



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 400**

51 Int. Cl.:
C07D 471/10 (2006.01)
A61K 31/438 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03813415 .1**
96 Fecha de presentación : **12.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1569933**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **Compuestos de pirrolidina y azetidina como antagonistas de CCR5.**

30 Prioridad: **13.12.2002 US 433372 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **SmithKline Beecham Corporation**
One Franklin Plaza
P.O. Box 7929
Philadelphia, Pennsylvania 19101, US

72 Inventor/es: **Yang, Hanbiao;**
Kazmierski, Wieslaw, Mieczyslaw y
Aquino, Christopher, Joseph

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Compuestos de pirrolidina y azetidina como antagonistas de CCR5.

El virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH") es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), una enfermedad que se caracteriza por la destrucción del sistema inmune, particularmente de las células T CD4⁺, con la consiguiente susceptibilidad para las infecciones oportunistas y su complejo precursor relacionado con el SIDA ("CRS"), un síndrome caracterizado por síntomas tales como linfadenopatía generalizada persistente, fiebre y pérdida de peso.

Además de CD4, el VIH necesita un correceptor para entrar en las células diana. Los receptores de quimiocinas funcionan junto con CD4 como correceptores para el VIH. Se ha identificado a los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5 como los principales correceptores para VIH-1. El CCR5 actúa como un correceptor principal para la fusión y entrada del VIH con tropismo para los macrófagos en las células del huésped. Se cree que estos receptores de quimiocinas desempeñan una función esencial en el establecimiento y la diseminación de una infección por VIH. Por consiguiente, se cree que los antagonistas de CCR5 son útiles como agentes activos terapéuticos contra el VIH.

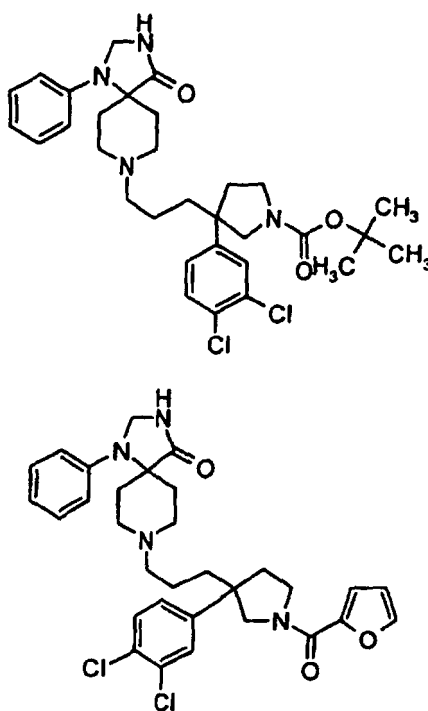
La Solicitud de Patente Internacional WO 94/26735 A1 describe pirrolidin-3-il-alquilo-piperidinas sustituidas, sus estereoisómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, procedimientos para producirlos y el uso de estos compuestos en actividades farmacológicas tales como el antagonismo de la taquicinina y su indicación para afecciones asociadas con la inflamación neurogénica y otras enfermedades.

La Solicitud de Patente Europea EP 1378510 A1 describe derivados de triazaspiro[5,5]undecano, sales de amonio cuaternario de los mismos, N-óxidos de los mismos y sales no tóxicas de los mismos, y composiciones farmacéuticas que los comprenden. Describe el uso de tales compuestos en la regulación del efecto de las quimiocinas/receptores de quimiocinas y su uso en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias.

Los inventores han descubierto actualmente una serie de compuestos no peptídicos de moléculas pequeñas que son útiles como inhibidores de la replicación del VIH.

La presente invención describe compuestos que son útiles en la inhibición de la replicación del VIH, en la prevención de la infección por VIH, en el tratamiento de la infección por VIH y en el tratamiento del SIDA y/o CRS, como sales farmacéuticamente aceptables o como ingredientes de composiciones farmacéuticas. La presente invención también describe el uso de los compuestos mencionados anteriormente en la elaboración de un medicamento para tratar el SIDA, para prevenir la infección por VIH y para tratar la infección por VIH como monoterapia o en combinación con otros antivirales, antiinfecciosos, inmunomoduladores, antibióticos o vacunas. La presente invención también describe composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos mencionados anteriormente que son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con CCR5. La presente invención también describe otros procedimientos para elaborar los compuestos mencionados anteriormente.

La presente invención incluye un compuesto o una sal del mismo seleccionados del grupo constituido por



5

10

15

20

25

30

35

40

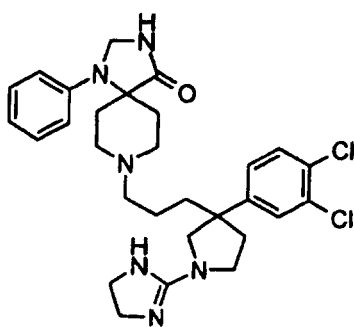
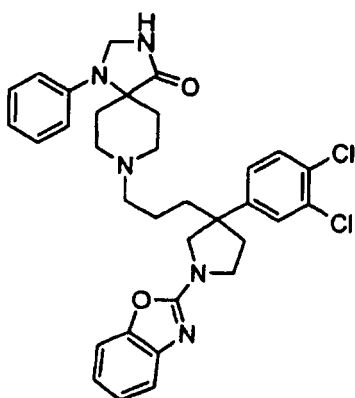
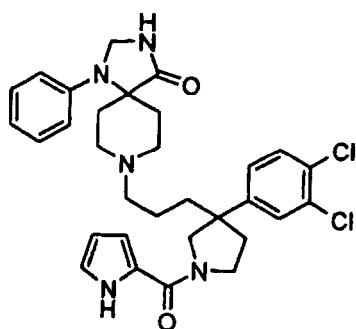
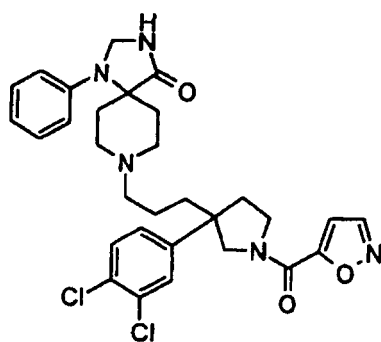
45

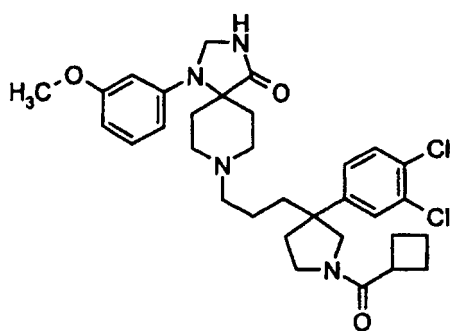
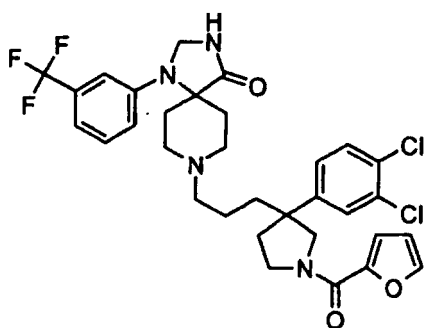
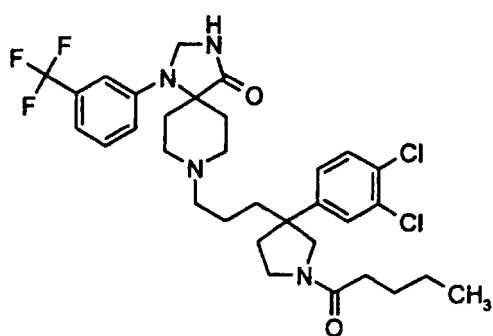
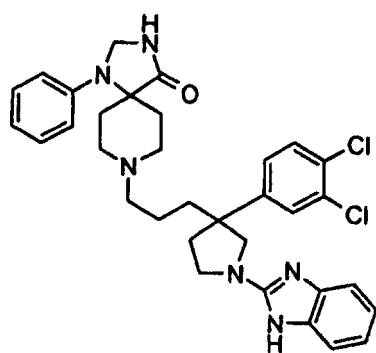
50

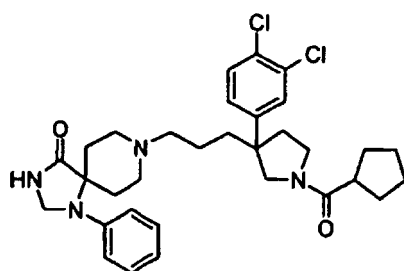
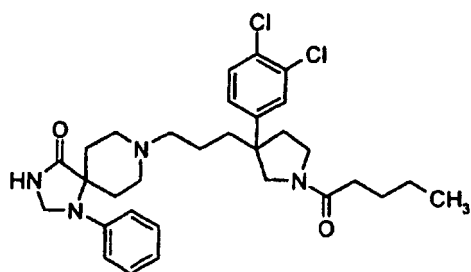
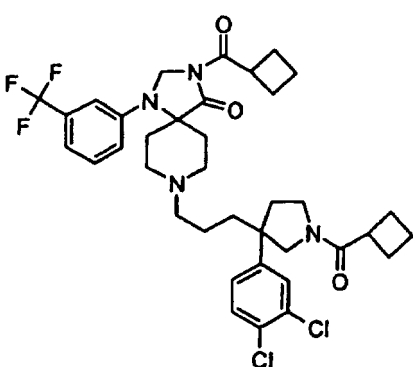
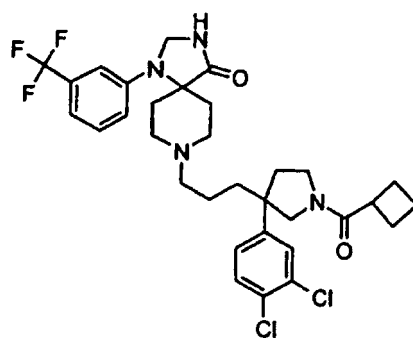
55

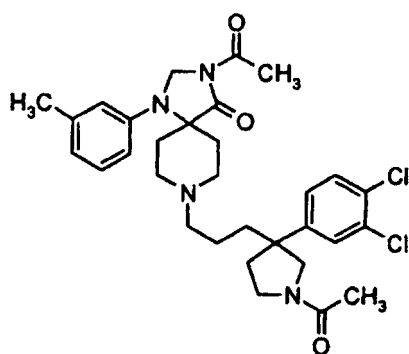
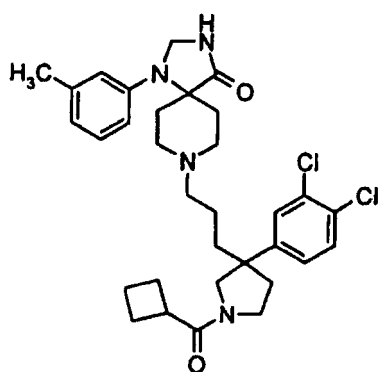
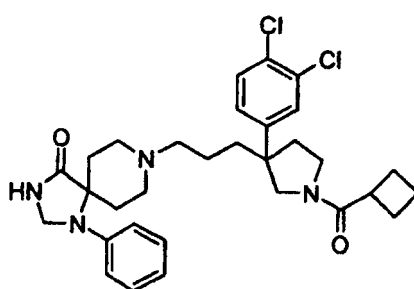
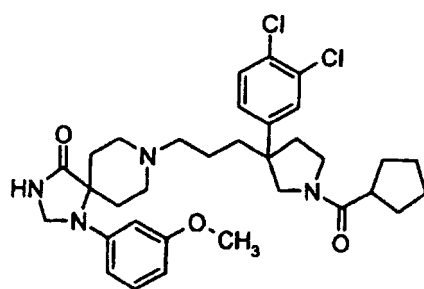
60

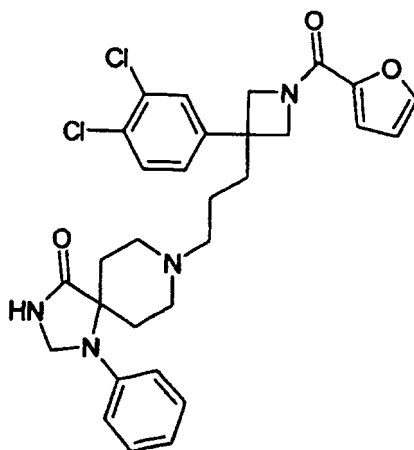
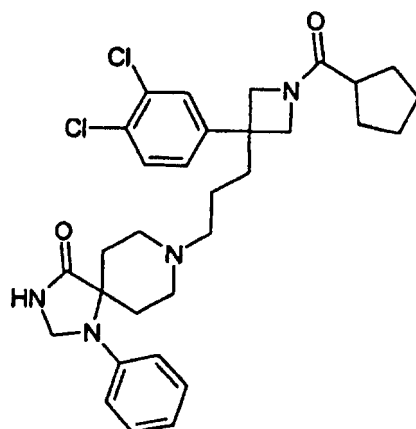
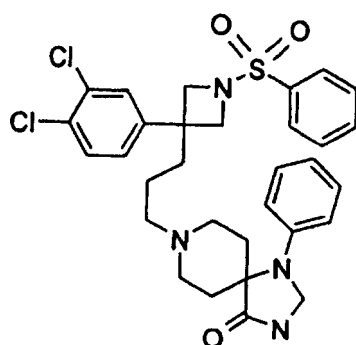
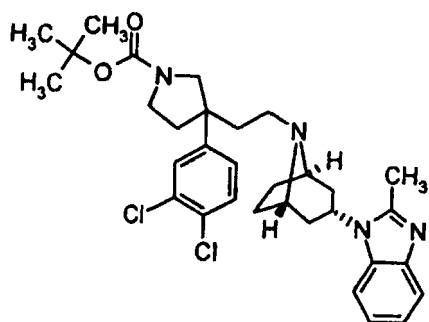
65











Otro aspecto de la presente invención incluye un compuesto de la presente invención para uso en terapia médica.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento (incluida la profilaxis) de una infección viral. De preferencia, la infección viral es una infección por VIH.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, incluida la profilaxis, de una infección bacteriana. De preferencia, la bacteria es *Yersinia pestis*.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, incluida la profilaxis, de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes autoinmune, el rechazo crónico de injertos, el asma, artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la enfermedad intestinal inflamatoria, la enfermedad inflamatoria crónica, la enfermedad glomerular, la nefritis sérica nefrotóxica, enfermedad renal, la enfermedad de Alzheimer, la encefalomiелitis autoinmune, la trombosis arterial, la rinitis alérgica, la arteriosclerosis, el síndrome de Sjogren (dermatomiositis), el lupus eritematoso sistémico, el rechazo de injertos, cánceres con infiltración leucocitaria de la piel u órganos, trastornos infecciosos incluidos la peste bubónica y la peste neumónica, la infección por el virus del papiloma humano, el cáncer de próstata, la cicatrización de heridas, la esclerosis amiotrófica lateral y trastornos inmunomediados.

Otro aspecto de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. De preferencia la composición farmacéutica está en la forma de un comprimido, una cápsula o un líquido.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de un medicamento, con otro agente terapéutico, para el tratamiento, incluida la prevención, de una infección viral en un mamífero. De preferencia la composición comprende uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo constituido por (1-alfa, 2-beta, 3-alfa)-9-[2,3-bis(hidroximetil)ciclobutil]guanina [(-)BHCG, SQ-34514, lobucavir], 9-[(2R,3R,4S)-3,4-bis(hidroximetil)-2-oxetanosil]adenina (oxetanocin-G), nucleósidos acíclicos, aciclovir, valaciclovir, famciclovir, ganciclovir, penciclovir, fosfonatos de nucleósidos acíclicos, (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil)ci-tosina (HPMPC), ácido [[2-(6-amino-9H-purin-9-il)etoxi]metil]fosfinilideno]bis(oximetileno)-2,2-dimetilpropanoi-co (bis-POM PMEA, adefovir dipivoxil), ácido [[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoxi]metil]fosfónico (teno-fovir), bis-(isopropoxycarboniloximetil) éster del ácido (R)-[[2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoxi]metil]fosfónico (bis-POC-PMPA), inhibidores de la ribonucleótido reductasa, 2-acetilpiridina 5-[(2-cloroanilino) tiocarbonil] tiocar-bonohidrazona e hidroxurea, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT, zi-dovudina), 2',3'-didesoxiciditina (ddC, zalcitabina), 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxinosina (ddl, didanosina), 2',3'-didehidrotimidina (d4T, stavudina), (-)-beta-D-2,6-diaminopurina dioxolano (DAPD), 3'-azido-2',3'-didesoxi-timidina-5'-H-fosfonato (fosfonovir), 2'-desoxi-5-yodo-uridina (idoxuridina), (-)-cis-1-(2-hidroximetil)-1,3-oxa-tiolano 5-il)-citosina (lamivudina), cis-1-(2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il)-5-fluorocitosina (FTC), 3'-desoxi-3'-fluorotimidina, 5-cloro-2',3'-didesoxi-3'-fluorouridina, (-)-cis-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9H-purin-9-il]-2-ci-clopenteno-1-metanol (abacavir), 9-[4-hidroxi-2-(hidroximetil)but-1-il]-guanina (H2G), ABT-606 (2HM-H2G) riba-virin, inhibidores de proteasas, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, saquinavir, fosamprenavir, (R)-N-terc-butyl-3-[(2S,3S)-2-hidroxi-3-N-[(R)-2-N-(isoquinolin-5-iloxiacetil)amino-3-metiltiopropanoil]amino-4-fenilbutanoil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolidina-4-carboxamida (KNI-272), dimetanosulfonato de 4R-(4alfa,5alfa,6beta)-1,3-bis[(3-aminofenil)metil] hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bis(fenilmetil)-2H-1,3-diazepin-2-ona (mozenavir), 3-[1-[3-[2-(5-trifluorometil)piridinil]-sulfonilamino]fenil]propil]-4-hidroxi-6alfa-fenil-6beta-propil-5,6-dihidro-2-piranona (tipranavir), N'-[2 (S)-Hidroxi-3(S)-[N-(metoxycarbonil)-1-terc-leucilamino]-4-fenilbutil-N alfa-(metoxycarbonil)-N'-[4-(2-piridil)ben-cil]-L-terc-leucilhidrazida (BMS-232632), 3-(2(S)-Hidroxi-3(S)-(3-hidroxi-2-metilbenzamido)-4-fenilbutanoil)-5,5-dimetil-N-(2-metilbencil)tiazolidina-4(R)-carboxamida (AG-1776), N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(1-(4-benzo [b]furanilmetil)-2(S)-N'-(terc-butylcarboxamido)piperazinil)pentanamida (MK-944A), interferones, α -interferón, inhibidores de la excreción renal, probenecid, inhibidores del transporte de nucleósidos, di-piridamol, pentoxifilina, N-acetilcisteína (NAC), Procisteína, α -tricosantin, ácido fosfonofórmico, inmunomoduladores, interleucina II, timosina, factores estimulantes de colonias de granulocitos macrófagos, eritropoyetina, CD₄ soluble y derivados de los mismos producidos por ingeniería genética, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inver-sa (NNRTIs), nevirapina (BI-RG-587), alfa-((2-acetil-5-metilfenil)amino)-2,6-dicloro-bencenoacetamida (lovirida), monometanosulfonato de 1-[3-(iso-propilamino)-2-piridil]-4-[5-(metanosulfonamido)-1H-indol-2-ilcarbonil] piper-a-zina (delavirdina), (10R, 11S, 12S)-12-hidroxi-6,6,10,11-tetrametil-4-propil-11,12-dihidro-2H,6H,10H-benzo(1,2-b:3,4-b':5,6-b'')tripiran-2-ona ((+)calanolida A), (4S)-6-cloro-4-(1E)-ciclopropiletinil)-3,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2(1H)-quinazolinona (DPC-083), (S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-1,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona (efavirenz, DMP 266), 1-(etoximetil)-5-(1-metiletil)-6-(fenilmetil)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (MKC-442), y 5-(3,5-diclorofenil)tio-4-isopropil-1-(4-piridil)metil-1H-imidazol-2-ilmetil carbamato (capravirina), antagonistas de la glucoproteína 120, PRO-2000, PRO-542, 1,4-bis[3-[(2,4-diclorofenil)carbonilamino]-2-oxo-5,8-disodiosulfanil] naftalil-2,5-dimetoxifenil-1,4-dihidrazona (FP-21399), antagonistas de citocina, reticulosa (Producto-R), 1,1'-azobis-formamida (ADA), octahidrocloruro de 1,11-(1,4-fenilenbis(metileno))bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (AMD-3100), inhibidores de la integrasa, e inhibidores de fusión.

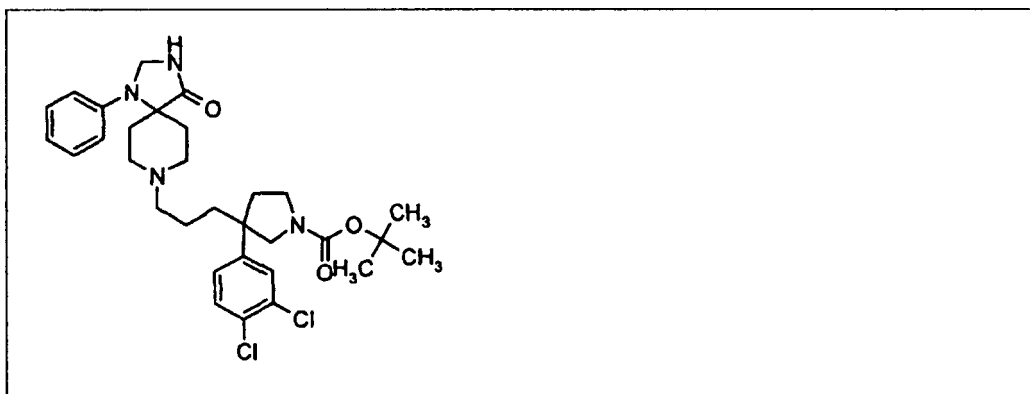
Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de un medicamento, con ritonavir, para el tratamiento, incluida la prevención, de una infección viral en un mamífero.

Los compuestos particulares de la presente invención incluyen

5

10

15



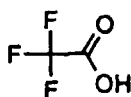
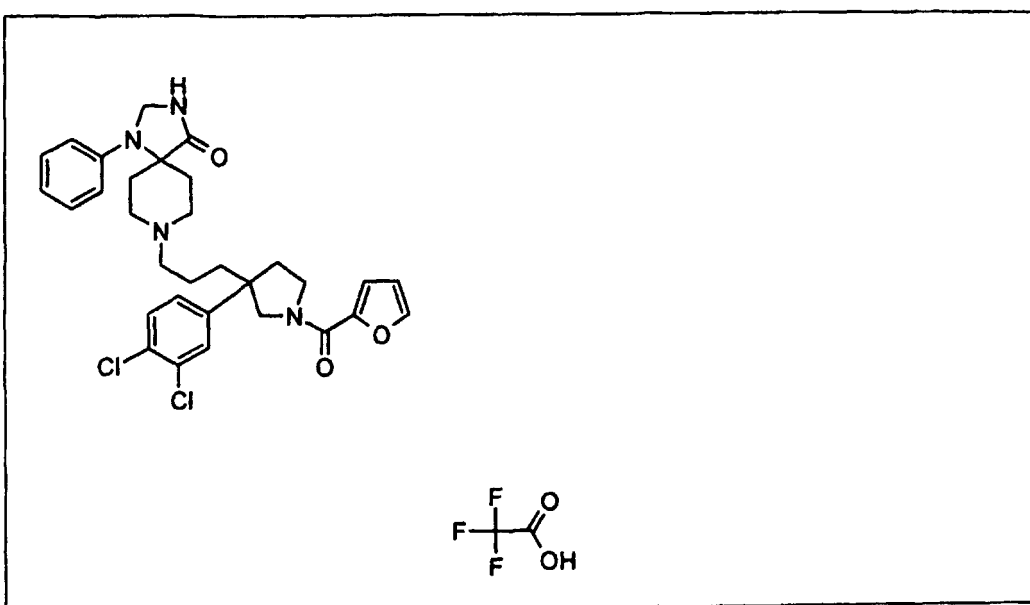
20

25

30

35

40



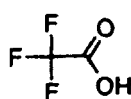
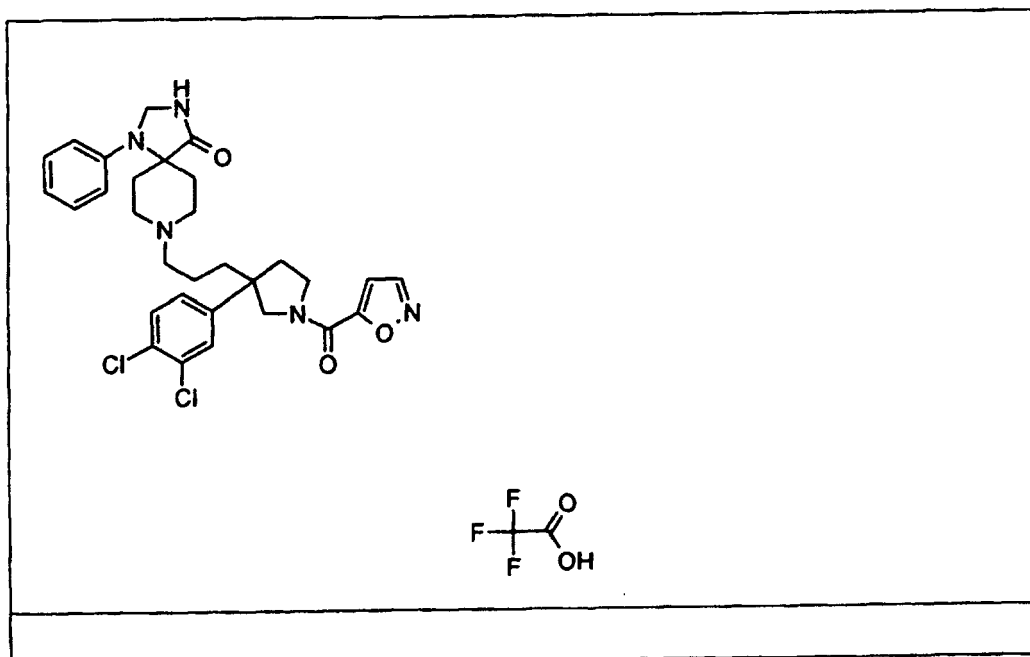
45

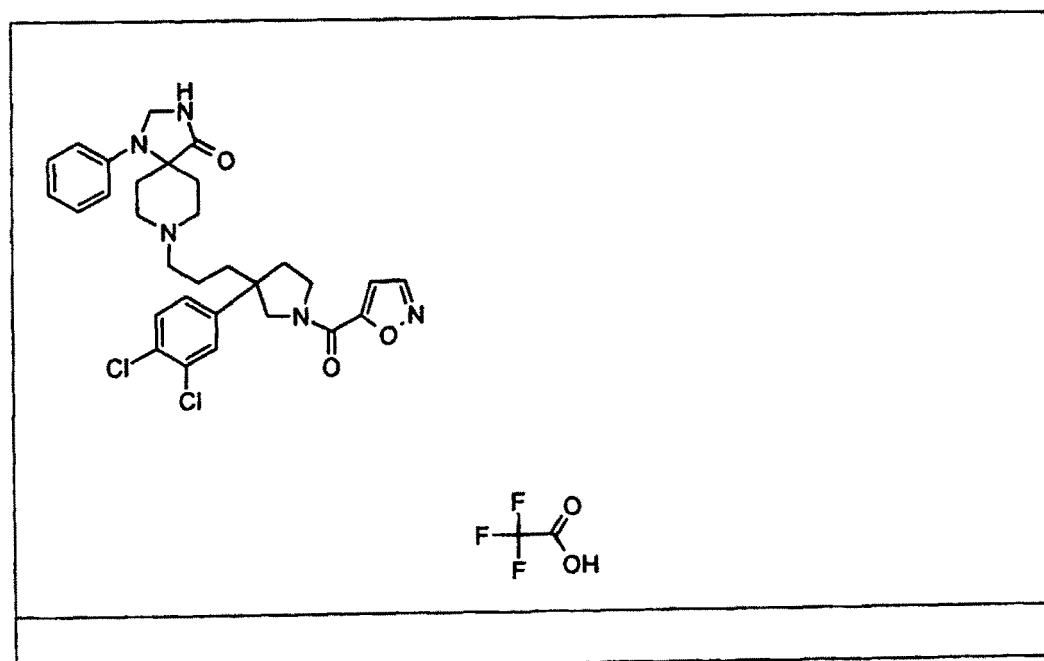
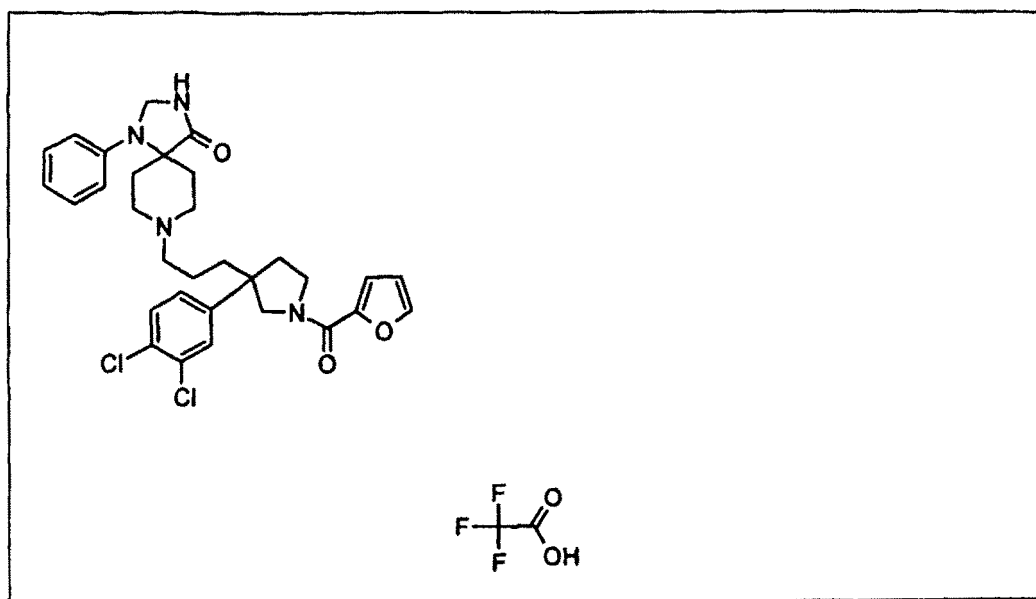
50

55

60

65



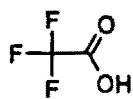
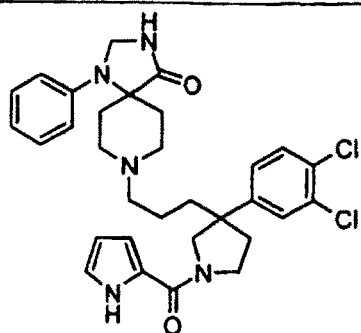


5

10

15

20



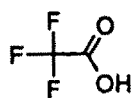
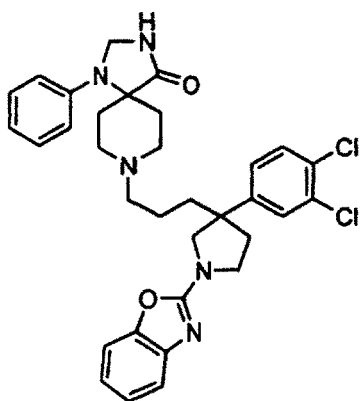
25

30

35

40

45



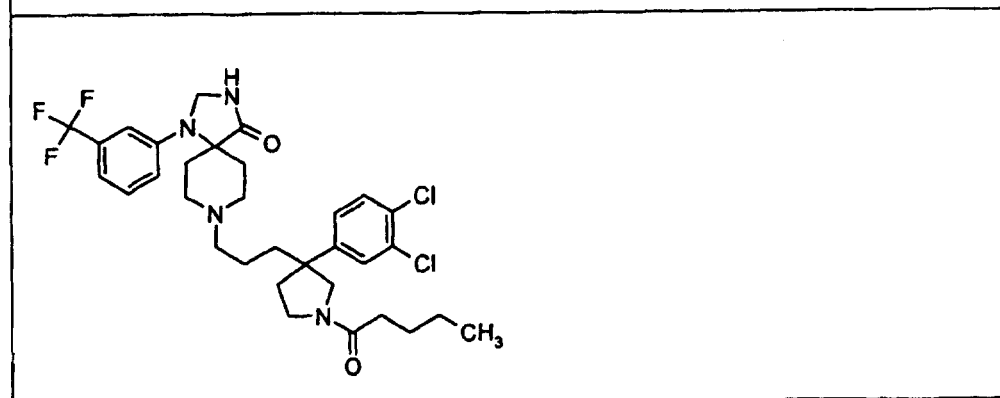
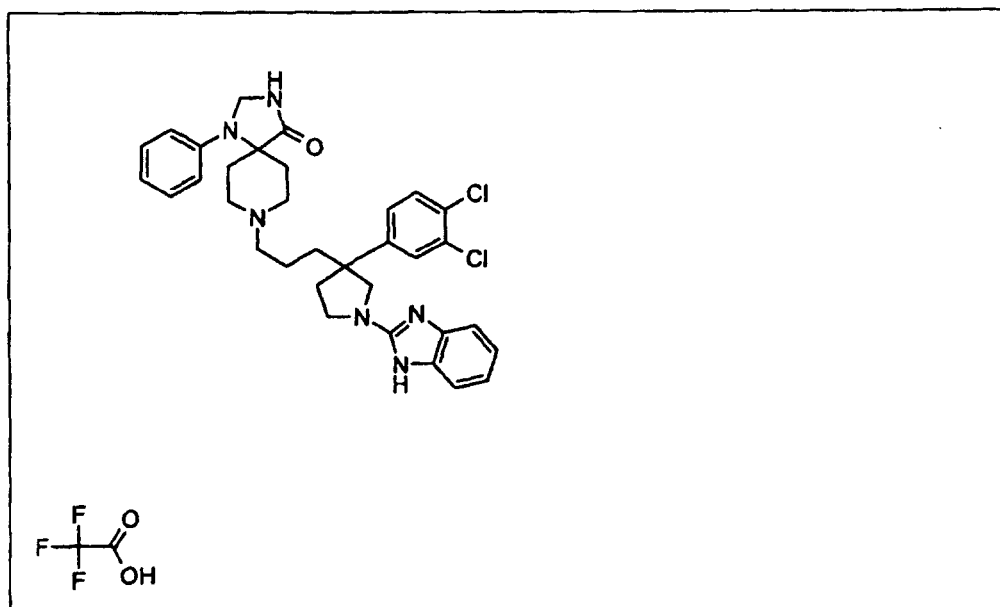
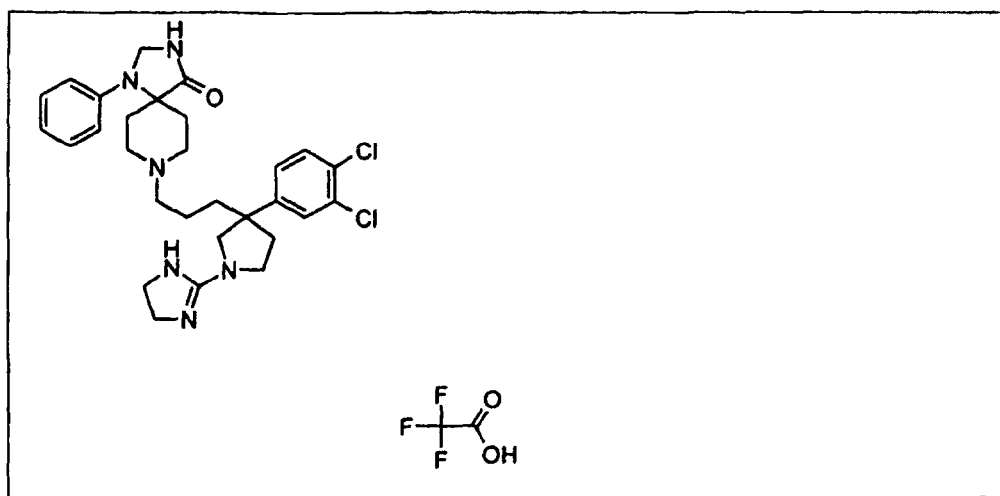
50

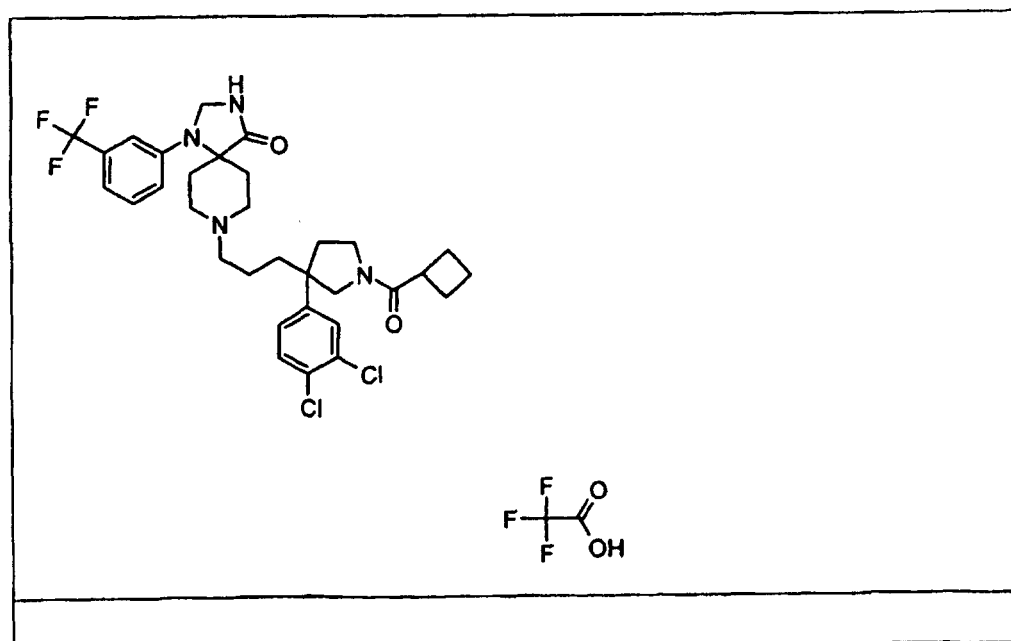
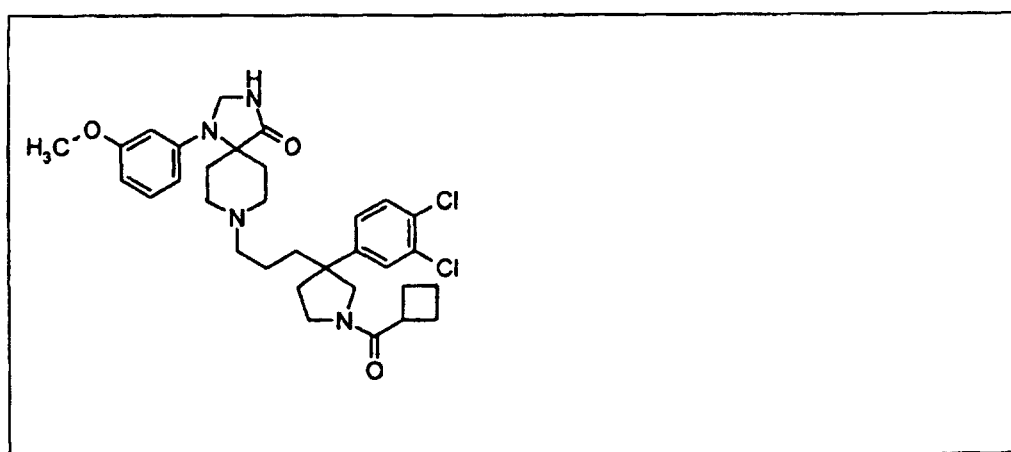
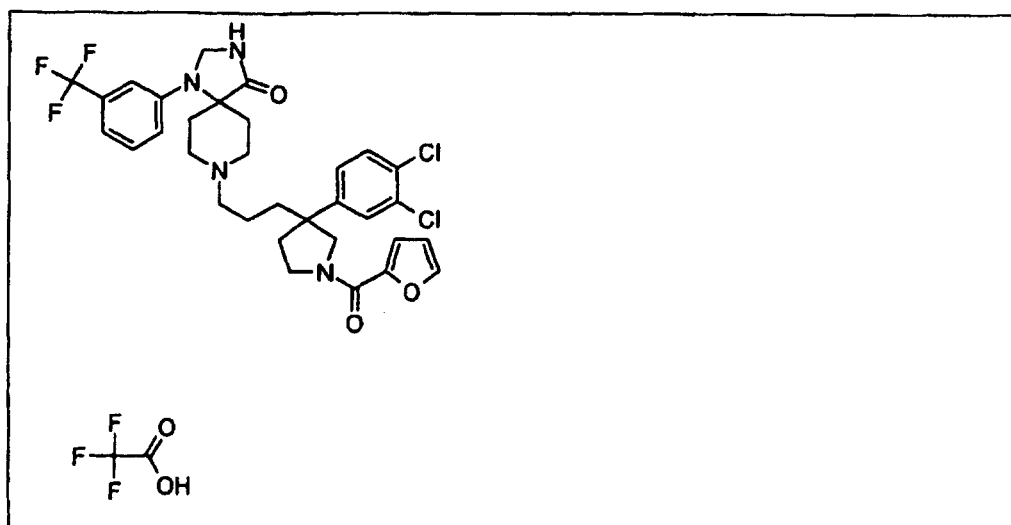


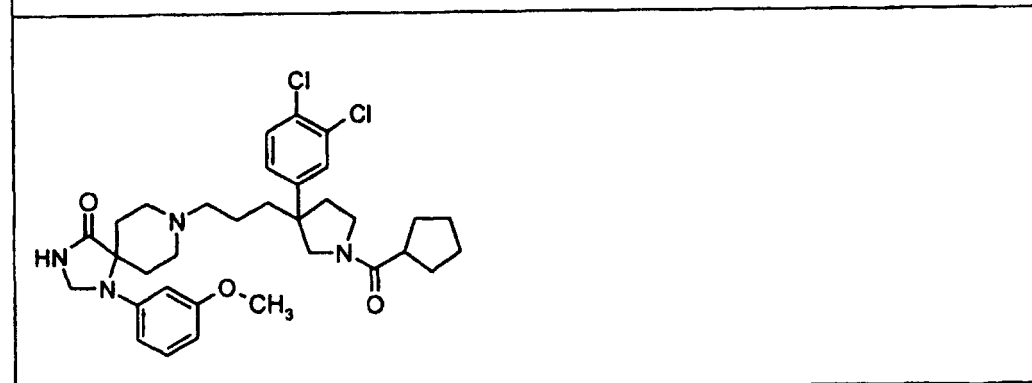
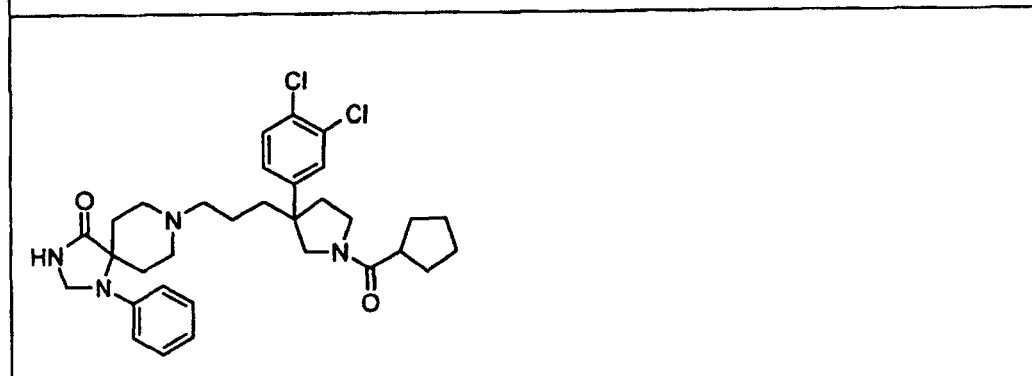
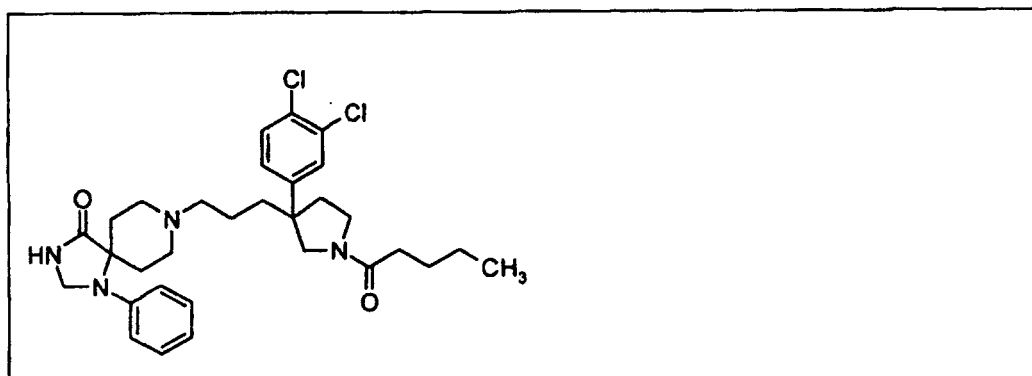
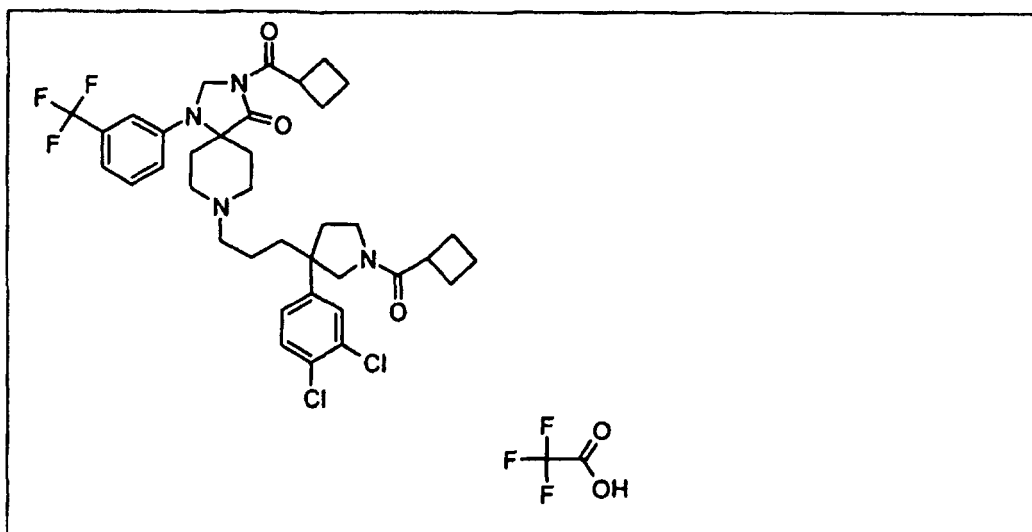
55

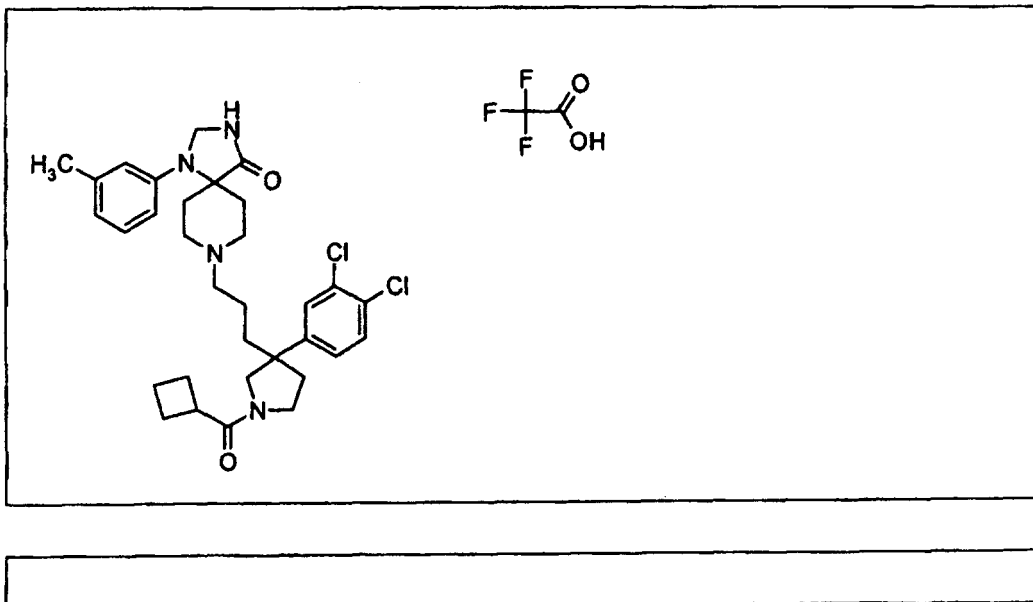
60

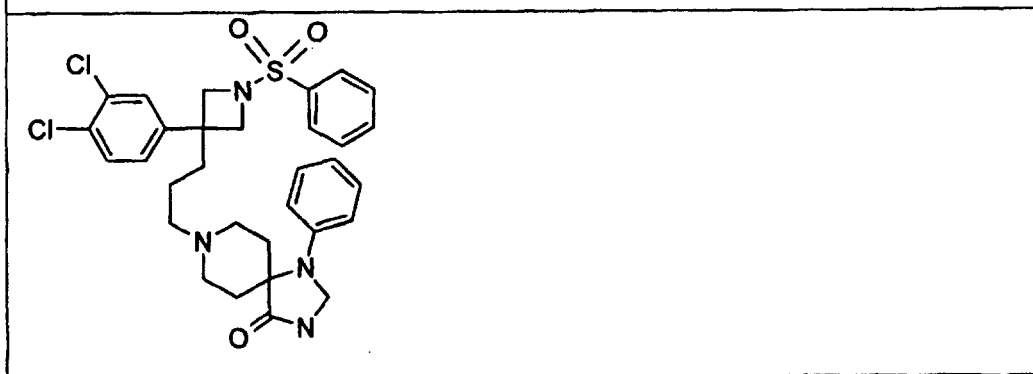
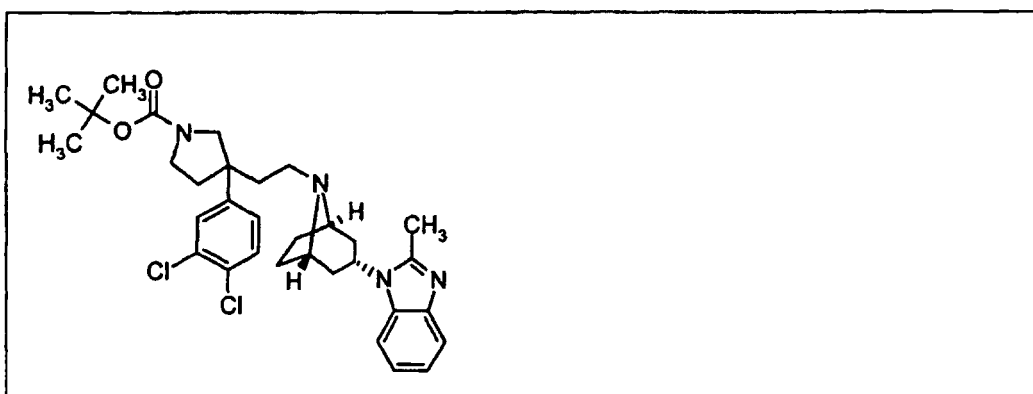
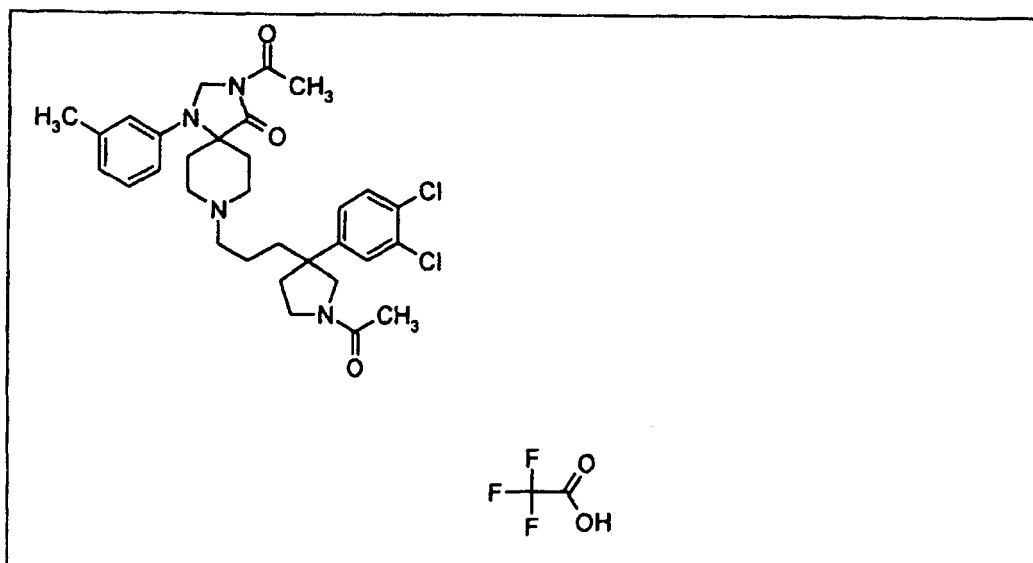
65

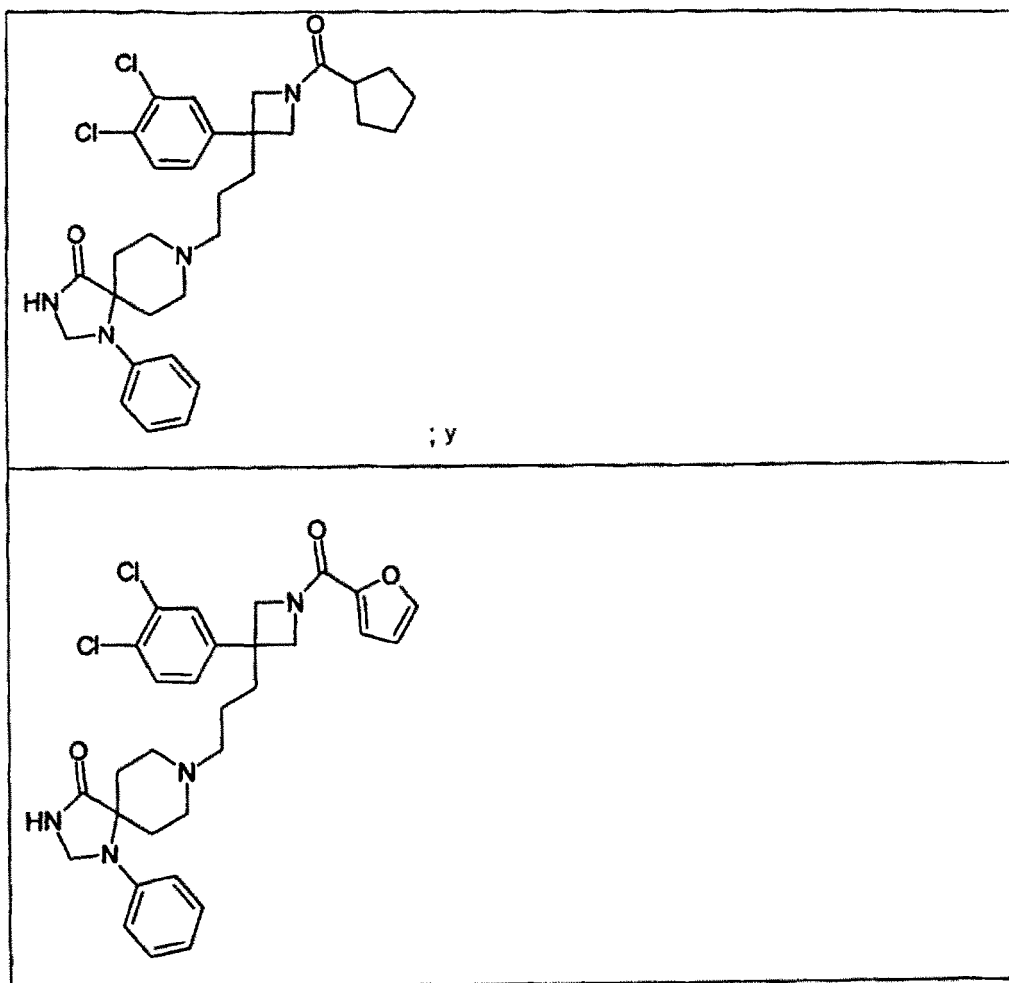












Más particularmente, los compuestos de la presente invención incluyen:

3-(3,4-diclorofenil)-3-[3-(4-oxo-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-il)propil]pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo;

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(2-furoil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(isoxazol-5-ilcarbonil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(1H-pirrol-2-ilcarbonil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-pentanoilpirrolidin-3-il]propil}-1-[3-(trifluorometil)fenil]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(2-furoil)pirrolidin-3-il]propil}-1-[3-(trifluorometil)fenil]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

8-{3-[1-(ciclobutilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-[3-(trifluorometil)fenil]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-pentanoilpirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

8-{3-[1-(ciclobutilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

ES 2 309 400 T3

8-{3-[1-(ciclobutilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-(3-metilfenil)-1,3, 8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona;

3-acetil-8-{3-[1-acetil-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-(3-metilfenil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona; y

8-{3,[1-(1,3-benzoxazol-2-il)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona.

El término “alquilo”, solo o en combinación con cualquier otro término, se refiere a un radical hidrocarburo alifático saturado, de cadena lineal o ramificada, que contiene un número especificado de átomos de carbono. Los ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isoamilo, n-hexilo y similares.

El término “cantidad farmacéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que es eficaz para tratar una enfermedad relacionada con CCR5, por ejemplo una infección viral, por ejemplo una infección por VIH, en un paciente ya sea como monoterapia o en combinación con otros agentes. El término “tratamiento” como se usa en este documento se refiere al alivio de síntomas de un trastorno particular en un paciente, o a la mejora de una medida improbable asociada a un trastorno particular, y puede incluir la supresión de recurrencia de síntomas en un paciente asintomático tal como un paciente en el que la infección viral se ha transformado en latente. El término “profilaxis” se refiere a la prevención de una enfermedad o afección o a la prevención de la presentación de síntomas de tal enfermedad o afección, en un paciente. Como se usa en este documento, el término “paciente” se refiere a un mamífero, incluido el ser humano.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo que puede administrarse a un paciente, junto con un compuesto de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y que no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica del agente terapéutico.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos según la invención incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen a los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, toluen-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftalen-2-sulfónico y bencensulfónico. Otros ácidos, tales como el oxálico, aunque no son farmacéuticamente aceptables, pueden usarse en la preparación de sales útiles como intermedios para la obtención de los compuestos de la invención y de sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables.

Las sales derivadas de bases adecuadas incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), sales de amonio, NW_4^+ (en las que W es alquilo C_{1-4}) y otras sales de aminas. Las sales de un átomo de hidrógeno o de un grupo amino fisiológicamente aceptables incluyen sales de ácidos carboxílicos orgánicos tales como los ácidos acético, láctico, tartárico, málico, isetiónico, lactobiónico y succínico; los ácidos sulfónicos orgánicos tales como los ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, bencensulfónico y p-toluensulfónico y ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico y sulfámico. Las sales de un compuesto con un grupo hidroxilo fisiológicamente aceptables incluyen al anión de dicho compuesto en combinación con un catión adecuado tal como Na^+ , NH_4^+ y NW_4^+ (en los que W es un grupo alquilo C_{1-4}).

Toda referencia a cualquiera de los compuestos anteriores también incluye una referencia a una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Las sales de los compuestos de la presente invención pueden elaborarse por medio de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de un compuesto de la presente invención con una base o ácido adecuados en un disolvente adecuado da la sal correspondiente.

Los compuestos según la presente invención contienen uno o más átomos de carbono asimétricos y por consiguiente se presentan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros únicos, mezclas diastereoméricas y diastereoisómeros individuales. Todas tales formas isoméricas de estos compuestos están expresamente incluidas en la presente invención. Cada carbono estereogénico puede estar en la configuración R o S. Aunque los compuestos específicos ejemplificados en esta solicitud pueden estar representados en una configuración estereoquímica particular, también se prevén los compuestos que tienen la estereoquímica opuesta en cualquier centro quiral dado o mezclas de los mismos.

A menos que se especifique de otra manera, las estructuras representadas en este documento tienen también la intención de incluir a los compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por el reemplazo de un hidrógeno por un deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido ^{13}C - o ^{14}C - también se encuentran dentro del alcance de la invención.

Algunos compuestos de esta invención pueden existir en formas tautoméricas alternativas. Todas tales formas tautoméricas de los compuestos presentes están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique de otra manera, la representación de cualquier tautómero incluye también a la otra.

La presente invención describe compuestos según la invención para uso en terapia médica, por ejemplo para el tratamiento, incluida la profilaxis, de infecciones virales tales como una infección por VIH y afecciones asociadas. Las referencias en este documento para tratamientos se extienden a la profilaxis así como al tratamiento de infecciones establecidas, síntomas y afecciones clínicas asociadas tales como el complejo relacionado con el SIDA (CRS), el sarcoma de Kaposi y la demencia del SIDA.

La presente invención describe el uso de los compuestos de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, incluida la profilaxis, de una enfermedad o afección relacionada con CCR5, por ejemplo, una infección viral, por ejemplo, una infección por VIH.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, incluida la prevención, de los síntomas o efectos de una infección viral en un animal infectado, por ejemplo, un mamífero incluido un ser humano. Según uno de los aspectos de la invención, la infección viral es una infección retroviral, en particular una infección por VIH. Otro aspecto de la invención incluye el uso de un compuesto según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, incluida la prevención, de los síntomas o efectos de una infección por VHB.

Los compuestos según la invención pueden usarse también en una terapia adyuvante en el tratamiento de infecciones de VIH o síntomas o efectos asociados al VIH, por ejemplo el sarcoma de Kaposi.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse también en el tratamiento, incluida la prevención, de otras enfermedades y afecciones relacionadas con CCR5, incluidas la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la diabetes autoinmune, el rechazo crónico de injertos, el asma, artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la enfermedad intestinal inflamatoria, la enfermedad inflamatoria crónica, la enfermedad glomerular, la nefritis sérica nefrotóxica, enfermedad renal, la enfermedad de Alzheimer, la encefalomiелitis autoinmune, la trombosis arterial, la rinitis alérgica, la arteriosclerosis, el síndrome de Sjogren (dermatomiositis), el lupus eritematoso sistémico, el rechazo de injertos, cánceres con infiltración leucocitaria de la piel u órganos, trastornos infecciosos incluidos la peste bubónica y la peste neumónica, la infección por el virus del papiloma humano, el cáncer de próstata, la cicatrización de heridas, la esclerosis amiotrófica lateral y trastornos inmunomediados.

La presente invención proporciona además el uso de un compuesto según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección clínica en un animal, por ejemplo, un mamífero incluido un ser humano cuya afección clínica incluye a las que se han discutido anteriormente en este documento. La presente invención incluye también el uso de un compuesto según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, incluida la profilaxis, de cualquiera de las enfermedades o afecciones mencionadas anteriormente.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, incluida la profilaxis, de cualquiera de las infecciones virales o afecciones mencionadas anteriormente.

Los anteriores compuestos de acuerdo con la invención y sus sales pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos para el tratamiento de las infecciones o afecciones anteriores. Las terapias de combinación según la presente invención comprenden la administración de un compuesto de la presente invención o una sal de los mismos y otro agente farmacéuticamente activo. El (los) ingrediente(s) activo(s) y los agentes farmacéuticamente activos pueden administrarse simultáneamente en la misma o en diferentes composiciones farmacéuticas o consecutivamente en cualquier orden. Las cantidades del (los) ingrediente(s) activo(s) y agente(s) farmacéuticamente activo(s) y los tiempos relativos de administración se seleccionarán para alcanzar el efecto terapéutico combinado deseado.

Los ejemplos de tales agentes terapéuticos incluyen agentes que son eficaces para el tratamiento de infecciones virales o de las afecciones asociadas. Entre estos agentes están (1-alfa, 2-beta, 3-alfa)-9-[2,3-bis(hidroximetil)ciclobutil]guanina [(-)BHCG, SQ-34514, lobucavir], 9-[(2R,3R,4S)-3,4-bis(hidroximetil)-2-oxetanosil]adenina (oxetanocin-G), nucleósidos acíclicos, aciclovir, valaciclovir, fanciclovir, ganciclovir y penciclovir, fosfonatos de nucleósidos acíclicos, por ejemplo (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil)citosina (HPMPC), ácido [[2-(6-amino-9H-purin-9-il)etoxi]metil]fosfinilideno]bis(oximetileno)-2,2-dimetilpropanoico (bis-POM PMEa, adefovir dipivoxil), ácido [[[1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoxi]metil]fosfónico (tenofovir) y bis-(isopropoxycarboniloximetil) éster del ácido (R)-[[2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoxi]metil]fosfónico (bis-POC-PMPA), inhibidores de la ribonucleótido reductasa, por ejemplo 2-acetilpiridina 5-[(2-cloroanilino) tiocarbonil] tiocarbonhidrazona e hidroxurea, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, por ejemplo 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT, zidovudina), 2',3'-didesoxicitidina (ddC, zalcitabina), 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxinosina (ddl, didanosina), 2',3'-didehidrotimidina (d4T, stavudina), (-)-beta-D-2,6-diaminopurina dioxolano (DAPD), 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina-5'-H-fosfofonato (fosfonovir), 2'-desoxi-5-yodo-uridina (idoxuridina), (-)-cis-1-(2-hidroximetil)-1,3-oxatolano 5-il)-citosina (lamivudina), cis-1-(2-hidroximetil)-1,3-oxatolano 5-il)-5-fluorocitosina (FTC), 3'-desoxi-3'-fluorotimidina, 5-cloro-2',3'-didesoxi-3'-fluorouridina, (-)-cis-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9H-purin-9-il]-2-ciclopenteno-1-metanol (abacavir), 9-[4-hidroxi-2-(hidroximetil)but-1-il]-guanina (H2G), ABT-606 (2HM-H2G) ribavirin, inhibidores de proteasas,

por ejemplo indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, saquinavir, fosamprenavir, (R)-N-terc-butil-3-[(2S,3S)-2-hidroxi-3-N-[(R)-2-N-(isoquinolin-5-iloxiacetil)amino-3-metilpropanoil]amino-4-fenilbutanoil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolidina-4-carboxamida (KNI-272), dimetanosulfo-nato de 4R-(4alfa,5alfa,6beta)]-1,3-bis[(3-aminofenil)metil] hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bis(fenilmetil)-2H-1,3-diazepin-2-ona (mozenavir), 3-[1-[3-[2-(5-trifluoro-metilpiridinil)-sulfonilamino]fenil]propil]-4-hidroxi-6alfa-fenetil-6beta-propil-5,6-dihidro-2-piranona (tipranavir), N'-[2(S)-Hidroxi-3(S)-[N-(metoxicarbonil)-1-terc-leucilamino]-4-fenilbutil-N^{alfa}-(metoxicarbonil)-N'-[4-(2-piridil)bencil]-L-terc-leucilhidrazida (BMS-232632), 3-(2(S)-Hidroxi-3(S)-(3-hidroxi-2-metilbenzamido)-4-fenilbutanoil)-5,5-dimetil-N-(2-metilbencil)tiazolidina-4(R)-carboxamida (AG-1776), N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(1-(4-benzo[b]furanil-metil)-2(S)-N'-(terc-butylcarboxamido)piperazinil)pentanamida (MK-944A), interferones tales como α -interferón, inhibidores de la excreción renal tales como probenecid, inhibidores del transporte de nucleósidos tales como dipiridamol; pentoxifilina, N-acetilcisteína (NAC), Procisteína, α -tricosantin, ácido fosfonofórmico así como inmunomoduladores tales como interleucina II o timosina, factores estimulantes de colonias de granulocitos macrófagos, eritropoyetina, CD₄ soluble y derivados de los mismos producidos por ingeniería genética, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTIs), por ejemplo nevirapina (BI-RG-587), alfa-((2-acetil-5-metilfenil)amino)-2,6-dicloro-bencenoacetamida (lovirida), monometanosulfonato de 1-[3-(isopropilamino)-2-piridil]-4-[5-(metanosulfonamido)-1H-indol-2-ilcarbonil] piperazina (delavirdina), (10R, 11S, 12S)-12-hidroxi-6,6,10,11-tetrametil-4-propil-11,12-dihidro-2H,6H,10H-benzo(1,2-b:3,4-b':5,6-b'')tripiran-2-ona ((+) calanolida A), (4S)-6-cloro-4-(1E)-ciclopropilfenil)-3,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2(1H)-quinazolinona (DPC-083), (S)-6-cloro-4-(ciclopropilfenil)-1,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona (efavirenz, DMP 266), 1-(etoximetil)-5-(1-metiletil)-6-(fenilmetil)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (MKC-442) y 5-(3,5-diclorofenil)tio-4-isopropil-1-(4-piridil)metil-1H-imidazol-2-ilmetil carbamato (capravirina), antagonistas de la glucoproteína 120, por ejemplo PRO-2000, PRO-542 y 1,4-bis[3-[(2,4-diclorofenil)carbonilamino]-2-oxo-5,8-disodiosulfanil]naftalil-2,5-dimetoxifenil-1,4-dihidrazona (FP-21399), antagonistas de citocina, por ejemplo reticulosa (Producto-R), 1,1'-azobis-formamida (ADA), octahidrocloreto de 1,11-(1,4-fenilenbis(metileno))bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (AMD-3100), inhibidores de la integrasa, o inhibidores de fusión, por ejemplo T-20 y T-1249.

La presente invención incluye además el uso de un compuesto según la invención en la fabricación de un medicamento para administración simultánea o secuencial con al menos otro agente terapéutico, tal como los definidos anteriormente en este documento.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse con un agente conocido por inhibir o reducir el metabolismo de los compuestos, por ejemplo el ritonavir. Por consiguiente, la presente invención describe el uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad como se describió anteriormente en este documento. Tal combinación puede administrarse de manera simultánea o secuencial.

En general, una dosis adecuada para cada una de las afecciones mencionadas anteriormente estará en el intervalo desde 0,01 hasta 250 mg por kilogramo de peso corporal del receptor (por ejemplo, un ser humano) por día, adecuadamente en el intervalo desde 0,1 hasta 100 mg por kilogramo de peso corporal por día y más adecuadamente en el intervalo desde 0,5 hasta 30 mg por kilogramo de peso corporal por día y particularmente en el intervalo desde 1,0 hasta 20 mg por kilogramo de peso corporal por día. A menos que se indique de otra manera, todos los pesos de los ingredientes activos se calculan como el compuesto original de fórmula (I); para las sales o ésteres de los mismos, los pesos podrían aumentarse proporcionalmente. La dosis deseada puede presentarse como una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas en intervalos adecuados a lo largo del día. En algunos casos puede administrarse la dosis deseada en días alternados. Estas subdosis pueden administrarse en formas de monodosis, por ejemplo, con un contenido de desde 10 hasta 1000 mg ó 50 hasta 500 mg, de manera adecuada desde 20 hasta 500 mg, y más adecuadamente desde 50 hasta 400 mg de ingrediente activo por forma de monodosis.

Aunque es posible administrar el ingrediente activo solo, resulta de preferencia presentarlo como una composición farmacéutica. Las composiciones de la presente invención comprenden al menos un ingrediente activo, según se definió anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables de los mismos y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cada vehículo debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no debe ser dañino para el paciente.

Las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración por vía oral, rectal, nasal, tópica (incluidas transdérmica, bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluidas subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica e intravítrea). Las composiciones pueden presentarse convenientemente en formas de monodosis y pueden prepararse por medio de cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales procedimientos representan otra descripción de la presente invención e incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el vehículo, que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan por asociación uniforme e íntima de los ingredientes activos con los vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o con ambos, y a continuación se da la forma al producto, si es necesario.

La presente invención incluye además una composición farmacéutica según se definió anteriormente en este documento en la que un compuesto de la presente invención o una sal del mismo y otro agente terapéutico se presentan por separado uno del otro como un kit de partes.

Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos adaptados para permanecer en íntimo contacto con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Tales parches contienen adecuadamente el compuesto activo 1) en una disolución acuosa, opcionalmente tamponada o 2) disuelto y/o dispersado en un adhesivo o 3) dispersado en un polímero. Una concentración adecuada del compuesto activo es desde aproximadamente 1% hasta 25%, adecuadamente desde 3% hasta 15%. Como una posibilidad particular, el compuesto activo puede administrarse desde un parche por electrotransporte o iontoforesis como se describe en general en Pharmaceutical Research 3 (6), 318 (1986).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, comprimidos oblongos, píldoras o comprimidos, cada uno con una cantidad predeterminada de los ingredientes activos; como un polvo o como gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo puede también presentarse como un bolo, electuario o pasta.

Puede prepararse un comprimido por medio de compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes. Los comprimidos pueden prepararse por medio de compresión de los ingredientes activos en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos en una máquina adecuada, opcionalmente mezclado con un ligante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetil celulosa), un lubricante, un diluyente inerte, un conservante, un disgregante (por ejemplo, almidón glicolato de sodio, povidona entrecruzada, carboximetilcelulosa sódica entrecruzada), agentes activos de superficie o dispersantes. Los comprimidos moldeados pueden prepararse por moldeado de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte en una máquina adecuada. Los comprimidos pueden opcionalmente recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada de los ingredientes activos usados en los mismos, por ejemplo, hidroximetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos pueden también proporcionarse con un recubrimiento entérico, para proporcionar liberación en partes del intestino diferentes del estómago.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por vía tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden los ingredientes activos en una base aromatizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y lavados bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como diafragmas, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o vaporizadores. En la técnica se sabe que las composiciones farmacéuticas que contienen tales vehículos además del ingrediente activo son adecuadas.

Las composiciones farmacéuticas para administración rectal pueden prepararse como un supositorio con un vehículo adecuado que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato u otro material usado comúnmente en la técnica. Los supositorios pueden formarse convenientemente por la mezcla de la combinación activa con el (los) vehículo(s) suavizados o derretidos seguida por enfriamiento y la obtención de la forma en moldes.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones estériles para inyección, isotónicas, acuosas o no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten a la composición farmacéutica en isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas o no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes, y liposomas u otros sistemas de micropartículas que están diseñados para dirigir el compuesto a los componentes de la sangre o a uno o más órganos. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en envases sellados con monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en condiciones de liofilización que requieren sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas de inyección pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de los tipos descritos anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de monodosis incluyen aquellas que contienen una dosis diaria o subdosis diaria de los ingredientes activos, como se citó anteriormente en este documento, o una fracción adecuada de los mismos.

Deberá entenderse que además de los ingredientes anteriormente mencionados en particular, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica considerando la composición farmacéutica en cuestión, por ejemplo, aquellas adecuadas para la administración oral pueden incluir otros agentes tales como edulcorantes, espesantes y agentes aromatizantes.

Ejemplos

El objeto de los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia es solamente ilustrativo y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Se adquirieron datos de CL-EM de acceso abierto, de baja resolución en modo de ionización por vaporización de electrones IVE pos/neg o IQPA pos/neg con barrido desde 100 hasta 1100 uma a 0,5 segundos/barrido. Condiciones de la CL: caudal 0,8 ml/min. H₂O al 85% (ácido fórmico al 0,1%) hasta MeOH al 100% (ácido fórmico al 0,075%) en 6 minutos. Columna Phenomenex Max-RP, 2,0 x 50 mm.

Los espectros de masas de alta resolución se adquirieron usando un espectrómetro de masas Micromass LCT (tiempo de vuelo) con inyección de flujo (AIF-EM) a 0,3 ml/ml con MeOH al 100% (ácido fórmico al 0,1%), tiempo de ensayo de 2 minutos, en modo IVE+, barrido desde 100 hasta 1100 uma a 0,5 segundos/barrido. Se usó reserpina como masa fina (m/z 609,2812) y para ajustar la escala de masas.

Como podrán apreciar los expertos en la técnica, pueden seguirse los siguientes esquemas para preparar los compuestos de la presente invención. Cualquier variación representada dentro del (los) esquema(s) ilustrados en este documento deben limitarse al esquema particular y no necesariamente extenderse al resto de la presente memoria descriptiva.

Abreviaturas usadas

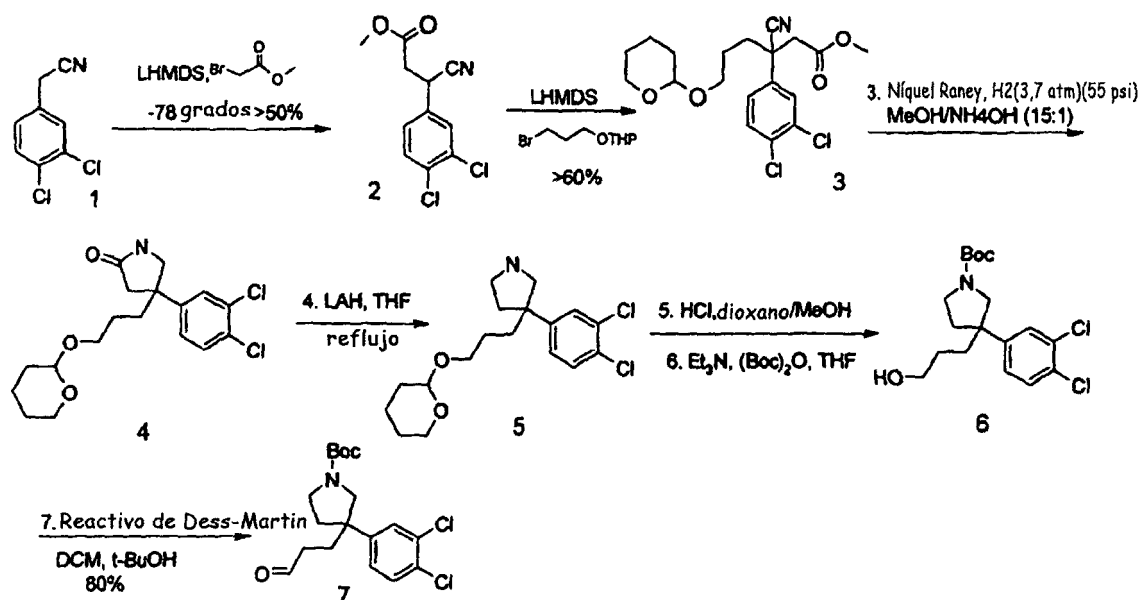
LHMDS = hexametil disilazida de litio.

THP = tetrahidropirano.

NMO = N-óxido de N-metilmorfolina.

I. El anillo B es pirrolidina

Pirrolidina con conector C3



1.1. Se disolvió el compuesto Intermedio 1, (3,4-diclorofenil)acetonitrilo (50,85 g, 273,38 mmol) en THF (200 ml). Se enfrió la disolución hasta -78°C , se añadió LHMDS (1 M en THF, 287 ml) por medio de una cánula. Se agitó el contenido a -78°C durante 30 minutos, a continuación se transfirió a una disolución de bromoacetato de metilo (40,77 ml, 430,58 mmol) a temperatura ambiente. Se completó la reacción en menos de cuatro horas. A continuación se eliminó el disolvente bajo presión reducida. Se disolvió el residuo en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera: H_2O 1:1, se secó, se filtró y concentró. La CRRC (cromatografía de resolución rápida en columna) con hexano:acetato de etilo (5:1) dio 20 g del producto intermedio 2 deseado.

1.2. Se disolvió el Compuesto Intermedio 2 (8,2 g, 31,9 mmol) en THF (200 ml) y se enfrió a -78°C . Se añadió LHMDS (1 M en THF, 33,5 mmol) y se agitó el contenido a -78°C durante 10 minutos antes de transferirlo por medio de una cánula a una disolución de 2-(3-bromopropoxi)-tetrahidro-2H-piran (6,48 ml, 38,29 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se completó en 4 horas y los disolventes se eliminaron bajo presión reducida, el residuo se disolvió nuevamente en acetato de etilo y se lavó con salmuera: H_2O 1:1, se secó, se filtró y concentró. La CRRC con hexano:EtOAc (5:1 hasta 4:1) dio 7,4 g del producto intermedio 3 como un aceite amarillo claro.

1.3. Se disolvió el Compuesto Intermedio 3 en MeOH (60 ml), seguido por hidróxido de amonio concentrado (4 ml) y Níquel Raney. Se hidrogenó el contenido (3,7 atm) (55 Psi) en el aparato de Parr durante la noche. Se aseguró el producto intermedio 4 deseado tras la filtración y eliminación del disolvente.

ES 2 309 400 T3

1.4. Se disolvió el compuesto Intermedio 4 (3,35 g, 13,48 mmol) en THF (50 ml), seguido por LAH (13,5 ml, en éter 1 M). La mezcla se sometió a reflujo bajo nitrógeno durante 1 hora, y a continuación se enfrió hasta 0°C con un baño de hielo seguido por una extinción meticulosa con agua. Se filtró la suspensión a través de un tapón de celite y se concentró para dar el producto intermedio 5 como un aceite incoloro.

1.5. Se disolvió el producto Intermedio 5 bruto en metanol (15 ml), seguido por HCl en dioxano (30 ml, 4M) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, durante este tiempo la mezcla viró a color rosa. A continuación la mezcla se concentró bajo presión reducida, se disolvió nuevamente en THF (40 ml) y se añadió trietilamina (10 ml) y (Boc)₂O en THF (14 ml, 1M). Tras agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se añadió solución saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo el producto con acetato de etilo. A continuación se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se eliminaron los disolventes y se purificó el producto por medio de cromatografía de resolución rápida en columna con hexano:acetato de etilo (1:1), dando 2,64 g del producto intermedio 6, oleoso.

1.6. Síntesis del compuesto intermedio 7: Disolver peryodinano de Dess-Martin (4,77 g, 11,25 mmol) en dicloro- metano (60 ml), seguido por t-BuOH (1,07 ml), agitar a temperatura ambiente durante 5 minutos y añadir gota a gota el compuesto del producto 6 (2,63 g, 7,03 mmol) en diclorometano (10 ml). Tras agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se diluye la mezcla con éter etílico y se lava con NaOH 1,3 N. A continuación se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se elimina el disolvente tras filtrar y se purifica el producto bruto por medio de cromatografía de resolución rápida en columna con hexano:acetato de etilo (3:1) dando 1,88 g del producto 7 como un aceite incoloro.

Los siguientes son datos analíticos representativos para los compuestos de la presente invención:

I. Compuesto Intermedio 2

3-ciano-3-(3,4-diclorofenil)propanoato de metilo

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7,22 (1H, d, J = 8,2 Hz), 4,25 (1H, t, J = 7,3 Hz), 3,71 (3H, s), 3,01 (1 H, dd, J = 16,8 Hz, 7,5 Hz), 2,82 (1H, dd, J = 16,8 Hz, 7,1 Hz). RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 169,35, 134,61, 133,39, 131,47, 129,71, 126,97, 119,16, 52,75, 39,60, 32,49. Análisis elemental calculado para C₁₁H₆Cl₂NO₂ C 51,19%, H 3,51%, N 5,43% hallado: C 51,02%, H 3,93% N 4,25%.

I. Compuesto Intermedio 3

3-ciano-3-(3,4-diclorofenil)-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexanoato de metilo

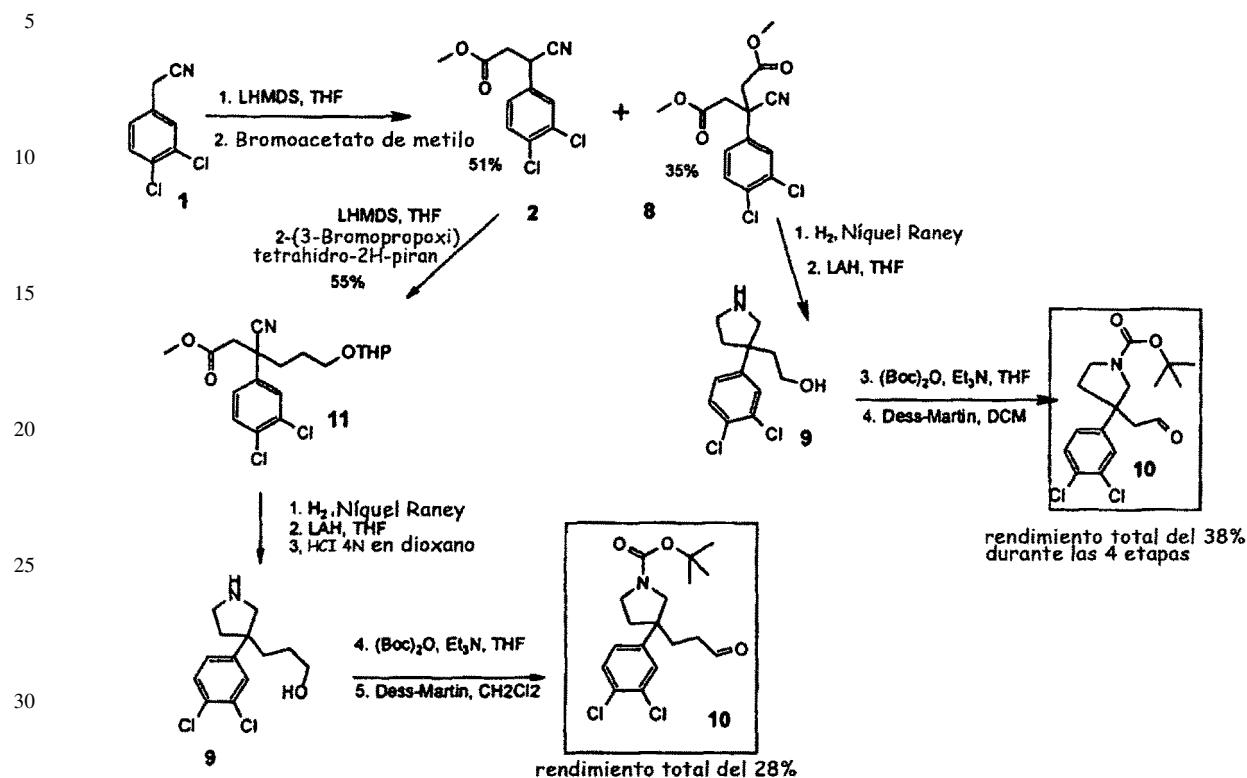
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7,47(1H, d, J = 2,3 Hz), 7,38 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,24 (1H, dd, J= 8,6 Hz, 2,4 Hz), 4,40 (1H, dt, J = 17,6 Hz, 3,7 Hz), 3,75-3,58 (2H, m), 3,52 (3H, s), 3,41-3,34 (1H, m), 3,30-3,24 (1H, m), 2,98 (1H, d, J = 16,5 Hz), 2,88 (1H, d, J = 16,4 Hz), 2,15-2,04 (1H, m), 2,00-1,90 (1H, m), 1,73-1,54 (3H, m), 1,47-1,28 (5H, m). RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 168,67, 138,08, 133,43, 132,65, 131,06, 128,30, 125,74, 120,70, 99,18, 99,09, 66,44, 66,32, 62,74, 62,64, 52,26, 44,35, 44,29, 37,52, 30,86, 25,68, 25,60, 19,90, 19,85. EMAR calculado para C₁₉H₂₃Cl₂NO₄ Na (M+Na)⁺: 422,0922 hallado: 422,0890.

1. Compuesto Intermedio 7

3-(3,4-diclorofenil)-3-(3-oxopropil)-1-pirrolidincarboxilato de 1,1-dimetiletilo

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 9,49 (1H, s), 7,29 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,17 (1H, s), 6,94 (1H, d, J = 8,4 Hz), 3,53-3,42 (2H, m), 3,36-3,18 (2H, m), 2,12-1,92 (5H, m), 1,88-1,78 (1H, m). RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 200,84, 154,70, 154,56, 144,49, 132,91, 131,04, 130,77, 128,79, 126,20, 79,88, 79,73, 55,71, 54,86, 48,89, 48,05, 44,47, 44,17, 39,97, 36,61, 35,23, 31,36, 28,67.

II. Pirrolidina con conector C2



La síntesis de la estructura de C2-pirrolidina se llevó a cabo mediante dos procedimientos. La alquilación de 1 con bromoacetato de metilo dio como resultado en una mezcla separable de 2 monoalquilado y 8 bis-alquilado, cada uno de los cuales se sometió al 10 deseado mediante una ruta separada.

El compuesto 2 se convirtió en 10 en cinco etapas y con un rendimiento total del 28%, mientras que la conversión de 8 a 10 podría llevarse a cabo en 4 etapas y en un mayor rendimiento total del 38%.

Los siguientes son datos analíticos representativos para los compuestos de la presente invención:

II. Compuesto Intermedio 8

3-ciano-3-(3,4-diclorofenil)pentanodioato de dimetilo

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,54 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), 7,43 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 7,31 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, $2,4$ Hz), 3,60 (6H, s), 3,22 (2H, d, $J = 16,6$ Hz), 3,04 (2H, d, $J = 16,7$ Hz). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 168,56, 137,38, 133,24, 131,12, 126,15, 125,48, 120,08. EMAR calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_4\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 352,019 hallado: 352,0123.

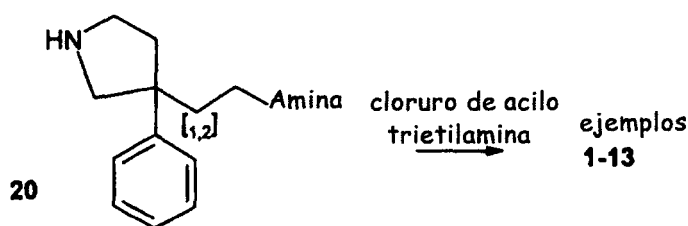
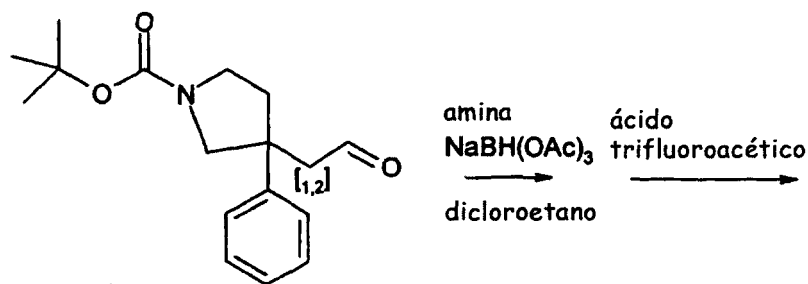
II. Compuesto Intermedio 10

3-(3,4-diclorofenil)-3-(3-oxopropil)-1-pirrolidincarboxilato de 1,1-dimetiletilo

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 9,39 (1H, s), 7,30-7,25 (2H, m), 7,02 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 3,62-3,51 (2H, m), 3,38-3,23 (2H, m), 2,82-2,62 (2H, m), 2,20-2,01 (2H, m), 1,36 (9H, d, $J = 9,2$ Hz). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 199,95, 154,56, 143,96, 132,95, 131,28, 130,80, 128,72, 126,14, 80,06, 79,91, 55,77, 55,66, 52,07, 47,16, 46,36, 44,22, 43,87, 36,35, 35,98, 28,67.

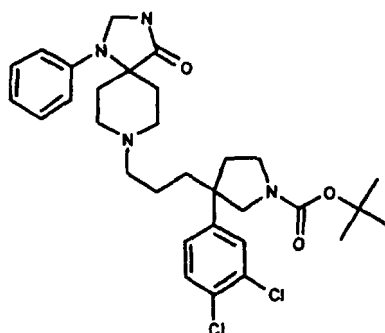
ES 2 309 400 T3

Los siguientes ejemplos representativos, Ejemplos 1-13 de la invención se sintetizaron de acuerdo con el siguiente esquema sintético III, representativo:



Ejemplo 1

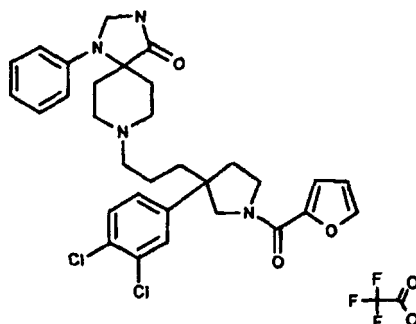
3-(3,4-Diclorofenil)-3-[3-(4-oxo-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-il)propil]pirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo



RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,42-7,40 (m, 1H), 7,31 (m, 2H), 7,24-7,07 (m, 2H), 6,94-6,87 (m, 2H), 6,30 (m, 1H), 3,57-3,32 (m, 3H), 2,71-2,57 (m, 2H), 2,32 (m, 1H), 2,13-2,07 (m, 2H), 1,83-1,70 (m, 4H), 1,52-1,49 (m, 7H), 1,29 (s, 9H), 0,91-0,86 (m, 4H). espectrometría de masa IE+ =587/589 (M+1, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 2

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(2-furoil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5] decan-4-ona



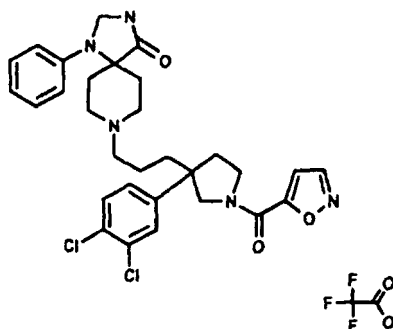
ES 2 309 400 T3

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,99 (s, 1H), 7,89 (m, 1H), 7,63 (m, 2H), 7,45-7,01 (m, 4H), 6,89 (m, 2H), 6,80 (m, 1H), 6,70-6,60 (m, 1H), 4,60 (s, 2H), 4,09 (m, 1H), 3,97-3,68 (m, 4H), 3,65-3,44 (m, 4H), 3,02 (m, 2H), 2,70 (m, 2H), 2,36-2,00 (m, 2H), 1,90-1,62 (m, 3H), 1,44-1,29 (m, 2H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 581/583$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 3

8-(3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(isoxazol-5-ilcarbonil)pirrolidin-3-il]propil]-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

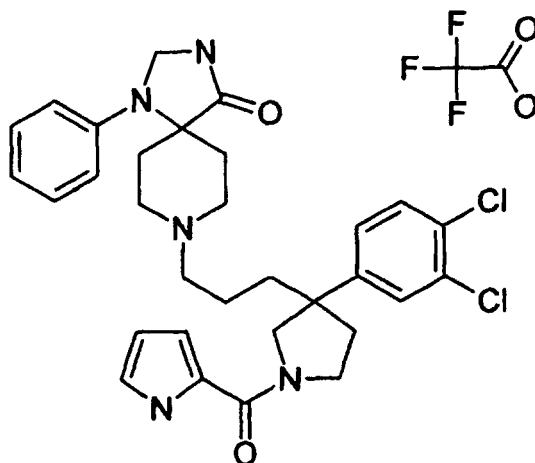


RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-D_6) δ 8,97 (s, 1H), 8,75 (m, 1H), 7,63 (m, 2H), 7,35-7,20 (m, 2H), 7,12-7,06 (m, 2H), 6,89 (m, 2H), 6,80 (m, 1H), 4,59 (s, 2H), 4,05 (m, 1H), 3,97-3,45 (m, 8H), 3,01 (m, 2H), 2,67 (m, 2H), 2,36-2,18 (m, 2H), 1,86-1,68 (m, 3H), 1,42-1,24 (m, 2H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 582/584$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 4

8-(3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(1H-pirrol-2-ilcarbonil)pirrolidin-3-il]propil]-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



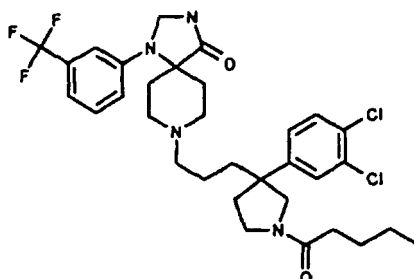
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) δ 11,45 (m, 1H), 8,96 (s, 1H), 7,59 (m, 2H), 7,32-7,11 (m, 3H), 6,85-6,56 (m, 5H), 6,10 (m, 1H), 4,56 (s, 2H), 4,01-3,40 (m, 9H), 2,96 (m, 2H), 2,66 (m, 2H), 2,31-2,12 (m, 2H), 1,81-1,56 (m, 3H), 1,50-1,21 (m, 2H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 580/582$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

ES 2 309 400 T3

Ejemplo 5

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-pentanoilpirrolidin-3-il]propil}-1-[3-(trifluorometil)fenil]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

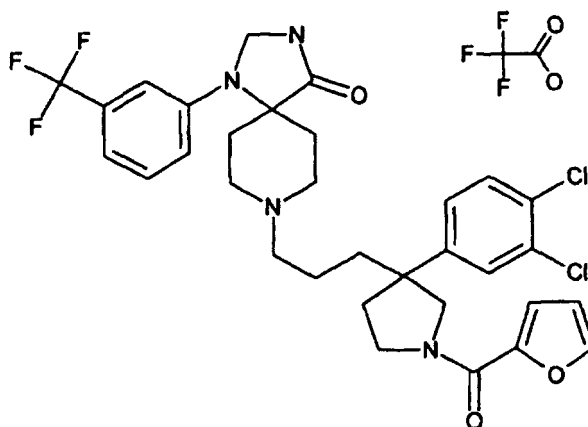


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,79 (m, 1 H), 7,36-7,01 (m, 6H), 6,95-6,88 (m, 1H), 4,74 (s, 2H), 3,87-3,78 (m, 1H), 3,70-3,48 (m, 3H), 3,41-3,34 (m, 1H), 2,76 (m, 3H), 2,36-2,05 (m, 6H), 1,81 (m, 1H), 1,68-1,53 (m, 5H), 1,42-1,11 (m, 5H), 0,94-0,83 (m, 4H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 638/640$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 6

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(2-furoil)pirrolidin-3-il]propil}-1-[3-(trifluorometil)fenil]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



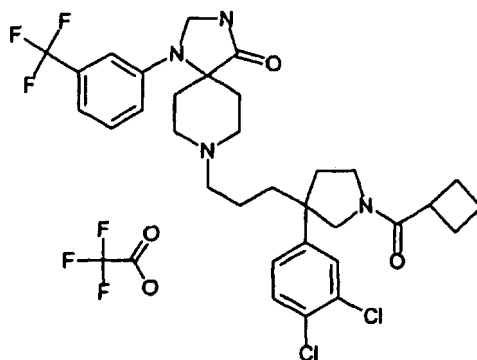
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,54 (m, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,41-7,25 (m, 4H), 7,18-7,02 (m, 4H), 6,46 (m, 1H), 4,73 (s, 2H), 4,10-3,74 (m, 4H), 2,79-2,52 (m, 3H), 2,38-2,12 (m, 3H), 1,81-1,57 (m, 3H), 1,32-1,10 (m, 3H), 0,85-0,68 (m, 4H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 649/651$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

ES 2 309 400 T3

Ejemplo 7

8-{3-[1-(ciclobutilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-[3-(trifluorometil)fenil]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

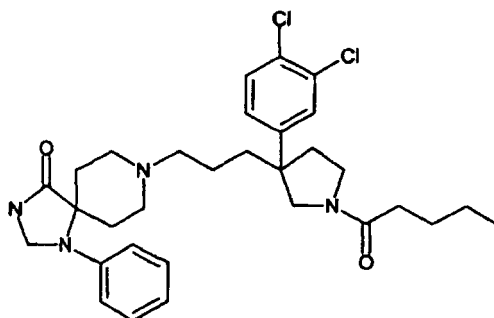


RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) δ 9,63-9,51 (m, 1H), 7,62-7,37 (m, 4H), 7,31-7,22 (m, 2H), 7,07 (s, 1H), 5,04 (s, 2H), 3,94-3,83 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,60 (s, 1H), 3,48-3,20 (m, 3H), 3,01 (m, 2H), 2,31-2,02 (m, 10H), 1,93-1,50 (m, 6H), 1,41-1,18 (m, 2H).

espectrometría de masas IE+ = 637/639 (M+1, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 8

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-pentanoilpirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



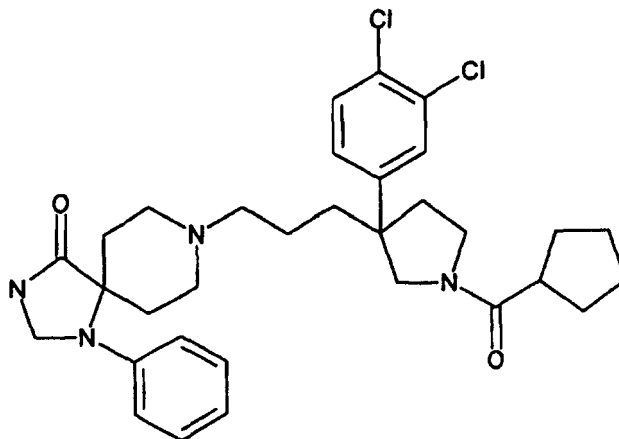
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,50-7,27 (m, 4H), 7,14-7,04 (m, 1H), 6,97-6,86 (m, 2H), 6,81-6,67 (m, 1H), 4,75 (s, 2H), 3,83-3,55 (m, 3H), 3,44 (m, 1H), 3,10-2,65 (m, 7H), 2,56-2,42 (m, 2H), 2,38-2,06 (m, 4H), 1,88-1,57 (m, 4H), 1,48-1,27 (m, 4H), 1,04-1,87 (m, 3H).

espectrometría de masas IE+ = 571/573 (M+1, patrón de isótopos 2 Cl)

ES 2 309 400 T3

Ejemplo 9

8-{3-[1-(ciclopentilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

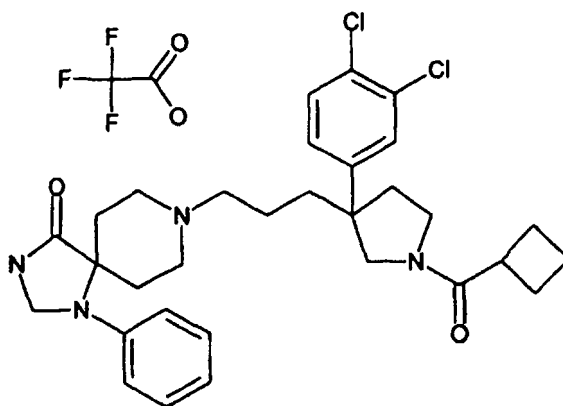


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,69-7,67 (m, 1H), 7,51-7,49 (m, 1H), 7,34 (m, 1H), 7,31-7,18 (m, 3H), 7,05-6,79 (m, 2H), 4,69 (s, 1H), 4,19 (m, 3H), 3,76-3,64 (m, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,28-3,12 (m, 1H), 2,65 (m, 1H), 2,32-2,09 (m, 4H), 1,72-1,61 (m, 5H), 1,45-1,19 (m, 7H), 0,94-0,78 (m, 8H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 583/585$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 10

8-{3-[1-(ciclobutilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

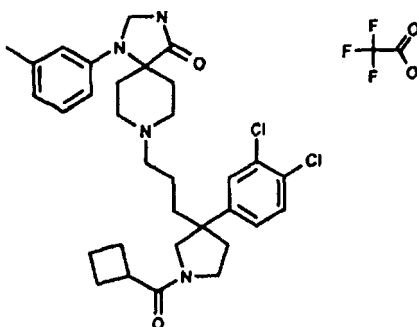


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,38-7,18 (m, 4H), 7,04 (m, 1H), 6,90-6,85 (m, 2H), 6,35 (m, 1H), 4,69 (s, 1H), 3,78-3,44 (m, 4H), 2,78-2,63 (m, 5H), 2,40-2,30 (m, 1H), 2,17-2,06 (m, 2H), 1,91-1,50 (m, 14H), 1,27-1,21 (m, 2H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 569/571$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 11

8-{3-[1-(ciclobutilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-(3-metilfenil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

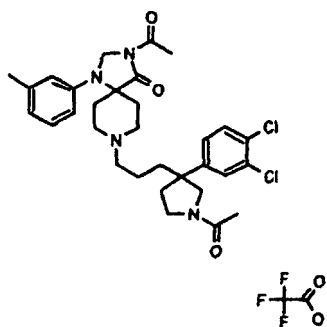


RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) δ 8,96 (s, 1H), 7,67-7,49 (m, 2H), 7,31-7,26 (m, 1H), 7,08 (m, 1H), 6,77 (m, 1H), 6,62 (m, 2H), 4,58 (s, 2H), 3,67-3,22 (m, 10H), 2,98 (m, 2H), 2,66 (m, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,16-2,04 (m, 5H), 1,94-1,79 (m, 3H), 1,74-1,52 (m, 3H), 1,42-1,22 (m, 2H).

espectrometría de masa $\text{IE}^+ = 583/585$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 12

3-acetil-8-{3-[1-acetil-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-(3-metilfenil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

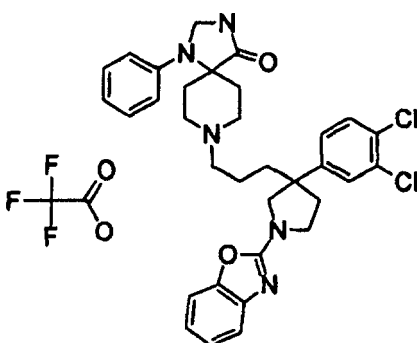


RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) δ 7,61-7,49 (m, 2H), 7,30 (m, 1H), 7,15 (m, 1H), 6,89 (m, 1H), 6,77 (m, 2H), 4,93 (s, 3H), 3,79 (m, 1H), 3,61-3,34 (m, 7H), 2,99 (m, 2H), 2,46 (s, 4H), 2,31-1,86 (m, 10H), 1,75-1,59 (m, 2H), 1,41-1,30 (m, 2H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 543/545$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Ejemplo 13

El compuesto 13 se sintetizó haciendo reaccionar la amina 20 con clorobenzoxazol. 8-{3-[1-(1,3-benzoxazol-2-il)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



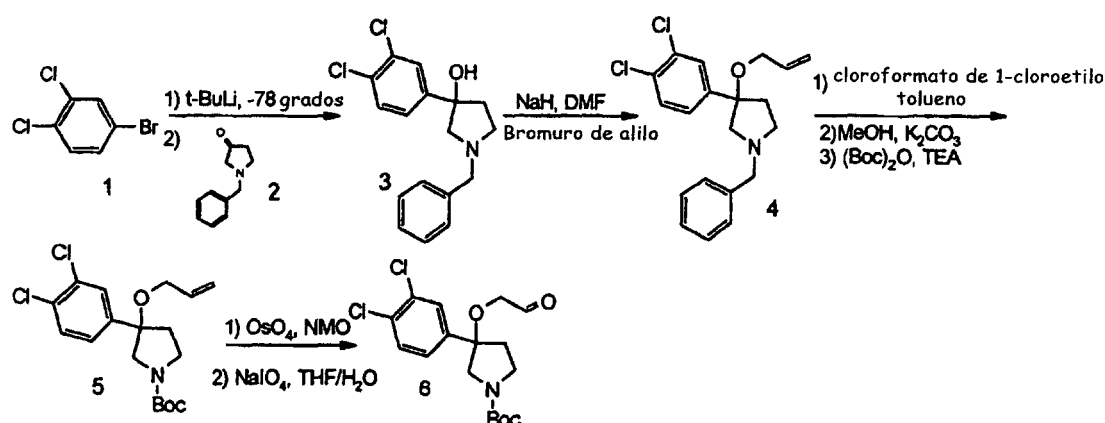
ES 2 309 400 T3

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,96 (s, 1H), 7,58 (m, 2H), 7,37-7,29 (m, 2H), 7,26-7,07 (m, 4H), 6,96 (m, 1H), 6,85 (m, 2H), 6,75 (m, 1H), 4,56 (s, 2H), 3,94-3,88 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,55-3,42 (m, 6H), 2,96 (m, 2H), 2,66 (m, 2H), 2,35-2,24 (m, 2H), 1,82-1,67 (m, 3H), 1,48-1,34 (m, 2H).

espectrometría de masas $\text{IE}^+ = 604/606$ ($\text{M}+1$, patrón de isótopos 2 Cl)

Otros compuestos de la presente invención incluyen compuestos conectados por oxígeno como se ilustra a continuación.

IV. Pirrolidina con conector O



Los siguientes son datos analíticos representativos para los compuestos de la presente invención:

IV. Compuesto Intermedio 3

3-(3,4-diclorofenil)-1-(fenilmetil)-3-pirrolidinol

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,63 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,40-7,26 (7H, m), 3,72 (2H, s), 3,42-3,30 (1H, m), 3,15-3,08 (1H, m), 2,64 (1H, d, $J = 10,2$ Hz), 2,60-2,53 (2H, m), 2,32-2,25 (1H, m), 2,22-2,14 (1H, m). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 145,19, 138,65, 132,53, 131,12, 130,34, 129,04, 128,68, 127,85, 127,54, 125,02, 80,21, 68,85, 60,01, 52,85, 42,44.

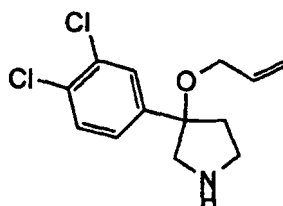
IV. Compuesto Intermedio 4

3-(3,4-diclorofenil)-1-(fenilmetil)-3-(2-propen-1-iloxi)pirrolidina

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,54 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,40-7,24 (7H, m), 5,92-5,82 (1 H, m), 5,28 (1H, dd, $J = 17,2$ Hz, 1,6 Hz), 5,14 (1 H, dd, $J = 10,5$ Hz, 1,1 Hz), 3,71-3,67 (4H, m), 3,01-2,77 (4H, m), 2,36-2,30 (1H, m), 2,18-2,13 (1H, m). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 135,05, 132,71, 131,20, 130,55, 128,92, 128,63, 128,52, 127,41, 125,76, 116,55, 86,06, 65,63, 64,88, 60,78, 53,50, 39,05.

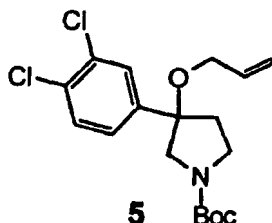
IV. Compuesto Intermedio 5

3-(3,4-diclorofenil)-3-(2-propen-1-iloxi)pirrolidina



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,47 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,42 (1 H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,23 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, 2,0 Hz), 5,88-5,78 (1H, m), 5,24 (1H, dd, $J = 9,3$ Hz, 1,5 Hz), 3,68-3,60 (3H, m), 3,40 (1H, d, $J = 12,0$ Hz), 3,337-3,27 (1H, m), 3,20-3,13 (1H, m), 2,95 (1H, d, $J = 12,1$ Hz), 2,36-2,29 (1H, m), 2,15-2,06 (1H, m). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 141,61, 134,85, 133,03, 132,09, 130,80, 128,95, 126,28, 116,77, 87,39, 65,16, 57,59, 45,87, 36,21.

Además el Compuesto Intermedio 5 puede protegerse con un grupo protector adecuado, como apreciarán los expertos en la técnica: 3-(3,4-diclorofenil)-3-(2-propen-1-iloxi)-1-pirrolidincarboxilato de 1,1-dimetiletilo

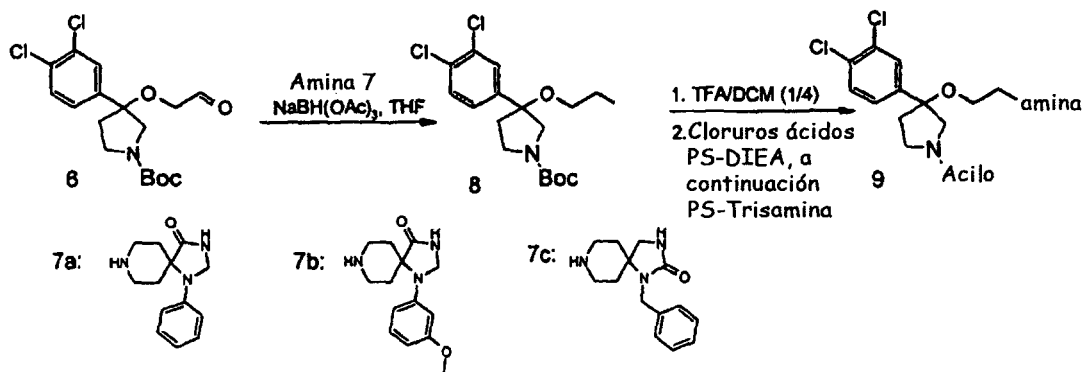


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,47-7,7,42 (2H, m), 7,24-7,21 (1H, m), 5,85-5,75 (1H, m), 5,23 (1H, d, $J = 17,2$ Hz), 5,12 (1H, dd, $J = 10,3$ Hz, 3,7 Hz), 3,88-3,42 (6H, m), 2,40-2,34 (1H, m), 2,17-2,08 (1H, m), 1,46 (9H, s).

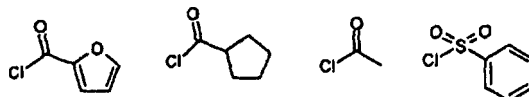
IV. Compuesto Intermedio 6

3-(3,4-diclorofenil)-3-[[2-oxoetil]oxi]-1-pirrolidincarboxilato de 1,1-dimetiletilo

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 9,59 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,47-7,45 (2H, m), 7,23-7,21 (1H, m), 3,94-3,72 (3H, m), 3,62-3,48 (3H, m), 2,41-2,38 (1H, m), 2,23-2,18 (1H, m), 1,47 (9H, s).

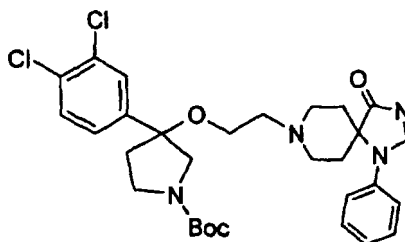


Añadir cloruros:



IV. Compuesto Intermedio 8a

3-(3,4-Diclorofenil)-3-[[2-(4-oxo-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-il)etil]oxi]-1-pirrolidincarboxilato de 1,1-dimetiletilo

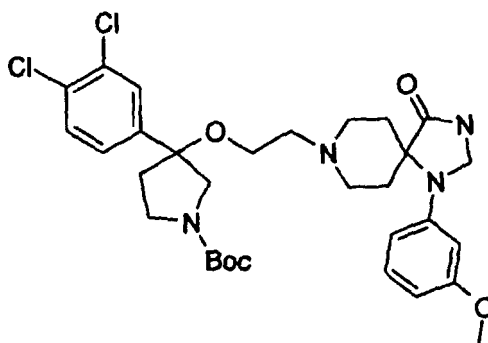


ES 2 309 400 T3

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,54 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,47 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 7,42 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,28 (2H, d, $J = 7,6$ Hz), 6,90-6,83 (3H, m), 4,72 (2H, s), 3,82 (1H, dd, $J = 40,4$ Hz, 11,6 Hz), 3,56 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), 3,50-3,42 (1H, m), 3,30-3,20 (2H, m), 2,81-2,58 (8H, m), 2,40-2,37 (1H, m), 2,16-2,05 (1H, m), 1,68 (2H, d, $J = 13,1$ Hz), 1,46 (9H, s). EMAR calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 589,2348 hallado: 589,2360.

IV. Compuesto Intermedio 8b

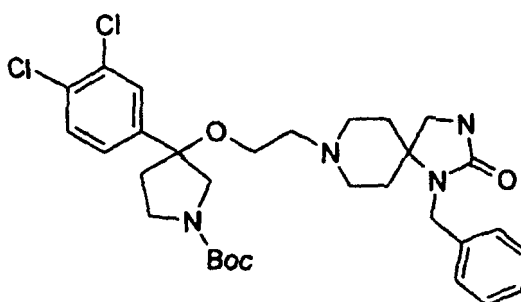
3-(3,4-Diclorofenil)-3-[(2-{1-[3-(metiloxi)fenil]-4-oxo-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-il}etil)oxi]-1-pirrolidincarboxilato de 1,1-dimetiletilo



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,97 (1H, s), 7,45-7,41 (2H, m), 7,29-7,25 (1H, m), 7,16 (1H, t, $J = 8,1$ Hz), 6,55 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 6,40-6,36 (2H, m), 4,69 (2H, s), 3,87-3,76 (4H, m), 3,56-3,41 (3H, m), 3,32-3,19 (2H, m), 2,80-2,57 (8H, m), 2,40-2,37 (1H, m), 2,16-2,05 (1H, m), 1,64 (2H, d, $J = 12,8$ Hz), 1,45 (9H, s). EMAR calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 619,2454 hallado: 619,2437.

IV. Compuesto intermedio 8c

3-(3,4-diclorofenil)-3-([2-[2-oxo-1-(fenilmetil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-il]etil]oxi)-1-pirrolidincarboxilato de 1,1-dimetiletilo



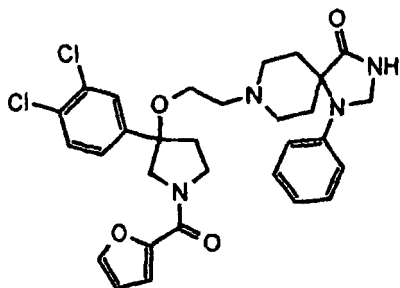
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,41-7,15 (8H, m), 4,31 (2H, s), 3,75 (1H, dd, $J = 42,5$ Hz, 11,5 Hz), 3,50-3,35 (3H, m), 3,25-3,04 (4H, m), 2,67 (2H, s ancho), 2,39-2,28 (3H, m), 2,08-2,00 (1H, m), 1,93-1,73 (4H, m), 1,47 (9H, s). EMAR calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 603 hallado: 603.

Además, como podrá apreciarse, la síntesis de análogos de O-piperidina puede proporcionarse a través de una síntesis paralela.

ES 2 309 400 T3

Ejemplo de Referencia 14

8-(2-[[3-(3,4-diclorofenil)-1-(2-furoil)pirrolidin-3-il]oxi]etil)-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



Peso Molecular = 583,51

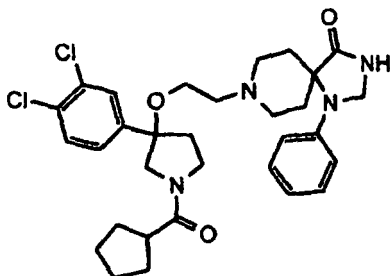
Masa Exacta = 582

Fórmula Molecular = $C_{30}H_{32}Cl_2N_4O_4$

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7,71-7,64 (2H, m), 7,56 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,48-7,44 (1 H, m), 7,23 (2H, t, $J = 7,7$ Hz), 7,16 (1H, d, $J = 3,5$ Hz), 6,98 (2H, d, $J = 8,9$ Hz), 6,84 (1H, t, $J = 7,3$ Hz), 4,65 (2H, d, $J = 3,6$ Hz), 4,36 (1H, dd, $J = 67,1$ Hz, 11,9 Hz), 4,14-4,10 (1H, m), 3,85-3,79 (1H, m), 3,83 (1H, dd, $J = 119,5$ Hz, 11,9 Hz), 3,43-3,37 (1H, m), 3,28-3,18 (1H, m), 2,92-2,65 (4H, m), 2,63-2,50 (4H, m), 2,45-2,38 (1H, m), 1,67-1,57 (2H, m). EMAR calculado para $C_{30}H_{33}Cl_2N_4O_4$ (M+H) $^+$: 583,1879 hallado: 583,1865.

Ejemplo de Referencia 15

8-(2-[[1-(ciclopentilcarbonil)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]oxi]etil)-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



Peso Molecular = 585,57

Masa Exacta = 584

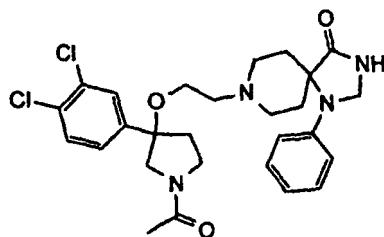
Fórmula Molecular = $C_{31}H_{38}Cl_2N_4O_3$

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7,65 (1H, dd, $J = 16,8$ Hz, 2,0 Hz), 7,55 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, 2,0 Hz), 7,45-7,40 (1H, m), 7,24 (2H, t, $J = 7,7$ Hz), 7,00 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,84 (1H, t, $J = 7,3$ Hz), 4,66 (2H, s), 4,08 (1H, dd, $J = 12,6$ Hz, 1,7 Hz), 3,82-3,78 (1H, m), 3,70-3,66 (1 H, m), 3,60-3,36 (3H, m), 3,27-3,18 (1H, m), 2,96-2,87 (3H, m), 2,80-2,72 (2H, m), 2,62-2,52 (5H, m), 2,38-2,22 (1H, m), 1,92-1,82 (2H, m), 1,77-1,56 (8H, m). EMAR calculado para $C_{31}H_{39}Cl_2N_4O_3$ (M+H) $^+$: 585,2399 hallado: 585,2384.

ES 2 309 400 T3

Ejemplo de Referencia 16

8-(2-([1-acetil-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]oxi)etil)-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



Peso Molecular = 531,48

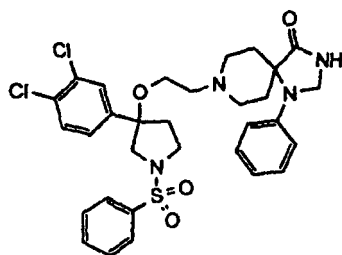
Masa Exacta = 530

Fórmula Molecular = $C_{27}H_{33}Cl_2N_4O_3$

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7,65 (1 H, dd, J = 12,8 Hz, 2,2 Hz), 7,55 (1H, dd, J = 8,4 Hz, 2,7 Hz), 7,42 (1H, dt, J = 8,9 Hz, 2,0 Hz), 7,24 (2H, dt, J = 9,3 Hz, 2,3 Hz), 6,99 (2H, d, J = 8,2 Hz), 6,84 (1H, t, J = 7,3 Hz), 4,66 (2H, s), 4,07 (1H, t, J = 11,2 Hz), 3,79-3,66 (2H, m), 3,58-3,35 (2H, m), 3,26-3,19 (1H, m), 2,95-2,83 (2H, m), 2,79-2,70 (2H, m), 2,63-2,52 (5H, m), 2,38-2,22 (1H, m), 2,07 (2H, d, J = 3,6 Hz), 1,66 (2H, d, J = 13,7 Hz). EMAR calculado para $C_{27}H_{33}Cl_2N_4O_3$ (M+H) $^+$: 531,1929 hallado: 531,1920.

Ejemplo de Referencia 17

8-(2-([3-(3,4-diclorofenil)-1-(fenilsulfonyl)pirrolidin-3-il]oxi)etil)-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



Peso Molecular = 629,61

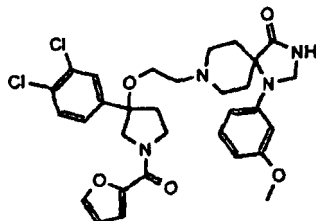
Masa Exacta = 628

Fórmula Molecular : $C_{31}H_{34}Cl_2N_4O_4S$

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7,87 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,66 (1H, t, J = 7,2 Hz), 7,58 (2H, 7,8 Hz), 7,51 (1H, d, J = 1,6 Hz), 7,47 (1 H, d, J = 8,4 Hz), 7,29 (1H, dd, J = 8,4 Hz, 2,0 Hz), 7,23 (2H, t, J = 8,2 Hz), 6,96 (2H, d, J = 8,2 Hz), 6,83 (1H, t, J = 7,3 Hz), 4,66 (2H, s), 3,79 (1H, dd, J = 11,3 Hz, 1,1 Hz), 3,57 (1H, t, J = 7,5 Hz), 3,46 (1H, d, J = 11,4 Hz), 3,42-3,38 (1 H, m), 3,12-3,09 (1H, m), 2,94-2,90 (1H, m), 2,80-2,70 (2H, m), 2,61-2,40 (5H, m), 2,22-2,13 (3H, m), 1,61 (2H, d, J = 11,4 Hz).

Ejemplo de Referencia 18

8-(2-([3-(3,4-diclorofenil)-1-(2-furoil)pirrolidin-3-il]oxi)etil)-1-(3-metoxifenil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



Peso Molecular = 613,54

Masa Exacta = 612

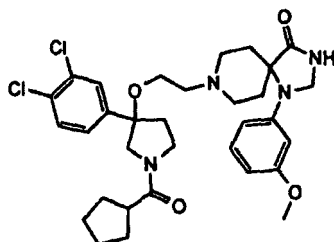
Fórmula Molecular = $C_{31}H_{34}Cl_2N_4O_5$

ES 2 309 400 T3

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,70-7,63 (2H, m), 7,56 (1 H, d, $J = 8,3$ Hz), 7,49-7,45 (1H, m), 7,16-7,12 (2H, m), 6,65-6,61 (1H, m), 6,59-6,55 (1H, m), 6,44 (2H, d, $J = 6,2$ Hz), 4,63 (2H, d, $J = 3,3$ Hz), 4,35 (1H, dd, $J = 67,0$ Hz, 11,9 Hz), 4,25-4,20 (1H, m), 3,85-3,79 (1H, m), 3,82 (1H, dd, $J = 109,8$ Hz, 12,0 Hz), 3,75 (3H, s), 3,42-3,39 (1H, m), 3,30-3,18 (1H, m), 2,90-2,65 (5H, m), 2,64-2,52 (4H, m), 2,45-2,39 (1H, m), 1,65-1,55 (2H, m). EMAR calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 613,1985 hallado: 613,1987.

Ejemplo de Referencia 19

8-(2-[[1-(ciclopentilcarbonyl)-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]oxi]etil)-1-(3-metoxifenil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



Peso Molecular = 615,60

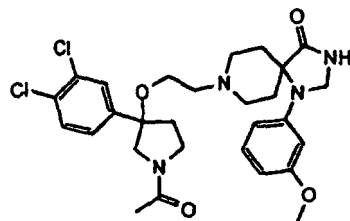
Masa Exacta = 614

Fórmula Molecular = $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,64 (1H, dd, $J = 17,0$ Hz, 2,0 Hz), 7,55 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, 5,3 Hz), 7,43 (1H, ddd, $J = 8,4$ Hz, 7,2 Hz, 2,0 Hz), 7,15 (1H, t, $J = 8,4$ Hz), 6,65-6,62 (1H, m), 6,45-6,43 (2H, m), 4,64 (2H, s), 4,11 (1H, q, $J = 11,3$ Hz), 3,83-3,79 (1H, m), 3,75 (3H, s), 3,70-3,65 (1H, m), 3,58-3,52 (1H, m), 3,47 (1H, d, $J = 12,6$ Hz), 3,41-3,35 (1H, m), 3,27-3,19 (1H, m), 2,98-2,84 (3H, m), 2,78-2,70 (2H, m), 2,64-2,52 (4H, m), 2,38-2,21 (1H, m), 1,92-1,80 (2H, m), 1,75-1,55 (8H, m). EMAR calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 615,2505 hallado: 615,2496.

Ejemplo de Referencia 20

8-(2-[[1-acetil-3-(3,4-diclorofenil)pirrolidin-3-il]oxi]etil)-1-(3-metoxifenil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



Peso Molecular = 561,51

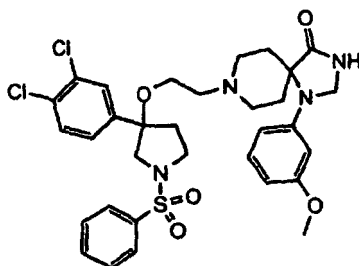
Masa Exacta = 580

Fórmula Molecular = $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,65 (1H, dd, $J = 12,6$ Hz, 2,0 Hz), 7,55 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, 3,1 Hz), 7,43 (1H, dt, $J = 9,3$ Hz, 2,0 Hz), 7,15 (1H, dt, $J = 8,6$ Hz, 3,1 Hz), 6,66-6,63 (1H, m), 6,45-6,43 (2H, m), 4,64 (2H, s), 4,06 (1H, t, $J = 12,7$ Hz), 3,75 (3H, s), 3,72 (2H, t, $J = 4,2$ Hz), 3,57-3,50 (1H, m), 3,45 (1H, d, $J = 12,6$ Hz), 3,41-3,35 (1H, m), 3,26-3,19 (1H, m), 2,93-2,83 (2H, m), 2,78-2,69 (2H, m), 2,64-2,52 (4H, m), 2,39-2,22 (1H, m), 2,07 (3H, d, $J = 2,7$ Hz), 1,64 (2H, d, $J = 13,5$ Hz). EMAR calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 561,2035 hallado: 561,2051.

Ejemplo de Referencia 21

8-(2-([3-(3,4-diclorofenil)-1-(fenilsulfonil)pirrolidin-3-il]oxi)etil)-1-(3-metoxifenil)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona



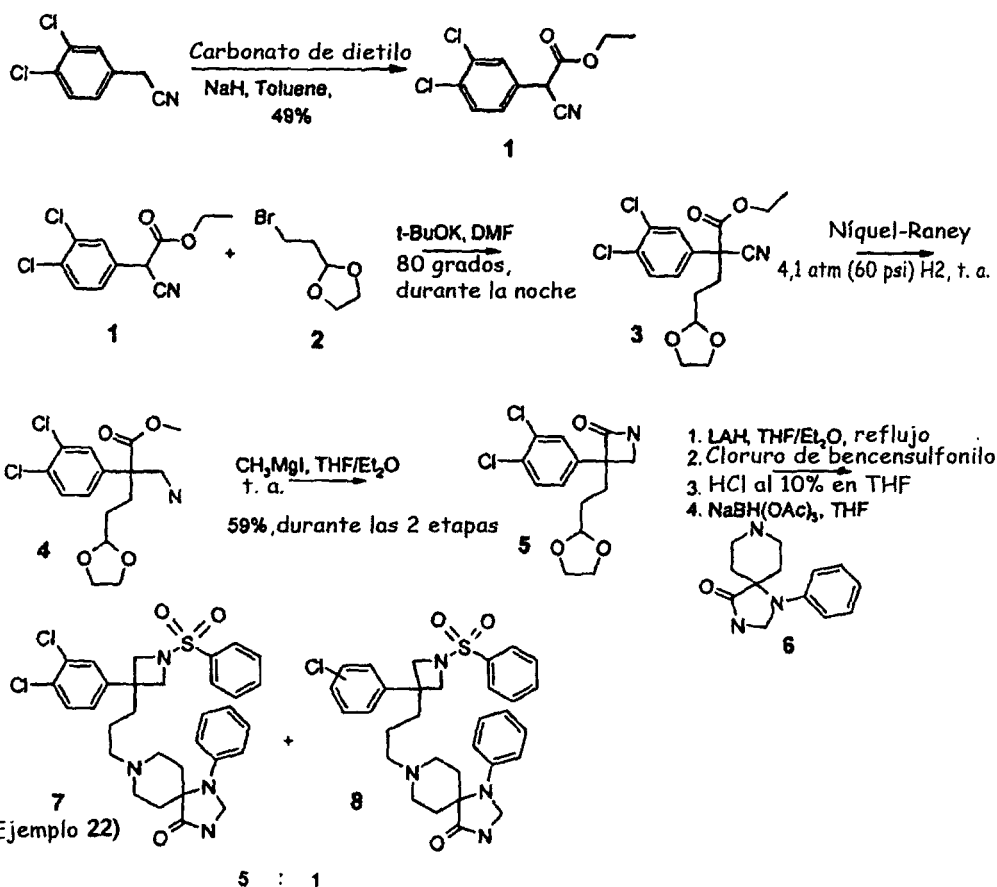
Peso Molecular = 659,63

Masa Exacta = 658

Fórmula Molecular = $C_{32}H_{36}Cl_2N_4O_5S$

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7,88 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,68-7,64 (1H, m), 7,61-7,57 (2H, m), 7,52 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,48 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,31 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $2,0$ Hz), 7,15 (1H, t, $J = 8,8$ Hz), 6,62 (1H, dd, $J = 7,4$ Hz, $2,0$ Hz), 6,45-6,44 (2H, m), 4,65 (2H, s), 3,81-3,76 (4H, m), 3,57 (1H, t ancho, $J = 3,7$ Hz), 3,48-3,38 (2H, m), 3,13-3,07 (1H, m), 2,98-2,85 (2H, m), 2,78-2,71 (2H, m), 2,60-2,49 (4H, m), 2,45-2,39 (1H, m), 2,24-2,14 (3H, m), 1,63-1,58 (2H, m). EMAR calculado para $C_{32}H_{37}Cl_2N_4O_4S$ ($M+H$) $^+$: 659,1862 hallado: 659,1845.

V. El anillo B es azetidina



ES 2 309 400 T3

Síntesis del Intermedio 1

Ciano(3,4-diclorofenil)acetato de etilo

5 A una solución de carbonato de dietilo (4,1 ml, 33,88 mmol) en tolueno (150 ml) a temperatura ambiente se le añadió hidruro de sodio (1,43 g, en aceite mineral al 60%, 35,75 mmol) y 3,4-diclorofenil acetonitrilo (6,34 g, 34,09 mmol). Se agitó el contenido a 80°C durante la noche. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió HCl (1N en H₂O, 100 ml). Se extrajo el contenido con acetato de etilo (3x). La fase orgánica combinada se lavó con agua, se secó (Na₂SO₄), se filtró y concentró. Se purificó el residuo por medio de cromatografía de resolución rápida en columna con hexano/acetato de etilo (6/1) para dar 7,42 g del producto (rendimiento del 85%) como un aceite marrón. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7,60 (1H, s ancho), 7,54 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,35 (1H, d ancho, J = 8,3 Hz), 4,72 (1H, s), 4,29 (2H, q, J = 14,2 Hz, 7,0 Hz), 1,28 (3H, t, J = 6,7 Hz). EMAR calculado para C₁₁H₉Cl₂NO₂ (M+H)⁺: 257 hallado: 257.

Síntesis del Intermedio 3

2-Ciano-2-(3,4-diclorofenil)-4-(1,3-dioxolan-2-il)butanoato de etilo

20 A una solución de 1 (7,02 g, 27,32 mmol) y 2-(2-bromoetil)-1,3-dioxolano se le añadió compuesto 2 (3,85 ml, 32,78 mmol) en DMF anhidro (100 ml), t-butoxido de potasio (32,78 ml, 1 M en t-BuOH). Se calentó el contenido hasta 80°C y se agitó durante la noche. Se añadió H₂O (400 ml) y salmuera (200 ml) al contenido y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica combinada sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La cromatografía de resolución rápida en columna con hexano/acetato de etilo (6/1) dio 9,5 g de aceite marrón (aproximadamente 85% de producto + aproximadamente 15% de MP). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7,66 (1H, d, J = 2,3 Hz), 7,48 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,40 (1H, dd, J = 8,4 Hz, 2,2 Hz), 4,91 (1H, t, J = 4,4 Hz), 4,30-4,20 (2H, m), 3,98-3,94 (2H, m), 3,86-3,83 (2H, m), 2,48 (1H, td, J = 12,2 Hz, 4,5 Hz), 2,24 (1H, td, J = 12,2 Hz, 4,3 Hz), 1,88-1,81 (1H, m), 1,75-1,68 (1H, m), 1,24 (3H, t, J = 7,1 Hz). RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 166,90, 134,68, 133,70, 131,28, 128,60, 125,88, 117,58, 103,04, 65,26, 63,91, 53,22, 32,24, 29,88, 14,06.

Síntesis del Intermedio 5

3-(3,4-Diclorofenil)-3-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-2-azetidiona

35 A una solución de 3 (1,50 g, 4,20 mmol) en EtOH (100 ml) se le añadió Níquel Raney (1 g). Se agitó el contenido con H₂ a 4,1 atm (60 psi) durante la noche. A continuación se filtró a través de celite y se concentró. El residuo se disolvió en Et₂O (20 ml), se añadió CH₃MgI (5,6 ml, 3M en Et₂O, 16,8 mmol). Se agitó el contenido a temperatura ambiente durante la noche. Se extinguió la reacción con disolución saturada de bicarbonato de sodio, se filtró a través de celite, se extrajo con EtOAc, se secó y a continuación se concentró. Se purificó el residuo por medio de cromatografía de resolución rápida en columna con hexano/EtOAc (1/2) para dar 0,78 g de producto (rendimiento del 59% durante dos etapas) como un sólido amarillo claro. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7,49 (1H, d, J = 2,1 Hz), 7,40 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,25 (1H, dd, J = 8,2 Hz, 1,9 Hz), 6,23 (1H, s), 4,82 (1H, t, J = 4,5 Hz), 3,93-3,88 (2H, m), 3,83-3,78 (2H, m), 3,50 (2H, dd, J = 15,9 Hz, 5,5 Hz), 2,10-2,02 (2H, m), 1,81-1,72 (1H, m), 1,61-1,52 (1H, m). RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 171,44, 140,05, 132,82, 131,48, 130,74, 128,92, 126,42, 103,83, 65,17, 62,98, 48,63, 31,37, 29,36. EMAR calculado para C₁₄H₁₆Cl₂NO₃ (M+H)⁺: 316; hallado: 316.

Síntesis del Intermedio 7 (Ejemplo 22)

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(fenilsulfonil)-3-azetidinil]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

50 A una solución de 5 (0,778 g, 2,47 mmol) en THF (15 ml), se le añadió LAH (4,94 ml, 1 M en Et₂OH, 4,94 mmol) a temperatura ambiente. Se calentó el contenido hasta la temperatura de reflujo durante 5 horas y a continuación se siguió agitando a temperatura ambiente durante la noche. Se enfrió la reacción hasta 0°C y se extinguió con H₂O (0,23 ml), hidróxido de sodio (al 15%, 0,23 ml) y H₂O (0,69 ml) en forma consecutiva. A continuación se filtró y se concentró para dar un aceite incoloro.

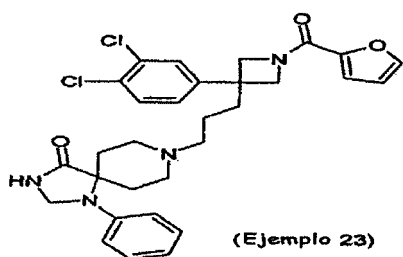
60 Se disolvió la mitad del aceite en diclorometano. Se añadió trietilamina (0,518 ml, 3,72 mmol), seguido por cloruro de bencensulfonilo (0,237 ml, 0,86 mmol). Se agitó el contenido a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó la fase orgánica con hidróxido de sodio 1N, se secó sobre sulfato de sodio. La separación por cromatografía preparativa en capa fina (TLC) con hexano/EtOAc (1/1) dio 100 mg de producto como un aceite incoloro.

65 A una solución del aceite en THF (9 ml), se le añadió HCl concentrado (1 ml). Se agitó el contenido a temperatura ambiente durante la noche, se extinguió con disolución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar un aceite incoloro.

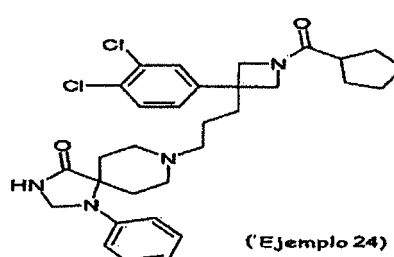
ES 2 309 400 T3

A una solución del aceite en THF (5 ml), se le añadió la amina 6 (0,15 g, 0,65 mmol). El contenido se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de añadir $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (0,27 g, 1,30 mmol). Se agitó el contenido a temperatura ambiente durante la noche. Se extinguió con disolución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró dando como resultado la mezcla 5:1 de 7 y 8. Se purificó el residuo mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (PHPLC) para eliminar el subproducto monoclora y dio como resultado 31 mg de producto 7 (Ejemplo 22) como un sólido blanco (sal del ácido fórmico). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 8,41 (1H, s), 7,81 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,61 (1H, t, $J = 7,3$ Hz), 7,54 (2H, t, $J = 7,5$ Hz), 7,33 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), 7,27 (2H, t, $J = 7,7$ Hz), 6,96 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), 6,89-6,85 (3H, m), 6,78 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, 2,2 Hz), 6,46 (1H, s), 4,73 (2H, s), 3,91 (2H, d, $J = 7,9$ Hz), 3,84 (2H, d, $J = 7,9$ Hz), 3,37-3,21 (4H, m), 2,99 (2H, td, $J = 14,3$ Hz, 4,9 Hz), 2,73 (2H, t, $J = 7,7$ Hz), 1,85-1,73 (4H, m), 1,48-1,40 (2H, m). EMAR calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 613,2; hallado: 613,3.

Los siguientes dos compuestos se obtuvieron de manera similar. Excepto por la sustitución del cloruro de bencenosulfonilo por cloruro de 2-furancarboxilo (23), cloruro de ciclopentanocarboxilo (24) en la síntesis descrita anteriormente para el ejemplo 22



Peso Molecular = 567,51
Masa Exacta = 568
Fórmula Molecular = $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$



Peso Molecular = 569,57
Masa Exacta = 568
Fórmula Molecular = $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$

Ejemplo 23

8-{3-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(2-furancarboxil)-3-azetidil]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,49 (1H, s), 7,43 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,30-7,26 (4H, m), 7,08 (1H, d, $J = 3,3$ Hz), 7,00 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, 2,0 Hz), 6,94-6,85 (3H, m), 6,50-6,47 (1H, m), 4,76-4,68 (3H, m), 4,61-4,56 (1H, m), 4,36 (1H, d, $J = 9,9$ Hz), 4,22 (1H, d, $J = 9,7$ Hz), 2,82-2,52 (6H, ancho), 2,46-2,30 (2H, s ancho), 2,04-1,96 (2H, m), 1,70 (2H, d, $J = 12,8$ Hz), 1,37 (2H, s ancho). EMAR calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 567; hallado: 567.

Ejemplo 24

8-{3-[1-(ciclopentilcarbonyl)-3-(3,4-diclorofenil)-3-azetidil]propil}-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7,44 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,30-7,25 (3H, m), 7,20 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), 6,97 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, 2,0 Hz), 6,92-6,85 (2H, m), 6,45 (1H, s ancho), 4,71 (2H, s), 4,30 (1H, d, $J = 8,1$ Hz), 4,24 (2H, d, $J = 11,4$ Hz), 4,18 (1H, d, $J = 9,5$ Hz), 2,70 (4H, s ancho), 2,63-2,54 (2H, m), 1,95-1,90 (2H, ancho), 1,80-1,67 (10H, m), 1,57-1,50 (2H, m), 1,37-1,20 (2H, ancho). EMAR calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 569; hallado: 569.

Como apreciarán los expertos en la técnica, otros compuestos de la presente invención pueden prepararse de manera similar de acuerdo con los esquemas proporcionados en este documento.

ES 2 309 400 T3

Datos biológicos

Se aplican las siguientes definiciones:

Cl ₅₀	Concentración del compuesto que desplaza el 50% del radioligando
pCl ₅₀	El valor de Cl ₅₀ determinado expresado como $-\log_{10}(\text{Cl}_{50})$

Unión al Receptor 5 de Quimiocina CC por Ensayo de Proximidad de Centelleo (CCR5 SPA)

Ensayo de proximidad de centelleo para el receptor de quimiocina CC humana, CCR-5.

Este protocolo describe una pantalla de alto rendimiento que usa la unión SPA para identificar compuestos que inhiben la unión de ¹²⁵I-MIP1α al receptor de quimiocina CCR5 humano.

El CCR5 es un receptor acoplado a la proteína G que liga los ligandos naturales de quimiocinas, MIP1α, MIP1β y RANTES. El CCR5 actúa como un correceptor con CD4 para la entrada del VIH-1 en las células T y en los monocitos humanos. Las quimiocinas tienen también una función en los procesos inflamatorios agudos y crónicos. Las quimiocinas son proteínas solubles producidas y liberadas por una gran diversidad de tipos celulares durante la fase inicial de una respuesta del huésped a una sustancia extraña que entra en el cuerpo.

Se expresaron receptores CCR5 humanos en células de ovario de hámster chino (CHO), N° de registro 12025. Se cultivaron las células en suspensión y se prepararon 50 a 80 ml de sedimentos de células de CCR5. Preparación de membranas: 1) Pesar los sedimentos; 2) Preparar un tampón HEPES 50 mM y enfriarlo con hielo, conteniendo Pefabloc 0,0025 mg/ml, Pepstatina A 0,0001 mg/ml, Leupeptina 0,00001 mg/ml, Aprotinina 0,00001 mg/ml (cóctel inhibidor de proteasas), pH 7,4; 3) Homogeneizar el sedimento en 5 volúmenes de tampón HEPES; 4) Homogeneizar nuevamente con una varilla de vidrio 10 a 20 veces; 5) Centrifugar el homogenado a 18.000 rpm en un rotor F28/36 usando una centrífuga refrigerada Sorvall RC26 PLUS durante 30 minutos; 6) Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 3 volúmenes de tampón HEPES; 7) Homogeneizar y centrifugar nuevamente usando las etapas 4-6, 2 veces más; 8) Volver a pesar el sedimento y homogeneizar en tampón HEPES 3X peso en volumen; 9) Colocar alícuotas de 0,5 a 1,5 ml de la preparación de membranas en pequeños viales y almacenar a -80 grados Centígrados; 10) Determinar la concentración de proteínas de la preparación de membranas usando el método BCA de Bio-Rad; 11) El homogenado de membranas necesitará caracterización para las condiciones de ensayo, a.) Concentración de proteínas; b.) Proporción proteína/perla óptima en SPA; y c.) Curva de saturación para determinar Kd y Bmáx en SPA.

El experimento de unión para la curva de saturación se realiza añadiendo cantidades variables de [¹²⁵I]MIP1α (0-8,5 nM a las membranas y perlas en concentraciones elegidas de la proporción proteína/perla óptima). Los datos se analizan usando un programa de ajuste de curvas no lineales. Kd y Bmáx se obtienen de la curva.

Se disuelve bacitracina 50 mg/ml en agua desionizada, se hierve durante 5 minutos (para destruir la actividad proteasa) y se enfría. Se preparan alícuotas de 1 ml y se almacena a -80°C.

Se prepara el cóctel inhibidor de proteasas disolviendo 25 mg/ml de Pefabloc, 1 mg/ml de Leupeptina, 1 mg/ml de Aprotinina y 1 mg/ml de Pepstatina A en DMSO al 100%. El cóctel puede separarse en alícuotas y almacenarse congelado a -20°C hasta su uso.

Sigmacote: Todos los frascos y recipientes que entran en contacto con el radioligando se tratan con Sigmacote para reducir la adhesividad. Aclarar los recipientes con Sigmacote sin diluir; aclarar con agua desionizada varias veces y dejar secar al aire antes de usar.

Ensayo de extinción de color - kit de extinción de color [¹²⁵I] SPA PVT, Cat. N° RPAQ 4030, Amersham Ltd. Se genera una curva de extinción de color para cada TopCount Packard y se almacena en cada protocolo de conteo específico para el ensayo. Esto se realiza para evitar que compuestos coloreados extingan los conteos de centelleo.

Preparación de los compuestos:

Se colocan los compuestos para una única determinación de concentración (One Shots) en Optiplacas Packard de 96 pocillos que contienen 1 μl del compuesto en DMSO al 100% en las columnas A1-H10 (80 compuestos/placa). Las columnas A11 a H11 se usan para unión total (Bo) (vehículo - 5 μl de la concentración de DMSO adecuada) y las columnas A12 a D12 se usan para la determinación de la unión no específica. No es necesaria otra preparación.

Los compuestos para las curvas de concentración-respuesta (10 puntos) se colocan en Optiplacas Packard de 96 pocillos que contienen 1 μl del compuesto en DMSO al 100% en las columnas A1-H10. Se desea realizar una curva de concentración-respuesta de 10 puntos para cada compuesto con una concentración de inicio alta de 30 μM (en el

ES 2 309 400 T3

ensayo final). Las columnas A11 a H11 se usan para la unión total (Bo) (vehículo - 5 μ l de la concentración de DMSO adecuada) y las columnas A12 a D12 se usan para la determinación de la unión no específica. No es necesaria otra preparación.

5 *Materiales*

HEPES 1 M, pH 7,4, Gibco, Cat. N° 15360-080

Bacitracina, Catálogo Sigma, Número 8-0125

10

Seroalbúmina Bovina, Cat. Sigma, N° A-7888

MgCl₂, J.T. Baker 2444-01

15

CaCl₂, Sigma, Cat. N° C5080

MIP1 α , Peprotech, Cat. N° 300-08

Sigmacote, Sigma, Cat. N° SL2

20

Perlas de Proximidad de Centelleo, Aglutinina del Germen de Trigo, Amersham, Cat. N° RPNQ 0001

[¹²⁵I]MIP1 α , NEN (N° NEX298)

25

Optiplaca Packard de 96 pocillos de base plana. Cat. N° 6005190

Placa Falcon de 96 pocillos de base redonda, Cat. N° 3077

TOPSEAL-S, Packard, Cat. N° 6005161

30

Sulfóxido de dimetilo, EM Science, Cat. N° MX1458-6

Puntas de pipeta siliconadas, Accutip, volumen 200-1300 μ l, Cat. N° P5048-85

35

Puntas de pipeta siliconadas, Bio Plas, Inc., volumen 1-200 μ l. Cat. N° 60828-908

Frasco de reactivo, Elkay, Cat. N° 175-RBAS-000

40

Preparación del tampón de ensayo:

Tampón HEPES 50 mM pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM (esto puede prepararse como anteriormente como una solución madre 100X), SAB al 1%, Bacitracina 0,5 mg/ml, Cóctel inhibidor de proteasas (véase preparación anterior) 100 μ l/100 ml, se añade DMSO hasta una concentración final de 2% por pocillo (incluye el compuesto %DMSO) si es necesario.

45

Detalles experimentales

50

Preparación de [¹²⁵I]MIP1 α :

Preparar las diluciones de radioligandos en los recipientes tratados con Sigmacote.

Reconstituid cada vial de 50 μ Ci con 0,5 ml de agua desionizada y almacenar a 4°C.

55

Actividad específica = 2.000 Ci/mmol.

Añadir aproximadamente 60.000 cpm (0,17 nM) a cada pocillo de ensayo en 50 μ l.

60

B_o:

Preparar una disolución de DMSO al 20% y añadir 5 μ l de la misma a cada pocillo en las columnas A11-H11. Esto da una concentración final de DMSO al 2% para el pocillo cuando se añade al 1% en el tampón de ensayo.

65

ES 2 309 400 T3

NSB:

Preparar una dilución madre de MIP1 α a 100 μ M usando agua desionizada, separar en alícuotas y congelar. Diluir la disolución madre de MIP-1 α hasta una concentración de 2 μ M en la misma disolución de DMSO al 20% usada anteriormente y añadir 5 μ l a los pocillos en las columnas A12 a D12 para dar la concentración final del ensayo de 100 nM. Preparar esto en un recipiente tratado con Sigmacote.

Preparación de membranas y perlas del SPA

La concentración final de ensayo para la membrana es de 15 μ g por pocillo. Las perlas del SPA se preparan añadiendo 5 ml de tampón de ensayo a un vial de 500 mg. La concentración final de perlas de SPA en el ensayo es de 0,25 mg/pocillo. Se mezclan las membranas y las perlas como una mezcla 1:1 (membrana:perla) y se mantiene a 4°C con agitación constante. Se añaden 50 μ l de la mezcla a cada pocillo del ensayo. Una vez añadidos todos los reactivos a las placas (volumen total del ensayo: 100 μ l), agitar las placas durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras 4 horas, colocar las placas en el TopCount y realizar el conteo de las placas en el TopCount durante 30 segundos por pocillo usando un programa adecuado (es decir, uno con una curva de extinción establecida para las condiciones del ensayo).

Reducción de los datos:

La reducción de los datos se realiza usando Microsoft Excel Addins Robofit o Robosage.

Para los ensayos de concentración única (One Shots), el resultado de cada prueba se expresa como inhibición % usando la siguiente fórmula: $100 \cdot (1 - (U1 - C2) / (C1 - C2))$. Donde U1 es la muestra desconocida en cpm observada en un pocillo particular, C1 es el promedio de cpm de las columnas 12 observado en ausencia de inhibidor añadido, y C2 es el promedio de cpm de las columnas 11 observado en presencia de 1 μ M de MIP1 α .

Para los ensayos de concentración-respuesta, el resultado de cada pocillo de prueba se expresa como %B/Bo (unión específica total %) usando la siguiente fórmula: $100 \cdot (U1 - C2) / (C1 - C2)$. Las curvas se generan graficando el %B/Bo versus la concentración y la CI₅₀ se obtiene usando la ecuación $y = V_{\max} \cdot (1 - (x^n / (k^n + x^n)))$.

Controles y patrones

Cada placa contiene 12 pocillos de unión total (columna A11-H11). El cpm/pocillo se promedia y se usa en la reducción de datos como valor C1. Cada placa también contiene 4 pocillos de unión no específica (pocillos A12-D12). Los conteos de estos pocillos se promedian y se usan en la reducción de datos como valor C2.

Se incluye una placa de patrones en cada experimento. Esta placa contiene una curva de concentración-respuesta de 14 puntos (en triplicado) para el compuesto patrón MIP1 α a una concentración inicial de 1 μ M. El pK_i histórico promedio obtenido con MIP1 α es 7,6.

El campo de respuesta biológica relevante para una concentración única (One Shots) es la inhibición %. Los valores de inhibición de >40 ó >50 se consideraron respuestas positivas.

El campo de respuesta biológica relevante para un experimento de concentración-respuesta es pK_i HOS Assay (También denominado Ensayo HOS-LTR-Luciferasa).

Materiales

DMEM (GibcoBRL N° 10564-011)

Trpsin-EDTA (GibcoBRL N° 25300-054)

Seroalbúmina bovina (SAB) inactivada por calor (Hyclone N° SH30070,03)

Placas de cultivo tisular tratadas, de 96 pocillos, de pares negros, fondo transparente (Costar N° 3904)

Placas de cultivo tisular tratadas, de 96 pocillos, de pares transparentes, fondo transparente (Costar N° 3598)

Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (GibcoBRL N° 14190-14'4)

Sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma N° D2650)

Ensayo de Informador Lucite Luciferasa (Packard N° 6016911)

HOS-CD4.CCR5-LTR-Luciferasa (Registro Bioresource N° 21164): Línea celular de osteosarcoma humano modificada por ingeniería genética para sobreexpresar CD4 humano y CCR5 humano (AIDS Repository cat. N° 3318) transfectado establemente con informador HIV-1-LTR-Luciferasa.

ES 2 309 400 T3

Preparación avanzada

Cultivo y mantenimiento de la línea celular HOS-CD4.CCR5-LTR-Luciferasa: Se propagaron las células en DMEM que contenía SAB al 2%. Se separaron las células por tripsinización convencional cuando se alcanzó confluencia del 80% (aproximadamente cada 2 a 3 días).

Valoración de poblaciones de virus

Las poblaciones de virus VIH-1 se valoraron en el sistema de ensayo para obtener una estimación del número de partículas infecciosas por unidad de volumen (descrito como RLU/ml). Se diluyeron las poblaciones virales en DMEM que contenía SAB al 2% y se ensayaron como se describe en la siguiente sección, "procedimiento".

Procedimiento

Se sembraron placas de cultivo tisular de 96 pocillos con paredes negras con HOS-CD4.CCR5-LTR-Luciferasa a 0,6 hasta $1,2 \times 10^3$ células por pocillo en 50 μ l de DMEM que contenía SAB al 2% y se colocaron en un incubador húmedo a 37°C, CO₂ al 5%, durante la noche. Al día siguiente, se valoraron los compuestos de prueba 4 veces a 2X la concentración final en DMEM + SAB al 2% + DMSO al 0,2%. Se transfirieron 50 μ l de compuesto valorado a las células HOS y se colocaron las placas en un incubador húmedo a 37°C, CO₂ al 5%, durante 1 hora. Se transfirieron otros 60 μ l de compuesto valorado 2X a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de paredes transparentes y se añadieron 60 μ l de VIH (diluido hasta m.o.i. adecuada) a cada pocillo y se mezcló meticulosamente. Se transfirieron 100 μ l de VIH/mezcla del compuesto a las placas con paredes negras que contenían 100 μ l de células/compuesto. Se colocaron las placas en el incubador húmedo a 37°C, CO₂ al 5%, durante 72 horas. Tras la incubación de 72 horas, se retiraron 150 μ l de sobrenadante y se añadieron 50 μ l de LUCLITE reconstituido (reactivo del kit) a cada pocillo. Se sellaron las placas y se leyó en un luminómetro TopCount (Packard) a 1 segundo/pocillo.

Reducción de datos

Las Unidades de Luz Relativas (RLU) se expresaron como control %.

$$(RLU \text{ en } [] \text{ del fármaco} / RLU \text{ sin fármaco}) * 100 = \text{Control \%}$$

Los valores de CI₅₀ se determinaron por medio de cualquiera de los siguientes cuatro modelos de regresión no lineal:

$$y = V_{\text{máx}} * (1 - (x^n / (K^n + x^n))) + Y_2$$

$$y = V_{\text{máx}} * (1 - (x^n / (K^n + x^n)))$$

$$y = V_{\text{máx}} * (1 - (x / (K + x))) + Y_2$$

$$y = V_{\text{máx}} * (1 - (x / (K + x)))$$

Donde: K es CI₅₀, Y₂ es el estado basal y N es el Coeficiente de Hill.

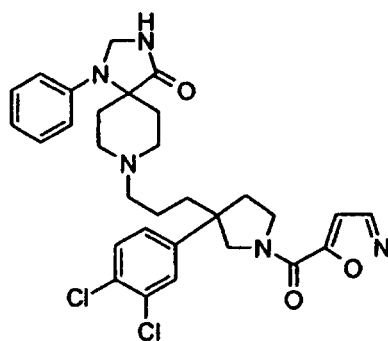
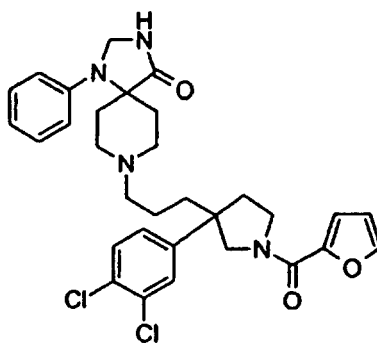
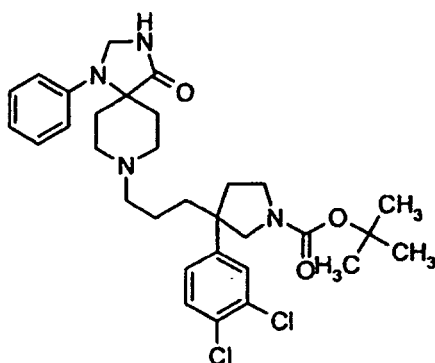
Cada uno de los compuestos de la presente invención proporciona un valor de pCI₅₀ de al menos 5 cuando se prueba en cada uno de los ensayos descritos anteriormente.

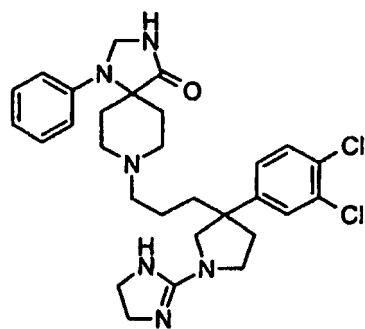
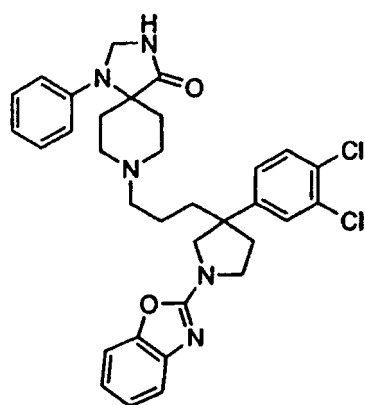
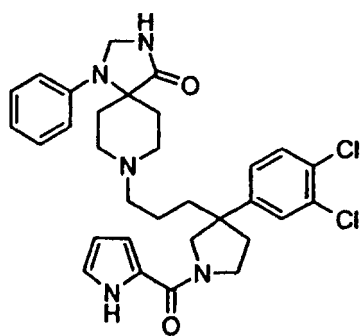
Los compuestos de prueba se usan en forma libre o en forma de sal.

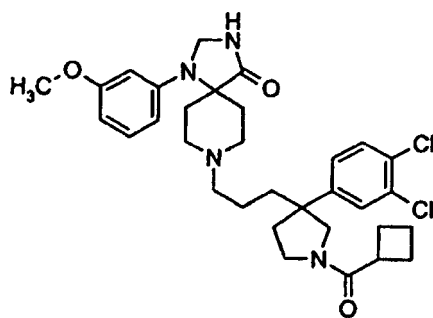
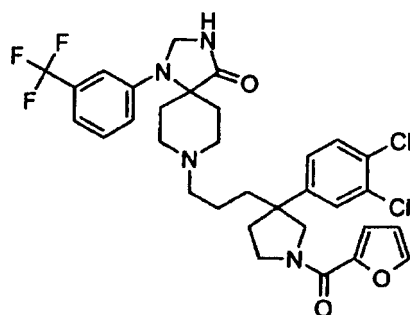
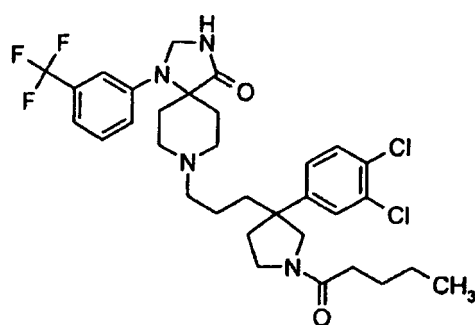
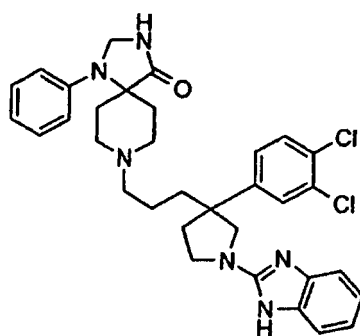
Todas las investigaciones cumplieron con los principios del cuidado de animales de laboratorio (Publicación NIH N° 85-23, revisada en 1985) la política farmacéutica estándar sobre el uso de animales.

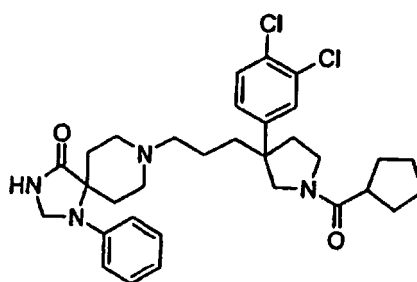
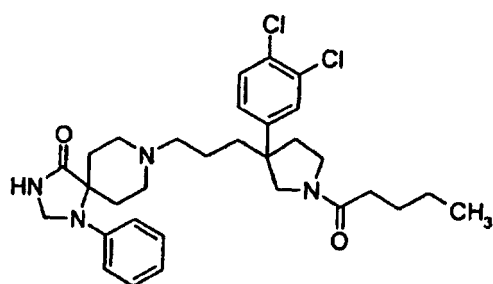
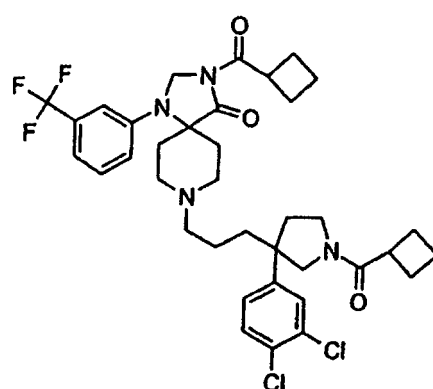
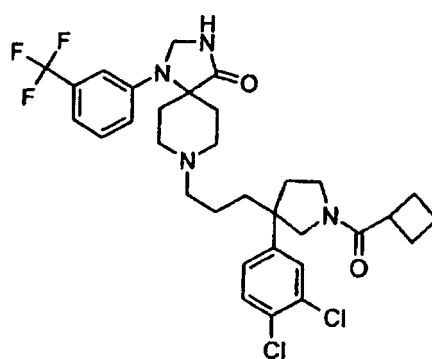
REIVINDICACIONES

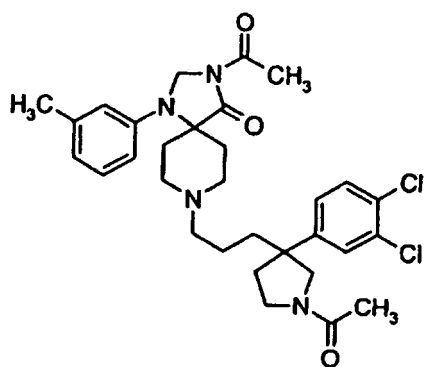
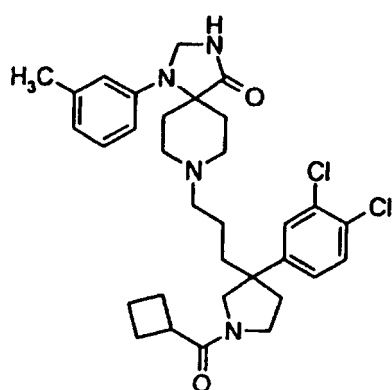
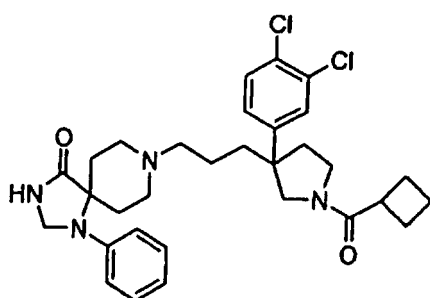
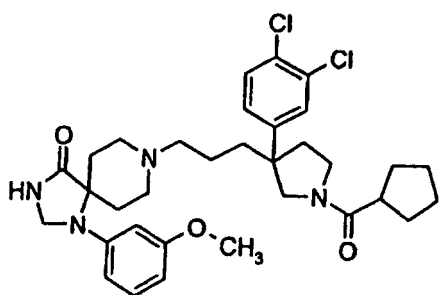
1. Un compuesto o una sal del mismo seleccionados del grupo constituido por

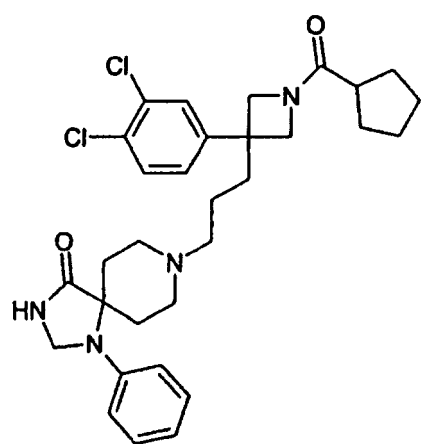
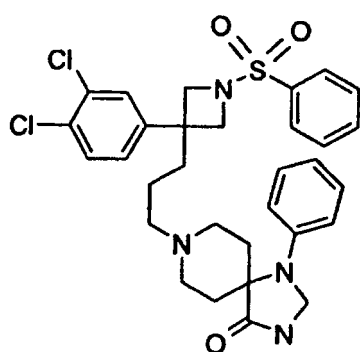
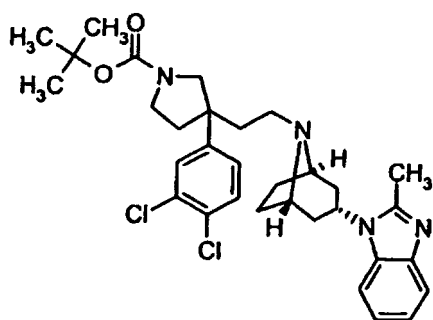




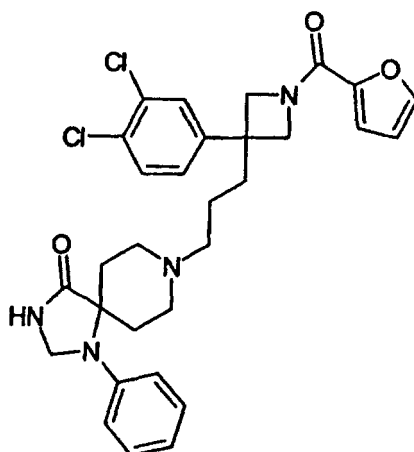








·γ



2. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, para uso en terapia médica.

3. El uso de un compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección viral.

4. El uso según la reivindicación 3 en el que la infección viral es una infección por VIH.

5. El uso de un compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana.

6. El uso según la reivindicación 5 en el que la bacteria es *Yersinia pestis*.

7. El uso de un compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la diabetes autoinmune, el rechazo crónico de injertos, el asma, artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la enfermedad intestinal inflamatoria, la enfermedad inflamatoria crónica, la enfermedad glomerular, la nefritis sérica nefrotóxica, enfermedad renal, la enfermedad de Alzheimer, la encefalomiелitis autoinmune, la trombosis arterial, la rinitis alérgica, la arteriosclerosis, el síndrome de Sjogren (dermatomiositis), el lupus eritematoso sistémico, el rechazo de injertos, cánceres con infiltración leucocitaria de la piel u órganos, trastornos infecciosos incluidos la peste bubónica y la peste neumónica, la infección por el virus del papiloma humano, el cáncer de próstata, la cicatrización de heridas, la esclerosis amiotrófica lateral y trastornos inmunomediados.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8 en la forma de un comprimido o una cápsula.

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9 en la forma de un líquido.

11. El uso de un compuesto según la reivindicación 1, o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento con otro agente terapéutico para el tratamiento de una infección viral en un mamífero.

12. El uso según la reivindicación 11, en el que dicha composición comprende otro agente terapéutico seleccionado del grupo constituido por (1-alfa, 2-beta, 3-alfa)-9-[2,3-bis(hidroximetil)ciclobutil]guanina [(-)BHCG, SQ-34514, lobucavir], 9-[(2R,3R,4S)-3,4-bis(hidroximetil)-2-oxetanosil]adenina (oxetanocin-G), nucleósidos acíclicos, aciclovir, valaciclovir, famciclovir, ganciclovir, penciclovir, fosfonatos de nucleósidos acíclicos, (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil)-citosina (HPMPC), ácido [[[2-(6-amino-9H-purin-9-il)etoxi]metil]-fosfinilideno]bis(oximetileno)-2,2-dimetilpropanoico (bis-POM PMEA, adefovir dipivoxil), ácido [[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoxi] metil]fosfónico (tenofovir), bis-(isopropoxycarboniloximetil) éster del ácido (R)-[[2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoxi]metil]fosfónico (bis-POC-PMPA), inhibidores de la ribonucleótido reductasa, 2-acetilpiridina 5-[(2-cloroanilino) tiocarbonil] tiocarbonohidrazona e hidroxurea, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT, zidovudina), 2',3'-didesoxicitidina (ddC, zalcitabina), 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxinosina (ddl, didanosina), 2',3'-dihidrotimidina (d4T, stavudina), (-)-beta-D-2,6-diaminopurina dioxolano (DAPD), 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina-5'-H-fosfonato (fosfonovir), 2'-desoxi-5-yodo-uridina (idoxuridina), (-)-cis-1-(2-hidroximetil)-1,3-oxatolano 5-il)-citosina (lamivudina), cis-1-(2-(hidroximetil)-1,3-oxatolano 5-il)-5-fluorocitosina (FTC), 3'-desoxi-3'-fluorotimidina, 5-cloro-2',3'-didesoxi-3'-fluorouridina, (-)-cis-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9H-purin-9-il]-2-ciclopenteno-1-metanol (abacavir), 9-[4-hidroxi-2-(hidroximetil)but-1-il]-guanina (H2G), ABT-606 (2HM-H2G) ribavirin, inhibidores de proteasas, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprena-

vir, saquinavir, fosamprenavir, (R)-N-terc-butil-3-[(2S,3S)-2-hidroxi-3-N-[(R)-2-N-(isoquinolin-5-iloxiacetil)amino-3-metiltiopropanoil]amino-4-fenilbutanoil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolidina-4-carboxamida (KNI-272), dimetanosulfonato de 4R-(4alfa,5alfa,6beta)-1,3-bis[(3-aminofenil)metil] hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bis(fenilmetil)-2H-1,3-diazepin-2-ona (mozenavir), 3-[1-[3-[2-(5-trifluorometilpiridinil)-sulfonilamino]fenil]propil]-4-hidroxi-6alfa-fenetil-6beta-propil-5,6-dihidro-2-piranona (tipranavir), N'-[2(S)-Hidroxi-3(S)-[N-(metoxicarbonil)-1-terc-leucilamino]-4-fenilbutil-N alfa-(metoxicarbonil)-N'-[4-(2-piridil)bencil]-L-terc-leucilhidrazida (BMS-232632), 3-(2(S)-Hidroxi-3(S)-(3-hidroxi-2-metilbenzamido)-4-fenilbutanoil)-5,5-dimetil-N-(2-metilbencil)tiazolidina-4(R)-carboxamida (AG-1776), N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2(R)-fenil-metil-4(S)-hidroxi-5-(1-(1-(4-benzo[b]furanilmetil)-2(S)-N'-(terc-butilcarboxamido)piperazinil)pentanamida (MK-944A), interferones, α -interferón, inhibidores de la excreción renal, probenecid, inhibidores del transporte de nucleósidos, dipiridamol, pentoxifilina, N-acetilcisteína (NAC), Procisteína, α -tricosantin, ácido fosfonofórmico, inmunomoduladores, interleucina II, timosina, factores estimulantes de colonias de granulocitos macrófagos, eritropoyetina, CD₄ soluble y derivados de los mismos producidos por ingeniería genética, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTIs), nevirapina (BI-RG-587), alfa-((2-acetil-5-metilfenil)amino)-2,6-dicloro-bencenoacetamida (lovirida), monometanosulfonato de 1-[3-(isopropilamino)-2-piridil]-4-[5-(metanosulfonamido)-1H-indol-2-ilcarbonil] piperazina (delavirdina), (10R, 11S, 12S)-12-hidroxi-6,6,10,11-tetrametil-4-propil-11,12-dihidro-2H,6H,10H-benzo(1,2-b:3,4-b':5,6-b'')tripiran-2-ona ((+) calanolida A), (4S)-6-cloro-4-(1E)-ciclopropiletetil-3,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2(1H)-quinazolinona (DPC-083), (S)-6-cloro-4-(ciclopropiletetil)-1,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona (efavirenz, DMP 266), 1-(etoximetil)-5-(1-metiletil)-6-(fenilmetil)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (MKC-442), y 5-(3,5-diclorofenil)tio-4-isopropil-1-(4-piridil)metil-1H-imidazol-2-ilmetil carbamato (capravirina), antagonistas de la glucoproteína 120, PRO-2000, PRO-542, 1,4-bis[3-[(2,4-diclorofenil)carbonilamino]-2-oxo-5,8-disodiosulfanil]naftalil-2,5-dimetoxifenil-1,4-dihidrazona (FP-21399), antagonistas de citocina, reticulosa (Producto-R), 1,1'-azobis-formamida (ADA), octahidrocloreto de 1,11-(1,4-fenilenbis(metileno))bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (AMD-3100), inhibidores de la integrasa, e inhibidores de fusión.

13. El uso según la reivindicación 12 en el que el otro agente terapéutico es ritonavir.