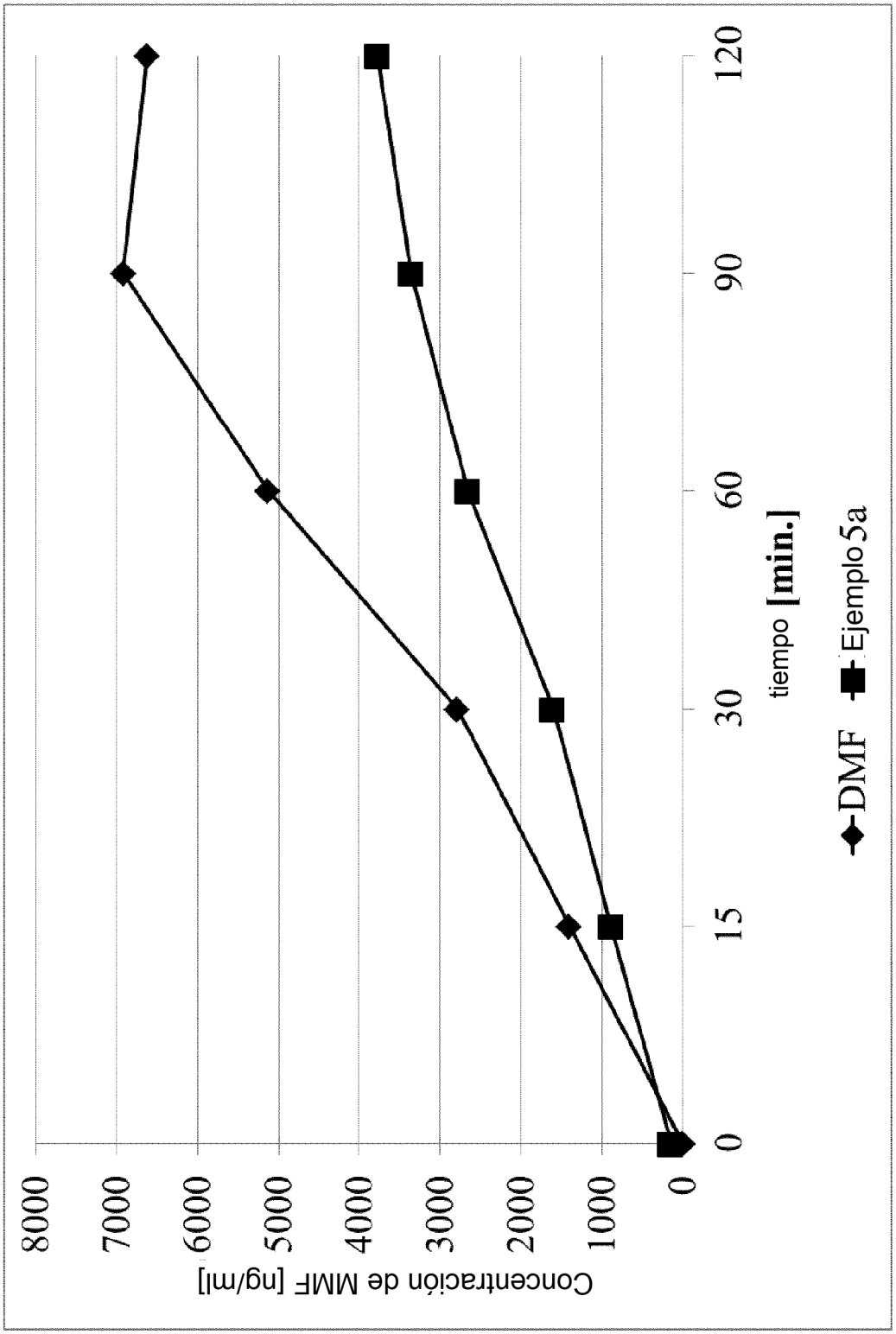
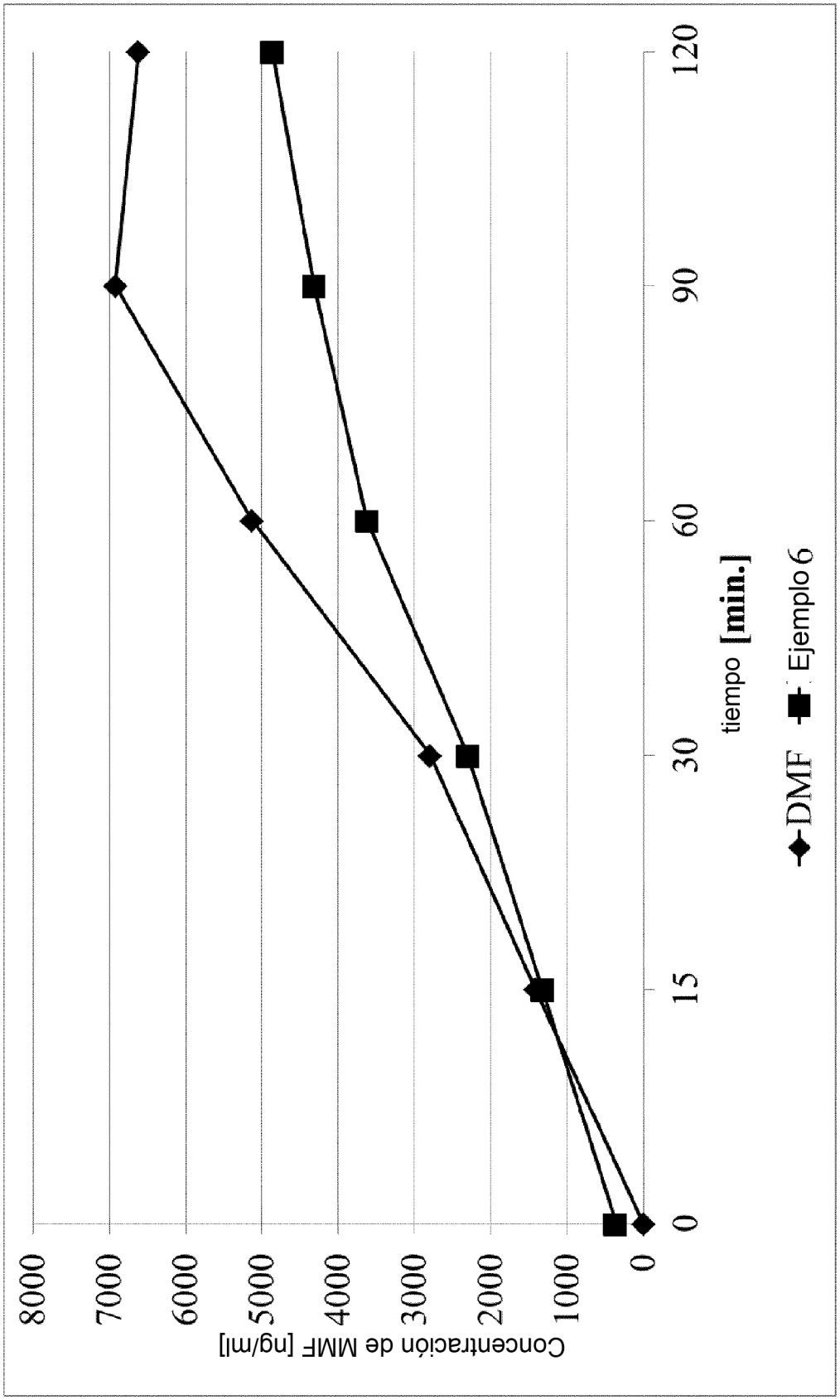

Concentración de MMF [ng/ml]
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
15
30
60
90
120
tiempo [min.]
DMF
Ejemplo 5a

Figura 6


Concentración de MMF [ng/ml]
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
15
30
60
90
120
tiempo [min.]
DMF
Ejemplo 6