



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 789**

51 Int. Cl.:

C07K 5/12 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04737852 .6**

96 Fecha de presentación : **18.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1633774**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Antagonistas macrocíclicos del receptor de motilina.**

30 Prioridad: **18.06.2003 US 479223 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2010

73 Titular/es: **Tranzyme Pharma Inc.**
3001 12e Avenue Nord IPS
Sherbrooke, Quebec J1H 5N4, CA

72 Inventor/es: **Fraser, Graeme;**
Marsault, Eric;
Peterson, Mark;
Hoveyda, Hamid;
Beaubien, Sylvie;
Benakli, Kamel y
Deziel, Robert

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 338 789 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

Antagonistas macrocíclicos del receptor de motilina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos macrocíclicos definidos conformacionalmente, a composiciones farmacéuticas que los comprenden y a intermedios usados en su fabricación. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos macrocíclicos que han demostrado que antagonizan selectivamente la actividad del receptor de motilina. La invención también se refiere a compuestos macrocíclicos útiles como productos terapéuticos para una serie de trastornos gastrointestinales, en particular aquellos en los que se observa un mal funcionamiento de la motilidad gástrica o un aumento de la secreción de motilina, tales como hipermotilinemia, síndrome del intestino irritable y dispepsia.

15 **Antecedentes de la invención**

Varias hormonas peptídicas están implicadas en el control de las diferentes funciones en el tracto gastrointestinal (GI), incluyendo la absorción, secreción, flujo sanguíneo y motilidad (Mulvihill, y col. en Basic and Clinical Endocrinology, 4ª Edición, Greenspan, F. S.; Baxter, J. D., eds., Appleton & Lange: Norwalk, CT, 1994, p. 551-570). Como las interacciones entre el cerebro y el sistema GI son críticas para la modulación apropiada de estas funciones, estos péptidos pueden producirse localmente en el tracto GI o distalmente en el SNC.

Una de estas hormonas peptídicas, la motilina, un péptido lineal de 22 aminoácidos, juega un papel regulador crítico en el sistema fisiológico GI por medio del control de la actividad motora gastrointestinal en ayunas. El péptido propiamente dicho se libera periódicamente desde la mucosa duodenal durante el ayuno en mamíferos, incluyendo los seres humanos. De manera más precisa, la motilina ejerce un efecto poderoso sobre la motilidad gástrica por medio de la contracción del músculo liso gastrointestinal para estimular el vaciado gástrico, reducir el tiempo de tránsito intestinal e iniciar la fase III del complejo motor migratorio en el intestino delgado (Itoh, Z., Ed., Motilin, Academic Press: San Diego, CA, 1990, ASIN: 0123757304; Nelson, D. K. Dig. Dis. Sci. 1996, 41, 2006-2015; Peeters, T. L.; Vantrappen, G.; Janssens, J. Gastroenterology 1980, 79, 716-719).

La motilina ejerce estos efectos por medio de receptores localizados predominantemente en el antro y duodeno proximal humanos, aunque sus receptores también se encuentran en otras regiones del tracto GI (Peeters, T. L.; Bormans, V.; Vantrappen, G. Regul. Pept. 1988, 23, 171-182). Por lo tanto, la hormona motilina está implicada en la motilidad tanto de la parte superior como de la parte inferior del sistema GI (Williams y col. Am. J. Physiol. 1992, 262, G50-G55). Además, se ha observado motilina y sus receptores en el SNC y la periferia, lo que sugiere un papel fisiológico en el sistema nervioso que aún no se ha esclarecido definitivamente (Depoortere, I.; Peeters, T. L. Am. J. Physiol. 1997, 272, G994-999 y O'Donohue, T. L. y col. Peptides 1981, 2, 467-477). Por ejemplo, se ha sugerido que los receptores de motilina en el cerebro juegan un papel regulador en varias funciones del SNC, incluyendo el comportamiento de alimentación y de bebida, el reflejo de la micción, la modulación neuronal central y del tronco cerebral y la secreción de hormonas de la pituitaria (Itoh, Z. Motilin and Clinical Applications. Peptides 1997, 18, 593-608; Asakawa, A.; Inui, A.; Momose, K.; y col., M. Peptides 1998, 19, 987-990 y Rosenfeld, D. J.; Garthwaite, T. L. Physiol. Behav. 1987, 39, 753-756). Estudios fisiológicos han proporcionado pruebas confirmatorias de que la motilina, efectivamente, puede tener un efecto sobre el comportamiento de alimentación (Rosenfeld, D. J.; Garthwaite, T. L. Phys. Behav. 1987, 39, 735-736).

La reciente identificación y clonación del receptor de motilina humano (documento WO 99/64436) ha simplificado y acelerado la búsqueda de agentes que puedan modular su actividad para fines terapéuticos específicos.

Debido a la implicación crítica y directa de la motilina en el control de la motilidad gástrica, los agentes que disminuyen (hipomotilidad) o aumentan (hipermotilidad) la actividad en el receptor de motilina son un área particularmente atractiva de investigación adicional en la búsqueda de nuevos productos farmacéuticos eficaces para estas indicaciones.

Se ha informado sobre agonistas peptídicos del receptor de motilina, que tienen aplicación clínica para el tratamiento de trastornos de hipomotilidad (documentos U.S. 5.695.952; 5.721.353; 6.018.037; 6.380.158; 6.420.521, solicitud U.S. 2001/0041791, documentos WO 98/42840; WO 01/00830 y WO 02/059141). También se ha informado sobre derivados de eritromicina, denominados comúnmente motilidas, como agonistas del receptor de motilina (documentos U.S. 4.920.102; 5.008.249; 5.175.150; 5.418.224; 5.470.961; 5.523.401. 5.554.605; 5.658.888; 5.854.407; 5.912.235; 6.100.239; 6.165.985; 6.403.775).

Los antagonistas del receptor de motilina son, en potencia, extremadamente útiles como tratamientos terapéuticos para enfermedades asociadas con la hiperomotilidad e hipermotilinemia, incluyendo el síndrome del intestino irritable, dispepsia, trastornos de reflujo gastroesofágico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pancreatitis, estenosis pilórica hipertrófica infantil, diabetes mellitus, obesidad, síndrome de malabsorción, síndrome carcinoide, diarrea, colitis atrófica o gastritis, síndrome de evacuación gastrointestinal rápida, síndrome postgastroenterostomía, estasis gástrica y trastornos de la alimentación que conducen a obesidad.

Una diversidad de compuestos peptídicos se han descrito como antagonistas del receptor de motilina (Depoortere, I.; Macielag, M. J.; Galdes, A.; Peeters, T. L. Eur. J. Pharmacol. 1995, 286, 241-247; documentos US 5.470.830; 6.255.285; 6.586.630; 6.720.433; U.S. 2003/0176643; WO 02/64623). Estos antagonistas peptídicos padecen las limitaciones conocidas de los péptidos como moléculas de fármaco, en particular una biodisponibilidad oral y un metabolismo de degradación deficientes.

La ciclación de derivados peptídicos es un procedimiento empleado para mejorar las propiedades de un péptido lineal tanto con respecto a la estabilidad metabólica como con respecto a la libertad conformacional. Las moléculas cíclicas tienden a ser más resistentes a las enzimas metabólicas. Se ha informado sobre estos antagonistas de motilina tetrapeptídicos cíclicos (Haramura, M. y col J. Med. Chem. 2002, 45, 670-675, documentos U.S. 2003/0191053; WO 02/16404).

También se ha informado sobre otros antagonistas de motilina, que son de naturaleza no peptídica y no cíclica (documentos U.S. 5.972.939; 6.384.031; 6.392.040; 6.423.714; 6.511.980; 6.624.165; 6.667.309; U.S. 2002/0111484; 2001/041701; 2002/0103238; 2001/0056106, 2002/0013352; 2003/0203906 y 2002/0002192).

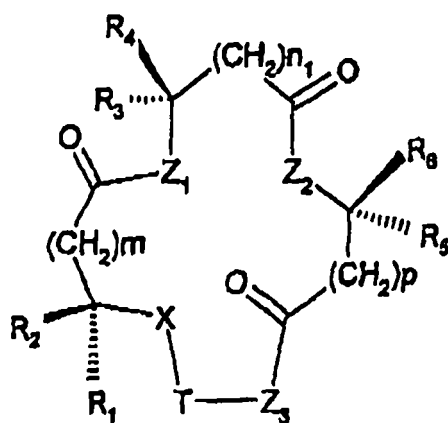
Los antagonistas de motilina macrocíclicos de la presente invención comprenden elementos tanto de estructura peptídica como de estructura no peptídica en una combinación que no se ha reivindicado para esta aplicación previamente.

De hecho, las características estructurales de los antagonistas de la presente invención son diferentes. En particular, dentro de los antagonistas de motilina conocidos que son péptidos cíclicos, se descubrió que los derivados que contenían D-aminoácidos carecían de actividad. Por el contrario, para los compuestos tripeptidomiméticos de la presente invención, se necesita la estereoquímica D para dos de los tres elementos constituyentes.

Los antagonistas de motilina de la presente invención también son distintos de la técnica anterior en que comprenden un elemento de cadena para cumplir el papel doble de controlar las conformaciones y proporcionar sitios adicionales para la interacción por medio de interacciones hidrófobas, formación de enlaces de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo.

Sumario de la invención

Los compuestos de fórmula (I):



(I)

y sales, hidratos o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos son aquellos en los que:

Z_1 , Z_2 y Z_3 se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por O, N y NR_{10} , donde R_{10} se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior y alquilo inferior sustituido;

R_1 se selecciona independientemente entre el grupo constituido por alquilo inferior sustituido con arilo, alquilo inferior sustituido con arilo sustituido, alquilo inferior sustituido con heteroarilo y alquilo inferior sustituido con heteroarilo sustituido;

R_2 es hidrógeno;

ES 2 338 789 T3

R₃ se selecciona independientemente entre el grupo constituido por alquilo y cicloalquilo con la condición de que cuando Z₁ es N, R₃ pueda formar un anillo heterocíclico de cuatro, cinco, seis o siete miembros junto con Z₁;

R₄ es hidrógeno;

5

R₅ y R₆ se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, con la condición de que al menos uno de R₅ y R₆ sea hidrógeno;

10 X se selecciona entre el grupo constituido por O, NR₈ y N(R₉)₂⁺;

- en el que R₈ se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, formilo, acilo, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, sulfonilo, sulfonamido y amidino; y

15 - R₉ se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo inferior y alquilo inferior sustituido;

m, n₁ y p se seleccionan independientemente entre 0, 1 ó 2; y

T es un radical bivalente de fórmula II:

20



en la que d y e se seleccionan independientemente entre 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

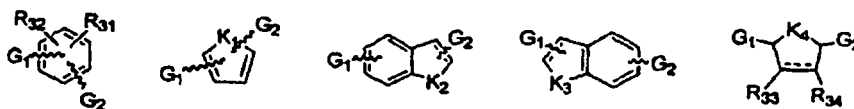
25

en la que U está unido a X de fórmula (I) y es -CH₂- o -C(=O)-;

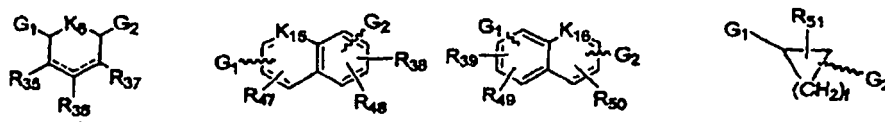
en la que cada uno de Y y Z está opcionalmente presente;

30 W, Y y Z se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por: -O-, -NR₂₈-, -S-, -SO-, -SO₂-, -C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-NH-, -NH-C(=O)-, -SO₂-NH-, -NH-SO₂-, -CR₂₉R₃₀-, -CH=CH- con una configuración Z o E, y -C≡C-, o de una estructura de anillos seleccionada independientemente entre el grupo:

35



40



45

en el que cualquier átomo de carbono contenido dentro de dicha estructura de anillos puede reemplazarse por un átomo de nitrógeno, con la condición de que si dicha estructura de anillos es una estructura de anillos monocíclicos, no comprenda más de cuatro átomos de nitrógeno y si dicha estructura de anillos es una estructura de anillos bicíclicos, no comprenda más de seis átomos de nitrógeno;

50

cada uno de G₁ y G₂ representa independientemente un enlace covalente o un radical bivalente seleccionado entre el grupo constituido por -O-, -NR₄₁-, -S-, -SO-, -SO₂-, -C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH-C(=O)-, -SO₂-NH-, -NH-SO₂-, -CR₄₂R₄₃-, -CH=CH- con una configuración Z o E, y -C≡C-; con la condición de que G₁ esté unido más íntimamente a U que G₂;

55

K₁, K₂, K₃, K₄, K₆, K₁₅ y K₁₆ se seleccionan independientemente entre el grupo constituido por O, NR₄₄ y S;

60

f se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

R₃₁, R₃₂, R₃₈, R₃₉, R₄₈ y R₄₉ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, halógeno, formilo, acilo, carboxi, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, carbamoilo, guanidino, ureido, amidino, ciano, nitro, mercapto, sulfonilo, sulfonilo y sulfonamido; y

65

R₃₃, R₃₄, R₃₅, R₃₈, R₃₇, R₄₇, R₅₀ y R₅₁ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroa-

riolo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, alcoxi, arilo, oxo, amina, halógeno, formilo, acilo, carboxi, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, carbamilo, guanidino, ureido, amidino, ciano, nitro, mercapto, sulfinilo, sulfonilo y sulfonamido.

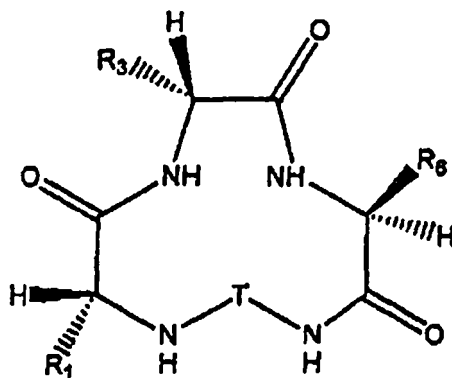
5

En un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (III)

10

15

20



25

seleccionados entre los compuestos de la Tabla 3.

En un segundo aspecto, la invención también propone compuestos de fórmula (III) que son antagonistas del receptor de motilina.

30

En un tercer aspecto, la invención propone composiciones y medicamentos para tratar un trastorno asociado con el receptor de motilina o una disfunción de la motilidad en seres humanos y otros mamíferos, que comprende un compuesto de fórmula (III).

Descripción detallada de la invención

35

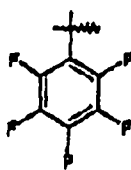
En la fórmula (I), que se ha representado anteriormente en el presente documento, R₁ se selecciona entre el grupo constituido por -(CH₂)_qR₁₁ y -CHR₁₂R₁₃

en el que q es 0, 1, 2 ó 3; y

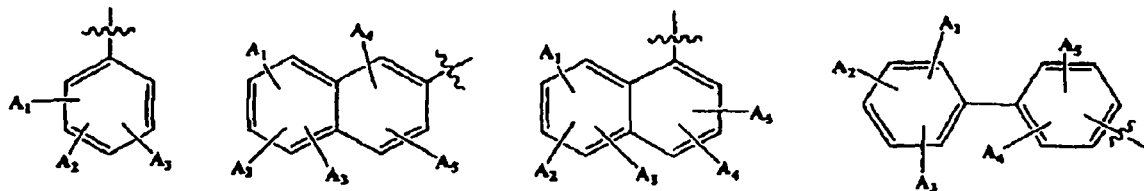
40

R₁₁ y R₁₂ se seleccionan independientemente entre una estructura de anillos del siguiente grupo:

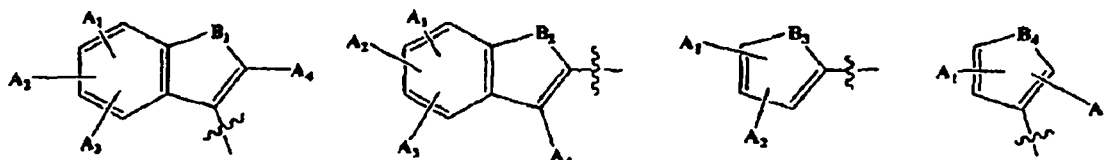
45



50



60



65

ES 2 338 789 T3

en el que cualquier átomo de carbono de dicha estructura puede reemplazarse por un átomo de nitrógeno, con la condición de que si dicha estructura de anillos es una estructura de anillos monocíclicos, no comprenda más de cuatro átomos de nitrógeno y si dicha estructura de anillos es una estructura de anillos bicíclicos, no comprenda más de seis átomos de nitrógeno;

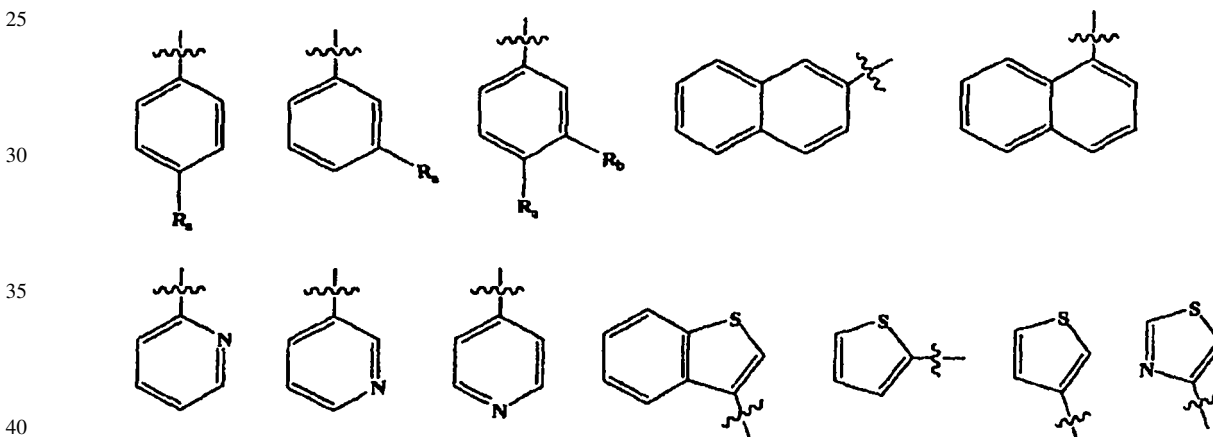
5 cada uno de A_1, A_2, A_3, A_4 y A_5 está opcionalmente presente y se selecciona independientemente entre el grupo constituido por halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, halógeno, formilo, acilo, carboxi, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, carbamoilo, guanidino, ureido, amidino, ciano, nitro, mercapto, sulfinilo, sulfonilo y sulfonamido;

15 B_1, B_2, B_3 y B_4 se seleccionan independientemente entre NR_{14}, S u O , donde R_{14} se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, formilo, acilo, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, sulfonilo y sulfonamido;

15 R_{13} es como se ha definido para R_{11} y R_{12} o se selecciona entre el grupo que comprende alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, amino, carboxi, carboxialquilo, carboxiarilo y amido.

20 en el que A_1, A_2, A_3, A_4 y A_5 se seleccionan lo más preferentemente entre halógeno, trifluorometilo, alquilo C_{1-6} o alcoxi C_{1-6} .

Preferentemente, R_{11}, R_{12} y R_{13} se seleccionan entre el grupo constituido por:



en el que R_a y R_b se eligen entre el grupo constituido por $Cl, F, CF_3, OCH_3, OH, C(CH_3)_3$ y CH_3 .

45 También preferentemente, R_3 en la fórmula (I) se selecciona entre el grupo constituido por:

$-(CH_2)_sCH_3, -CH(CH_3)(CH_2)_tCH_3, -CH(OR_{15})CH_3, -CH_2SCH_3, -CH_2CH_2SCH_3, -CH_2S(=O)CH_3, -CH_2CH_2S(=O)CH_3, -CH_2S(=O)_2CH_3, -CH_2CH_2S(=O)_2CH_3, -(CN)_uCH(CH_3)_2, -C(CH_3)_3$ y $-(CH_2)_y-R_{21}$, donde:

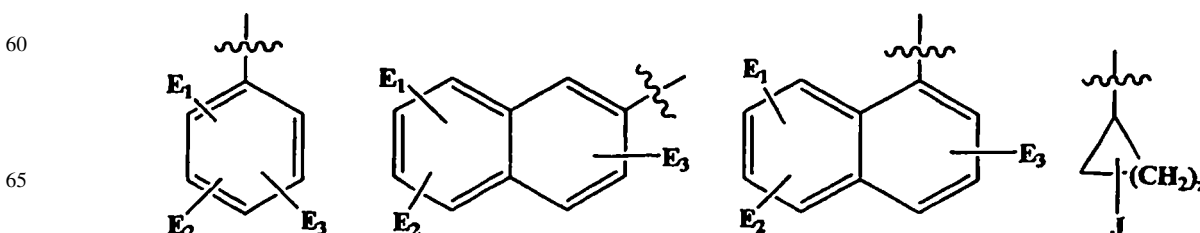
50 s y u se seleccionan independientemente entre 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

t se selecciona independientemente entre 1, 2, 3 ó 4;

y se selecciona entre 0, 1, 2, 3 ó 4;

55 R_{15} se selecciona entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, formilo y acilo;

R_{21} se selecciona entre una estructura de anillos seleccionada entre el siguiente grupo:



ES 2 338 789 T3

en el que cualquier átomo de carbono de dicha estructura de anillos puede reemplazarse por un átomo de nitrógeno, con la condición de que si dicha estructura de anillos es una estructura de anillos monocíclicos, no comprenda más de cuatro átomos de nitrógeno y si dicha estructura de anillos es una estructura de anillos bicíclicos, no comprenda más de seis átomos de nitrógeno;

5

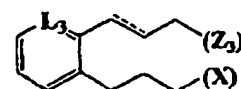
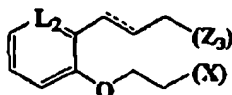
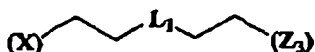
z se selecciona entre 1, 2, 3, 4 ó 5;

10 cada uno de E₁, E₂ y E₃ está opcionalmente presente y se selecciona independientemente entre el grupo constituido por halógeno alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, alcoxi, arilo, amina, halógeno, formilo, acilo, carboxi, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, carbamoilo, guanidino, ureido, amidino, ciano, nitro, mercapto, sulfinilo, sulfonilo y sulfonamido y

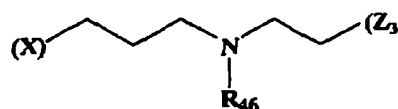
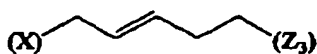
15 J está opcionalmente presente y se selecciona entre el grupo constituido por alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxilo, alcoxi, arilo, oxo, amina, halógeno, formilo, acilo, carboxi, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, carbamoilo, guanidino, ureido, amidino, mercapto, sulfinilo, sulfonilo y sulfonamido.

20 La porción de cadena (T) de la fórmula (I) se selecciona preferentemente entre el grupo constituido por:

25

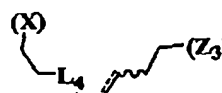


30



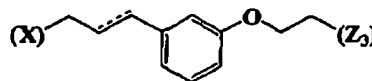
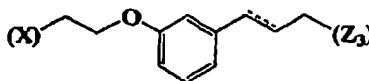
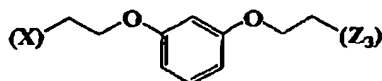
35

40



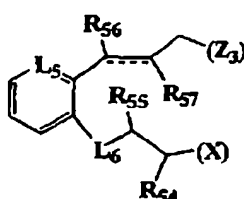
45

50



55

60



65

ES 2 338 789 T3

en el que

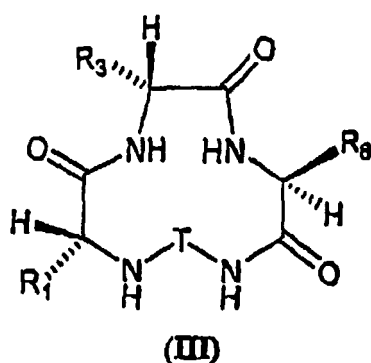
L_1 es O, NH o NMe; L_2 es CH o N; L_3 es CH o N; L_4 es O o CH_2 ; L_5 es CH o N; L_6 es $CR_{52}R_{53}$ u O; R_{46} es H o CH_3 ;

R_{52} , R_{53} , R_{54} , R_{55} , R_{56} y R_{57} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, hidroxi, alcoxi, ariloxi, amino y oxo; o R_{52} junto con R_{53} o R_{54} junto con R_{55} o R_{56} junto con R_{57} pueden formar independientemente un anillo cíclico de tres a siete miembros que comprende átomos de carbono, oxígeno, azufre y/o nitrógeno;

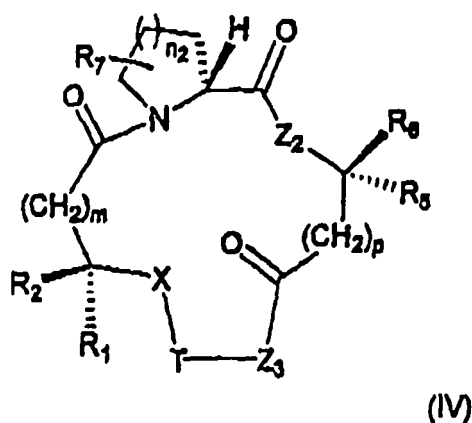
(X) es el sitio de un enlace covalente con X en la fórmula (I); y

(Z_3) es el sitio de un enlace covalente con Z_3 en la fórmula (I).

En una realización particularmente preferida de la invención, se proporcionan compuestos de fórmula (I) en la que m, n y p son 0, X, Z_1 , Z_2 y Z_3 son NH y R_2 , R_4 y R_5 son hidrógeno, representados por la fórmula (III):



Los compuestos de fórmula (I) en la que cuando Z_1 es un átomo de nitrógeno, R_3 forma un anillo heterocíclico de cuatro, cinco, seis o siete miembros junto con Z_1 se representan por la fórmula (IV):



en la que dicho anillo heterocíclico puede contener un segundo átomo de nitrógeno, o un átomo de oxígeno o azufre;

n_2 se selecciona entre 0, 1, 2 ó 3

R_7 está opcionalmente presente y se selecciona entre el grupo constituido por alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, hidroxi, alcoxi, ariloxi, oxo, amino, halógeno, formilo, acilo, carboxi, carboxialquilo, carboxiarilo, amido, carbamoilo, guanidino, ureido, amidino, mercapto, sulfinilo, sulfonilo y sulfonamido.

Debe entenderse que, en el contexto de la presente invención, los términos amino, guanidina, ureido y amidino también incluyen derivados sustituidos de los mismos.

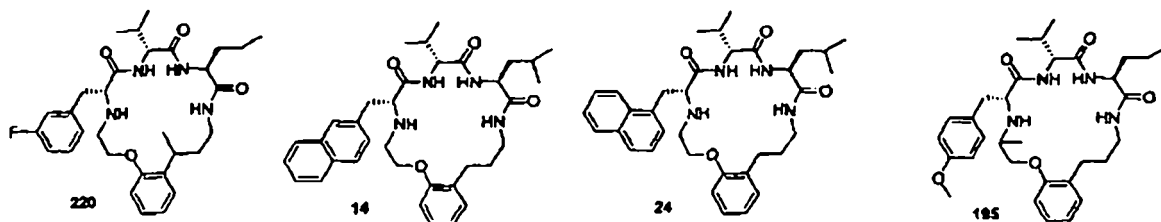
Preferentemente, la invención proporciona composiciones y medicamentos para tratar un trastorno asociado con la hipermotilidad o hipermotilinia en seres humanos y otros mamíferos que comprenden un compuesto de fórmula (III).

Descripción de las realizaciones preferidas

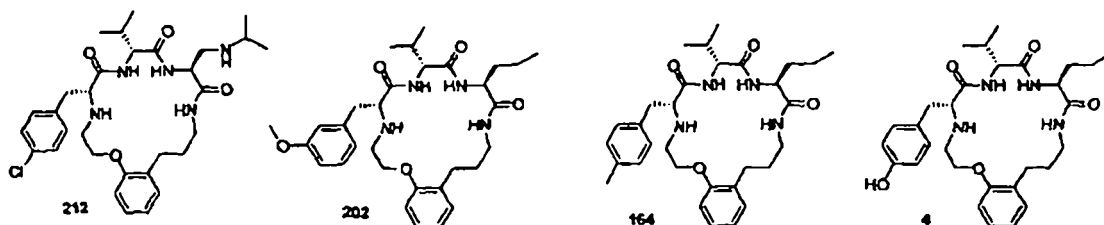
10

Los compuestos específicamente preferidos de la presente invención incluyen:

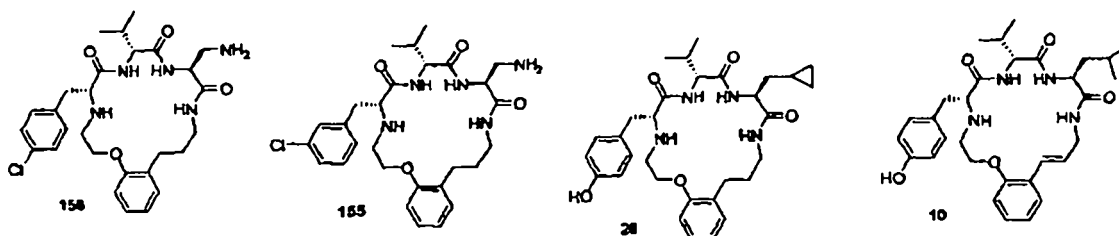
15



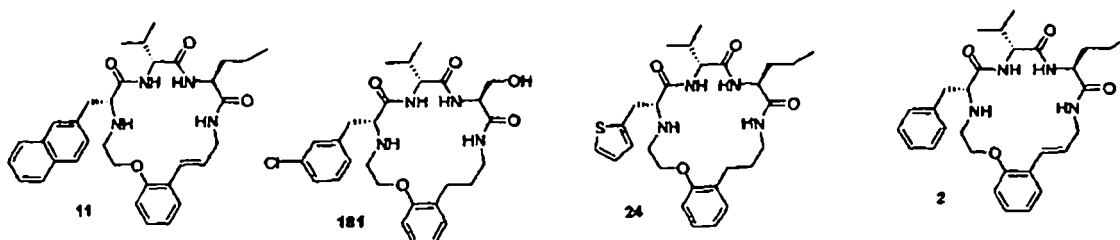
25



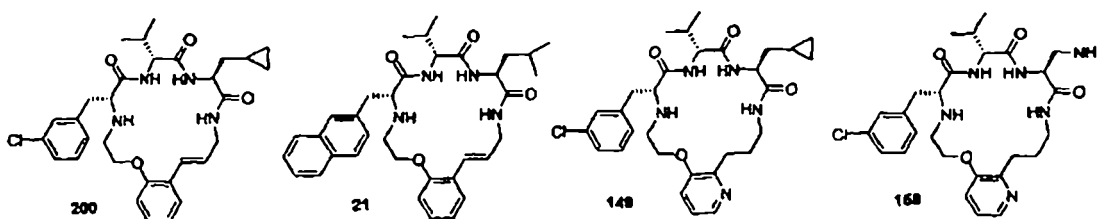
35



45

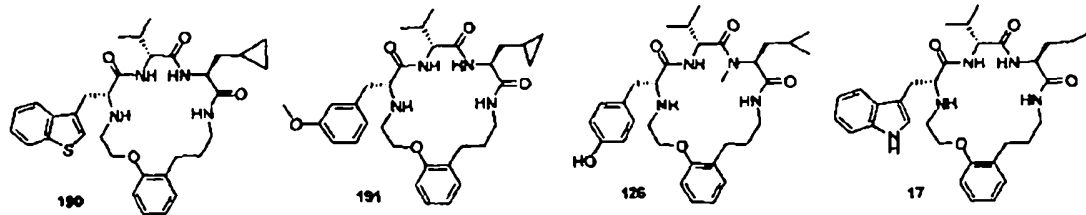


55

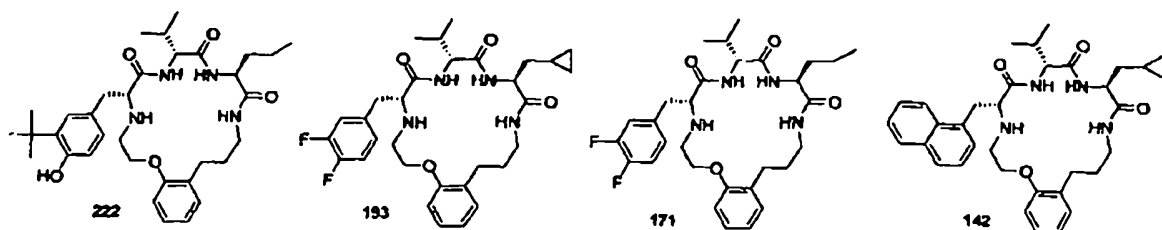


65

5

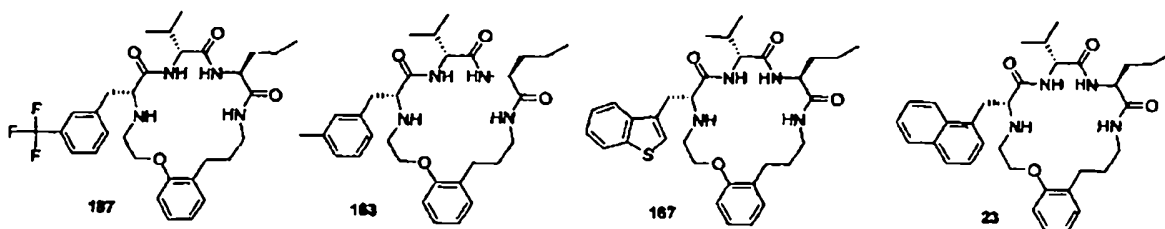


10



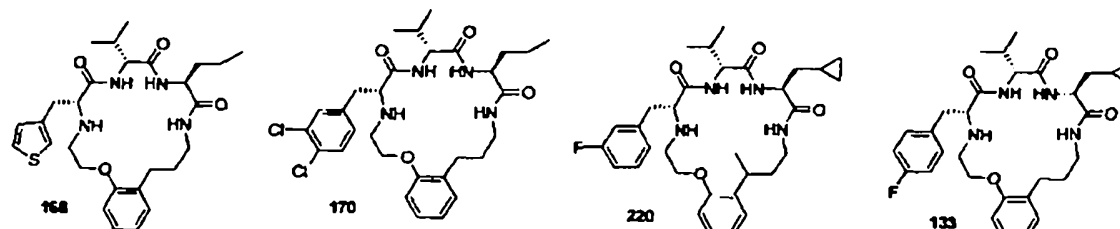
20

25



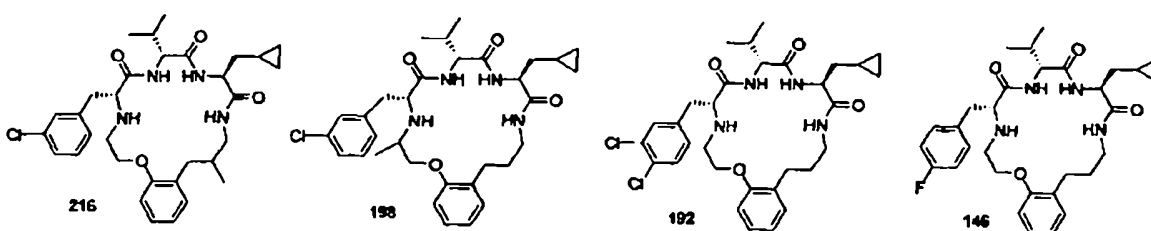
30

35



40

45



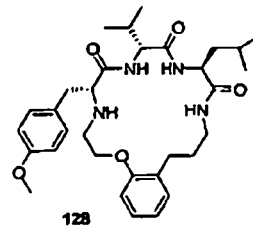
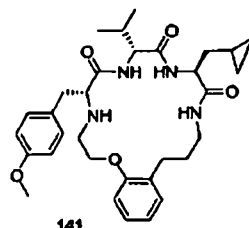
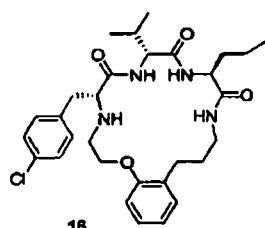
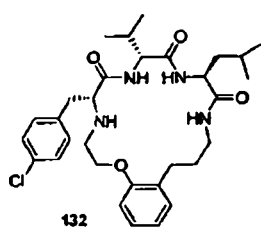
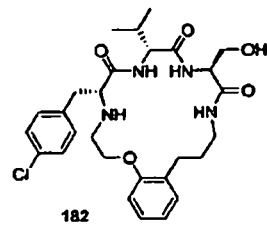
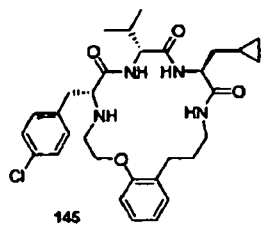
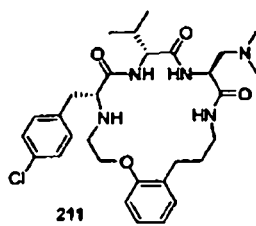
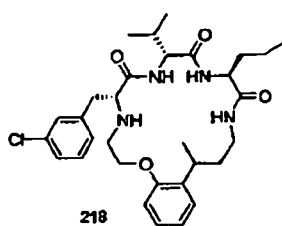
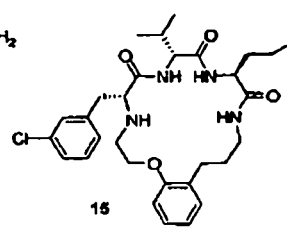
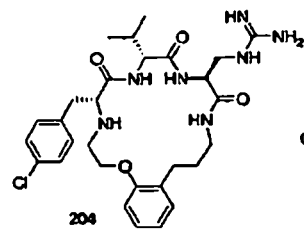
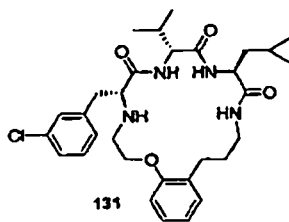
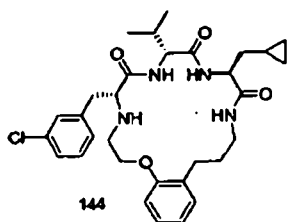
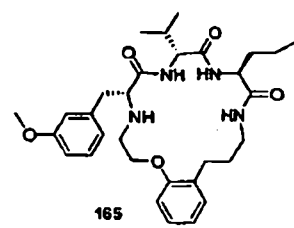
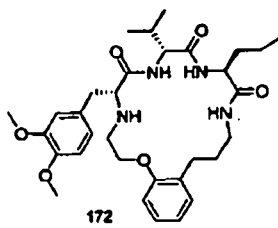
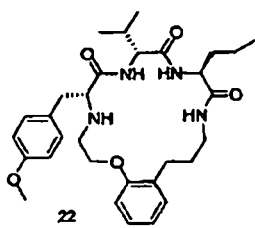
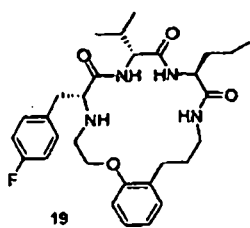
50

55

60

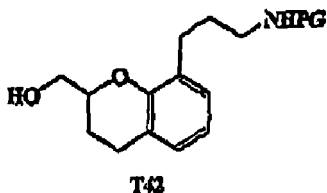
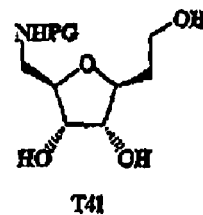
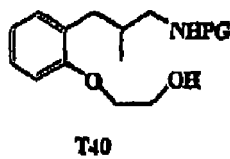
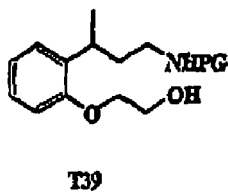
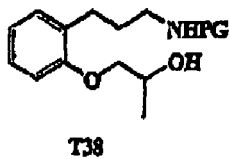
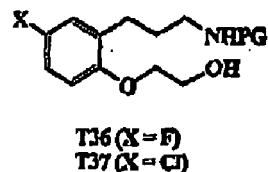
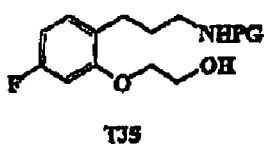
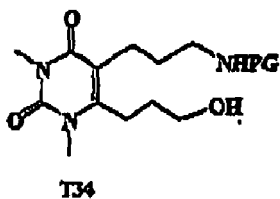
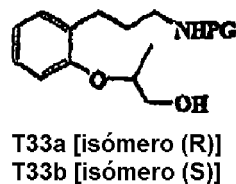
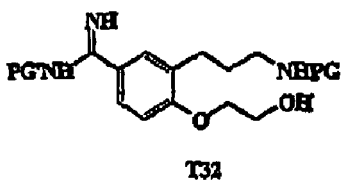
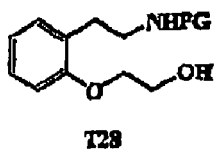
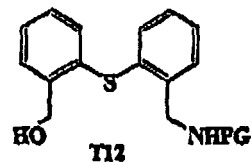
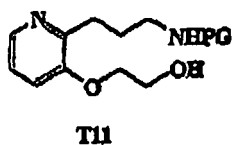
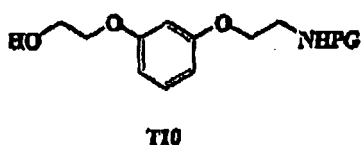
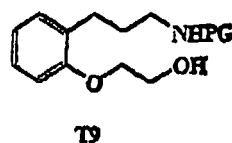
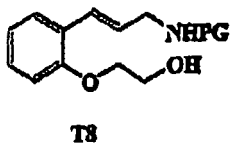
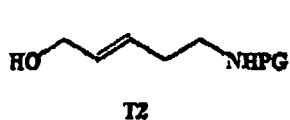
65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



Además de las cadenas preferidas (T) ilustradas previamente, a continuación en el presente documento se muestran otras cadenas específicas

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60



PG y PG' indican un grupo protector de amina convencional compatible con el protocolo sintético, tal como Boc, Ddz, Fmoc o Alloc

En una realización preferida, la presente invención se refiere a composiciones y medicamentos para tratar el síndrome del intestino irritable, dispepsia, enfermedad de Crohn, trastornos de reflujo gastroesofaríngeo, colitis ulcerosa, pancreatitis, estenosis pilórica hipertrófica infantil, síndrome carcinoide, síndrome de malabsorción, diarrea, diabetes mellitus, obesidad, síndrome postgastroenterostomía, colitis atrófica o gastritis, estasis gástrica, síndrome de evacuación gastrointestinal rápida, enfermedad celíaca y trastornos de la alimentación que conducen a obesidad en seres humanos y otros mamíferos, que comprenden un compuesto de fórmula (III).

Procedimientos sintéticos

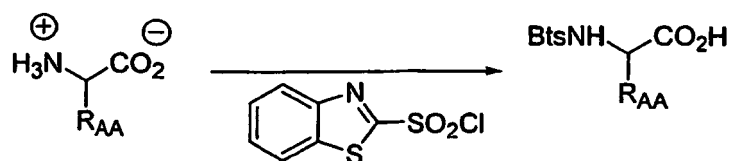
A. Información General

Los reactivos y disolventes eran de calidad reactiva o mejor y se usaron según se recibieron de los proveedores comerciales a menos que se indique otra cosa. La DMF, el DCM y el THF usados son de DriSolv® (EM Science, E. Merck) o de calidad de síntesis excepto para (i) desprotección, (ii) reacciones de protección de resina y (iii) lavado. La NMP usada para las reacciones de acoplamiento de aminoácidos (AA) es de calidad analítica. La DMF se desgasificó adecuadamente poniéndola al vacío durante un mínimo de 30 min antes del uso. El Tyr(3tBu) se sintetizó siguiendo el procedimiento indicado en el documento JP2000 44595. Se preparó Cpa usando procedimientos bibliográficos (Tetrahedron: Asymmetry 2003, 14, 3575-3580) o se obtuvo de fuentes comerciales. Los aminoácidos protegidos con Boc y Fmoc y los derivados protegidos en las cadenas laterales, incluyendo los de N-metil aminoácidos y aminoácidos no naturales, se obtuvieron de proveedores comerciales o se sintetizaron a través de metodologías convencionales conocidas por los expertos en la materia. Los Ddz-aminoácidos se sintetizaron por procedimientos convencionales o se obtuvieron de fuentes comerciales en Orpegen (Heldelberg, Alemania) o Advanced ChemTech (Louisville, KY, Estados Unidos). Los Bts-aminoácidos se sintetizaron como se describe en el Ejemplo 6. Los hidroxiácidos se obtuvieron de proveedores comerciales o se sintetizaron a partir de los aminoácidos correspondientes por procedimientos bibliográficos. La TLC analítica se realizó sobre placas recubiertas previamente de gel de sílice 60F254 (0,25 mm de espesor) que contenían un indicador de fluorescencia. La expresión “se concentró/evaporó a presión reducida” indica evaporación utilizando un evaporador rotatorio bajo presión de un aspirador de agua o a fuerte vacío proporcionado por una bomba de vacío de aceite mecánica según sea apropiado para la retirada del disolvente. “Dry pack” indica cromatografía sobre gel de sílice que no se ha tratado previamente con disolvente, aplicada generalmente a escalas mayores para purificaciones en las que existe una gran diferencia en el F_R entre el producto deseado y cualquier impureza. Para los procedimientos de química en fase sólida, “secado de la manera convencional” significa que la resina se seca primero al aire (1 h) y posteriormente al vacío (normalmente con una bomba de aceite) hasta que se alcanza la sequedad total (~30 min a una noche).

B. Procedimientos Sintéticos para Componentes Básicos de la Invención

Ejemplo 6

Procedimiento Convencional para la Síntesis de Bts-Aminoácidos



A una solución del aminoácido o derivado de aminoácido (0,1 mol, 1,0 equiv.) en hidróxido sodio 0,25 N (0,08 mol, 0,8 equiv.) con un pH inicial de aproximadamente 9,5 (medidor de pH) a la que se le añadió en una porción Bts-Cl sólido (0,11 mol, 1,1 equiv.). La suspensión resultante se agitó vigorosamente durante 2-3 d. El pH de la reacción debe ajustarse con hidróxido sodio 5,0 N según se requiera para que se mantenga dentro del intervalo de 9,5-10,0 durante este tiempo. Típicamente, el pH tiene que ajustarse cada 20-30 min durante las primeras 5 h. Cuando el pH deja de caer, significa que la reacción casi se ha completado. Esto puede confirmarse por TLC (EtOAc:MeOH, 95:5). Después de que se completara, la mezcla de reacción se lavó con Et₂O. El lavado se continúa hasta que la ausencia de impurezas no polares en la fase acuosa se confirma por TLC (típicamente 3 x 100 ml). Después la solución acuosa se enfrió a 0°C, se acidificó a pH 2,0 con HCl 1 N hasta que no se formó más turbidez y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Como alternativa, puede usarse una mezcla de DCM y EtOAc como disolvente de extracción, dependiendo de la solubilidad del producto obtenido de diferentes aminoácidos o derivados. Debe apreciarse que no puede usarse sólo DCM como disolvente debido a la emulsión formada durante la extracción. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 150 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El DCM (1 vez) y los hexanos (2 veces) se evaporaron del residuo con el fin de garantizar la retirada completa del EtOAc y dar el compuesto deseado en forma de un sólido con un rendimiento del 55-98%.

ES 2 338 789 T3

Lo siguiente son modificaciones que han probado ser útiles para ciertos aminoácidos:

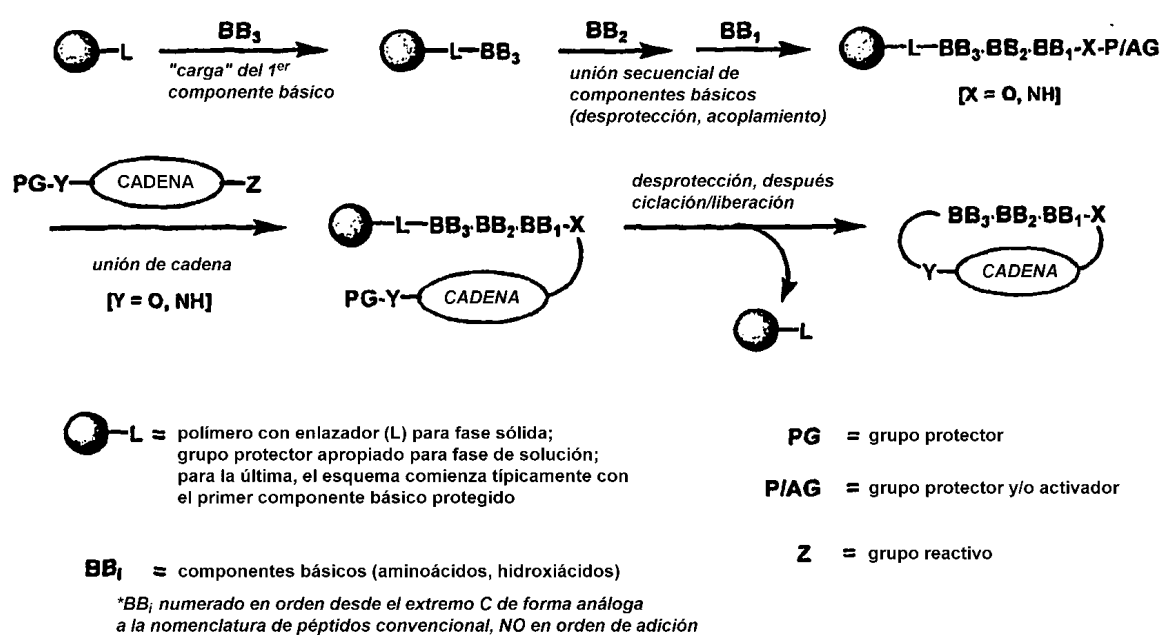
Gly, Ala, D-Ala, β -Ala y GABA: Usar 1,5 equiv. de aminoácido por equiv. de Bts-Cl, con el fin de evitar la dibetsilación.

Met: Realizar la reacción en una atmósfera de N_2 para evitar la oxidación.

Gln y Asn: Debido a la solubilidad de Bts-Gln y Bts-Asn, el tratamiento requerido se modifica a partir del procedimiento convencional: Después de que se completara la reacción, la mezcla de reacción se lavó con éter dietílico. El lavado se continúa hasta que la ausencia de impurezas no polares en la fase acuosa se confirma por TLC (típicamente 3 x 100 ml). Después, la fase acuosa se enfría a 0°C y se acidifica a pH 2,0 con HCl 6 N. Se empleó HCl 6 N para minimizar el volumen de la solución debido a la solubilidad en agua de Bts-Gln y Bts-Asn. (Por el contrario, son difíciles de disolver en DCM, EtOAc o cloroformo). La solución se mantuvo a 0°C durante 10 min y el producto se recogió por filtración en forma de un precipitado de color blanco. El sólido se lavó con agua fría (1 vez), salmuera fría (2 veces) y agua (1 x, 25°C). Se tomó el pH de este lavado, y si no era de aproximadamente 4, el sólido se lavó de nuevo con agua. Finalmente, el sólido se lavó con EtOAc frío y después con Et₂O frío (2 veces) y finalmente se secó al vacío (bomba de aceite) (rendimiento del 83-85%).

C. Estrategia Sintética General para Macrociclos Definidos Conformacionalmente de la Presente Invención

Esquema 1



Los compuestos de Fórmula I pueden sintetizarse usando técnicas de síntesis de solución tradicionales o procedimientos de química en fase sólida. En cualquier caso, la construcción implica cuatro fases: primero, síntesis de los componentes básicos, incluyendo de uno a cuatro restos, que comprende elementos de reconocimiento para el receptor biológico diana, más un resto de cadena, principalmente para el control y definición de la conformación. Estos componentes básicos se unen juntos, típicamente de forma secuencial, en una segunda fase que emplea transformaciones químicas convencionales. Después, los precursores de la unión se ciclan en la tercera etapa para proporcionar las estructuras macrocíclicas. Finalmente, una etapa de proceso post-ciclación que implica la retirada de los grupos protectores y la purificación opcional proporciona después los compuestos finales deseados (Esquema 1). Este procedimiento se ha descrito previamente en el documento WO 01/25257 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 09/679.331.

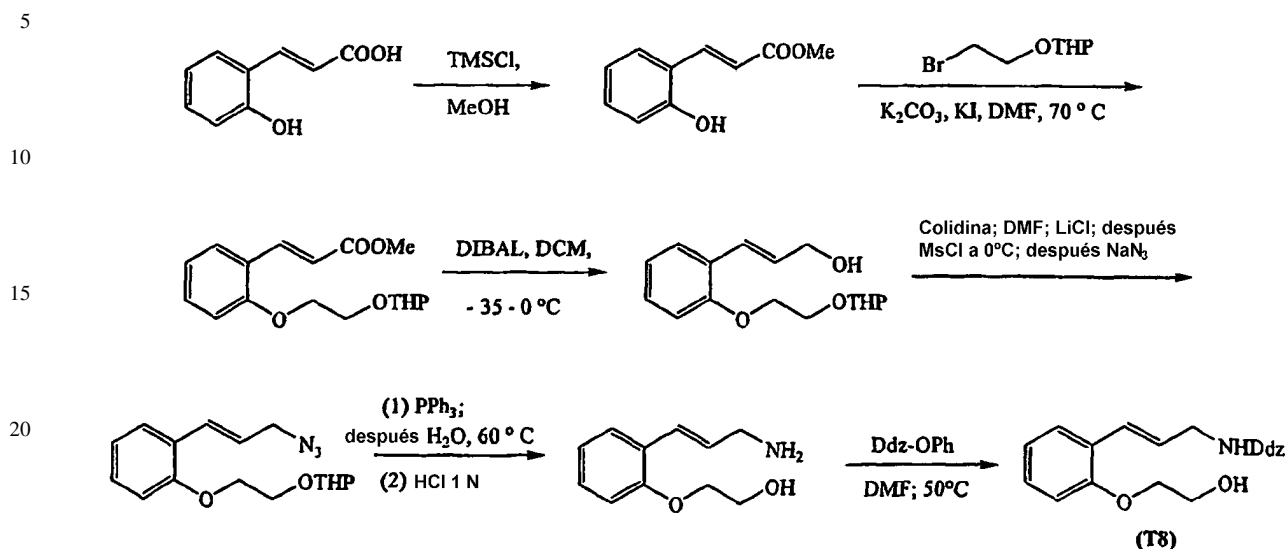
D. Procedimientos para la Síntesis de Cadenas Representativas de la Presente Invención

Los componentes importantes de la cadena requeridos para los compuestos de la invención se sintetizan como se describe en el documento WO01/25257, Solicitud Provisional de Estados Unidos con N° de Serie 60/491.248 o en el presente documento.

ES 2 338 789 T3

Ejemplo 16

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T8



Etapa T8-1: Se añadió clorotrimetilsilano (116 ml, 0,91 mol, 1,5 equiv.) a una suspensión de ácido 2-hidroxicinámico (100 g, 0,61 mol, 1,0 equiv.) en MeOH (500 ml, calidad HPLC) durante 30 min a 0°C. La mezcla resultante se agitó a ta durante una noche. La reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH: 98/2). El calentamiento de la mezcla de reacción en agua caliente puede acelerar el proceso si es necesario. Después de que se completara la reacción, la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida, produciendo 2-hidroxicinamato de metilo en forma de un sólido de color blanco (108,5 g) con rendimiento cuantitativo. La identidad de este compuesto intermedio se confirma por RMN. Esta reacción puede realizarse a gran escala (kg) con resultados similares.

Etapa T8-2: Se añadió gota a gota 3,4-dihidro-2H-pirano (DHP, 140 ml, 1,54 mol, 2,52 equiv.) a 2-bromoetanol (108 ml, 1,51 mol, 2,5 equiv.) en un matraz de fondo redondo de 2 l con agitación mecánica a 0°C durante 2 h. La mezcla resultante se agitó durante 1 h más a ta. Al matraz anterior se le añadieron 2-hidroxicinamato de metilo de la Etapa T8-1 (108 g, 0,61 mol, 1,0 equiv.), carbonato potásico (92,2 g, 0,67 mol, 1,1 equiv.), yoduro potásico (20 g, 0,12 mol, 0,2 equiv.) y DMF (300 ml, calidad espectrométrica). La mezcla de reacción se agitó a 70°C (temperatura externa) durante 24 h. La reacción se controló por TLC (DCM/Et₂O: 95/5). La reacción se dejó enfriar a ta y se añadió Et₂O (450 ml). Las sales inorgánicas se retiraron por filtración y se lavaron con Et₂O (3 x 50 ml). El filtrado se diluyó con hexanos (400 ml) y se lavó con agua (3 x 500 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El éster en bruto (producto deseado y exceso de Br-C₂H₄-OTHP) se usó para la reducción posterior sin purificación adicional.

Etapa T8-3: Se añadió lentamente DIBAL (1,525 l, 1,525 mol, 2,5 equiv., 1,0 M en DCM) a una solución del éster en bruto anterior de la Etapa T8-2 (0,61 mol basándose en el rendimiento teórico) en DCM anhidro (610 ml) a -35°C con agitación mecánica durante 1,5 h. La mezcla resultante se agitó durante 1,5 h a -35°C y después durante 1,5 h a 0°C. La reacción se controló por TLC (hex/EtOAc: 50/50). Cuando se completó, se añadió lentamente Na₂SO₄·10 H₂O (100 g, 0,5 equiv.); se observó desprendimiento de hidrógeno, y cuando disminuyó se añadió agua (100 ml). La mezcla se calentó a ta y se agitó durante 10 min, después se calentó a 40°C con agua caliente y se agitó a la temperatura de reflujo durante 20 min. La mezcla se enfrió a ta, se diluyó con DCM (600 ml) y la solución superior se decantó en un filtro. El sólido que quedaba en el matraz se lavó con diclorometano (5 x 500 ml) con agitación mecánica y se filtró. El filtrado de cada lavado se comprobó por TLC y se realizaron lavados adicionales si fue necesario para recuperar más cantidad de producto. En un procedimiento de trabajo alternativo, después de la dilución con DCM (600 ml), la mezcla se filtró. Después, el sólido resultante se extrajo de forma continua con TEA al 0,5% en diclorometano usando un extractor Soxhlet. Típicamente se obtuvo un rendimiento superior por este procedimiento alternativo, aunque no requiere más tiempo. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por dry pack (EtOAc/hex/Et₃N: 20/80/0,5) para dar el producto alcohol en forma de un aceite amarillento (rendimiento: 90%). La identidad y la pureza se confirmaron por RMN.

Etapa T8-4: A una mezcla del alcohol alílico de la Etapa T8-3 (28 g, 0,100 mol, 1,0 equiv.) y colidina (0,110 m 1,1 equiv.) en 200 ml de DMF anhidra en una atmósfera de N₂ se le añadió LiCl anhidro (4,26 g, 0,100 mol, 1,0 equiv.) disuelto en 1 ml de DMF anhidra. Después, la mezcla se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota MsCl (12,67 g, 0,110 mol, 1,1 equiv., recién destilado sobre P₂O₅). La reacción se dejó calentar a ta y se controló por TLC (3:7 de EtOAc/hex). Cuando la reacción se completó, se añadió NaN₃ (32,7 g, 0,500 mol, 5,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche siguiendo el progreso por RMN. Cuando la reacción se completó, la mezcla se vertió en un baño

ES 2 338 789 T3

de agua enfriada con hielo y se extrajo con éter dietílico (3 veces). Después las fases orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con tampón citrato (2 veces), con bicarbonato sódico saturado (2 veces) y finalmente con salmuera (1 vez). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. La azida alílica se obtuvo con un rendimiento combinado del 90%, y era de calidad suficiente para usarse tal cual para la siguiente etapa.

5 Etapa T8-5: Se añadió PPH_3 (25,9 g, 0,099 mol, 1,5 equiv.) a $0^\circ C$ a una solución de la azida alílica de la Etapa T (20,0 g, 0,066 mol, 1,0 equiv.) en 100 ml de THF. La solución se agitó durante 30 min a $0^\circ C$ y durante 20 h a ta. Después, se añadió agua (12 ml) y la solución resultante se calentó a $60^\circ C$ durante 4 h. La solución se enfrió a ta, se
10 añadió HCl 2 N (15 ml) y la mezcla se agitó durante 90 min a $50^\circ C$. La fase orgánica separada se extrajo con HCl 0,05 N (2 x 1 ml). La fase acuosa combinada se lavó con Et_2O (5 x 150 ml) y tolueno (4 x 150 ml) (podría ser necesaria más extracción, seguido de TLC), que se combinaron y se extrajeron de nuevo con HCl 0,05 N (1 x 100 ml). Esta fase acuosa ácida de la última extracción se combinó con la fase acuosa principal y se lavó de nuevo con éter (5 x 150 ml). Después, el pH de la fase acuosa se ajustó a 8-9 mediante la adición de hidróxido sódico (5 N). Debe tenerse
15 cuidado de no ajustar el pH por encima de 9 debido a las condiciones de reacción requeridas por la siguiente etapa. La fase acuosa se concentró a presión reducida (aspirador, después bomba de aceite) o se liofilizó a sequedad. Al residuo se le añadió tolueno (2 veces) y después también se evaporó a presión reducida para retirar las cantidades residuales de agua. El producto en bruto (amino alcohol deseado junto con sal inorgánica) se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

20 Etapa T8-6: Una mezcla del amino alcohol en bruto de la Etapa T8-5 (0,5 mol basándose en el rendimiento teórico), Ddz-OPh (174 g, 0,55 mol, 1,1 equiv.) y Et_3N (70 ml, 0,5 mol, 1,0 equiv.) en DMF (180 ml) se agitó durante 24 h a $50^\circ C$. Se añade más cantidad de DMF si se requiere para disolver todos los materiales. La reacción se controló por TLC (hex/ $EtOAc$: 50/50, detección de ninhidrina). Después de que se completara la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con Et_2O (1,5 l) y agua (300 ml). La fase acuosa separada se extrajo con Et_2O (2 x 150 ml). La fase orgánica
25 combinada se lavó con agua (3 x 500 ml) y salmuera (1 x 500 ml), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. Las fases se controlaron por TLC para garantizar que no se perdía producto en la fase acuosa. Si así lo indicaba, se realizaron una o más extracciones adicionales de la fase acuosa con Et_2O para recuperar este material. El producto en bruto se purificó por dry pack (condiciones de columna recomendadas: $EtOAc$ /hex/ Et_3N : de 35/65/0,5 a 65/35/0,5) para dar la cadena Ddz-T8 en forma de un jarabe de color amarillo pálido (rendimiento: ~40%). La identidad y la pureza del producto se confirmaron por RMN.

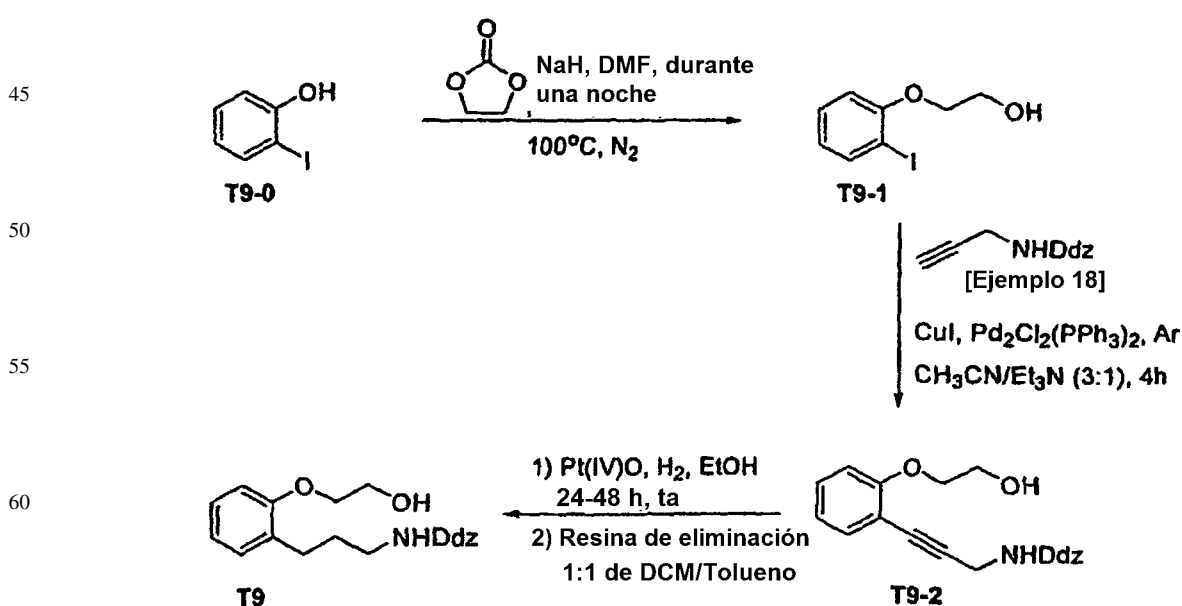
1H RMN ($DMSO-d_6$): 1,6 ppm (s, 6H, 2 x CH_3), 3,6-3,8 ppm (s ancho, 10 H, 2 x OCH_3 , 2 x OCH_2), 3,95 ppm (triplete, 2H, CH_2N), 6-6,2 ppm (m, 2H, 2 x CH), 6,2-6,5 ppm (m, 3H, 3 x CH, aromático), 6,6-7,6 ppm (m, 5H, aromático).

35

Ejemplo 17

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T9

40



ES 2 338 789 T3

El rendimiento de Ddz-T9 a partir de T9-0 a una escala de 65 g fue de 60,9 g (91%)

^1H RMN (CDCl_3): δ 7,19-7,01, (m, 2H), 6,92-9,83 (m, 2H), 6,53 (s a, 2H), 6,34 (t, 1H), 5,17 (t a, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,01 (c a, 2H), 2,66 (t, 3H), 1,26 (s a, 8H);

^{13}C RMN (CDCl_3) δ 960,9, 156,8, 155,6, 149,6, 130,4, 127,5, 121,2, 111,7, 103,2, 98,4, 80,, 69,7, 61,6, 55,5, 40,3, 30,5, 29,3, 27,4

La cadena T9 también puede sintetizarse a partir de T8 mediante reducción como en la etapa T9-3 o con otros catalizadores de hidrogenación apropiados conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 18

Procedimiento Convencional para la Síntesis de Ddz-propargilamina

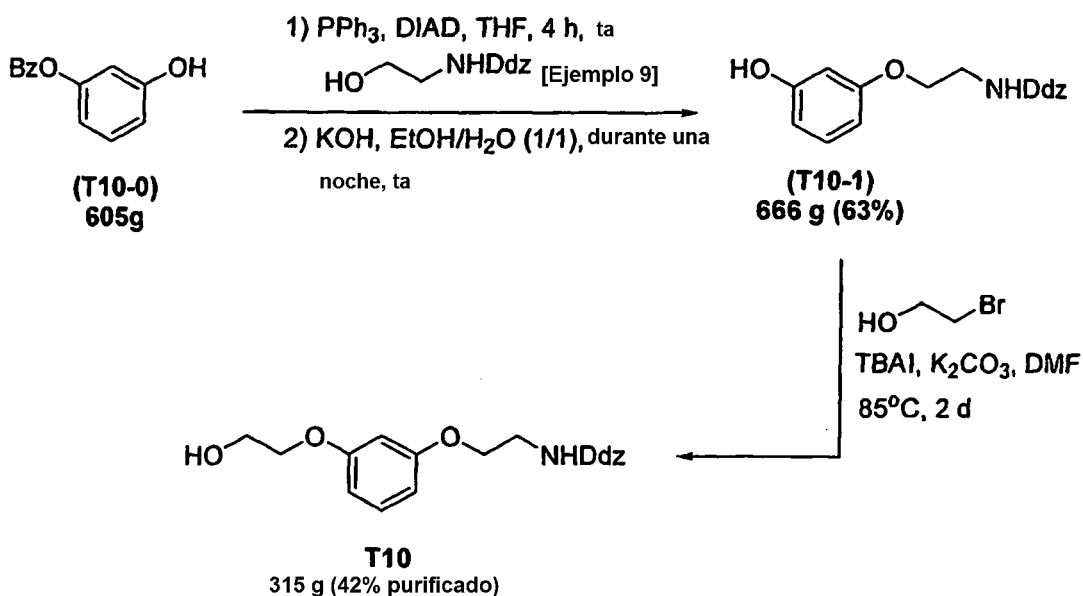


En un matraz de tres bocas seco, una solución de propargilamina (53,7 g, 0,975 mol, 1,5 equiv.) en DMF desgasificada (Drisolv, 388 ml) se trató con Ddz- N_3 (170,9 g, 0,65 mol, 1,0 equiv.), tetrametilguanidina (TMG, 81,4 ml, 0,65 mol, 1,0 equiv.) y DIPEA (113,1 ml, 0,65 mol, 1,0 equiv.) y se agitó a 50°C durante una noche. La reacción se controló por TLC (condiciones: 25/75 de EtOAc/hex. F_R : 0,25; detección: UV, ninhidrina). Después de que se completara, la DMF se evaporó a presión reducida a sequedad y el residuo se disolvió en Et_2O (1 l). La solución orgánica se lavó secuencialmente con tampón citrato (pH 4,5, 3 veces), bicarbonato sódico acuoso saturado (2 veces) y salmuera (2 veces), después se secó con MgSO_4 , se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. Se obtuvo un sólido de color naranja pálido. Este sólido se trituroó con EtOAc al 1% en hex, después se recogió por filtración y se secó al vacío (bomba de aceite) para proporcionar el producto deseado (153,4 g, 85,2%).

Ejemplo 19

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T10

Procedimiento A



Se han desarrollado dos rutas alternativas para esta cadena. El primer enfoque sintético se desarrolla partiendo del monobenzoato de resorcinol disponible en fuentes comerciales (T10-0). La reacción de Mitsunobu en condiciones convencionales con el amino alcohol protegido del Ejemplo 9, seguido de saponificación del benzoato proporcionó T10-1 con buen rendimiento después de la recrystalización. La alquilación del fenol con 2-bromoetanol usando las

ES 2 338 789 T3

condiciones optimizadas mostradas permitió la obtención del producto deseado Ddz-T10 después de la purificación dry pack con un rendimiento del 42%.

TLC (1:1 de EtOAc/Hexanos, detección: UV, ninhidrina; $F_R = 0,17$)

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 7,18, t, 1H, $J = 8,2$ Hz; 6,51, m, 5H; 6,34, t, 1H, $J = 2,2$ Hz; 5,19, s, 1H; 4,05, t, 2H, $J = 5,0$ Hz; 3,94, m, 4H; 3,75, s, 6H; 3,49, d, 2H $J = 5,2$ Hz; 1,73, s, 6H.

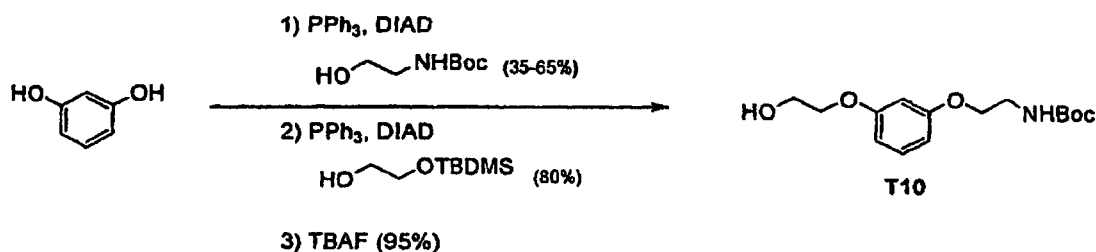
$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3) δ 160,856; 160,152; 160,005; 155,410; 149,305; 130,279; 107,438; 107,310; 103,163; 101,877; 98,517; 69,488; 67,382; 61,595; 55,427; 40,420; 29,427.

HPLC (gradiente convencional) t_R : 7,25 min

EM: 420 (M+H)

Procedimiento B

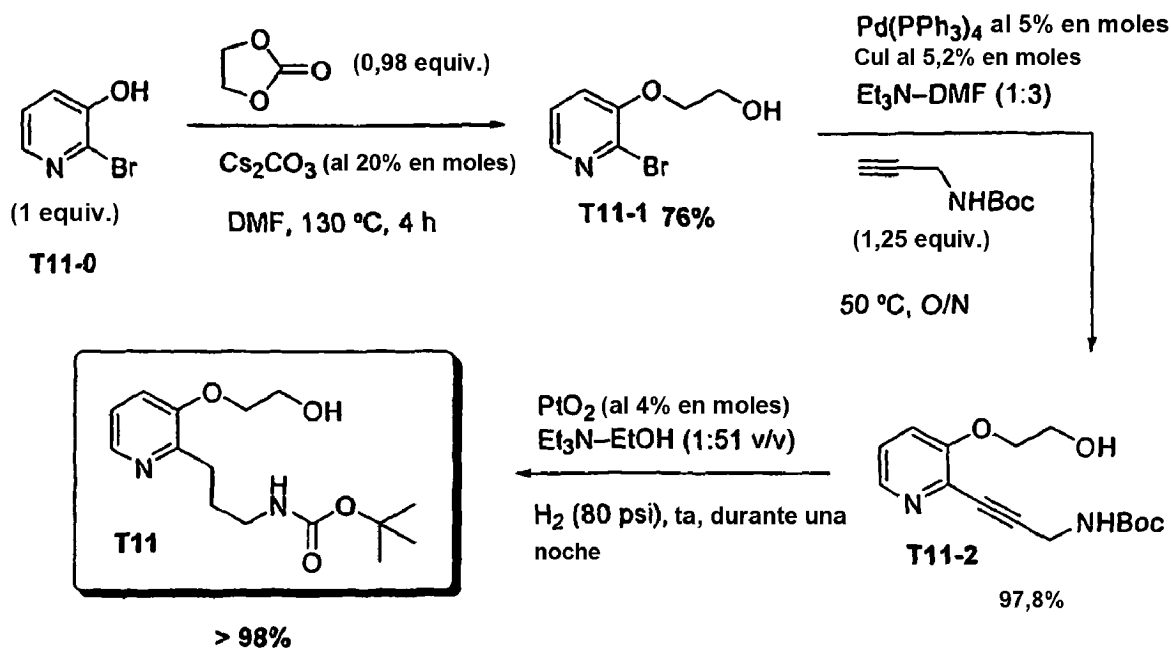
La segunda ruta sintética para T10 se presenta en el esquema adjunto.



A partir de resorcinol, se realizan dos reacciones de Mitsunobu sucesivas con los dos sintones de carbono apropiados ilustrados, obtenidos a su vez a partir de 2-aminoetanol y etilenglicol, respectivamente, a través de metodologías de protección conocidas. En último lugar, la desprotección del silil éter, también en condiciones convencionales, proporcionó Boc-T10. Aunque los rendimientos de los dos procedimientos son comparables, el primero requería menos manipulación mecánica y se prefiere para grandes escalas.

Ejemplo 20

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T11



ES 2 338 789 T3

TLC (15:85 de THF/DCM; detección: UV; F_R : 0,33).

^1H RMN (DMSO- d_6) δ 8,00, d, 1H; 7,32, d, 1H; 7,15, m, 1H; 6,44, s, 2H; 6,33, s, 1H; 3,99, t, 2H; 3,71, m, 8H; 2,89, m = 4, 2H; 2,71, t, 2H; 1,71, m = 5, 2H; 1,61, s, 6H.

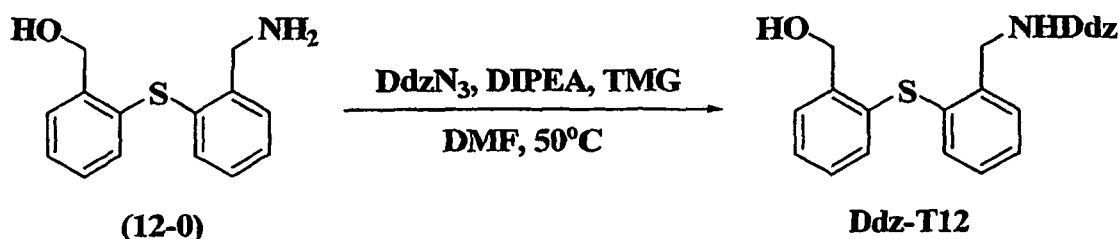
^{13}C RMN, disolvente DMSO- d_6) δ 160,879; 153,275; 151,405; 150,447; 140,773; 122,666; 118,934; 103,347; 98,456; 79,778; 70,449; 60,212; 55,717; 55,599; 29,740; 28,592,

HPLC (gradiente convencional) t_R : 5,4 min

EM: 419 (M+H)

Ejemplo 26

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T12



En un matraz seco de tres bocas y de 3 l se preparó una solución de (aminometil)feniltiobencil alcohol (12-0, 96 g, 0,39 mol) en DMF desgasificada (1 l, 0,4 M). A esto se le añadió DdzN₃ (0,95 equiv.), seguido de TMG (0,39 mol, 49 ml). La reacción se agitó durante 10 min y después se añadió DIPEA (68 ml, 0,39 mol). La mezcla se calentó a 50°C en una atmósfera de N₂ hasta que el análisis por TLC no indicó DdzN₃ restante (típicamente 48 h). (eluyente de TLC: 50:50 de EtOAc:Hex; detección: ninhidrina). Después de que se completara, a la mezcla de reacción se le añadieron 3 l de tampón citrato y la fase acuosa separada se extrajo con Et₂O (3 x 1500 ml). La fase orgánica combinada se lavó secuencialmente con tampón citrato (2 x 200 ml), agua (2 x 200 ml) y salmuera (2 x 200 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. Se obtuvo un aceite de color naranja oscuro, que se purificó por dry-pack. Para este procedimiento, el aceite primero se disolvió en EtOAc:Hex:DCM:TEA (20:80:1:0,5, v/v/v/v). En este momento, en algunas ocasiones se requería una pequeña cantidad adicional de DCM para garantizar la disolución completa. La solución se cargó sobre la columna y después la columna se eluyó con EtOAc:Hex:DCM:Et₃N (20:80:1:0,5) hasta que todas las impurezas se separaron tal como se indicó por TLC, prestando particular atención a la más cercana al producto deseado. Después, la elución se continuó con 30:70:0,5 de EtOAc:Hex:Et₃N (v/v/v) y finalmente con EtOAc:hexanos:Et₃N (50:50:0,5) para eluir el producto deseado. Después de la retirada del disolvente de las fracciones que contenían el producto a presión reducida, el residuo se disolvió en la cantidad mínima de DCM, se añadió un volumen tres veces mayor de hexanos y después los disolventes se evaporaron de nuevo a presión reducida. Este tratamiento se repitió hasta que se obtuvo una espuma de color blanquecino. Esta última solidificó mientras se secaba al vacío (bomba de aceite). Como alternativa, el material produjo un sólido después de la concentración secuencial con DCM (1 vez) y hexanos (2 veces). La cadena Ddz-T12 se obtuvo en forma de un sólido de color blanquecino (rendimiento del 85-90%).

Ejemplo 29

Procedimiento Convencional para la Unión de Cadenas Utilizando la Reacción de Mitsunobu

Ejemplo 29-A

Usando Aducto de PPh₃-DIAD Aislado

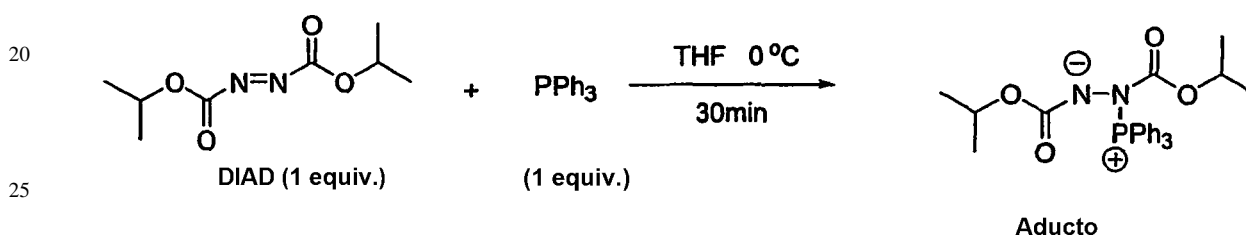
A una solución 0,2 M de la cadena apropiada (1,5 equiv.) en THF o THF-tolueno (1:1) se le añadió el aducto de PPh₃-DIAD (pre-formado mezclando cantidades equivalentes de los reactivos y aislado por evaporación del disolvente, véase el Ejemplo 29-C) (1,0 equiv.). La mezcla resultante se agitó manualmente durante 10 segundos (la solución permaneció turbia) y después se añadió a la resina. Como alternativa, la resina se añadió a la solución. La suspensión de reacción se agitó durante una noche (después de ~5 min, la mezcla se volvió limpia). La resina se filtró y se lavó 2 veces con DCM, 1 vez con tolueno, 1 vez con EtOH, 1 vez con tolueno, 1 vez con DCM/MeOH, 1 vez con (THF/MeOH), 1 vez con (DCM/MeOH), 1 vez con (THF/MeOH) y 2 veces con DCM y después se secó de manera convencional.

Ejemplo 29-B

Usando el "Procedimiento de PPh₃-DIAD *In Situ*"

5 A una solución 0,2 M de la cadena apropiada (4 equiv.) en THF o THF-tolueno (1:1) se le añadió trifetilfosfina (4 equiv.). La mezcla resultante se agitó manualmente hasta que se obtuvo una solución homogénea y después se añadió a la resina. Como alternativa, a la solución se le añadió la resina (o la resina que contenía MiniKans). Después, a esta suspensión se le añadió DIAD (3,9 equiv.) y la reacción se agitó durante una noche. *Nota: Como la reacción es exotérmica, a escalas mayores, la reacción debe enfriarse en un baño de hielo. Además, debe proporcionarse una ventilación apropiada para permitir la descarga de cualquier acumulación de presión.* La resina se filtró y se lavó con DCM (2 veces), tolueno (1 vez), EtOH (1 vez), tolueno (1 vez), DCM/MeOH (1 vez) 1 vez con THF/MeOH (1 vez), DCM/MeOH (1 vez), THF/MeOH (1 vez) y 2 veces con DCM y después se secó de manera convencional.

Ejemplo 29-C

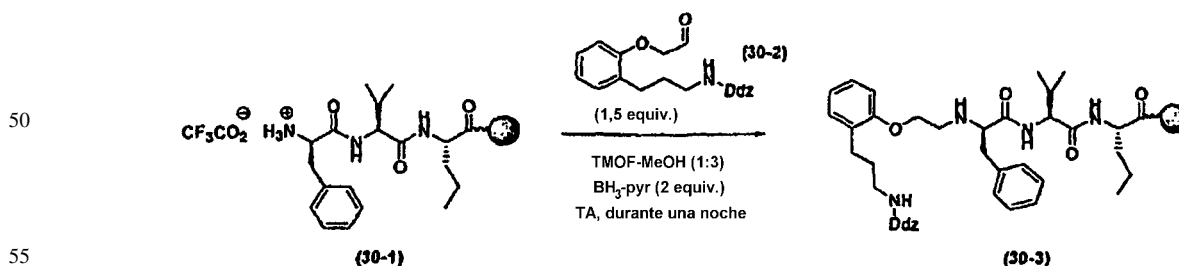
Procedimiento para la Síntesis de Aducto de PPh₃-DIAD

30 Se añadió gota a gota DIAD (1 equiv.) a una solución bien agitada de trifetilfosfina (1 equiv.) en THF (0,4 M) a 0°C en una atmósfera de nitrógeno. Después la mezcla se mantuvo a 0°C con agitación durante 30 min. El sólido de color blanco obtenido se recogió por filtración (usar filtros vitrificados de tamaño medio), se lavó con THF anhidro frío hasta que los lavados se decoloraron y finalmente se lavó una vez con Et₂O anhidro. Después, el producto sólido de color blanco se secó al vacío (bomba de aceite) y se almacenó en una atmósfera de nitrógeno. (Nota: El aducto de PPh₃-DIAD puede prepararse en mayor cantidad que la requerida inmediatamente y almacenarse en una atmósfera de nitrógeno; es muy importante almacenar este reactivo en condiciones anhidras).

Ejemplo 30

Procedimiento Convencional para la Unión de Cadenas mediante Aminación Reductora

40 En ciertos casos, el procedimiento de Mitsunobu del Ejemplo 29 no puede aplicarse o no es eficaz para la incorporación de la cadena. De hecho, la aminación reductora se ha desarrollado como una alternativa que puede emplearse para la incorporación de la cadena como se ilustra más adelante en el presente documento para una de las cadenas preferidas. Puede usarse una química similar para incorporar otras cadenas de la presente invención.

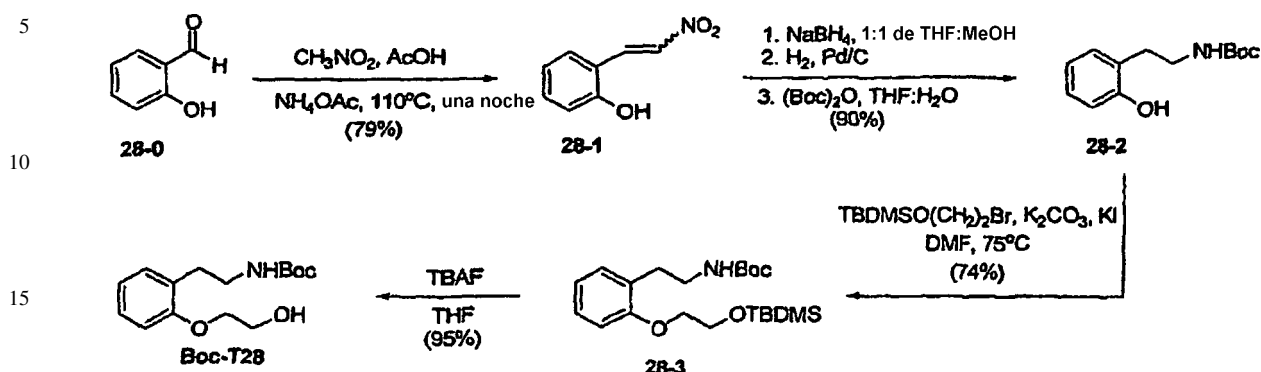


60 La cadena con la amina protegida en forma de su derivado de Ddz se oxidó de forma eficaz para dar el aldehído correspondiente 30-2 usando SO₃-pyr en DMSO-Et₃N-DCM. Este aldehído (0,14 mmol, 56 mg, 1,5 equiv. basándose en la carga del soporte de resina) se disolvió en una mezcla 1:3 de TMOF-MeOH (DriSolv, 4 ml) a ta. A esto se le añadió la resina que contenía el tri péptido (30-1, en forma de su sal del ácido trifluoroacético de la desprotección de la amina terminal), la mezcla se agitó brevemente para humedecer la resina y después se introdujo en la suspensión complejo de borano-piridina (en forma de la solución 8 M disponible en fuentes comerciales, 23 μl, 2 equiv.). La reacción se agitó durante una noche y después la resina se filtró, se lavó con DCM (2 veces), THF (1 vez), DCM/MeOH [3:1] (1 vez), THF/MeOH [3:1] (1 vez) y DCM (2 veces) y se secó de manera convencional. Debe tenerse cuidado para garantizar que el producto unido a resina deseado 30-3 no está contaminado con el material dialquilado. Sin embargo, incluso si la reacción no se desarrolla hasta completarse o si está presente una pequeña cantidad del producto secundario de dialquilación, el material es de suficiente pureza para la reacción de macrociclación.

ES 2 338 789 T3

Ejemplo 32

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T28

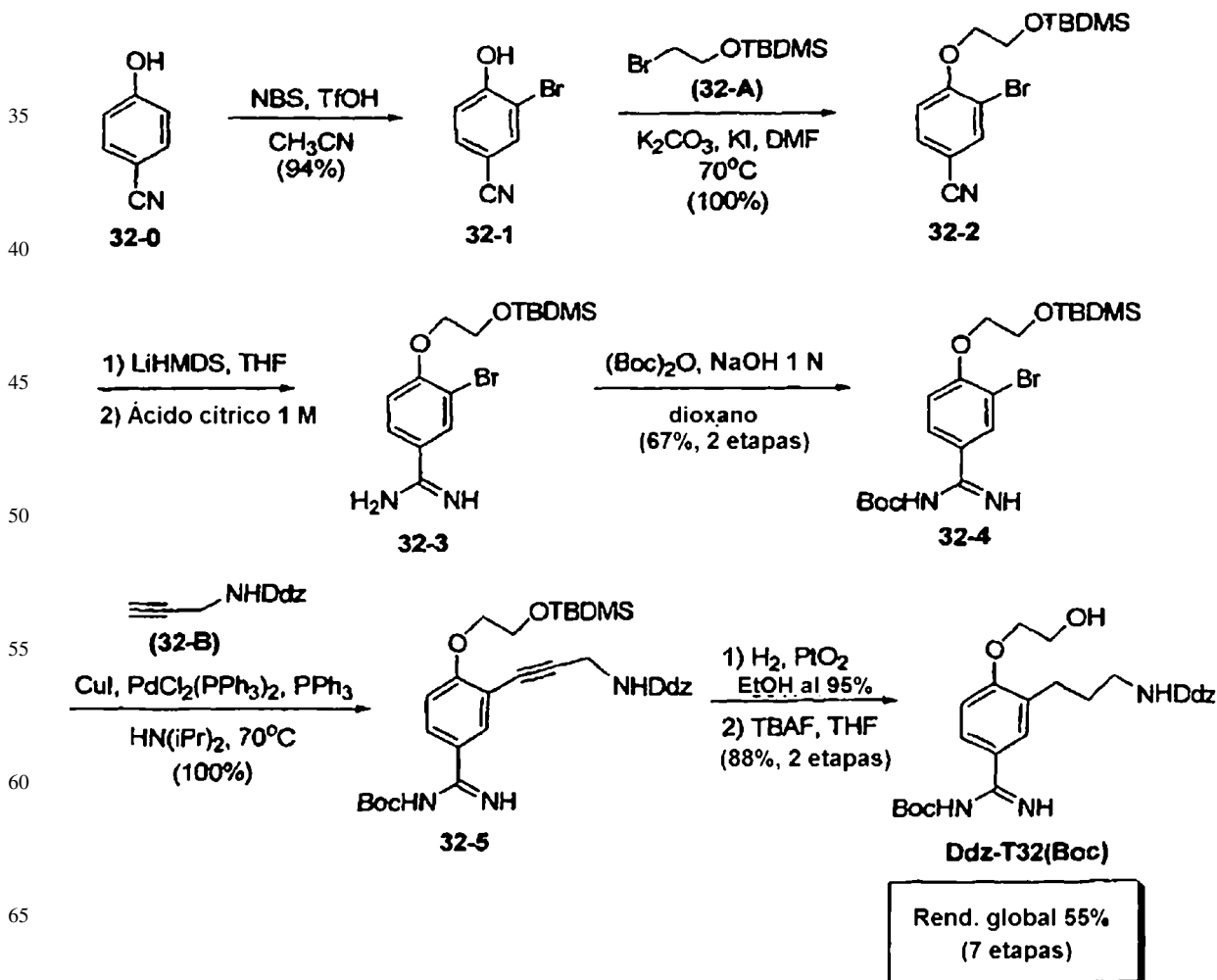


20 La reacción de Henry del 2-hidroxibenzaldehído 28-0 proporcionó 28-1 con un rendimiento del 79%. Esto se siguió de reducción primero con borohidruro sódico y después con hidrogenación catalítica para dar la amina, que después se protegió en forma de su derivado de Boc, 28-2. Los rendimientos de estas dos primeras etapas fueron inferiores a mayores escalas. La alquilación de 28-2 con el TBDMS éter de 2-bromoetanol, sintetizado por procedimientos convencionales, dio 28-3 con un rendimiento del 74%. La desprotección del silil éter en condiciones convencionales produjo la cadena protegida deseada, Boc-T28. El uso alternativo de carbonato de etileno para la alquilación del fenol para evitar las etapas de protección/desprotección dio un rendimiento del 73%.

25

Ejemplo 36

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T32



ES 2 338 789 T3

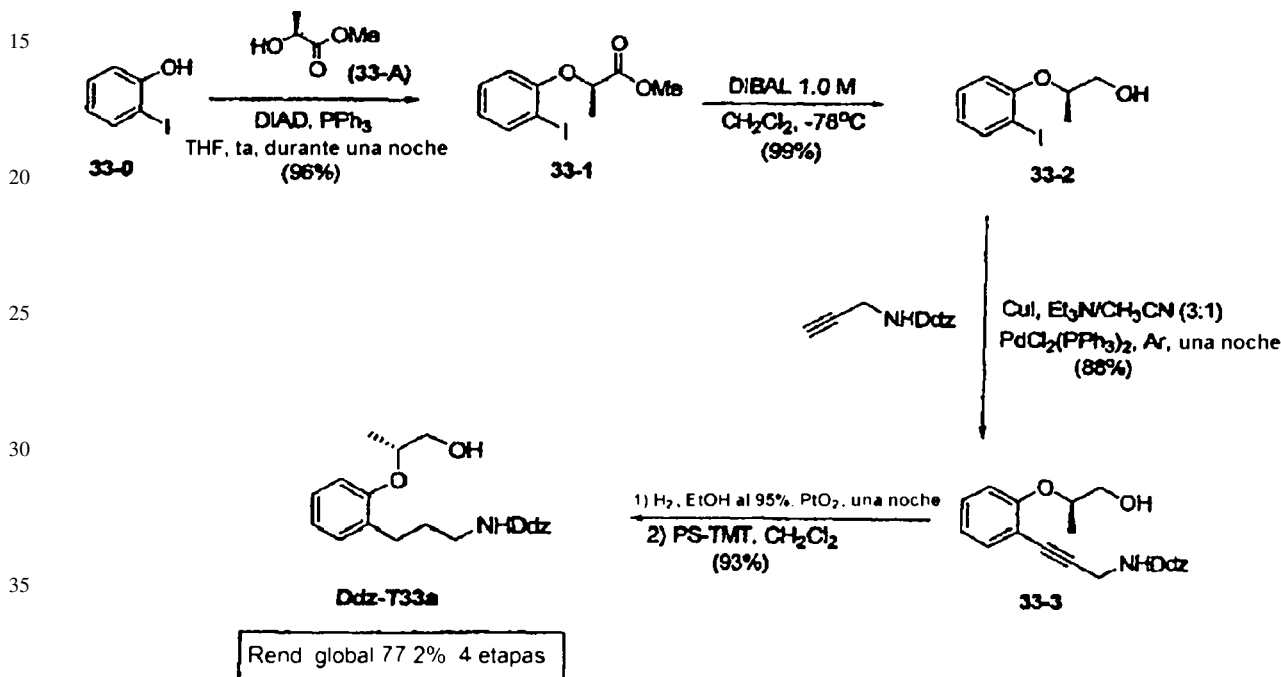
TLC (EtOAc al 100%; detección: UV, CMA; $F_R = 0,24$).

^1H RMN (CDCl_3 , ppm): 7,74 (1H, dd), 7,35 (1H, d), 6,72 (1H, d), 6,53-6,49 (2H, m), 3,61-3,29 (1H, m), 5,06 (1H, t), 4,25-4,01 (2H, m), 3,91-3,89 (2H, m), 3,73 (3H, s), 2,99 (2H, dd), 2,63 (2H, t), 1,71 (8H, ancho), 1,53 (9H, s).

^{13}C RMN (CDCl_3 , ppm): 163,8, 162,2, 161,0, 159,7, 155,9, 149,4, 130,0, 129,1, 128,0, 126,8, 110,8, 98,1, 80,9, 79,3, 69,7, 61,3, 55,5, 39,1, 29,3, 28,5, 26,7.

Ejemplo 37

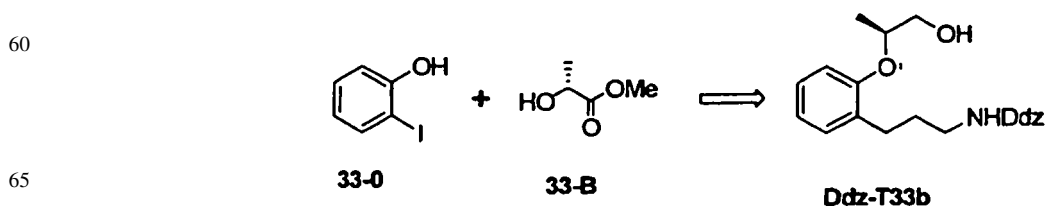
Procedimiento Convencional para la Síntesis de las Cadenas T33a y T33b



La construcción del isómero (R) de esta cadena (T33a) se realizó a partir del 2-yodofenol (33-0) y el lactato de (S)-metilo (33-A). La reacción de Mitsunobu de 33-0 y 33-A se desarrolló con inversión de la configuración con un rendimiento excelente para dar 33-1. La reducción del éster para dar el alcohol correspondiente (33-2) también se produjo con un alto rendimiento y se siguió de reacción de Sonogashira con Ddz-propargilamina. El alquino del producto de acoplamiento resultante, 33-3, se redujo con hidrogenación catalítica. El tratamiento con resina de eliminación proporcionó el producto deseado, Ddz-T33a. ^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm) 7,18-7,11 (m, 2H), 6,90 (m, 2H), 6,52 (m, 2H), 6,33 (m, 1H), 5,09 (t a, 1H), 4,52 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,08 (c a, 2H), 2,64 (t a, 2H), 1,75 (m, 8H); 1,27 (d a, 3H), ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 160,8, 155,5, 149,5, 131,2, 130,6, 127,4, 121,2, 113,3, 103,2, 98,4, 80,7, 74,8, 66,5, 55,4, 40,2, 30,6, 29,3, 29,2, 27,4, 16,1.

HPLC (gradiente convencional): t_R : 7,93 min

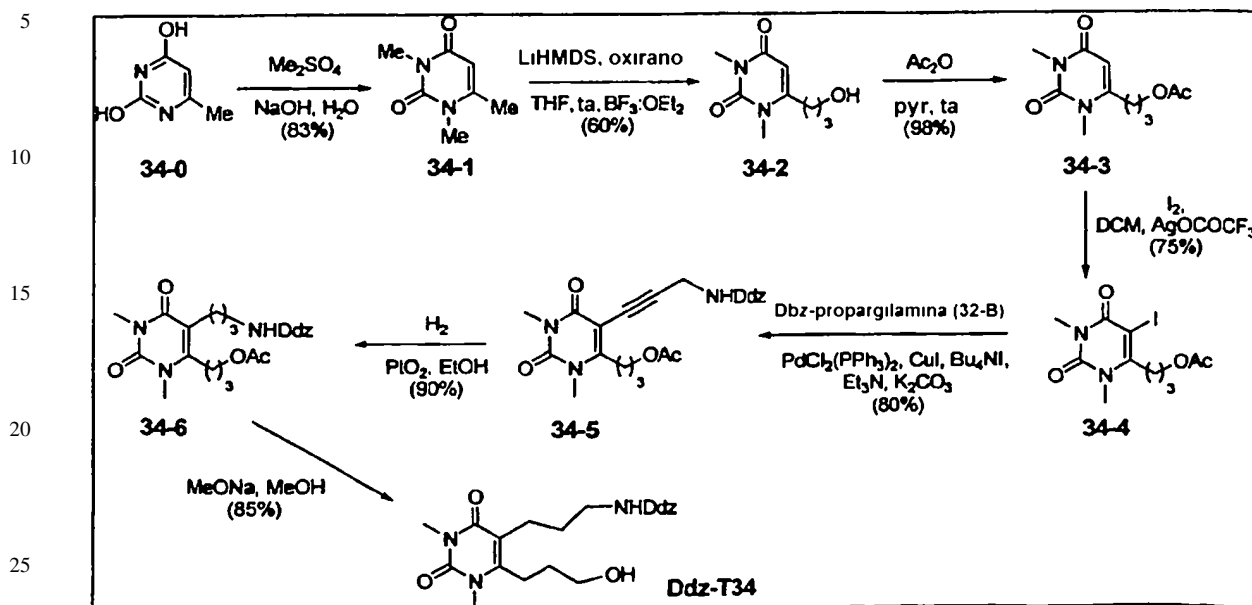
La síntesis del enantiómero (S) (Ddz-T33b) se realizó de una manera idéntica con un rendimiento comparable partiendo del lactato de (R)-metilo (33-B)



ES 2 338 789 T3

Ejemplo 38

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T34



TLC (EtOAc al 100%; detección: CMA, $F_R = 0,5$).

PM calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$, 477,55; EM Encontrado $(\text{M}+\text{H})^+$ 478.

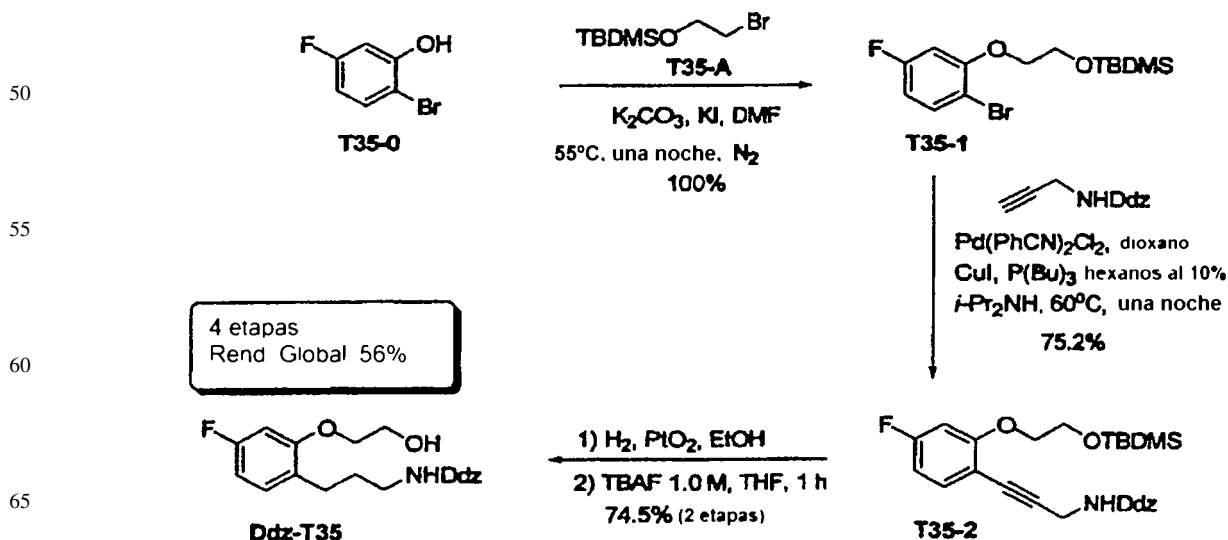
^1H RMN (CDCl_3) δ 1,62 (m, 2H), 1,70 (m, 8H), 2,43 (m, 2H), 2,67 (m, 2H), 3,07 (m, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,43 (s, 3H), 3,6 (m, 2H), 3,75 (s, 6H), 5,40 (sb, 1H), 6,31 (s, 1H), 6,49 (s, 2H)

^{13}C RMN (CDCl_3) δ 23,25 ($\underline{\text{CH}_2}$), 25,97 ($\underline{\text{CH}_2}$), 28,56 ($\underline{\text{CH}_3}$), 39,31 ($\underline{\text{CH}_3}$), 30,09 ($\underline{\text{CH}_3}$), 31,25 ($\underline{\text{CH}_2}$), 32,19 ($\underline{\text{CH}_2}$), 40,1 ($\underline{\text{CH}_2}$), 55,47 ($\underline{\text{CH}_3}$), 61,38 ($\underline{\text{CH}_2}$), 80,65 ($\underline{\text{Cq}}$), 99,38 ($\underline{\text{Cq}}$), 103,17 ($\underline{\text{Cq}}$), 111,01 ($\underline{\text{Cq}}$), 149,60 ($\underline{\text{Cq}}$), 151,33 ($\underline{\text{Cq}}$), 152,4 ($\underline{\text{Cq}}$), 160,80 ($\underline{\text{Cq}}$).

HPLC (gradiente convencional) t_R : 6,68 min.

Ejemplo 39

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T35



ES 2 338 789 T3

TLC (25/75 de EtOAc/Hex; detección: UV, ninhidrina; $F_R = 0,03$)

^1H RMN (CDCl_3): δ 7,06-7,00 (t a, 1H), 6,61-6,52 (m, 4H), 6,35 (m, 1H), 5,12 (t a, 1H), 4,03 (m, 2H), 3,95 (m, 2H), 3,77 (s, 6H), 3,11-3,04 (c a, 2H), 2,60 (t a, 2H), 1,75 (m, 8H)

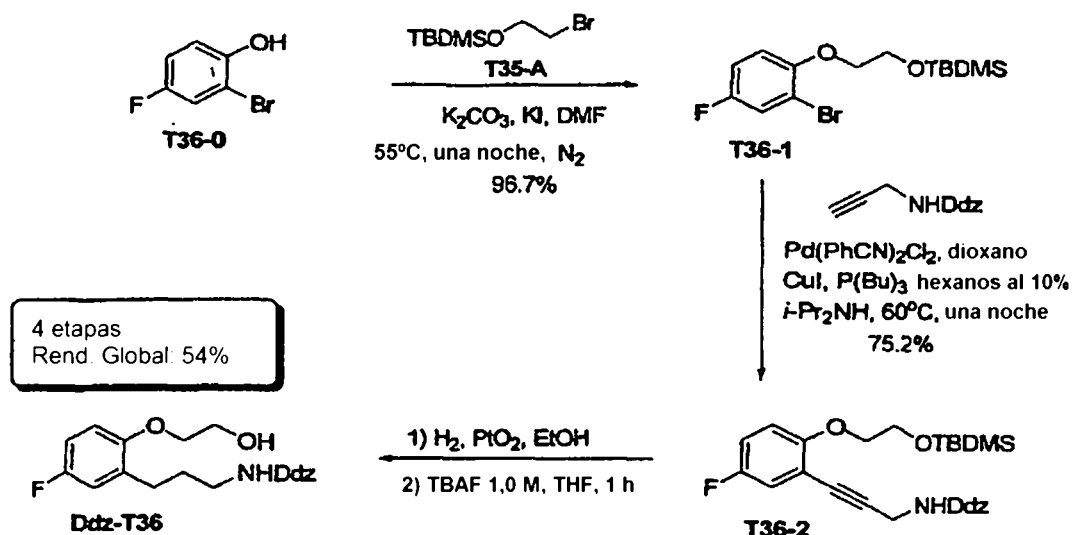
^{13}C RMN (CDCl_3): 8163,9, 160,9, 160,6, 157,6, 157,5, 155,6, 149,5, 130,8, 130,6, 125,9, 107,26, 106,9, 103,2, 98,4, 80,8, 77,5, 69,9, 61,3, 60,9, 60,6, 55,4, 40,3, 30,4, 29,3, 26,9,

HPLC (gradiente convencional): $t_R = 8,37$ min

Ejemplo 40

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T36

74,5% (2 etapas)



TLC: (25/75 de EtOAc/Hex; detección: UV, ninhidrina; $F_R = 0,03$)

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 6,84-6,75 (m, 3H), 6,52 (s a, 2H), 6,34 (m, 1H), 5,17 (t a, 1H), 4,01 (m, 2H), 3,93 (m, 2H), 3,77 (s, 6H), 3,10 (c a, 2H), 2,63 (t a, 2H), 1,74 (m, 8H)

^{13}C RMN (CDCl_3) δ 160,9, 158,9, 155,8, 55,6, 152,9, 152,9, 149,5, 132,4, 132,3, 117,1, 116,8, 112,7, 112,6, 103,2, 98,4, 80,8, 70,4, 61,6, 55,5, 40,2, 30,3, 29,3, 27,4.

HPLC (gradiente convencional): $t_R = 8,29$ min

ES 2 338 789 T3

Ejemplo 41

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T37

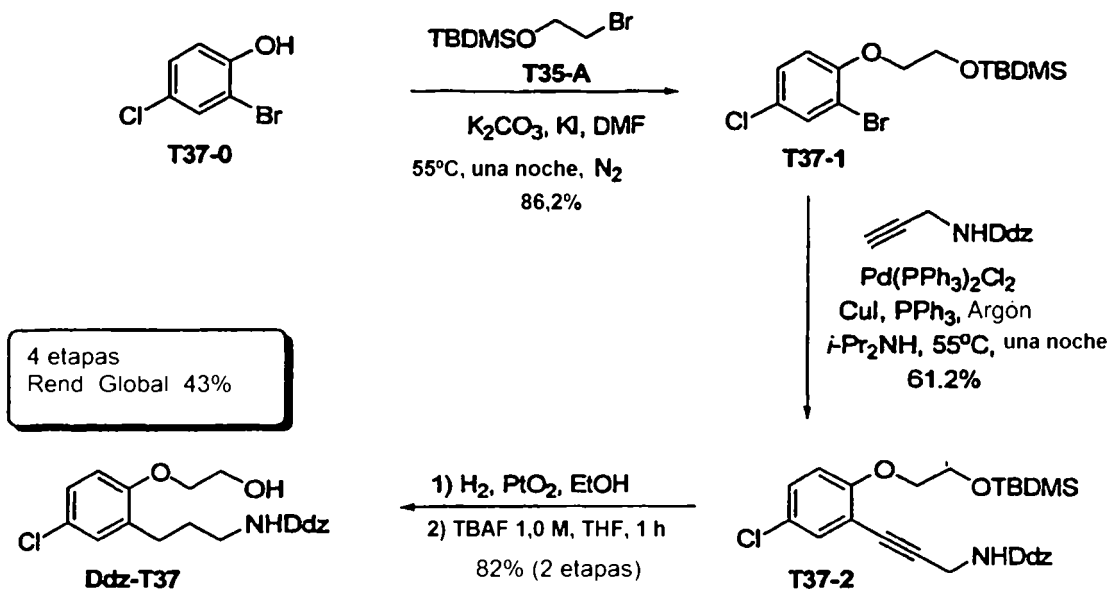
5

10

15

20

25



30

TLC (25/75 de EtOAc/Hex; detección: UV, ninhidrina; $F_R = 0,03$)

^1H RMN (CDCl_3): δ 7,12-7,08 (d a, 2H), 6,76-6,73 (d, 1H), 6,52 (m, 2H), 6,33 (s a, 1H), 5,15 (t a, 1H), 4,02 (m, 2H), 3,95 (m, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,09 (c a, 2H), 2,61 (t a, 2H), 1,74 (m, 8H).

35

^{13}C RMN (CDCl_3) δ 160,8, 155,6, 155,4, 149,5, 132,4, 130,1, 127,0, 126,0, 112,8, 103,2, 98,4, 80,8, 70,0, 61,4, 55,5, 40,3, 30,2, 29,3, 24,5, 27,4

HPLC (gradiente convencional): $t_R = 9,60$ min

40

Ejemplo 42

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T38

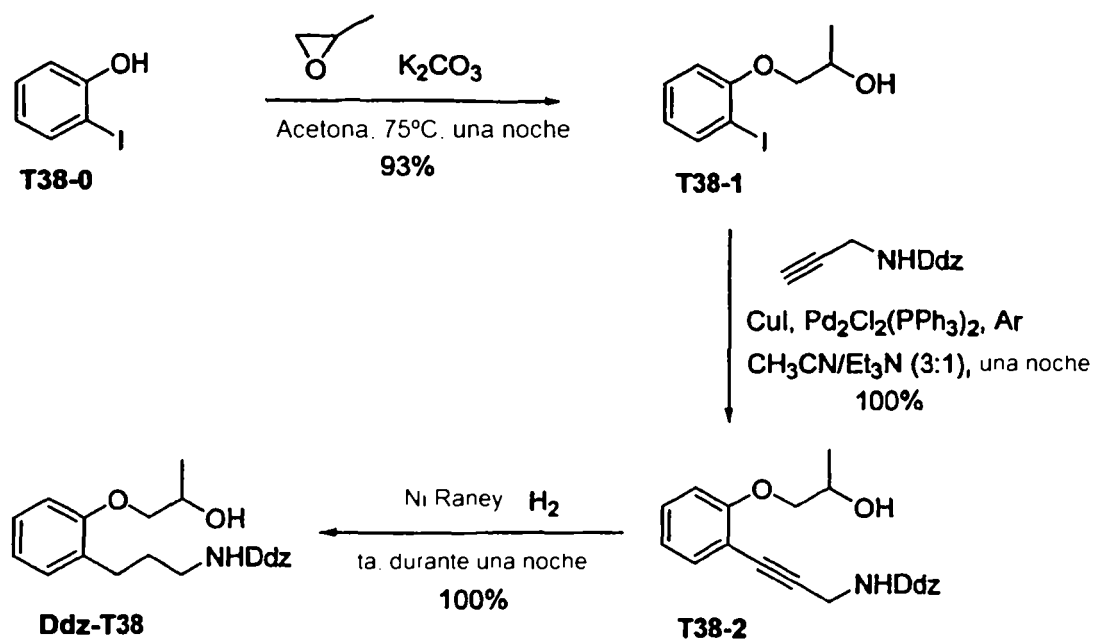
45

50

55

60

65



ES 2 338 789 T3

¹H RMN (CDCl₃): δ 7,20-7,10, (m, 2H), 6,95-6,80 (m, 2H), 6,55 (s a, 2H), 6,35 (s, 1H), 5,18 (t a, 1H), 4,12 (m, 1H), 3,95 (m, 2H), 3,80 (s, 6H), 3,15 (c a, 2H), 2,65 (t, 2H), 1,98 (s a, 2H), 1,65 (s a, 6H), 1,25 (m, 3H).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 160,8, 156,6, 155,8, 149,6, 130,4, 127,5, 121,3, 111,7, 103,2, 98,4, 80,7, 73,5, 66,6, 55,5, 40,2, 30,5, 29,3, 29,1, 27,3, 19,5,

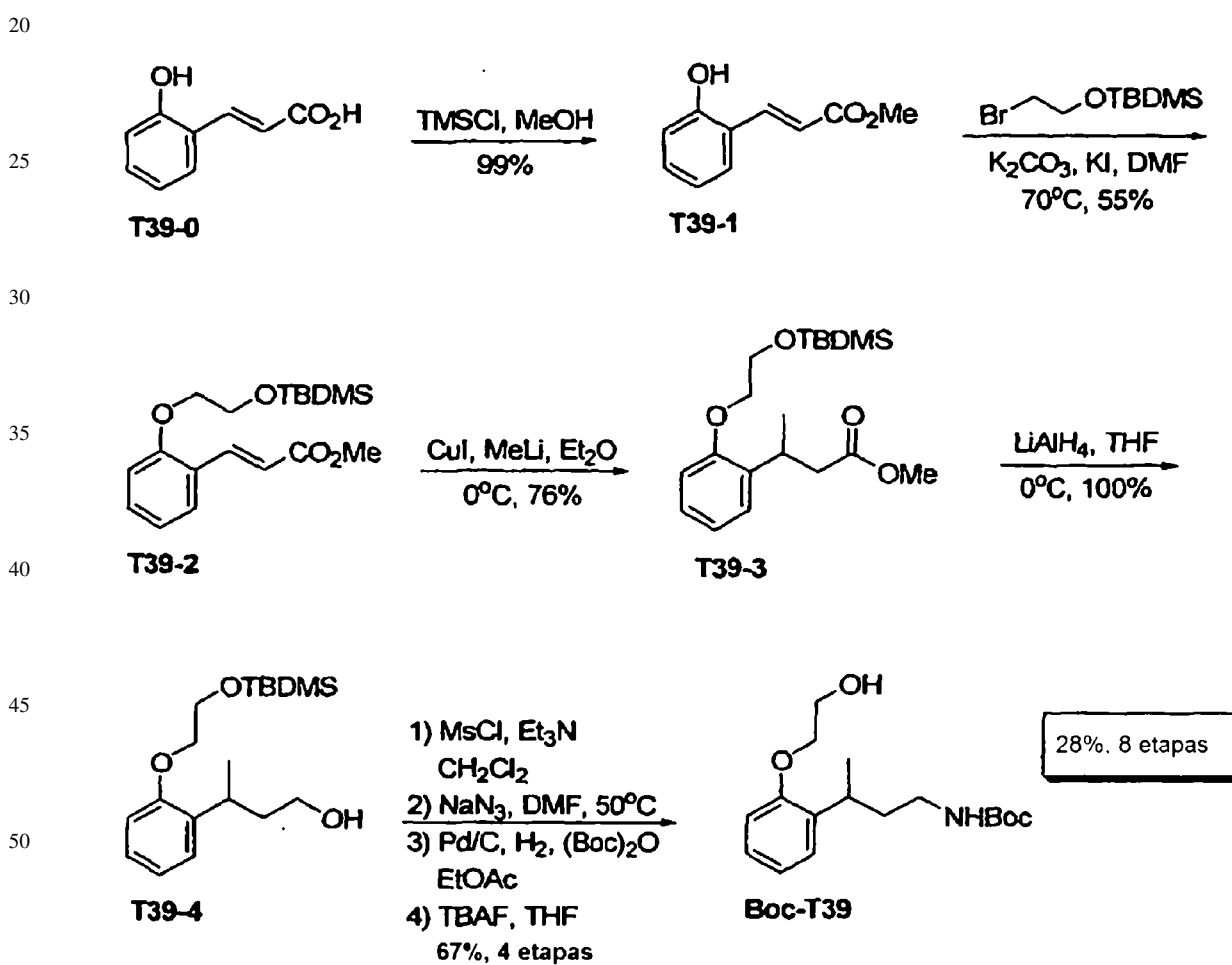
T38 quiral puede conseguirse mediante el uso de procedimientos sintéticos asimétricos, resolución o técnicas de cromatografía quiral disponibles en la bibliografía.

t_R de HPLC (gradiente convencional) = 8,46 min

El material quiral puede conseguirse partiendo con el epóxido quiral. Por ejemplo, el isómero (S) de T38 se construyó con un rendimiento global del 89% a partir de óxido de (S)-propileno.

Ejemplo 43

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T39



TLC (EtOAc al 50%, Hex al 50%; detección: UV y CMA; F_R = 0,25)

¹H RMN (CDCl₃, ppm): 7,11-7,08 (2H, m), 6,86 (1H, t), 6,76 (1H, d), 5,05 (1H, ancho), 4,26-3,85 (4H, m), 3,22-3,07 (2H, m), 2,71 (1H, ancho), 1,66-1,60 (2H, m), 1,33 (9H, s), 1,17 (3H, d).

¹³C RMN (CDCl₃, ppm): 156,9, 135,0, 127,1, 127,0, 121,4, 111,7, 69,9, 61,5, 39,8, 38,4, 28,7, 20,7.

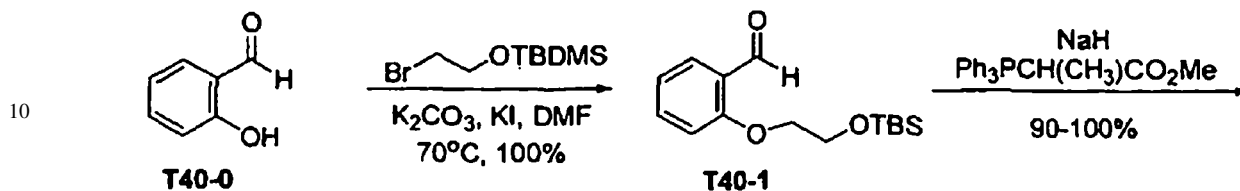
T39 quiral puede conseguirse mediante el uso de procedimientos de síntesis asimétricos, resolución o técnicas de cromatografía quiral disponibles en la bibliografía.

ES 2 338 789 T3

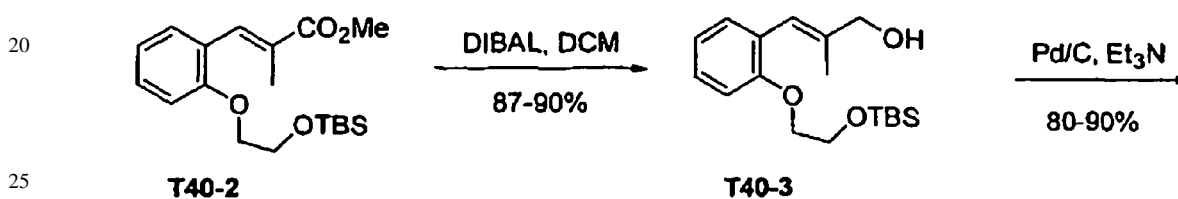
Ejemplo 44

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T40

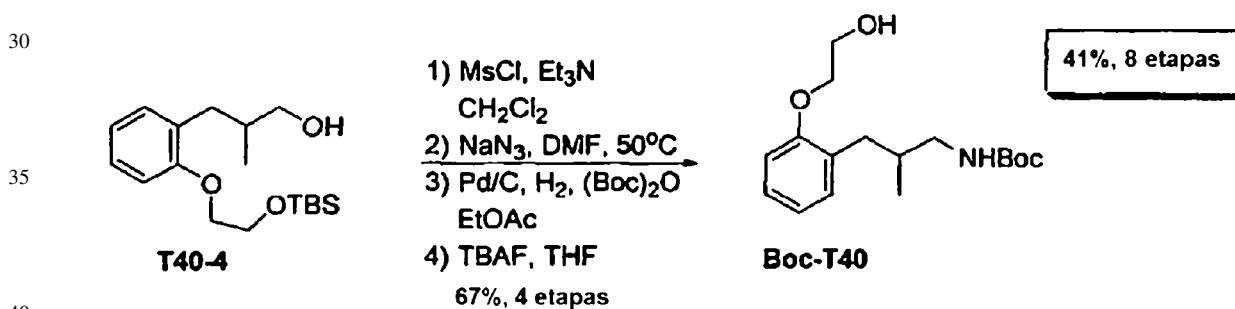
5



15



25



40

45 TLC (EtOAc al 50%, Hex al 50%; detección: UV y CMA; $F_R = 0,25$)

45

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , ppm): 7,11-7,08 (2H, m), 6,86 (1H, t), 6,76 (1H, d), 5,05 (1H, ancho), 4,26-3,85 (4H, m), 3,22-3,07 (2H, m), 2,71 (1H, ancho), 1,66-1,60 (2H, m), 1,33 (9H, s), 1,17 (3H, d).

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , ppm): 156,1, 135,0, 127,1, 127,0, 121,4, 111,7, 69,9, 61,5, 39,8, 38,4, 28,7, 20,7.

50

T40 quiral puede conseguirse mediante el uso de procedimientos de síntesis asimétricos, resolución o técnicas de cromatografía quiral disponibles en la bibliografía.

55

60

65

ES 2 338 789 T3

Ejemplo 45

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T41

5

10

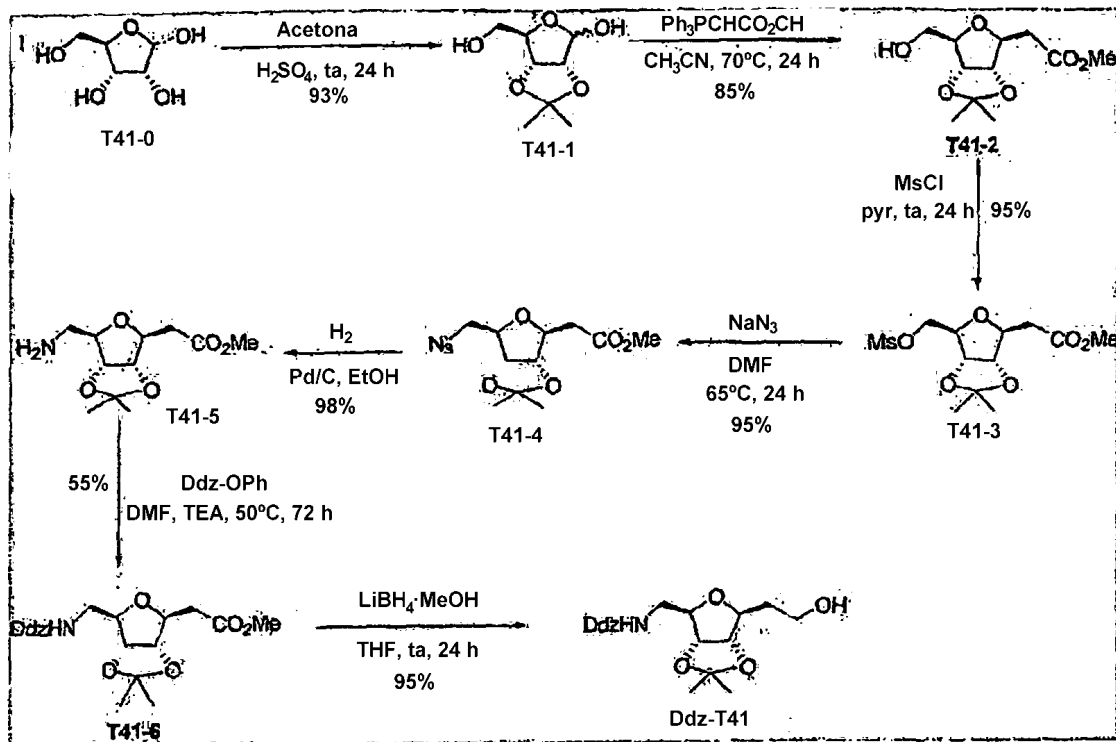
15

20

25

30

35



40

45

50

55

60

65

TLC (EtOAc al 100%; detección: CMA; $F_R = 0,5$)

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 1,23 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 1,69 (s, 3H), 1,74 (s, 3H), 1,90 (m, 2H), 2,35 (m, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,76 (s, 6H), 3,92 (m, 2H), 4,40 (m, 2H), 5,10 (m, 1H), 6,15 (s, 1H), 6,25 (s, 2H).

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3) δ 25,52 (CH_3), 27,53 (CH_3), 28,88 (CH_3), 29,61 (CH_3), 35,92 (CH_2), 42,62 (CH_2), 55,43 (CH_3), 60,60 (CH_2), 82,38 (CH), 83,33 (CH), 83,68 (CH), 84,96 (CH), 98,26 (CH), 103,23 (CH), 118,3 (Cq), 149,50 (Cq), 156,20 (Cq), 160,02 (Cq)

HPLC (gradiente convencional): $t_R = 6,64$ min

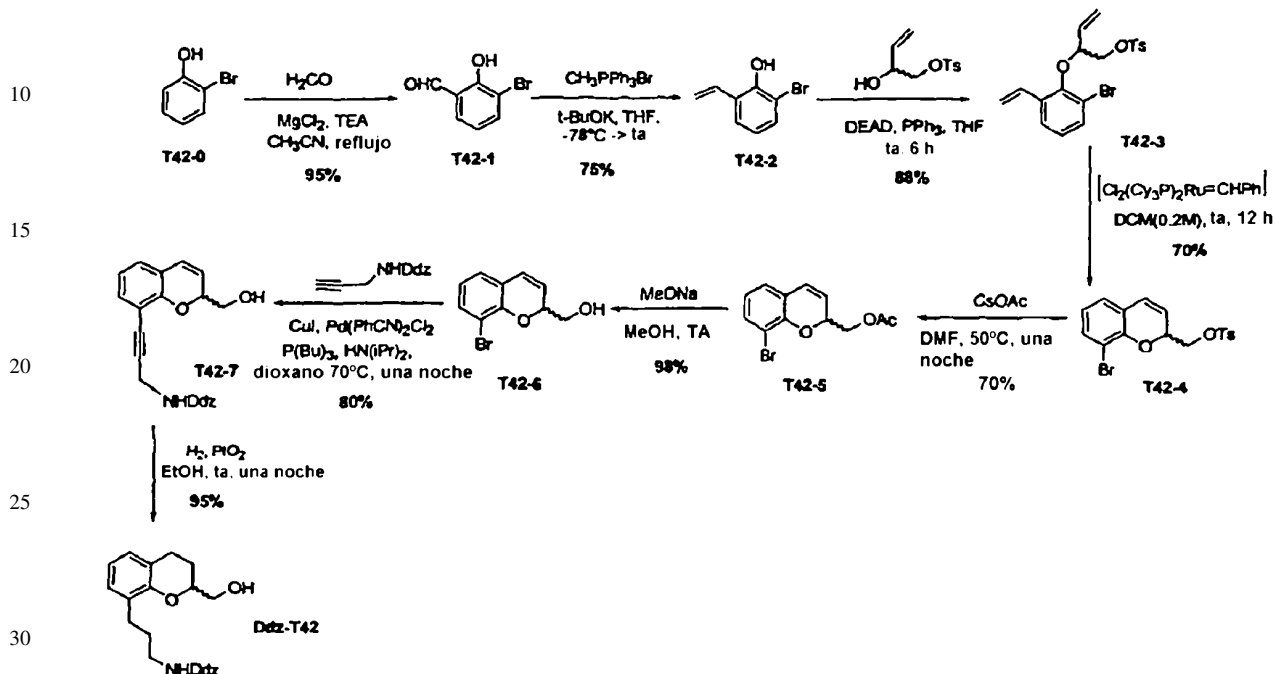
EM: M+H encontrado : 439

ES 2 338 789 T3

Ejemplo 46

Procedimiento Convencional para la Síntesis de la Cadena T42

5



35

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6,82-6,98 (m, 2H); 6,80-6,75 (m, 1H); 6,53 (s, 2H); 6,35 (t, 1H, 2 Hz); 5,23 (a, 1H); 4,08 (m, 1H); 3,90-3,68 (m, 8H); 3,20-2,97 (m, 2H); 2,95-53 (m, 4H); 2,0-1,63 (m, 10H).

40

$^{13}\text{C RMN}$ (75,5 MHz, CDCl_3) δ 160,85; 155,56; 152,55; 149,56; 128,13; 127,77; 120,28; 103,22; 98,43; 80,72; 76,80; 65,76; 55,46; 40,23; 30,45; 29,34; 29,22; 27,10; 24,97; 23,94.

45

(Esquema pasa a página siguiente)

50

55

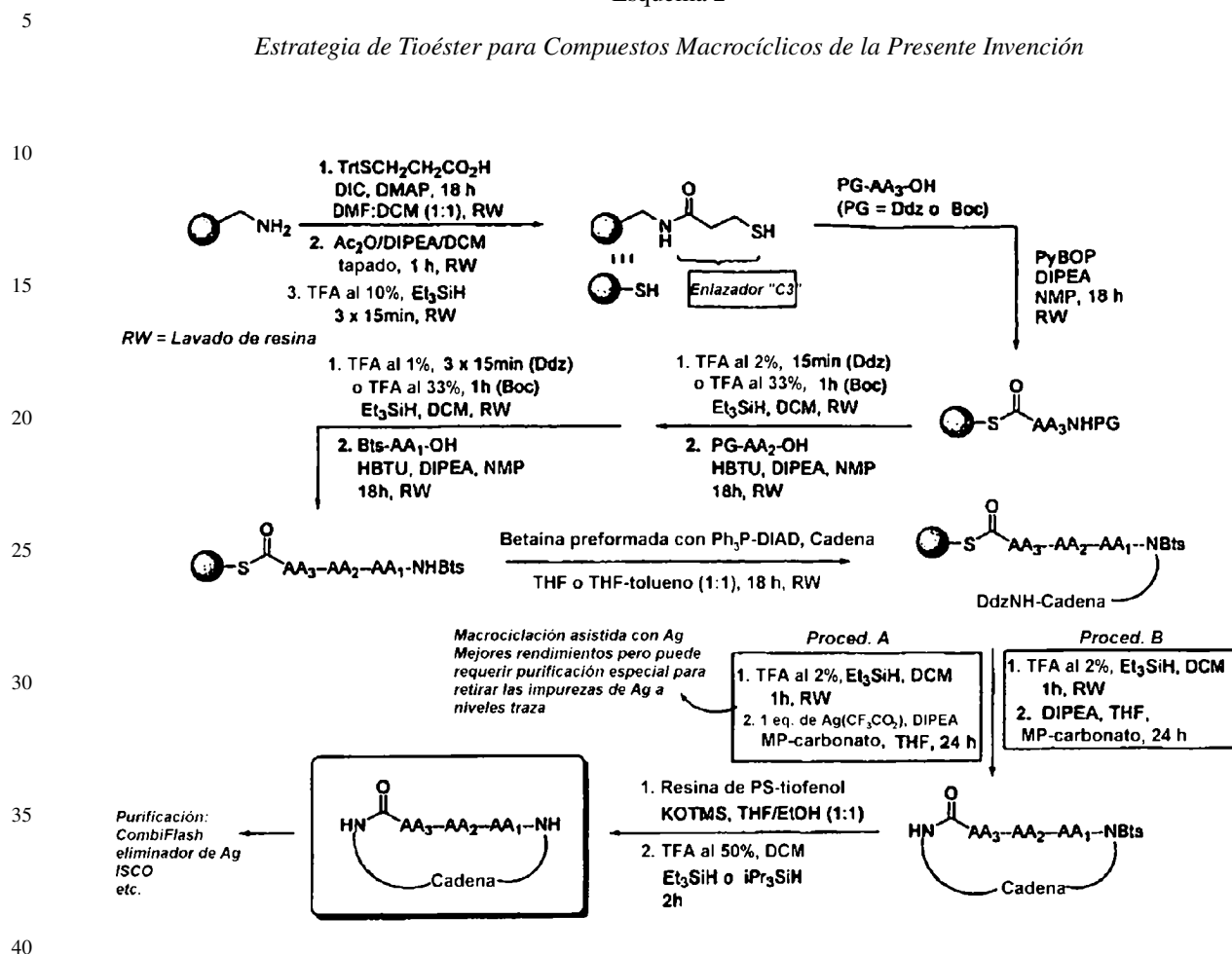
60

65

E. Ejemplos de Estrategias Sintéticas para los Compuestos Macroclíclicos de la Invención

Esquema 2

Estrategia de Tioéster para Compuestos Macroclíclicos de la Presente Invención



Uno o más de los aminoácidos indicados pueden reemplazarse por hidroxiácidos correspondientes y acoplarse con el siguiente componente básico utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Ejemplo 47

Procedimiento Convencional para la Macroclización con Enlazador de Tioéster

50 La resina que contenía el precursor de ciclación se combina en un recipiente adecuado con resina de MP-carbonato prelavada [Argonaut Technologies, Foster City, CA, la resina de MP-carbonato suministrada por fuentes comerciales se trató con 3 x THF (1 l por 400 g) y se secó durante una noche a 30°C en un horno de vacío] (de 1,4 a 1,6 equiv. con respecto a la carga inicial de la resina de síntesis). Después, se añadió una solución 0,2 M de DIPEA en THF a las resinas combinadas (1 ml/60 mg de resina de MP-carbonato) y la suspensión se agitó durante una noche a ta. Posteriormente, la resina se filtró y se aclaró 2 veces con THF. Los filtrados combinados se recogen juntos en un recipiente apropiado y después el contenido volátil se evapora a presión reducida [además de los procedimientos convencionales, el disolvente también puede retirarse al vacío usando evaporación centrífuga (ThermoSavan Discovery, SpeedVac o comparable)] para proporcionar los macrociclos en bruto.

Ejemplo 48

Procedimiento Convencional para la Macroclización Asistida con Plata con Enlazador de Tioéster

65 Excepto para la propia ciclación y posterior tratamiento, este procedimiento es idéntico al del Ejemplo 47. La resina que contiene el precursor de ciclación se combinó en un recipiente apropiado con resina de MP-carbonato prelavada [Argonaut Technologies, la resina de MP-carbonato suministrada por fuentes comerciales se trató con THF (3

ES 2 338 789 T3

5 veces, 1 l por 400 g) y se secó durante una noche a 30°C en un horno de vacío] (de 1,4 a 1,6 equiv. con respecto a la carga inicial de la resina de síntesis). A esto se le añadieron THF (1 ml por 100 mg de resina) y trifluoroacetato de plata (1 equiv. con respecto a la carga inicial de la resina). Finalmente, se añadió una cantidad de DIPEA suficiente para obtener una solución 0,2 M. La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche. Después, la solución se filtró y las
10 resinas se lavaron 2 veces con THF. Los filtrados se recogen juntos en un recipiente apropiado, después se evaporan a presión reducida [(el contenido volátil también podría retirarse al vacío usando evaporación centrífuga (ThermoSavant Discovery, SpeedVac o comparable)] para proporcionar los macrociclos en bruto. Para este procedimiento, el trifluoroacetato de plata debería almacenarse en un desecador entre cada uso. Además, se recomienda usar una nueva botella de THF (o una botella que se haya abierto recientemente en una atmósfera de N₂ o Ar) para minimizar la formación de óxido de plata.

15 Además, también puede usarse una estrategia de metatesis de cierre del anillo (RCM), desarrollada por Grubbs y col. para conseguir algunos de los compuestos macrocíclicos de la invención (véase, por ejemplo el documento US 5.811.515; Grubbs, R.H. y col. J. Org Chem. 2001, 66, 5291-5300; Fürstner, A. Angew. Chem. Int. Ed. 2000, 39, 3012-3043).

20 Para conseguir ciertos derivados de compuestos de la presente invención, se requerían reacciones adicionales de las del esquema general. Para algunos, fue ventajoso hacer reaccionar la funcionalidad a derivatizar antes de la formación del anillo macrocíclico. La estructura cíclica puede restringir el acceso de los reactivos a esa funcionalidad. Por ejemplo, en la síntesis de derivados de N-metilo y N-acilo de macrociclos, donde el átomo de nitrógeno secundario del anillo es el sitio de derivatización, es preferible realizar la reacción antes de la aplicación del protocolo de ciclación apropiado.

25 En otros casos, por ejemplo en la derivatización de la funcionalidad de cadena lateral, la reacción se realizó mejor después de la formación del anillo macrocíclico. Por ejemplo, otra reacción de restos amino sobre ejemplos de cadenas laterales típicamente se realizó de forma eficaz por reacción del macrociclo parcialmente protegido. De esta manera, la acilación, sulfonilación, alquilación (a través de aminación reductora), formación de guanidina y urea se realizaron mediante procedimientos convencionales.

30 La Tabla 1, a continuación en el presente documento, muestra un resumen representativo, pero de ningún modo exclusivo, de la síntesis química de varios compuestos representativos de la invención.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 789 T3

TABLA 1

Síntesis de Compuestos Representativos de la Presente Invención

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales
5						
10	1	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29 ninguna
	2	Bts-D-Phe	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T8	Ejemplo 29 ninguna
15	3	Bts-D-Phe	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29 ninguna
	4	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29 ninguna
20	5	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Ala	Boc-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29 ninguna
	6	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Met	Ddz-T8	Ejemplo 29 ninguna
25	7	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nle	Ddz-T8	Ejemplo 29 ninguna
	8	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Phe	Ddz-T8	Ejemplo 29 ninguna
30	9	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Val	Ddz-T8	Ejemplo 29 ninguna
35	10	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Ddz-T9	Ejemplo 29 ninguna
40	11	Bts-D-2-Nal	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T8	Ejemplo 29 ninguna
	12	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Abu	Ddz-T8	Ejemplo 29 ninguna
45	13	Bts-D-Phe	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29 ninguna
	14	Bts-D-2-Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29 ninguna
50	15	Bts-D-Phe (3CI)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29 ninguna

55

60

65

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
10	16	Bts-D-Phe (4Cl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
15	17	Bts-D-Trp (Boc)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
20	18	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-2-Abu	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
25	19	Bts-D-Phe (4F)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
30	20	Bts-D-Phe	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T8	Ejemplo 29	ninguna
35	21	Bts-D-2-Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T8	Ejemplo 29	ninguna
40	22	Bts-D-Tyr (OMe)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
45	23	Bts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
50	24 25	Bts-D-2-Thi	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
55		Bts-D-Phe (2Cl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
60	26	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
65	27	Bts-D-4-Thz	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
	28	Bts-D-3-Pal	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
	29	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Ddz-Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
	30	Bts-D-Tyr (tBu)	Hnva(THP)	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
	34	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Tyr (tBu)	Boc-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
	38	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Ala	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
	39	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-β-Ala	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
	40	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Gly	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
10							
	41	Bts-D-Tyr (tBu)	Bloc-Phe	Boc-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
15							
	52	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Phg	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
20							
	55	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz-Lys(Boc)	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
25							
	56	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz Orn(Boc)	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
30							
	57	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz-Ser(tBu)	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
35							
	58	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz-Tyr(tBu)	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
40							
	59	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz-Trp(Boc)	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
45							
	60	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc- Tyr(OMe)	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
50							
	65	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T2	Ejemplo 29	ninguna
55							
	71	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T10	Ejemplo 29	ninguna
60							
	72	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-2-Nal	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
65							
	76	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-2-Nal	Boc-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
	77	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Nle	Boc-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
	80	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Ile	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales
5						
85	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-D-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
10						
87	Bts-D-Bip	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
88	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
15						
89	Bts-D-Hfe	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
90	Bts-D-Dip	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
20						
91	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Nva	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
92	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Tle	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
25						
96	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-b-Ala	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
30						
97	Bts-D-Tyr (tBu)	I Boc-D-Chg	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
35						
98	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T18	Ejemplo 29	ninguna
40						
99	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T15	Ejemplo 29	ninguna
45						
109	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Ddz- Dab(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
50						
110	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T11	Ejemplo 29	ninguna
55						
111	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Hval(THP)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
60						
112	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
65						
120	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Pro	Boc-Nva	Ddz-T8	Ejemplo 29	ninguna
121	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Ac-T8-NH2	Ejemplo 29	ninguna

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
	122	Boc-D-3-Pal	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 30	ninguna
10							
	123	Boc-D-2-Pal	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 30	ninguna
15							
	124	Boc-D-4-Pal	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 30	ninguna
20							
	125	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Cpg	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
25							
	126	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-NMeLeu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
30							
	127	Boc-D-His (Mts)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T12	Ejemplo 30	ninguna
35							
	128	Bts-D-Tyr (OMe)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
40							
	129	Bts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
45							
	130	Bts-D-2-Thi	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
50							
	131	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
55							
	132	Bts-D-Phe (4Cl)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
60							
	133	Bts-D-Phe (4F)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
65							
	134	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T2	Ejemplo 29	ninguna
	135	Bts-D-Tyr (OMe)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
	136	Bts-D-1Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
	137	Bts-D-2-Thi	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
	138	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Leu	oc-T11	Ejemplo 29	ninguna

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
	139	Bts-D-Phe (4Cl)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
10							
	140	Bts-D-Phe (4F)	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
15							
	141	Bts-D-Tyr (OMe)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
	142	Bts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
20							
	143	Bts-D-2-Thi	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
	144	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
25							
	145	Bts-D-Phe (4Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
	146	Bts-D-Phe (4F)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
30							
	147	Bts-D-Tyr (OMe)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
35							
	148	Bts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
	149	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
40							
	150	Bts-D-Phe (4Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
	151	Bts-D-Phe (4F)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T11	Ejemplo 29	ninguna
45							
	152	Bts-D-Tyr (OMe)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
50							
	153	Bts-D-1-Nal	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
	154	Bts-D-2-Thi	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
55							
	155	Bts-D-Phe (3Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
60							

65

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
	156	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz-Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
10							
	157	Bts-D-Phe (4F)	Ddz-D-Val	Ddz-Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
15							
	158	Bts-D-Phe (3Cl)	Ddz-D-Val	Ddz-Dap(Boc)	Ddz-T11	Ejemplo 29	ninguna
20							
	159	Bts-D-Tyr (But)	Boc-D-Ile	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
25							
	160	Bts-D-Tyr (But)	Boc-D-allolle	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
30							
	161	Boc-D-Phe (4C H ₂ NHF moc)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 30	ninguna
35							
	162	Bts-D-Phe (2Me)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
40							
	163	Bts-D-Phe (3Me)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
45							
	164	Bts-D-Phe (4Me)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
50							
	165	Bts-D-Phe (30 Me)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
55							
	188	Bts-D-Phe (20 Me)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
60							
	167	Bts-D-3- benzotienilo	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
	168	Bts-D-3-Thi	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boo-T9	Ejemplo 29	ninguna
	169	Bts-D-b- HomoP he (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
	170	Bts-D-Phe (3,4 diCl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	8oo-T9	Ejemplo 29	ninguna

65

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
10	171	Bts-D-Phe (3,4 diF)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
15	172	Bts-D-Phe (3,4 diOMe)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
20	173	Bts-D-1Nal	Hnva(THP)	Boc-Nva	Boo-T9	Ejemplo 29	ninguna
25	174	Bts-D-Tyr (OMe)	Hnva(THP)	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
30	175	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T33b	Ejemplo 29	ninguna
35	176	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T33a	Ejemplo 29	ninguna
40	177	Bts-D-Tyr (tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T28	Ejemplo 29	ninguna
45	178	Bts-D-Tyr (OMe)	Ddz-D-Val	Ddz-Ser(tBu)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
50	179	Bts-D-1-Nal	Ddz-D-Val	Ddz-Ser(tBu)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
55	180	Bts-D-2- Thi	Ddz-D-Val	Ddz-Ser(tBu)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
60	181	Bts-D-Phe (3Cl)	Ddz-D-Val	Ddz-Ser(tBu)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
	182	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz-Ser(tBu)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
	183	Bts-D-Phe (4F)	Ddz-D-Val	Ddz-Ser(tBu)	Ddz-T9	Ejemplo 29	ninguna
	184	Bts-D-1-Nal	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T11	Ejemplo 29	ninguna
	185	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T11	Ejemplo 29	ninguna
	186	Ddz-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz-His(Mts)	Ddz-T9	Ejemplo 30	ninguna
	187	Bts-D-Phe (3C F3)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna

65

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
	188	Bts-D-Phe (3F)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
10							
	189	Bts-D-Phe (4N 02)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
15							
	190	Bts-D-3- benzotienil	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
20							
	191	Bts-D-Phe (30 Me)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
25							
	192	Bts-D-Phe (3,4 diCl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
30							
	193	Bts-D-Phe (3,4 diF)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
35							
	194	Bts-D-Tyr (OMe)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T34	Ejemplo 29	ninguna
40							
	195	Bts-D-Tyr (OM e)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T38	Ejemplo 29	ninguna
45							
	196	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Ddz- T32(Boc)	Ejemplo 29	ninguna
50							
	197	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T34	Ejemplo 29	ninguna
55							
	198	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T38	Ejemplo 29	ninguna
60							
	199	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T41	Ejemplo 29	ninguna
	200	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T8	Ejemplo 29	ninguna
	201	Bts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T8	Ejemplo 29	ninguna
	202	Bts-D-Phe (30 Me)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T8	Ejemplo 29	ninguna
	203	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	acetilación

65

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales	
5							
10	204	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Odz-T9	Ejemplo 29	guanidinilación
15	205	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-NMeLeu	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
20	206	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	mesilación
25	207	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	TMS- isocianato seguido de ácido diluido
30	208	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	guanidinilación
35	209	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	acetilación
40	210	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	aminación reductora con acetona
45	211	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	aminación reductora con exceso de formaldehído
50	212	Bts-D-Phe (4Cl)	Ddz-D-Val	Ddz- Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29	aminación reductora con acetona
55	213	Bts-D-Tyr (3,5d il)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29	ninguna
60	214	Bts-D-Tyr (OMe)	Boc-D-Val	Boc-Hse(Bzl)	Boc-T9	Ejemplo 29	hidrogenolisis para la retirada del grupo protector

65

ES 2 338 789 T3

TABLA 1 (continuación)

	AA₁	AA₂	AA₃	Cadena	Unión de Cadena	Etapas Adicionales
5						
10	215	Bts-D-Tyr (tBu)	Ddz-D-Val	Ddz-Dap(Boc)	Ddz-T9	Ejemplo 29 aminación reductora con exceso de formaldehído
15	216	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T40	Ejemplo 29 ninguna
20	217	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Cpa	Boc-T36	Ejemplo 29 ninguna
25	218	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T39	Ejemplo 29 ninguna
30	219	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T37	Ejemplo 29 ninguna
35	220	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T39	Ejemplo 29 ninguna
40	221	Bts-D-Phe (3Cl)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T35	Ejemplo 29 ninguna
45	222 1	Bts-D-Tyr (3tBu)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29 ninguna
50	223	Bts-D-Tyr (But)	Boc-D-Val	Boc-Nva	Boc-T9	Ejemplo 29 acetilación
55	224	3ts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29 aminación reductora con formaldehído
	225	3ts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29 acetilación
	226	Bts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29 aminación reductora con aldehído
	227	Bts-D-1-Nal	Boc-D-Val	Boc-Leu	Boc-T9	Ejemplo 29 aminación reductora con benzaldehído
Notas						
Cualquier aminoácido o cadena designada como el derivado de Boc podría sustituirse con el derivado de Dbz correspondiente.						

D. Datos Analíticos para los Compuestos Seleccionados de la Invención

Los espectros de ¹H y ¹³C RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury 300 MHz y se referencian de forma interna con respecto a las señales de protones residuales del disolvente. La información acerca de la conformación de las moléculas en solución puede determinarse utilizando técnicas de RMN bidimensionales apropiadas conocidas por los expertos en la materia. Las purificaciones por HPLC se realizaron sobre una columna Waters XTerra MS C18, usando el sistema Waters FractionLynx. Las purificaciones cromatográficas a media presión automatizadas se realizaron en un sistema Isco CombiFlash 16x con cartuchos de sílice o C18 desechables que permitían el procesamiento de hasta dieciséis (16) muestras simultáneamente. Los espectros de EM se registraron en un sistema Waters Micromass Platform II o ZQ. Los espectros de EMAR se registraron con un espectrómetro VG Micromass ZAB-ZF. La información química y biológica se almacenó y analizó utilizando el software de bases de datos ActivityBase. (IDBS, Guildford, Surrey, UK).

ES 2 338 789 T3

Procedimientos Generales para Análisis por HPLC Analítica

Los análisis por HPLC se realizan en un sistema Waters Alliance 2695 que funciona a 1 ml/min usando una columna Xterra MS C18 de 4,6 x 50 mm (3,5 μ m). Una Waters 996 PDA proporcionó datos de UV para la determinación de la pureza. Un filtro LCPackings (50:40:10) permitió la separación del flujo en tres partes. La primera parte (50%) se dirigió a una EM Micromass Platform II equipada con una sonda de IQPA para confirmar la identidad. La segunda parte (40%) se dirigió a un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD, Polymer Laboratories, PL-ELS-1000) para la determinación de la pureza y la última porción (10%) a un detector de nitrógeno de quimioluminiscencia (CLND, Antek Model 8060) para la cuantificación y determinación de la pureza. Los datos se capturaron y se procesaron utilizando la versión más reciente del paquete de software Waters Millennium.

Un procedimiento de CL de ejemplo adecuado para los compuestos de la presente invención usa MeOH como disolvente A, H₂O como disolvente B y TFA al 1%/H₂O como disolvente D. La composición de la fase móvil inicial es 5% de A, 85% de B y 10% de D. A continuación se muestran los detalles del procedimiento de gradiente convencional:

	Tiempo	% de A	% de B	% de D	Curva
	0,00	5	85	10	6
	1,00	5	85	10	6
	6,00	50	40	10	6
	9,00	50	40	10	6
	14,00	90	0	10	6
	17,00	90	0	10	6
	17,50	5	85	10	6
	20,00	5	85	10	6

Los compuestos 2-6, 8-10, 56, 65 y 144 son como se definen en la Tabla (3), a continuación en el presente documento.

Compuesto 2

Rendimiento: se obtuvieron 12 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,83 (m, 1H); 8,53 (m, 1H); 7,63 (m, 1H); 7,4-7,08 (m, 7H); 7,00-6,84 (m, 2H); 6,60 (d, 15 Hz, 1H); 6,41 (dt, 15 Hz, 5,4 Hz, 1H); 4,35 (m, 1H); 4,25-4,05 (m, 3H); 3,94 (dt, 1H, 6 Hz, 15 Hz); 3,79 (dd, 1H, 3,6 Hz, 8,4 Hz); 3,60 (m, 1H); 3,52-3,40 (d a, 1H); 3,22-3,06 (m, 4H); 1,88 (m, 2H); 1,54-1,28 (m, 2H); 1,25 (d, 3H, 4,8 Hz); 1,22 (d, 3H, 2,7 Hz); 0,92-0,80 (m, 6H).

EMAR calc. para C₃₀H₄₀N₄O₄: 520,3049; encontrado 520,3057 \pm 0,0016

HPLC [procedimiento de gradiente convencional (se refiere al presentado en los Procedimientos Generales para los Análisis por HPLC Analítica)] t_R = 9,55 min.

Compuesto 4

Rendimiento: se obtuvieron 12 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,35 (a, 1H); 8,98 (a, 1H); 5,52 (d, 1H, 8,4 Hz); 8,38 (a, 1H); 7,25 (a, 1H); 7,13-7,07 (m, 4H); 6,86 (t, 2H, 7,5 Hz); 6,57 (d, 2H, 8,7 Hz); 4,33 (a, 1H); 4,21-4,02 (m, 3H); 3,78 (dd, 1H, 3,3 Hz; 8,1 Hz); 3,65-3,54 (m, 1H); 3,31-3,23 (m, 1H); 3,13-3,02 (m, 4H); 2,78-2,2,28-2,18 (m, 1H); 2,0-1,80 (m, 2H); 1,50-1,30 (m, 3H); 1,25 (d, 3H, 4,5 Hz); 1,22 (d, 3H, 4,5 Hz); 1,01 (d, 3H, 6,6 Hz); 0,90 (d, 3H, 6,6 Hz); (t, 3H, 7,5 Hz).

¹³C RMN (75,5 MHz, DMSO-d₆) δ 172,22; 171,37; 157,77; 157,44; 156,04; 131,76; 130,80; 130,70; 127,88; 121,82; 115,83; 111,71; 62,13; 60,62; 54,21; 52,81; 47,13; 42,47; 33,31; 29,69; 29,30; 28,61; 20,36; 19,44; 18,72; 17,60; 13,97,

EMAR calc. para C₃₀H₄₂N₄O₅: 538,3155; encontrado: 538,3145 \pm 0,0016

t_R de HPLC (gradiente convencional) = 8,12 min.

ES 2 338 789 T3

Compuesto 5

Rendimiento: se obtuvieron 17 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

5 ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,02 (a, 1H); 8,47 (d, 1H, 8,4 Hz); 7,7 (a, 1H); 7,58 (d, 1H, 5,4 Hz); 7,28 (dd, 1H, 7,8 Hz, 0,8 Hz); 7,20 (t, 1H, 9,0 Hz, 0,8 Hz); 7,14 (d, 2H, 8,4 Hz); 6,98-6,91 (m, 3H); 6,66 (d, 8,7 Hz); 6,63 (d, 1H, 15,0 Hz); 6,43 (dt, 1H, 6,0 Hz, 15,0 Hz); 4,28-3,86 (m, 6H); 3,60-3,40 (m, 2H); 3,22-3,12 (m, 1H); 3,05 (d, 2H, 5,4 Hz); 1,92-1,80 (m, 1H); 1,56-1,40 (m, 1H); 1,36-1,20 (m, 2H); 1,25 (d, 3H, 6,6 Hz); 0,84 (t, 3H, 7,2 Hz).

10 ^{13}C RMN (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 172,54; 171,86; 158,97; 158,56; 127,39; 155,84; 131,62; 129,73; 129,20; 129,02; 128,43; 126,30; 124,51; 122,01; 115,85; 112,88; 61,23; 52,90; 51,23; 47,08; 42,66; 36,13; 33,30; 21,14; 19,57; 17,07; 14,14; 11,49.

EMAR calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5$: 508,2685; encontrado: $508,2681 \pm 0,0015$

15 t_R de HPLC (gradiente convencional) = 7,67 min.

Compuesto 6

20 Rendimiento: se obtuvieron 16 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

25 ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,37 (a, 1H); 8,87 (a, 1H); 8,61 (d, 1H, 8,7 Hz); 7,62 (a, 1H); 7,27 (d, 1H, 7,8 Hz); 7,21 (t, 1H, 8,4 Hz); 7,14 (d, 2H, 8,4 Hz); 6,98-6,87 (m, 3H); 6,64 (d, 2H, 8,1 Hz); 6,70 (d, 1H, 15,6 Hz); 6,39 (dt, 1H, 6,3 Hz, 15,6 Hz); 4,44-4,36 (m, 1H); 4,34-4,08 (m, 2H); 4,45-3,92 (dt, 1H, 6,9 Hz, 15,6 Hz); 3,74 (dd, 1H, 3,6 Hz, 8,4 Hz); 3,54-3,26 (m, 3H); 3,22-3,02 (m, 3H); 2,60-2,36 (m, 4H); 2,24-2,14 (m, 1H); 2,02 (s, 3H); 1,96-1,89 (m, 1H); 1,80-1,66 (m, 1H); 1,01 (d, 3H, 6,3 Hz); 0,90 (d, 3H, 6,6 Hz).

30 ^{13}C RMN (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 171,51; 171,26; 158,90; 158,49; 157,38; 155,86; 131,63; 129,82; 129,21; 128,86; 128,63; 126,21; 121,98; 115,83; 112,83; 62,11; 61,06; 51,97; 47,10; 42,78; 30,91; 30,67; 29,34; 20,37; 19,39; 15,06.

EMAR calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$: 568,2719; encontrado: $568,2711 \pm 0,0017$

35 t_R de HPLC (procedimiento general) = 7,92 min.

Compuesto 8

40 Rendimiento: se obtuvieron 27 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

45 ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,05 (a, 1H); 8,43 (a, 1H); 8,34 (d, 1H, 9,3 Hz); 7,40 (a, 1H); 6,97 (d, 1H, 7,5 Hz); 6,92-6,74 (m, 9H); 6,67-6,54 (m, 2H); 6,33-6,25 (m, 3H); 6,10 (dt, 1H, 5,7 Hz, 16,2 Hz); 4,22 (dt, 1H, 0,9 Hz, 12 Hz); 3,94-6,66 (m, 4H); 3,30 (dd, 1H, 3,6 Hz, 7,8 Hz); 3,24 (m, 1H); 3,18 (m, 1H); 2,85-2,68 (m, 3H); 2,44-2,23 (m, 2H); 1,32 (o, 1H, 7,5 Hz); 0,97-0,89 (m, 1H); 0,42 (d, 3H, 6,6 Hz); 0,01 (d, 3H, 6,6 Hz).

^{13}C RMN (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 171,20; 157,35; 155,88; 139,12; 131,61; 130,87; 129,74; 129,21; 128,77; 128,88; 126,85; 126,19; 121,97; 115,82; 112,84; 62,04; 61,10; 55,07; 50,01; 47,09; 42,85; 37,42; 29,11.

50 EMAR calc. para $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_5$: 586,3155; encontrado: $586,3145 \pm 0,0017$

t_R de HPLC (procedimiento general) = 9,34 min.

Compuesto 9

Rendimiento: se obtuvieron 17 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

60 ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,39 (a, 1H); 8,83 (a, 1H); 8,29 (d, 1H, 9,3 Hz); 7,62 (a, 1H); 7,28 (d, 1H, 6,6 Hz); 7,20 (t, 1H, 6,9 Hz); 7,12 (d, 2H, 7,8 Hz); 6,98-6,91 (m, 2H); 6,63 (d, 2H, 8,4 Hz); 6,58 (d, 1H, 16,2 Hz); 6,40 (dt, 1H, 5,7 Hz, 16,2 Hz); 4,29-4,13 (m, 3H); 4,03-3,92 (m, 2H); 3,52 (m, 1H); 3,15-3,05 (m, 3H); 2,45-2,37 (m, 1H); 1,96-1,88 (m, 1H); 1,25 (dd, 2H, 4,5 Hz; 6 Hz); 1,01 (d, 3H, 6,3 Hz); 0,91 (d, 3H, 6,6 Hz); 0,86 (d, 3H, 7,2 Hz); 0,81 (d, 3H, 6,6 Hz).

65 ^{13}C RMN (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 171,85; 171,17; 157,37; 155,87; 131,59; 129,88; 129,18; 128,97; 128,78; 128,51; 126,16; 121,97; 115,83; 112,85; 61,55; 61,18; 58,15; 54,22; 47,08; 42,89; 36,32; 29,35; 29,00; 20,34; 19,56; 18,73; 17,44.

ES 2 338 789 T3

EMAR calc. para $C_{30}H_{40}N_4O_5$ 536,2998; encontrado: $536,2990 \pm 0,0017$.

t_R de HPLC (gradiente convencional) = 8,15 min.

5 Compuesto 10

Rendimiento: se obtuvieron 24 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

10 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,33 (a, 1H); 8,82 (a, 1H); 8,56 (d, 1H, 8,3 Hz); 7,60 (a, 1H); 7,27 (d, 2H, 7,8 Hz); 7,20 (t, 1H, 7,8 Hz); 7,13 (d, 2H, 8,4 Hz); 6,95 (t, 2H, 7,8 Hz); 6,64 (d, 2H, 8,4 Hz); 6,57 (d, 1H, 15,4 Hz); 6,38 (dt, 1H, 15,4 Hz, 5,8 Hz); 4,26-4,10 (m, 3H); 3,96 (dt, 1H, 5,4 Hz, 8,4 Hz); 3,77 (dd, 1H, 3,7 Hz, 7,8 Hz); 3,51-3,24 (m, 3H); 3,18-3,02 (m, 3H); 1,90 (h, 1H, 6,4 Hz); 1,73-1,54 (m, 2H); 1,45 (dt, 1H, 6,7 Hz, 0,9 Hz); 0,99 (d, 3H, 6,6 Hz); 0,89 (d, 3H, 6,3 Hz); 0,87 (d, 3H, 6,0 Hz); 0,80 (d, 3H, 6,3 Hz).

15 ^{13}C RMN (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 172,23; 171,17; 157,37; 155,88; 131,62; 129,82; 129,19; 128,95; 128,59; 126,24; 121,99; 115,84; 112,88; 64,23; 61,98; 61,14; 51,43; 61,14; 51,43; 47,07; 42,81; 29,38; 24,85; 24,11; 21,00; 20,32; 19,30.

20 EMAR calc. para $C_{31}H_{42}N_4O_5$ 550,3155; encontrado: $550,3150 \pm 0,0016$.

t_R de HPLC (gradiente convencional) = 8,91 min.

25 Compuesto 56

Rendimiento: se obtuvieron 16 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

30 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,39 (a, 1H); 8,90 (a, 1H); 8,67 (d, 1H, 8,4 Hz); 7,74 (a, 4H); 7,29-7,08 (m, 4H); 6,99-6,87 (m, 2H); 6,64 (d, 2H, 8,1 Hz); 6,61 (d, 1H, 16,5 Hz); 6,40 (dt, 1H, 5,7 Hz, 16,5 Hz); 4,40-4,06 (m, 4H); 4,02-3,95 (m, 1H); 3,79 (dd, 1H, 3,6 Hz, 7,8 Hz); 3,55-3,30 (m, 2H); 3,16-3,05 (m, 3H); 2,82-2,69 (m, 2H); 2,02-1,85 (m, 2H); 1,64-1,43 (m, 3H); 1,29-1,23 (m, 1H); 1,01 (d, 3H, 6,3 Hz); 0,91 (d, 3H, 6,3 Hz); 0,86-0,84 (m, 2H).

t_R de HPLC (gradiente convencional) = 5,71 min.

35

Compuesto 65

Rendimiento: se obtuvieron 17 mg de macrociclo puro (cuantificación por CLND).

40 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,60 (a, 1H); 9,39 (a, 1H); 8,88 (a, 1H); 8,70 (d, 1H, 7,5 Hz); 8,57 (d, 1H, 4,2 Hz); 7,27 (t, 6 Hz); 6,96 (d, 2H, 8,4 Hz); 6,66 (d, 2H, 8,4 Hz); 5,78-5,68 (m, 1H); 5,42-5,33 (m, 1H); 3,96-3,89 (m, 1H); 3,80-3,57 (m, 5H); 3,41-3,34 (m, 1H); 3,10-2,90 (m, 1H); 2,78-2,66 (m, 1H); 2,21-2,10 (m, 1H); 2,06-1,93 (m, 1H); 1,70-1,60 (m, 1H); 1,52-1,41 (m, 1H); 1,39-1,26 (m, 1H); 1,25 (d, 3H, 4,8 Hz); 1,23 (d, 3H, 4,5 Hz); 0,83 (dd, 3H, 3 Hz, 4,5 Hz).

45

^{13}C RMN (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 172,68; 172,63; 159,15; 158,73; 157,38; 157,25; 130,89; 124,99; 116,03; 62,51; 62,12; 54,29; 49,27; 42,47; 32,77; 30,43; 28,85; 20,46; 19,59; 18,72; 17,39; 13,90; 13,09,

50 EMAR calc. para $C_{24}H_{36}N_4O_4$: 444,2736; encontrado: $444,2726 \pm 0,0013$

t_R de HPLC (gradiente convencional) = 6,80 min.

55 Compuesto 144

60 1H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 7,4 (m, 1H); 7,27 (dt, 1H, 1,5 Hz, 6,6 Hz); 7,22-7,14 (m, 2H); 7,08-6,98 (m, 2H); 6,78 (t, 2H, 6,6 Hz); 4,45-4,39 (m, 2H); 4,15 (d, 2H, 8,1 Hz); 7,74 (d, 1H, 9,3 Hz); 3,54 (d, 1H, 10,8 Hz); 3,35-3,22 (m, 2H); 3,20 (c, 1H, 1,5 Hz); 2,82-2,71 (m, 1H); 2,61-2,55 (m, 1H); 2,21-2,11 (m, 1H); 2,02-1,94 (m, 1H); 1,74-1,40 (m, 5H); 1,04 (d, 3H, 6,6 Hz); 0,93 (d, 3H, 6,6 Hz); 0,74-0,64 (m, 1H); 0,45-0,28 (m, 2H); 0,15-0,08 (m, 1H); 0,06-0,02 (m, 1H).

60

65 ^{13}C RMN (75,5 MHz, CD_3OD) δ 173,29; 172,14; 167,51; 155,47; 134,86; 134,81; 130,38; 130,31; 128,81; 128,25; 127,44; 121,63; 110,39; 107,71; 105,02; 67,10; 66,66; 62,81; 62,06; 60,10; 53,99; 41,44; 36,07; 31,91; 30,01; 29,18; 28,94; 27,79; 23,68; 23,15; 19,08; 18,25; 8,17; 4,98; 3,16.

EMAR: calc. para $C_{31}H_{41}N_4O_4Cl$ 568,2816; encontrado $568,2802 \pm 0,0017$

ES 2 338 789 T3

F. Datos Espectrales de Masas para los Compuestos Seleccionados de la Invención

TABLA 2

Análisis de los compuestos seleccionados de la invención

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

	Fórmula Molecular	Peso Molecular (calculado)	Masa Monoisotópica	M+H Encontrado
1	C30H40N4O5	536,7	536	537
2	C30H40N4O4	520,7	520	521
3	C30H42N4O4	522,7	522	523
4	C30H42N4O5	538,7	538	539
5	C28H36N4O5	508,6	508	509
6	C30H40N4O5S	568,7	568	569
7	C31H42N4O5	550,7	550	551
8	C34H42N4O5	586,7	586	587
9	C30H40N4O5	536,7	536	537
10	C31H42N4O5	550,7	550	551
11	C34H44N4O4	572,7	572	573
12	C29H38N4O5	522,6	522	523
13	C31H44N4O4	536,7	536	537
14	C35H46N4O4	586,8	586	587
15	C30H41N4O4Cl	557,1	556	557
16	C30H41N4O4Cl	557,1	556	557
17	C32H43N5O4	561,7	561	562
18	C29H40N4O5	524,7	524	525
19	C30H41N4O4F	540,7	540	541
20	C31H42N4O4	534,7	534	535
21	C35H44N4O4	584,7	584	585
22	C31H44N4O5	552,7	552	553
23	C34H44N4O4	572,7	572	573
24	C28H40N4O4S	528,7	528	529
25	C30H41N4O4Cl	557,1	556	557
26	C31H42N4O5	550,7	550	551
27	C27H39N5O4S	529,7	529	530
28	C29H41N5O4	523,7	523	524
29	C28H39N5O5	525,6	525	526
30	C30H41N3O6	539,7	539	540
34	C34H40N4O6	600,7	600	601
38	C28H36N4O5	508,6	508	509
39	C28H36N4O5	508,6	508	509
40	C27H34N4O5	494,6	494	495
41	C34H40N4O5	584,7	584	585

ES 2 338 789 T3

(continuación)					
	Fórmula Molecular	Peso Molecular (calculado)	Masa Monoisotópica	M+H Encontrado	
5					
	52	C33H38N4O5	570,7	570	571
	55	C31H43N5O5	565,7	565	566
10	56	C30H41N5O5	551,7	551	552
	57	C28H36N4O6	524,6	524	525
15	58	C34H40N4O6	600,7	600	601
	59	C36H41N5O5	623,7	623	624
	60	C35H42N4O6	614,7	614	615
20	65	C24H36N4O4	444,6	444	445
	71	C29H40N4O6	540,7	540	541
	72	C38H42N4O5	634,8	634	635
25	76	C38H42N4O5	634,8	634	635
	77	C31H42N4O5	550,7	550	551
	80	C31H42N4O5	550,7	550	551
30	85	C30H40N4O5	536,7	536	537
	87	C36H46N4O4	598,8	598	599
	88	C34H50N4O5	594,8	594	595
35	89	C31H44N4O4	536,7	536	537
	90	C36H46N4O4	598,8	598	599
	91	C30H42N4O5	538,7	538	539
40	92	C31H44N4O5	552,7	552	553
	96	C28H38N4O5	510,6	510	511
45	97	C33H46N4O5	578,7	578	579
	98	C24H39N5O4	461,6	461	462
	99	C24H39N5O4	461,6	461	462
50	109	C29H41N5O5	539,7	539	540
	110	C29H41N5O5	539,7	539	540
	111	C30H41N3O6	539,7	539	540
55	112	C31H44N4O5	552,7	552	553
	120	C30H38N4O5	534,6	534	535
	121	C32H45N5O6	595,7	595	596
60	122	C31H43N4O4Cl	571,2	570	571

65

ES 2 338 789 T3

(continuación)					
	Fórmula Molecular	Peso Molecular (calculado)	Masa Monoisotópica	M+H Encontrado	
5	123	C29H41N5O4	523,7	523	524
	124	C29H41N5O4	523,7	523	524
10	125	C30H40N4O5	536,7	536	537
	126	C32H46N4O5	566,7	566	567
15	127	C30H38N6O3S	562,7	562	563
	128	C32H46N4O5	566,7	566	567
	129	C35H46N4O4	586,8	586	587
20	130	C29H42N4O4S	542,7	542	543
	131	C31H43N4O4Cl	571,2	570	571
	132	C31H43N4O4Cl	571,2	570	571
25	133	C31H43N4O4F	554,7	554	555
	134	C25H37N4O3Cl	477,0	476	477
	135	C31H45N5O5	567,7	567	568
30	136	C34H45N5O4	587,8	587	588
	137	C28H41N5O4S	543,7	543	544
	138	C30H42N5O4Cl	572,1	571	572
35	139	C30H42N5O4Cl	572,1	571	572
	140	C30H42N5O4F	555,7	555	556
	141	C32H44N4O5	564,7	564	565
40	142	C35H44N4O4	584,7	584	585
	143	C29H40N4O4S	540,7	540	541
	144	C31H41N4O4Cl	569,1	568	569
45	145	C31H41N4O4Cl	569,1	568	569
	146	C31H41N4O4F	552,7	552	553
	147	C31H43N5O5	565,7	565	566
50	148	C34H43N5O4	585,7	585	586
	149	C30H40N5O4Cl	570,1	569	570
	150	C30H40N5O4Cl	570,1	569	570
55	151	C30H40N5O4F	553,7	553	554
	152	C29H41N5O5	539,7	539	540
60	153	C32H41N5O4	559,7	559	560

65

ES 2 338 789 T3

(continuación)					
	Fórmula Molecular	Peso Molecular (calculado)	Masa Monoisotópica	M+H Encontrado	
5	154	C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₄ S	515,7	515	516
	155	C ₂₈ H ₃₈ N ₅ O ₄ Cl	544,1	543	544
10	156	C ₂₈ H ₃₈ N ₅ O ₄ Cl	544,1	543	544
	157	C ₂₈ H ₃₈ N ₅ O ₄ F	527,6	527	528
	158	C ₂₇ H ₃₇ N ₆ O ₄ Cl	545,1	544	545
15	159	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₅	552,7	552	553
	160	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₅	552,7	552	553
20	161	C ₃₁ H ₄₅ N ₅ O ₄	551,7	551	552
	162	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₄	536,7	536	537
	163	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₄	536,7	536	537
25	164	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₄	536,7	536	537
	165	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₅	552,7	552	553
	166	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₅	552,7	552	553
30	167	C ₃₂ H ₄₂ N ₄ O ₄ S	578,8	578	579
	168	C ₂₈ H ₄₀ N ₄ O ₄ S	528,7	528	529
	169	C ₃₁ H ₄₃ N ₄ O ₄ Cl	571,2	570	571
35	170	C ₃₀ H ₄₀ N ₄ O ₄ Cl ₂	591,6	590	591
	171	C ₃₀ H ₄₀ N ₄ O ₄ F ₂	558,7	558	559
	172	C ₃₂ H ₄₆ N ₄ O ₆	582,7	582	583
40	173	C ₃₄ H ₄₃ N ₃ O ₅	573,7	573	574
	174	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₆	553,7	553	554
	175	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₅	552,7	552	553
45	176	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₅	552,7	552	553
	177	C ₂₉ H ₄₀ N ₄ O ₅	524,7	524	525
	178	C ₂₉ H ₄₀ N ₄ O ₆	540,7	540	541
50	179	C ₃₂ H ₄₀ N ₄ O ₅	560,7	560	561
	180	C ₂₆ H ₃₆ N ₄ O ₅ S	516,7	516	517
	181	C ₂₈ H ₃₇ N ₄ O ₅ Cl	545,1	544	545
55	182	C ₂₈ H ₃₇ N ₄ O ₅ Cl	545,1	544	545
	183	C ₂₈ H ₃₇ N ₄ O ₅ F	528,6	528	529
60	184	C ₃₁ H ₄₀ N ₆ O ₄	560,7	560	561

65

ES 2 338 789 T3

(continuación)					
	Fórmula Molecular	Peso Molecular (calculado)	Masa Monoisotópica	M+H Encontrado	
5	185	C27H37N6O4Cl	545,1	544	545
	186	C31H40N6O5	576,7	576	577
10	187	C31H41N4O4F3	590,7	590	591
	188	C30H41N4O4F	540,7	540	541
	189	C30H41N5O6	567,7	567	568
15	190	C33H42N4O4S	590,8	590	591
	191	C32H44N4O5	564,7	564	565
	192	C31H40N4O4Cl2	603,6	602	603
20	193	C31H40N4O4F2	570,7	570	571
	194	C32H48N6O6	612,8	612	613
	195	C32H46N4O5	566,7	566	567
25	196	C32H43N6O4Cl	611,2	610	611
	197	C32H45N6O5Cl	629,2	628	629
	198	C32H43N4O4Cl	583,2	582	583
30	199	C27H39N4O6Cl	551,1	550	551
	200	C31H39N4O4Cl	567,1	566	567
35	201	C34H42N4O4	570,7	570	571
	202	C31H42N4O5	550,7	550	551
	203	C30H40N5O5Cl	586,1	585	586
40	204	C29H40N7O4Cl	586,1	585	586
	205	C32H45N4O4Cl	585,2	584	585
	206	C29H40N5O6SCl	622,2	621	622
45	207	C29H39N6O5Cl	587,1	586	587
	208	C29H41N7O5	567,7	567	568
	209	C30H41N5O6	567,7	567	568
50	210	C31H45N5O5	567,7	567	568
	211	C30H42N5O4Cl	572,1	571	572
	212	C31H44N5O4Cl	586,2	585	586
55	213	C30H40N4O5I2	790,5	790	791
	214	C30H42N4O6	554,7	554	555
60	215	C30H43N5O5	553,7	553	554

65

ES 2 338 789 T3

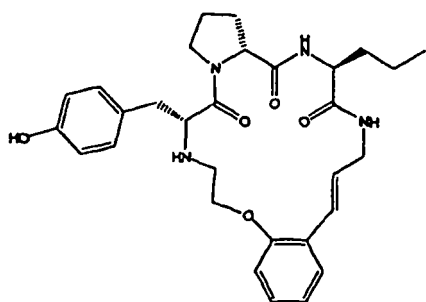
(continuación)					
	Fórmula Molecular	Peso Molecular (calculado)	Masa Monoisotópica	M+H Encontrado	
5	216	C32H43N4O4Cl	583,2	582	583
	217	C31H40N4O4FCl	587,1	586	587
10	218	C31H43N4O4Cl	571,2	570	571
	219	C30H40N4O4Cl2	591,6	590	591
15	220	C31H43N4O4F	554,7	554	555
	221	C30H40N4O4FCl	575,1	574	575
	222	C34H50N4O5	594,8	594	595
20	223	C32H44N4O6	580,7	580	581
	224	C36H48N4O4	600,8	600	601
	225	C37H48N4O5	628,8	628	629
25	226	C39H49N5O4S	683,9	683	684
	227	C42H52N4O4	676,9	676	677
<u>Notas</u>					
30	1. Las fórmulas moleculares y los pesos moleculares (PM) se calculan automáticamente a partir de la estructura mediante el software ActivityBase (IDBS, Guildford, Surrey, Reino Unido) o, sólo para el PM, a partir del programa de dominio público Molecular Weight Calculator v. 6.32				
35	2. M+H obtenido a partir del análisis por CL-EM usando el Procedimiento General descrito				
40	3. Todos los análisis realizados sobre el material después de la purificación por HPLC preparativa				

Procedimientos biológicos y resultados

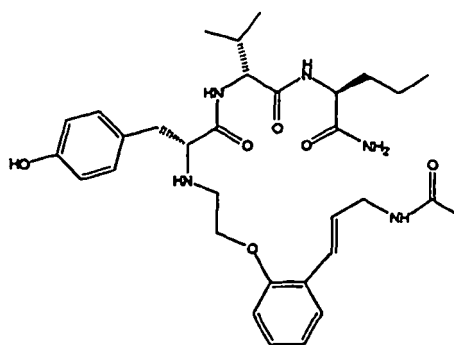
45 Los compuestos de la presente invención se evaluaron con respecto a su capacidad de interactuar en el receptor de motilina humano utilizando un ensayo competitivo de unión a radioligando como se describe en el Procedimiento B1. Puede realizarse una caracterización adicional de la interacción utilizando los ensayos funcionales descritos en los Procedimientos B2, B3 y B4. Algunos de estos procedimientos pueden realizarse, si se desea, en un modo de alto rendimiento para permitir la evaluación simultánea de muchos compuestos. También se han descrito otros ensayos que son adecuados para HTS, tales como los basados en la expresión estable de un gen sintético para el receptor de motilina humano.

55 En la Tabla 3 se presentan resultados del examen de compuestos representativos de la presente invención usando el Procedimiento B1. La actividad de unión se presenta como intervalos con los siguientes niveles: A = 0,001-0,10 μ M; B = 0,10-1,0 μ M; C = 1,0-10,0 μ M. Además, más adelante se muestran los resultados del ensayo de dos compuestos adicionales usando este Procedimiento. Como puede observarse, esto demuestra la actividad de un compuesto bicíclico representativo de Fórmula IV de la invención, que se obtuvo como resultado de la incorporación de D-prolina como segundo bloque constituyente de reconocimiento. Significativamente, la ausencia de actividad de unión obtenida con el compuesto 121, que es el análogo lineal del compuesto 1 (K_i = nivel B), ilustra la importancia crítica de la estructura cíclica para conseguir la interacción deseada.

65

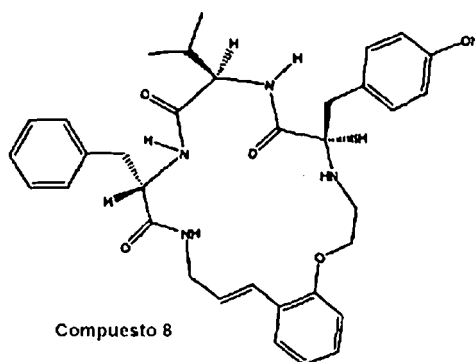
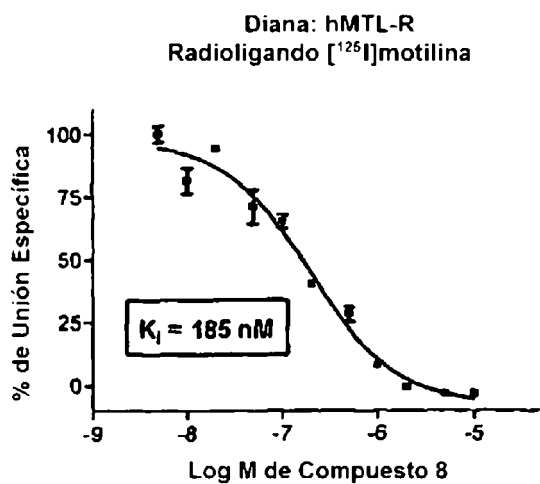


Compuesto 120
K_i = nivel B

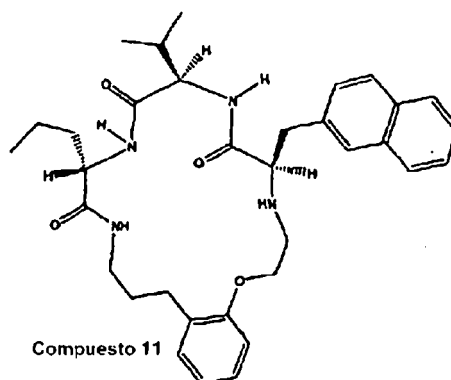
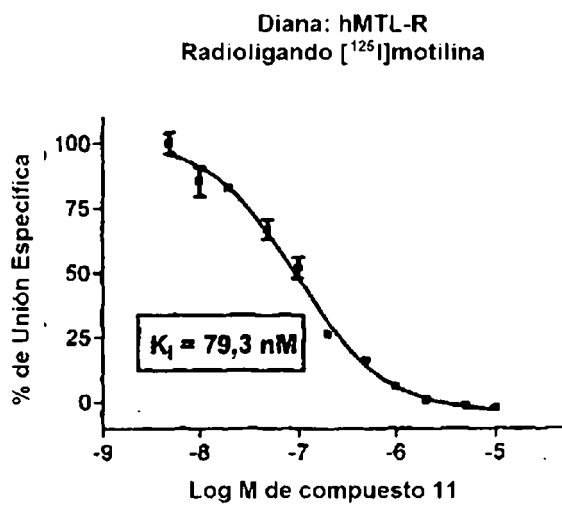


Compuesto 121
K_i > 10 μM

A continuación se presentan en la presente memoria curvas de unión competitiva para dos compuestos representativos de la invención (Compuestos 8 y 11):



Compuesto 8



Compuesto 11

ES 2 338 789 T3

Para la determinación del significado funcional de la unión, los compuestos preferentemente se ensayan en el ensayo de Aequerina como se describe en el Procedimiento B2, aunque también es aplicable el procedimiento del Procedimiento B3. Como puede verse en los datos presentados en la Tabla 4, los compuestos representativos examinados actúan como antagonistas en el receptor de motilina y carecen de actividad agonista a las concentraciones estudiadas. La actividad funcional se presenta como intervalos con los siguientes niveles: A = 0,001-0,10 μM ; B = 0,10-1,0 μM . La mayor sensibilidad del ensayo del Procedimiento B2, casi 100 veces mayor que la del Procedimiento C, hace que sea el preferido para esta evaluación. Esto es evidente en los valores de CE_{50} obtenidos en cada uno para el patrón de agonista positivo motilina. Además, el Procedimiento B2 mide el acontecimiento de señalización real, lo que hace que sea más relevante para el efecto que se desea, mientras que el ensayo del Procedimiento B3 simplemente mide la renovación de GTP.

TABLA 4

Demostración de Actividad Antagonista en el Receptor de Motilina

	Aequerina (Procedimiento B2) ¹	
Compuesto	Unión (K_i)	CI_{50}
142	A	B
149	A	B
167	A	A
168	A	A
212	A	A
Motilina (humana, porcina) ²	0,6	no aplicable
¹ La actividad se presenta como intervalos con los siguientes niveles: A = 0,001-0,10 μM ; B = 0,10-1,0 μM ² La motilina humana y porcina son el mismo péptido.		

Además, un ensayo *ex vivo* común y aceptado científicamente para la medición de la actividad agonista o antagonista en el receptor de motilina es la contracción de duodeno de conejo u otro tejido de músculo liso gastrointestinal. Los agonistas se definen como compuestos que inducen una contracción >50% con respecto al péptido motilina, mientras que los antagonistas se definen como compuestos que producen una inhibición >50% de la respuesta a la motilina. Los compuestos de la presente invención han mostrado una actividad antagonista significativa en este ensayo. Por ejemplo, el compuesto 144 presentó un valor de $\text{pA}_2 = 6,95$, mientras que el compuesto 165 tenía un valor de $\text{pA}_2 = 7,17$, calculado a partir de los gráficos de Schild de la respuesta obtenida a diversas concentraciones como se describe en el Procedimiento B4.

La motilidad gástrica generalmente se mide en situación clínica como el tiempo necesario para el vaciado gástrico y el tiempo de tránsito posterior a través del tracto GI. Los exámenes de vaciado gástrico son bien conocidos para los expertos en la materia y, en resumen, comprenden el uso de un agente de contraste oral, tal como bario, o un metal radiomarcado. Los sólidos y los líquidos pueden medirse independientemente.

Un alimento o líquido de ensayo se radiomarca con un isótopo ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) y, después de la ingestión o administración, se mide el tiempo de tránsito a través del tracto GI y el vaciado gástrico con visualización usando cámaras gama. Estos estudios se realizan antes y después de la administración del agente terapéutico para cuantificar la eficacia del compuesto.

Ejemplo de Procedimiento B1

Ensayo Competitivo de Unión a Radioligando (Receptor de Motilina)

Materiales

- Se prepararon membranas a partir de células CHO transfectadas de forma estable con el receptor de motilina humano y se utilizaron en una cantidad de 1,5 μg /punto de ensayo [PerkinElmer™ SignalScreen Product n° 6110544]

ES 2 338 789 T3

- [¹²⁵I]-Motilina (PerkinElmer, n° NEX-378); concentración final: 0,04-0,06 nM
- Motilina (Bachem™, n° H-4385); concentración final: 1 μM
- 5 • Placas Multiscreen Harvest-GF/B (Millipore™, n° MAHFB1H60)
- Placa de titulación de polipropileno de pocillos profundos (Beckman Coulter™, n° 267006)
- 10 • TopSeal-A (PerkinElmer, n° 6005185)
- Sellado inferior (Millipore, n° MATAH0P00)
- MicroScint-0 (PerkinElmer, n° 6013611)
- 15 • Tampón de Unión: Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,1%

Volúmenes de Ensayo

- 20 • 150 μl de membranas diluidas en tampón de unión
- 10 μl de compuesto diluido en tampón de unión
- 25 • 10 μl de radioligando ([¹²⁵I]-Motilina) diluido en tampón de unión

Concentraciones de Ensayo Finales (N=11) para los Compuestos:

10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005 μM.

30

Manipulación de los Compuestos

35 Los compuestos se proporcionaron congelados en hielo seco a una concentración de solución madre de 10 mM diluidos en DMSO al 100% y se almacenaron a -20°C hasta el día del ensayo. El día del ensayo, los compuestos se dejaron descongelar a temperatura ambiente y después se diluyeron en tampón de ensayo de acuerdo con las concentraciones de ensayo deseadas. En estas condiciones, la concentración final máxima de DMSO en el ensayo fue del 0,5%.

Protocolo de Ensayo

40 En placas de pocillos profundos, se combinan membranas celulares diluidas (1,5 μg/ml) con 10 μl de tampón de unión (unión total, N=5), motilina 1 μM (unión no específica, N=3) o la concentración apropiada de compuesto de ensayo. La reacción se inicia por la adición de 10 μl de [¹²⁵I]-motilina (concentración final 0,04-0,06 nM) a cada pocillo. Las placas se cierran herméticamente con TopSeal-A, se someten a agitación vorticial suave y se incuban a 45 temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se detiene filtrando las muestras a través de placas Multiscreen Harvest prehumedecidas (polietilénimina al 0,3%, 2 h) usando un Tomtec Harvester, las muestras se lavan 9 veces con 500 μl de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) frío y después las placas se secan al aire en una campana de extracción de vapores durante 30 minutos. Se aplica un sellado inferior a las placas antes de la adición de 25 μl de MicroScint-0 a 50 cada pocillo. Las placas después se cierran herméticamente con TopSeal-A y se someten a un recuento durante 30 seg. por pocillo en un Contador de Centelleo y Luminiscencia TopCount Microplate (PerkinElmer) en el que los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm).

55 Los datos se analizan por GraphPad™ Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) usando un análisis de regresión no lineal de pendiente variable. Los valores de K_i se calcularon usando un valor de K_d de 0,16 nM para [¹²⁵I]-motilina (determinado previamente durante la caracterización de la membrana).

$$60 \quad D_{\max} = 1 - \frac{\text{concentración de ensayo con desplazamiento máximo} - \text{unión no específica}}{\text{unión total} - \text{unión no específica}} \times 100$$

65 en la que la unión total y no específica representan las cpm obtenidas en ausencia o presencia de motilina 1 μM, respectivamente.

ES 2 338 789 T3

Ejemplo de Procedimiento B2

Ensayo Funcional de Aequorina (Receptor de Motilina)

5 *Materiales*

• Se prepararon membranas usando líneas celulares de AequScreen™ (EUROSCREEN, Bélgica) que expresan el receptor de motilina humano (línea celular ES-380-A; receptor con n° de acceso AF034632). Esta línea celular se construye por transfección del receptor de motilina humano en células CHO-K1 que coexpresan G_{α16} y la Aequorina dirigido mitocondrialmente (n° de Ref ES-WT-A5).

- Motilina (Bachem, n° H-4385)
- Tampón de ensayo: DMEM-F12 (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) con HEPES 15 mM y BSA al 0,1% (pH 7,0)
- Coelenterazina (Molecular Probes™, Leiden, Los Países Bajos)
- Concentraciones de Ensayo Finales (N=5) para los Compuestos:

20 10, 3,16, 1, 0,316, 0,1 μM.

25 *Manipulación de los Compuestos*

Los compuestos se proporcionaron como películas secas en una cantidad de aproximadamente 1,2 μmol en placas de 96 pocillos formateadas previamente. Los compuestos se disolvieron en DMSO al 100% a una concentración de 10 mM y se almacenaron a -20°C hasta el uso adicional. Las placas hijas se prepararon a una concentración de 500 μM en DMSO al 30% con BSA al 0,1% y se almacenaron a -20°C hasta el ensayo. El día del ensayo, los compuestos se dejaron descongela a temperatura ambiente y después se diluyeron en tampón de ensayo de acuerdo con las concentraciones de ensayo deseadas. En estas condiciones, la concentración máxima final de DMSO en el ensayo fue del 0,6%.

35 *Preparación de las Células*

Las células se recogen a partir de placas de cultivo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ suplementada con EDTA 5 mM, se sedimentan durante 2 minutos a 1000 x g, se resuspenden en tampón de ensayo (véase anteriormente) a una densidad de 5 x 10⁶ células/ml y se incuban durante una noche en presencia de coelenterazina 5 μM. Después de la carga, las células se diluyeron con tampón de ensayo a una concentración de 5 x 10⁵ células/ml.

45 *Protocolo de Ensayo*

Para el ensayo de agonista, se mezclaron 50 μl de la suspensión celular con 50 μl de la concentración apropiada de compuesto de ensayo o motilina (agonista de referencia) en placas de 96 pocillos (muestras por duplicado). La emisión de luz resultante de la activación de los receptores se registró usando el Functional Drug Screening System 6000 'FDSS 6000' (Hamamatsu Photonics K. K., Japón).

50 Para el ensayo de antagonista, se inyectó una concentración CE80 aproximada de motilina (es decir 0,5 nM; 100 μl) sobre la suspensión celular que contenía los compuestos de ensayo (muestras por duplicado) 15-30 minutos después de finalizar el ensayo de agonista y se midió la emisión posterior de luz resultante de la activación de los receptores como se describe en el párrafo anterior.

55 Los resultados se expresan como unidades relativas de luz (URL). Las curvas de concentración-respuesta se analizaron usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) por análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea) basándose en la ecuación $E = E_{max} / (1 + CE_{50} / C)^n$ en la que E es el valor de URL medido a una concentración dada de agonista (C), E_{max} es la respuesta máxima, CE₅₀ es la concentración que produce un 50% de estimulación y n es el índice de pendiente. Para el ensayo de agonista, los resultados para cada concentración de compuesto de ensayo se expresaron como porcentaje de activación con respecto a la señal inducida por motilina a una concentración igual a la CE₈₀ (es decir 0,5 nM). Para el ensayo de antagonista, los resultados para cada concentración de compuesto de ensayo se expresaron como porcentaje de inhibición con respecto a la señal inducida por motilina a una concentración igual a la CE₈₀ (es decir 0,5 nM).

65

ES 2 338 789 T3

Ejemplo de Procedimiento B3

Ensayo Funcional de Motilina [³⁵S]-GTPγS FlashPlate

5 *Materiales*

• Se prepararon membranas a partir de células CHO transfectadas de forma estable con el receptor de motilina humano y se utilizaron en una cantidad de 1,5 μg/punto de ensayo.

10 [PerkinElmer SignalScreen Product n° 6110544]

• GTPγS (Sigma, n° G-8634)

• [³⁵S]-GTPγS (PerkinElmer, n° NEX-030H)

15

• Motilina (Bachem, n° H-4385)

• Microplacas FlashPlate de 96 pocillos (PerkinElmer, n° SMP200)

20

• Placa de titulación de polipropileno de pocillos profundos (Beckman Coulter, n° 267006)

• TopSeal-A (PerkinElmer, n° 6005185)

25

• Tampón de Ensayo: Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, GDP 1 μM, BSA al 0,1%

Volúmenes de Ensayo

30

• 25 μl de compuesto diluido en tampón de ensayo

• 25 μl de tampón de ensayo (ensayo de agonista) o motilina 0,6 μM (concentración final 0,1 μM) diluida en tampón de ensayo (ensayo de antagonista)

35

• 100 μl de [³⁵S]-GTPγS diluido en tampón de ensayo

Concentraciones de Ensayo Finales (N=12) para los Compuestos

50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 μM.

40

Manipulación de los Compuestos

45

Los compuestos se proporcionaron congelados en hielo seco a una concentración de solución madre de 10 mM diluidos en DMSO al 100% y se almacenaron a -20°C hasta el día del ensayo. El día del ensayo, los compuestos se dejaron descongelar a temperatura ambiente y después se diluyeron en tampón de ensayo de acuerdo con las concentraciones de ensayo deseadas. En estas condiciones, la concentración final máxima de DMSO en el ensayo fue del 0,5%.

50

Protocolo de Ensayo

Se inmovilizaron membranas CHO en microplacas FlashPlate de 96 pocillos. Se combinaron compuesto de ensayo, GTPγS, motilina y [³⁵S]-GTPγS en cada pocillo de acuerdo con los volúmenes de ensayo descritos anteriormente.

55

Para el ensayo para medir la actividad agonista, se añadieron 25 μl más de tampón a cada pocillo además de 25 μl de tampón (valor basal N=4), motilina 1 μM (concentración final) (valor de E_{max}, N=3), GTPγS 25 μM (concentración final) (valor no específico, N=4), o la concentración apropiada de compuesto de ensayo (N=3).

60

Para el ensayo para medir la actividad antagonista, se añaden 25 μl más de tampón (control no estimulado) o motilina (concentración final 0,1 μM) a cada pocillo, además de 25 μl de tampón (valor basal, N=3), motilina 1 μM (concentración final) (valor de E_{max}, N=3), GTPγS 25 μM (concentración final) (valor no específico, N=4) o la concentración apropiada de compuesto de ensayo (N=3).

65

La reacción se inicia por la adición de 100 ml de [³⁵S]-GTPγS a cada pocillo. Cada placa se cierra herméticamente (TopSeal-A) y se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 150 minutos. Después, las placas se someten a un recuento durante 30 segundos por pocillo en el TopCount NXT.

ES 2 338 789 T3

Los datos se analizaron por GraphPad Prism 3,0 (GraphPad Software, San Diego, CA) usando un análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea) para el cálculo de los valores de CI_{50}/CE_{50} .

5

$$E_{\max}(\text{agonista}) \text{ o } D_{\max}(\text{antagonista}) = \frac{\text{Superior} - \text{Inferior}}{\text{Inferior}} \times 100$$

10

en la que Superior e Inferior corresponden a los valores superior e inferior de la curva de dosis-respuesta calculada por GraphPad Prism.

15

Ejemplo de Procedimiento B4

Ensayo de Contractilidad de Duodeno de Conejo

20

Se suspendieron verticalmente segmentos duodenales en cámaras de órganos de 10 ml rellenas con tampón de Krebs y conectadas a un transductor de fuerza isotónica, con una precarga de 1 g. Después de un periodo de estabilización, las tiras de músculo se expusieron a acetilcolina 10^{-4} M y se lavaron. Esto se repitió hasta que se obtuvo una contracción máxima estable (2-3 veces) con un intervalo de al menos 20 minutos.

25

Después de alcanzar un valor basal estable, los compuestos de ensayo se añadieron al baño. Después de una incubación de 15 minutos, se registró una curva de dosis-respuesta a la motilina añadiendo concentraciones crecientes logarítmicamente de motilina al baño (concentración final de 10^{-9} a 10^{-6} M). También se realizó un experimento blanco (sin que estuviera presente compuesto de ensayo). Al final de la curva de dosis-respuesta se administró una dosis supramáxima de acetilcolina (10^{-4} M) y esta respuesta se usó como referencia (contracción del 100%).

30

Los resultados de los experimentos a diferentes concentraciones de compuesto de ensayo se combinaron y analizaron para obtener el valor de pA_2 a partir del gráfico de Schild.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55




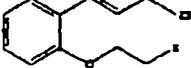
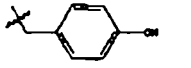
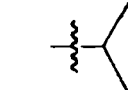
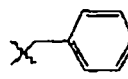
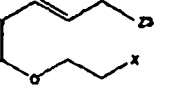
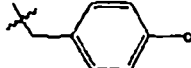
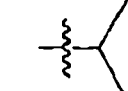
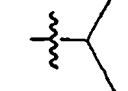
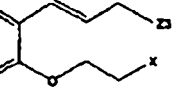
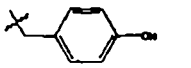
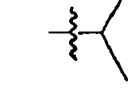
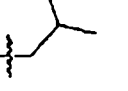
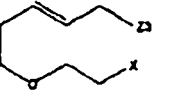
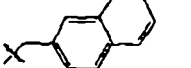
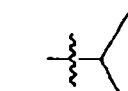
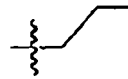
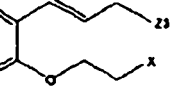

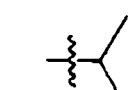
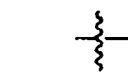
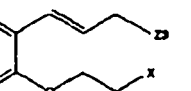
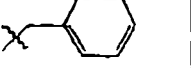
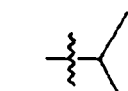
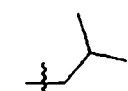
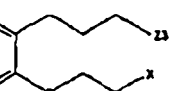
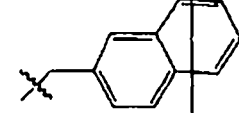
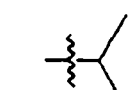
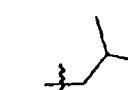
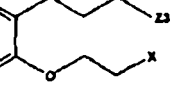
60

65

TABLA 3

Actividad de Unión de los Compuestos Seleccionados

	F_R	R_3	R_4	T	$K_1^{1,2}$
1					B
2					A
3					B
4					A
5		CH3			B
6					B

5	7					B
10	8					B
15	9					B
20	10					A
25	11					A
30	12					B
35	13					B
40	14					B

65

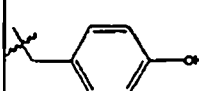

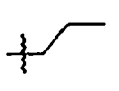
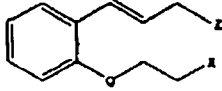
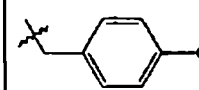


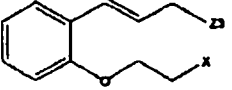
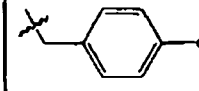

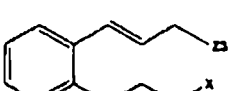
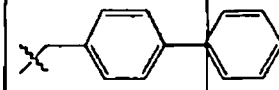

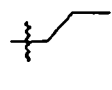
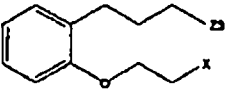
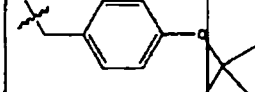

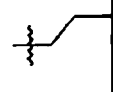
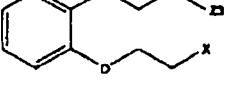
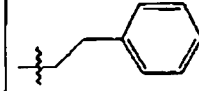

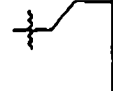
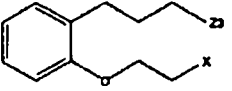
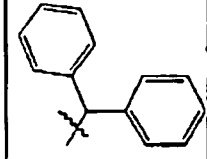
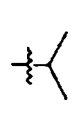
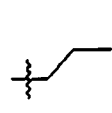
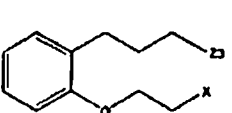
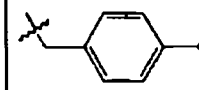
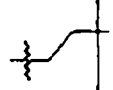
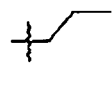
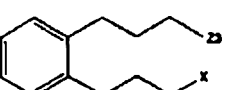
5	15					A
10	16					A
15	17					B
20	18					B
25	19					A
30	20					B
35	21					A
40	22					A
45						
50						
55						
60						
65						

5	34				B	
10	38				C	
15	39				B	
20	40				C	
25	41					C
30	41				B	
35	52					B
40	55					B
45	56					B
50						
55						
60						

65

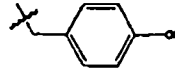
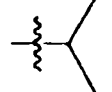
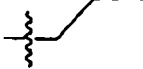
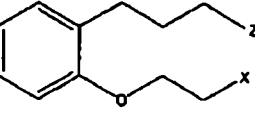
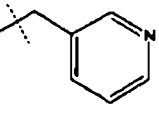
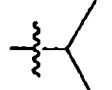
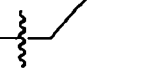
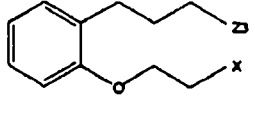
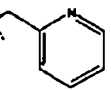
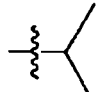
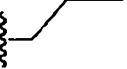
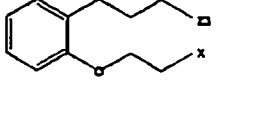
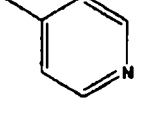
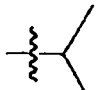
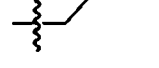
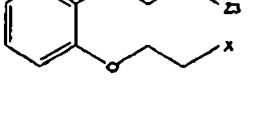
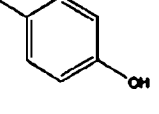
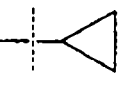

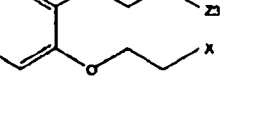
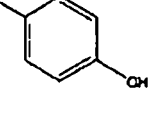
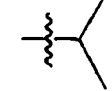
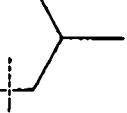
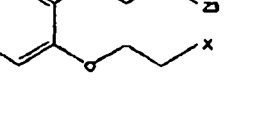
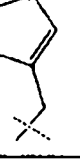
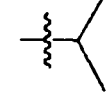
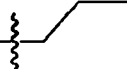
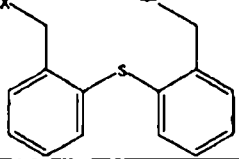
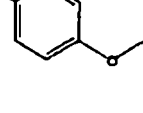
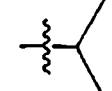
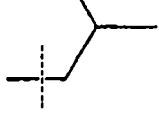
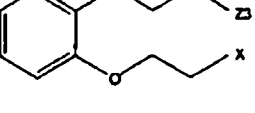
57					B 23
58					B
59					B
60					C
65					B
71					B
72					B
76					C

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

5	77					C
10	80					B
15	85			H		B
20	87					B
25	88					C
30	89					C
35	90					C
40	91					C
45						
50						
55						
60						

65

5	92					B
10	96		H			C
15	97					C
20	98					C
25	99					C
30	109					B
35	110					B
40	111					B
45						
50						
55						
60						
65						

112					B
122					B
123					B
124					B
125					B
126					B
127					B
128					B

129					A
130					B
131					A
132					A
133					A
134					C
135					B
136					B

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

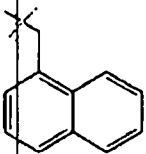
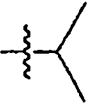
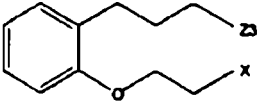
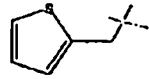
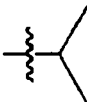
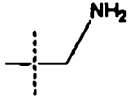
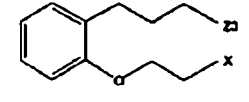
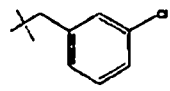
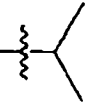
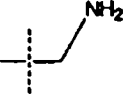
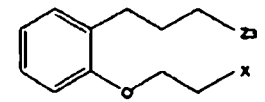
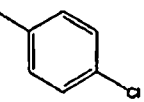
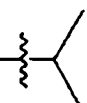
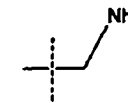
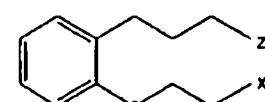
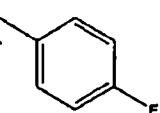
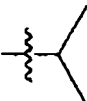
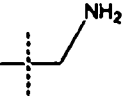
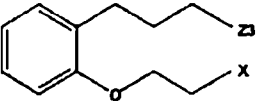
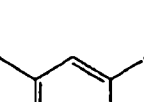
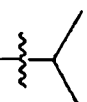
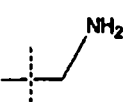
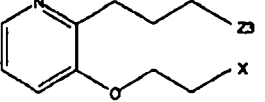
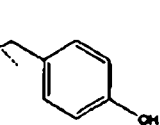
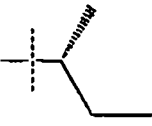
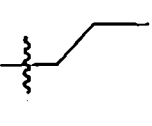
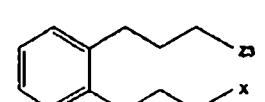
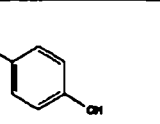
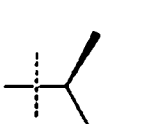
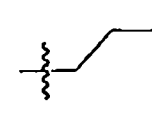
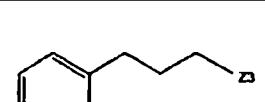
60

65

5	137					B
10	138					B
15	139					B
20	140					B
25	141					A
30	142					A
35	143					B
40	144					A
45						
50						
55						
60						
65						

5	145				A
10	146				A
15	147				B
20	148				B
25	149				A
30	150				B
35	151				B
40	152				B
45					
50					
55					
60					

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

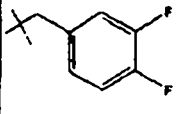
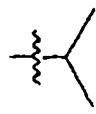
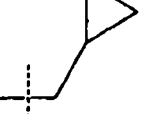
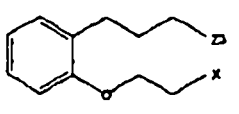
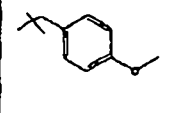
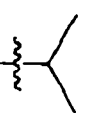
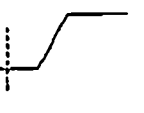
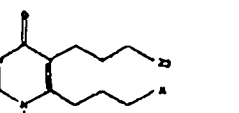
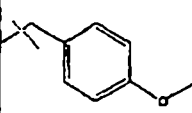
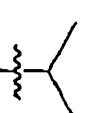
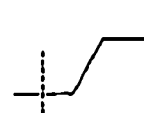
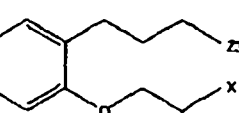
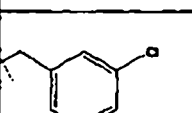
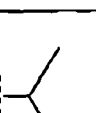

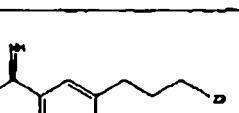
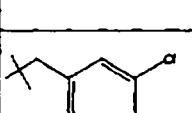
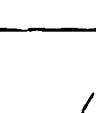
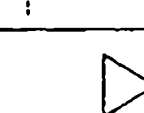
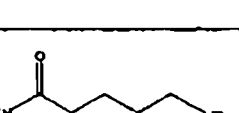
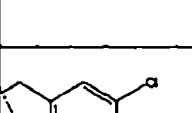
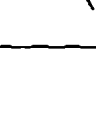
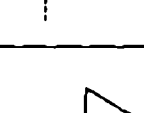
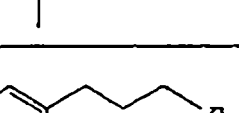
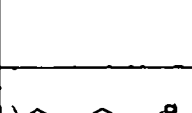
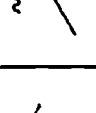

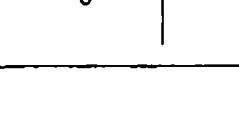




153					B
154					B
155					A
156					A
167					B
158					A
159					B
160					B

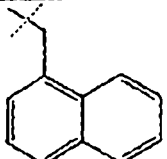
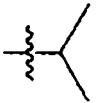

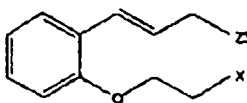
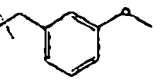
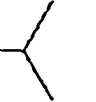
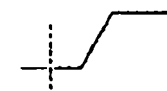
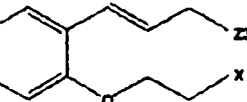
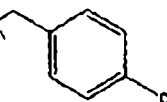
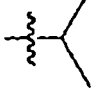
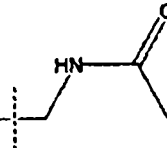
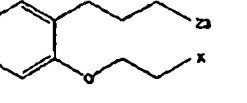
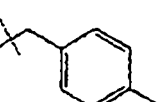
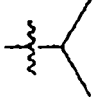
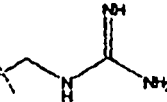
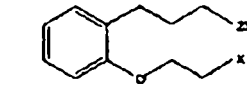
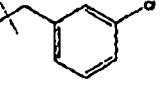
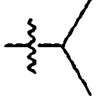
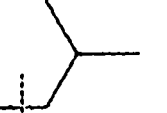
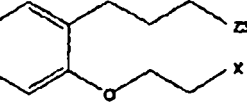
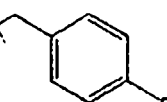
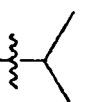
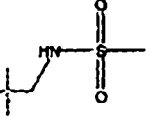
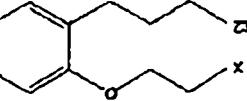
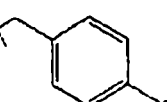
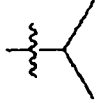
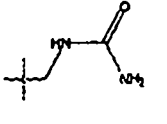
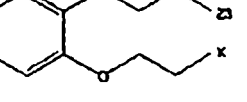
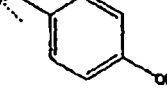
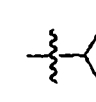
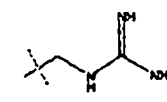
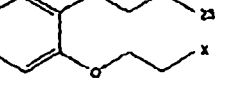
5	161					B
10	162					B
15	163					A
20	164					B
25	165					A
30	166					B
35	167					A
40	168					A
45						
50						
55						
60						
65						

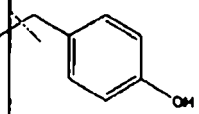
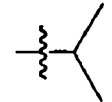
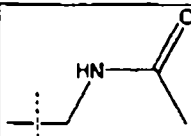
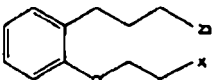
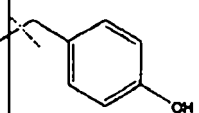
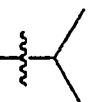
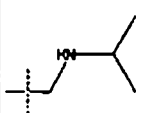
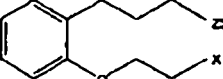
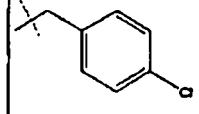
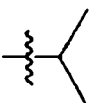
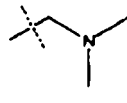
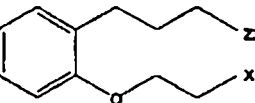
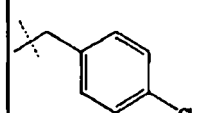
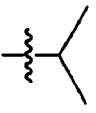
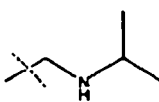
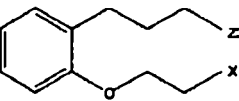
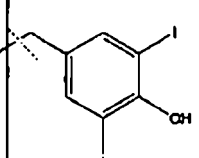
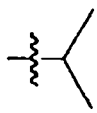
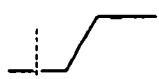
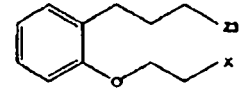
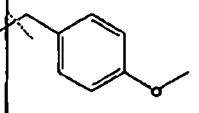
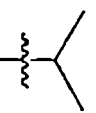
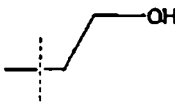
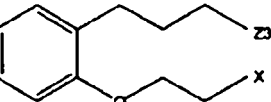
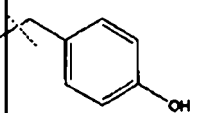
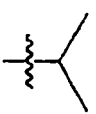
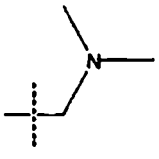
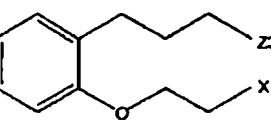
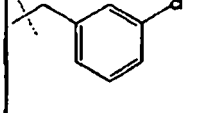
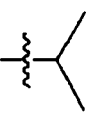
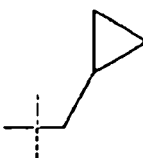
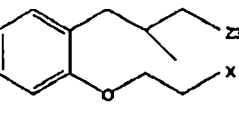
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

177					B
178					B
179					B
180					B
181					A
182					A
183					B
184					B

185					B
186					B
187					A
188					A
189					B
190					A
191					A
192					A

5	193					A
10	194					B
15	195					A
20	196					
25	197					
30	198					A
35	199					B
40	200					A
45						
50						
55						
60						

201					B
202					A
203					B
204					A
205					B
206					B
207					B
208					B

209					C
210					
211					A
212					A
213					B
214					B
215					B
216					A

5

10

15

20

25

30

35

40

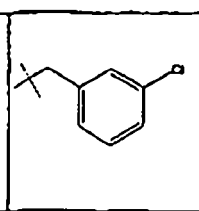
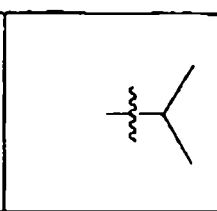
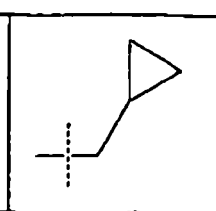
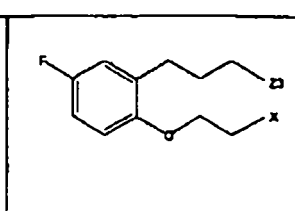
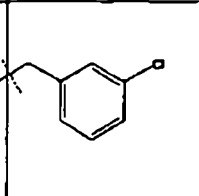
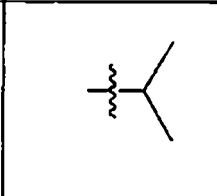
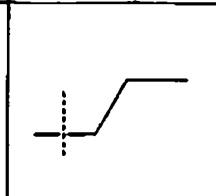
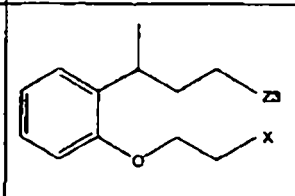
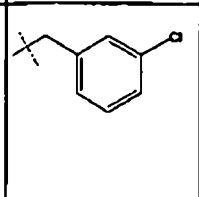
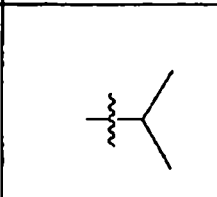
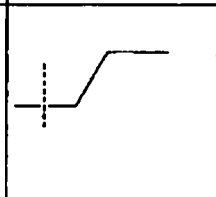
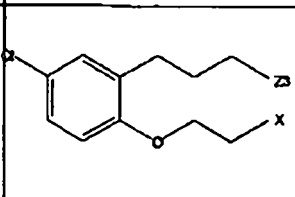
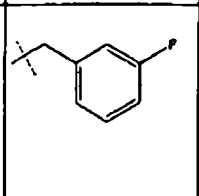
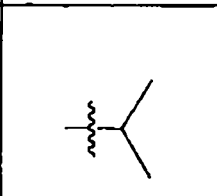
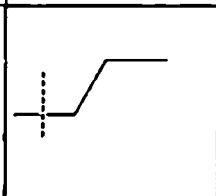
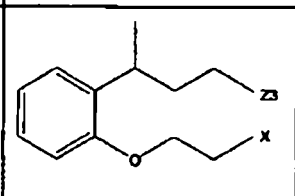
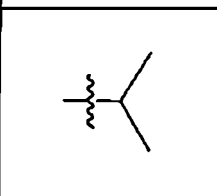
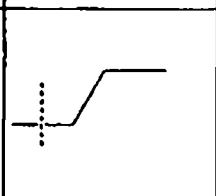
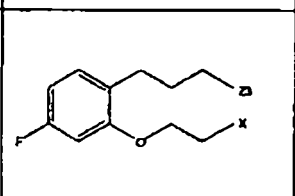
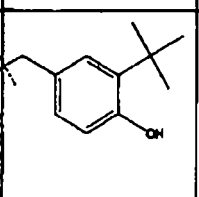
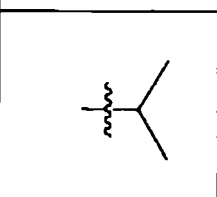
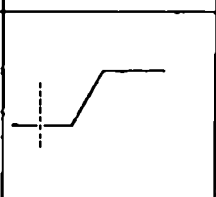
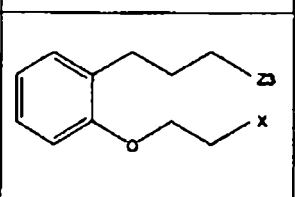
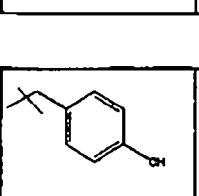
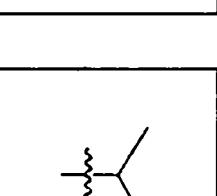
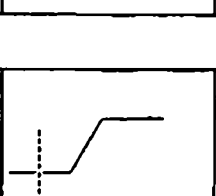
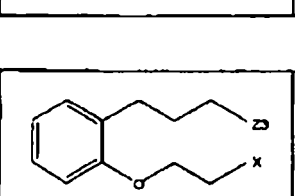
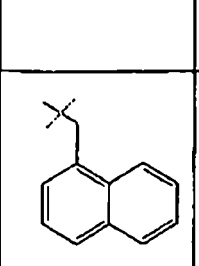
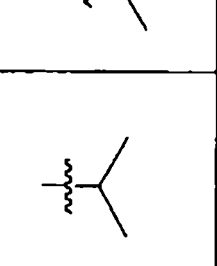
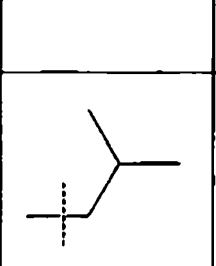
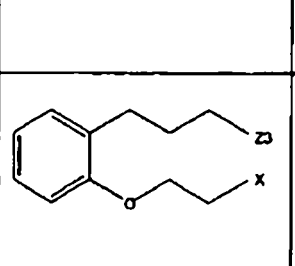
45

50

55

60

65

217					B
218					A
219					B
220					A
221					B
222					A
223					C
224					B

ES 2 338 789 T3

5	225					B
10	226					C
15	227					B
20						

Notas

25 Ensayos de unión competitiva a radioligando usando el Procedimiento B1

Valores indicados en forma de intervalos: A = 0,001-0,100 μM ; B = 0,100-1,0 μM ; C = 1,0-10,0 μM

X es NH excepto para:

30 Compuesto 223 y 225, X es:



40 Compuesto 224, X es NMe



50 Compuesto 226, X es:



60 Z_1 , Z_2 y Z_3 son H excepto para los compuestos 30, 173 y 174, en los que Z_1 es O y para el compuesto 111 en el que Z_2 es O.

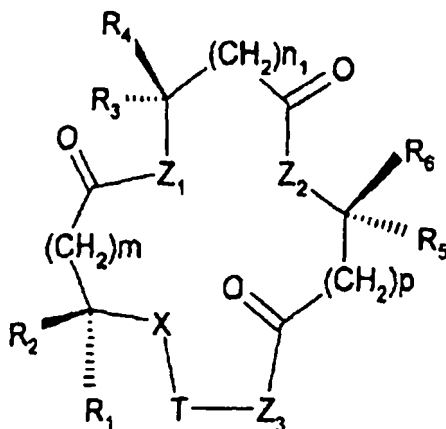
R_2 , R_4 y R_5 son hidrógeno excepto para el compuesto 65 en el que es:



m, n_1 y p son cero.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



seleccionado entre los compuestos de la Tabla 3 mostrada en la memoria descriptiva.

2. Un antagonista del receptor de motilina con una estructura como se define en la reivindicación 1.

3. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con el receptor de motilina o la disfunción de motilina.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para tratar un trastorno asociado con el receptor de motilina o la disfunción de motilina.

5. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con la hipermotilidad o hipermotilinemia.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para tratar un trastorno asociado con la hipermotilidad o hipermotilinemia.

7. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del síndrome del intestino irritable o la dispepsia.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para tratar el síndrome del intestino irritable o la dispepsia.

9. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, trastornos de reflujo gastroesofágico, colitis ulcerosa, pancreatitis, estenosis pilórica hipertrófica infantil, síndrome carcinoide, malabsorción, diarrea, diabetes mellitus, obesidad, colitis atrófica o gastritis, estasis gástrica, síndrome de evacuación gastrointestinal rápida, síndrome postgastroenterostomía, enfermedad celíaca y trastornos de la alimentación que conducen a obesidad.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para tratar la enfermedad de Crohn, trastornos de reflujo gastroesofágico, colitis ulcerosa, pancreatitis, estenosis pilórica hipertrófica infantil, síndrome carcinoide, malabsorción, diarrea, diabetes mellitus, obesidad, colitis atrófica o gastritis, estasis gástrica, síndrome de evacuación gastrointestinal rápida, síndrome postgastroenterostomía, enfermedad celíaca y trastornos de la alimentación que conducen a obesidad.

11. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéutico.

12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como un antagonista del receptor de motilina.

13. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para su uso como un antagonista del receptor de motilina.