

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 293**

51 Int. Cl.:

A61K 31/197 (2006.01)
A61K 33/04 (2006.01)
A61K 33/42 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2020** **PCT/EP2020/056483**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2020** **WO20182870**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2020** **E 20708139 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023** **EP 3937924**

54 Título: **Compuestos y composiciones que comprenden los mismos para el tratamiento de la hipertensión o falla cardíaca**

30 Prioridad:

11.03.2019 EP 19305286

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2024

73 Titular/es:

QUANTUM GENOMICS (25.0%)
33, rue Marbeuf
75008 Paris, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%) y
COLLEGE DE FRANCE (25.0%)

72 Inventor/es:

BALAVOINE, FABRICE;
COMPÈRE, DELPHINE;
KECK, MATHILDE;
MARC, YANNICK;
LLORENS-CORTÉS, CATHERINE y
BOITARD, SOLÈNE E.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 965 293 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos y composiciones que comprenden los mismos para el tratamiento de la hipertensión o falla cardíaca

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto, a una composición que comprende el mismo, a un método para preparar el compuesto y al uso de este compuesto en terapia. En particular, la presente invención se refiere a compuestos que son útiles en el tratamiento y prevención de hipertensión arterial primaria y secundaria, ictus, isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca y renal, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, proteinuria diabética, síndrome X y glaucoma.

Antecedentes de la invención

La Hipertensión Esencial (HTN) y la Falla Cardíaca (HF) son dos de las principales patologías de las enfermedades cardiovasculares. La HTN afecta aproximadamente a mil millones de personas en todo el mundo. Es un importante factor de riesgo de enfermedad coronaria, HF, apoplejía e insuficiencia renal. A pesar de la disponibilidad de fármacos eficaces y seguros, la HTN y sus factores de riesgo concomitantes siguen sin controlarse en muchos pacientes. La HF sigue siendo la principal causa de hospitalización de pacientes mayores de 65 años en los países occidentales. La HF afecta de una a cinco personas de cada mil en los países industrializados, todas las edades consideradas, con una prevalencia de tres a veinte de cada mil. A pesar del gran número de fármacos disponibles, la HF tiene un mal pronóstico, ya que la supervivencia a un año, considerando todas las etapas, es de alrededor del 65 %. La HF sigue siendo una de las primeras causas de muerte cardiovascular; en consecuencia, todavía subsiste la necesidad médica no cubierta de desarrollar nuevas clases de fármacos eficientes y seguros.

Se sabe que el sistema renina-angiotensina sistémico (RAS) desempeña una función central en la regulación de la presión arterial (BP) y el metabolismo del sodio. Los fármacos sistémicos dirigidos al RAS, tales como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) y los antagonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁) son clínicamente eficaces para reducir la BP y prevenir la morbilidad y mortalidad cardiovascular y renal en los pacientes. Además, la actividad del sistema renina-angiotensina aldosterona (RAAS) aumenta en pacientes con HF y sus mecanismos de mala adaptación pueden provocar efectos adversos tales como remodelación cardíaca y activación simpática. Los medicamentos recomendados por la IA actual basados en la evidencia para la HF con fracción de eyección reducida son principalmente moléculas que actúan sobre el RAAS, como los inhibidores de la ACE o los bloqueadores del receptor AT₁ y agentes bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos.

Un RAS funcional que controla las funciones cardiovasculares y la homeostasis de los fluidos corporales también está presente en el cerebro. Varios estudios sugieren que el aumento de la actividad del RAS cerebral da como resultado un aumento de la actividad de las neuronas simpáticas y la liberación de vasopresina y que la hiperactividad del RAS cerebral desempeña una función fundamental en la mediación de la BP elevada en varios modelos animales de HTN, así como en la remodelación y disfunción cardíaca en modelos animales de HF (Marc Y, Llorens-Cortes, C Progress in Neurobiology 2011, 95, pp 89-103; Westcott KV et al, Can. J. Physiol. Pharmacol. 2009, 87, pp 979-988). Debido a que evidencias recientes apoyan que la angiotensina III (Ang III) a través de su acción sobre el receptor AT₁ puede ser el verdadero péptido efector del RAS cerebral para el control central de la BP, la aminopeptidasa A cerebral (APA), la enzima que genera Ang III a partir de la angiotensina II (Ang II) en el cerebro constituye una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de la HTN y para el tratamiento de la HF.

La aminopeptidasa A (APA, EC 3.4.11.7) es una metaloproteasa de zinc unida a una membrana, que se ha caracterizado como la enzima responsable de la conversión de AngII en AngIII en el cerebro (Zini S et al, Proc. Natl. Acad. Sci. utiliza 1996, 93, pp 11968-11973). Hasta ahora se han desarrollado varios inhibidores de APA ((Chauvel EN et al, J. Med. Chem. 1994, 37, pp 1339-1346; Chauvel EN et al, J. Med. Chem. 1994, 37, pp 2950-2957; David C et al, J. Med. Chem. 1999, 42, pp 5197-5211; Georgiadis D et al, Biochemistry 2000, 39, pp1152-1155; Inguimbert N et al, J. Peptide Res. 2005, 65, pp 175-188). Entre ellos, se informó que EC33 (sulfonato de (3S)-3-amino-4-tiol-butilo) es un inhibidor de APA específico y selectivo. Se encontró que las infusiones centrales de EC33 inhiben la actividad cerebral de APA, bloquean las respuestas presoras a la infusión intracerebroventricular (icv) de Ang II y reducen la BP en varios modelos experimentales de hipertensión (Fournié-Zaluski MC et al Proc. Natl. Acad. Sci. utiliza 2004, 101, pp 7775-7780).

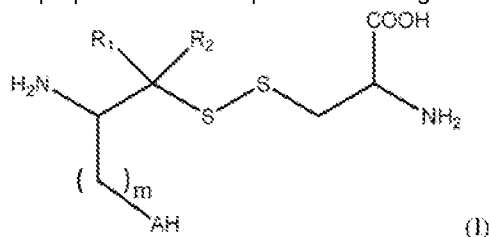
Se demostró además que las administraciones orales agudas en ratas conscientes hipertensas con sal DOCA y ratas SHR de RB 150 (también conocido como fribastat) (15 a 150 mg/kg), un profármaco de EC33 que penetra el cerebro, inducen una disminución dependiente de dosis en la presión arterial ((Bodineau L et al, Hypertension 2008, 51, pp 1318-1325; Marc Y et al, Hypertension 2012, 60, pp 411-418). Curiosamente, se encontró que RB150 reduce la BP en ratas con sal DOCA y SHR, en primer lugar al disminuir la liberación de vasopresina, aumentar la diuresis acuosa y la natriuresis, disminuyendo de esta manera el volumen sanguíneo y la BP para controlar los valores y, en segundo lugar, al disminuir el tono simpático, reduciendo de esta manera las resistencias vasculares y, en consecuencia, disminuyendo la BP. También se informó que las administraciones orales crónicas de RB150 y el inhibidor de la ACE, enalapril, son igualmente efectivas para inhibir la disfunción cardíaca observada en ratas con HF después de un infarto de miocardio (MI) (Boitard S et al, Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2019, 127, pp 215-222). RB150 es capaz de ingresar al cerebro después de la administración oral, bloquear la actividad de la APA cerebral, normalizar la BP en ratas hipertensas y

prevenir la disfunción cardíaca después de un MI en ratas, lo que sugiere que los inhibidores de APA cerebrales representan una nueva clase de agentes de acción central para el tratamiento de la HTN y HF.

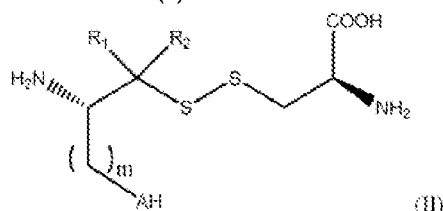
Los presentes inventores han identificado ahora compuestos novedosos que actúan in vivo como potentes inhibidores de APA cerebrales y, a ese respecto, pueden ser eficaces para reducir la hipertensión arterial y pueden tener utilidad en el tratamiento de la hipertensión arterial y las enfermedades a las que contribuye directa e indirectamente, tales como la falla cardíaca. Dichos compuestos también presentan una biodisponibilidad y parámetros farmacocinéticos satisfactorios, lo que los convierte en buenos candidatos para la administración oral o parenteral.

Resumen de la invención

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona un compuesto con la siguiente fórmula (I):



y más específicamente que tiene la siguiente fórmula (II):



En la que:

AH representa $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$;

m es 1, 2 o 3;

R_1 y R_2 representan independientemente H, un grupo alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} o alquinilo C_{2-6} , cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo que se sustituye opcionalmente por al menos uno de los siguientes radicales escogidos del grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo, O-arilo, O-arilalquilo o O-cicloalquilo; dicho arilo, heterociclo, cicloalquilo, O-arilo, O-arilalquilo, grupo O-cicloalquilo se sustituye opcionalmente con uno o más radicales escogidos de un átomo de halógeno, un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo haloalquilo, un grupo haloalcoxi, un grupo acilo, un grupo O-cicloalquilo, un grupo heteroalquilo, un grupo O-arilo, un grupo O-arilalquilo, un grupo arilo, un grupo heterociclo o un grupo arilalquilo; una sal farmacéutica, solvato, forma zwitteriónica o cualquier profármaco de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención divulga una composición que comprende dicho compuesto de la fórmula (I) y más específicamente de la fórmula (II). La composición es más particularmente una composición farmacéutica. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención, preferiblemente en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de la hipertensión arterial y enfermedades relacionadas directa o indirectamente, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de esta invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para uso en terapia o medicina como Ingrediente Farmacéutico Activo, y en particular, en medicina humana, y más específicamente para el tratamiento de la hipertensión arterial y enfermedades o trastornos relacionados indirecta y directamente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipertensión arterial y enfermedades o trastornos relacionados directa o indirectamente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento de un paciente que padece hipertensión arterial y enfermedades relacionadas directa e indirectamente que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1. describe la inhibición de la actividad *ex vivo* de APA cerebral de ratón después de la administración intravenosa (i.v.) del Ejemplo 1 (50 mg/kg).

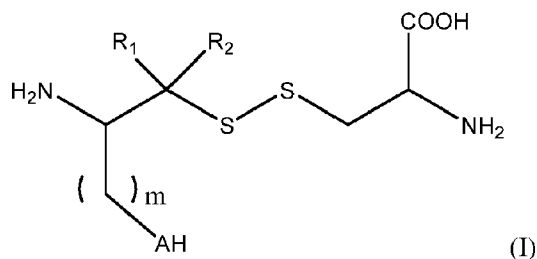
La Figura 2. describe la inhibición de la actividad *ex vivo* de APA cerebral de ratas hipertensas después de administración *per os* (p.o.) del Ejemplo 2 (8 mg/kg).

Las Figuras 3a. y 3b. demuestran el efecto de la administración p.o. del Ejemplo 2 (8 mg/kg) sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratas hipertensas.

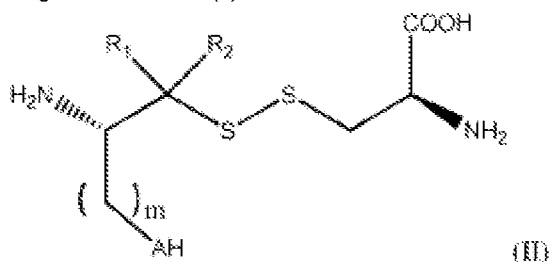
La Figura 4. muestra los efectos de la administración oral crónica de fribastat, ramipril o el ejemplo 2 sobre la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) en ratones de 4 semanas después del MI. Los valores se expresan como la Media $\pm$ EEM de n=9 a n=15.

Descripción detallada

Por tanto, la presente invención se refiere a un compuesto con la siguiente fórmula (I):



y más específicamente que tiene la siguiente fórmula (II):



en la que:

AH representa $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$;
m es 1, 2 o 3;

R_1 y R_2 representan independientemente H, un grupo alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} o alquinilo C_{2-6} , cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo que se sustituye opcionalmente por al menos uno de los siguientes radicales escogidos del grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo, O-arilo, O-arilalquilo o O-cicloalquilo; dicho arilo, heterociclo, cicloalquilo, O-arilo, O-arilalquilo, grupo O-cicloalquilo se sustituye opcionalmente con uno o más radicales escogidos de un átomo de halógeno, un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo haloalquilo, un grupo haloalcoxi, un grupo acilo, un grupo O-cicloalquilo, un grupo heteroalquilo, un grupo O-arilo, un grupo O-arilalquilo, un grupo arilo, un grupo heterociclo o un grupo arilalquilo.

La presente invención proporciona compuestos de acuerdo con la invención para uso o en métodos de prevención o tratamiento de la hipertensión arterial y enfermedades a las que la hipertensión arterial contribuye directa o indirectamente. Dichas enfermedades incluyen enfermedades del corazón, del sistema vascular periférico y cerebral, del cerebro, de los ojos y del riñón. En particular, las enfermedades incluyen hipertensión arterial primaria y secundaria, ictus, isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca o renal, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, proteinuria diabética, síndrome X y glaucoma.

Como se utiliza en el presente documento, "un compuesto de la invención" significa un compuesto descrito anteriormente o un profármaco del mismo o una sal, solvato o cualquier forma zwitteriónica farmacéuticamente aceptable del mismo.

Dentro del contexto de la presente invención:

El término "alquilo" o "Alqu" significa una cadena de hidrocarburos saturada, monovalente o divalente, lineal o ramificada, que comprende de 1-6 átomos de carbono, tal como grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo,

- tert-butilo, tert-butilmetilo, n-pentilo o n-hexilo. En una realización preferida, el "alquilo" es un grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo o tert-butilo, más preferiblemente un grupo metilo o etilo.
- 5 El término "alquenilo" se refiere a un grupo alifático insaturado, lineal o ramificado que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono. El término "alquenilo (C₂-C₆)" incluye más específicamente un grupo etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, pentenilo o hexenilo.
- 10 El término "alquinilo" se refiere a un grupo alifático insaturado, lineal o ramificado que comprende al menos un triple enlace carbono-carbono. El término "alquinilo (C₂-C₆)" incluye más específicamente un grupo etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, isopentinilo o hexinilo.
- El término "acilo" significa un grupo -C(O)R, donde R es un grupo alquilo como se definió anteriormente o un grupo fenilo. Un grupo acilo incluye, por ejemplo, un grupo acetilo, etilcarbonilo o benzoilo.
- 15 El término "alcoxi" o "alquiloxi" significa un grupo -OAlqu en el que Alqu es un grupo alquilo como se definió anteriormente. Un grupo alcoxi incluye, por ejemplo, un grupo metoxi, etoxi, n-propiloxi o tert-butiloxi.
- 20 El término "arilo" o "Ar" significa un sistema aromático monocíclico o bicíclico que comprende de 4-10 átomos de carbono, que se entiende en el caso de un sistema bicíclico, uno de los ciclos es aromático y el otro ciclo es aromático o insaturado. Los grupos arilo incluyen, por ejemplo, grupos fenilo, naftilo, indenilo o benzociclobutenilo, preferiblemente un grupo fenilo.
- El término "arilalquilo" significa un grupo -Alqu-Ar, en el que Alqu representa un grupo alquilo como se definió anteriormente, y Ar representa un grupo arilo como se definió anteriormente.
- 25 El término "cicloalquilo" significa un sistema monocíclico o policíclico saturado, tal como un sistema bicíclico fusionado o con puente, que comprende de 3-12 átomos de carbono, tal como grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, adamantilo, decalinilo o norbornilo.
- 30 El término "O-cicloalquilo" significa un grupo cicloalquilo como se definió anteriormente conectado al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno. O-cicloalquilo incluye, por ejemplo, el grupo O-ciclopentilo u O-ciclohexilo.
- El término "O-arilo" significa un grupo arilo como se definió anteriormente conectado al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno. O-arilo incluye, por ejemplo, el grupo O-fenilo.
- 35 El término "O-arilalquilo" significa un grupo arilalquilo como se definió anteriormente conectado al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno. O-arilalquilo incluye, por ejemplo, el grupo O-bencilo.
- El término "haloalquilo" significa una cadena de hidrocarburos saturada, lineal o ramificada, que comprende de 1-6 átomos de carbono y sustituida con uno o más, y en particular de 1-6 átomos de halógeno, tales como los grupos trifluorometilo o 2,2,2-trifluoroetilo.
- 40 El término "haloalcoxi" significa una cadena de hidrocarburos saturada lineal o ramificada, que comprende de 1-6 átomos de carbono y sustituida con uno o más, y en particular de 1-6 átomos de halógeno, dicha cadena se conecta al compuesto a través de un átomo de oxígeno, tal como los grupos trifluorometoxi o 2,2,2-trifluoroetoxi.
- 45 El término "heterociclo" significa un sistema monocíclico o bicíclico saturado, insaturado o aromático, fusionado, espirofusionado o puenteado, con 3-12 miembros, que comprende 1-4 heteroátomos, idénticos o diferentes, seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, y que contiene eventualmente 1 o 2 grupos oxo (=O) o tioxo (=S), se entiende que en el caso de un sistema bicíclico, uno de los ciclos puede ser aromático y el otro ciclo es aromático, saturado o insaturado. El heterociclo incluye, por ejemplo, grupos piperidilo, piperazilo, furilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, piradizínilo, benzofurilo, benzotienilo, indolilo, quinolilo, isoquinolilo, benzodioxolilo, benzodioxinilo, benzo[1,2,5]tiadiazolilo, benzo[1,2,5]oxadiazolilo, [1,2,3]triazolilo o [1,2,4]triazolilo.
- 50 El término "heteroalquilo" significa una cadena de hidrocarburo saturada, lineal o ramificada, que comprende de 1 a 5 átomos de carbono y al menos 1 o 2 heteroátomos, tales como átomos de azufre, nitrógeno u oxígeno. Heteroalquilo, por ejemplo, incluye el grupo -O(CH₂)₂OCH₃ o -(CH₂)₂OCH₃.
- 55 El término "átomo de halógeno" significa átomo de flúor, bromo, cloro o yodo.
- 60 El término "grupo protector" o "grupo de protección" significa el grupo que bloquea selectivamente el sitio reactivo en un compuesto multifuncional de tal manera que una reacción química se pueda llevar a cabo selectivamente en otro sitio reactivo no protegido, con el significado convencionalmente asociado a este último en la química de síntesis.
- 65 En la presente invención, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a lo que se puede utilizar en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no indeseable, biológicamente o de otro modo, y que es comúnmente aceptada para un uso farmacéutico veterinario o humano.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" de los compuestos de la invención incluye sales convencionales formadas a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, así como sales de amonio cuaternario. Ejemplos más específicos de sales de ácido adecuadas incluyen clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, propiónico, succínico, glicólico, fórmico, láctico, maleico, tartárico, cítrico, palmoico, malónico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico hidroxinaftoico, yodhídrico, málico, esteroico, tánico, etc. Ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas incluyen sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, zinc, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína. Por ejemplo, las formas de sal preferidas incluyen clorhidrato.

El término "profármaco" significa un derivado químico del compuesto, objeto de la invención, que genera *en vivo* dicho compuesto mediante una o más reacciones químicas espontáneas con el medio fisiológico, notablemente mediante reacciones enzimáticas, fotólisis y/o reacciones metabólicas. En el presente caso, los profármacos de los compuestos de la invención generan compuestos *in vivo* identificados como inhibidores de la aminopeptidasa A.

Se puede obtener un profármaco al derivatizar un grupo funcional con fracciones lábiles específicas. El profármaco con función ácida (tal como ácido fosfínico, ácido carboxílico, ácido sulfónico o ácido fosfónico) comprende notablemente éster, el profármaco con función amina comprende notablemente [(2-metilpropanoil)oxi]etoxicarbonilo.

Otros ejemplos se describen en n T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery system", Vol.14, A.C.S Symposium Series, American Chemical Society (1975) y "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", edited by E.B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987).

De acuerdo con la invención, el término "isómero" se refiere a compuestos de la invención que tienen fórmulas moleculares idénticas a las identificadas en el presente documento pero que difieren por naturaleza o en la secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereoisómeros" y los estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan "enantiómeros" o "isómeros ópticos". Los "estereoisómeros" se refiere a racematos, enantiómeros y diastereoisómeros.

El experto en la técnica reconocerá que existen estereocentros en los compuestos de la invención. Cualquier centro quiral de un compuesto de la invención puede ser (R), (S) o racemato. De acuerdo con lo anterior, la presente invención incluye todos los estereoisómeros e isómeros geométricos posibles de los compuestos de la fórmula (I) e incluye no sólo compuestos racémicos sino también isómeros ópticamente activos. De acuerdo con una realización preferida, los compuestos de la invención son de fórmula (II). Cuando se desea un compuesto de fórmula (I) como un enantiómero único, se puede obtener mediante resolución del producto final o mediante síntesis estereoespecífica a partir de un material de partida isoméricamente puro o de cualquier intermedio adecuado. La resolución del producto final, un intermedio o un material de partida se puede efectuar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Stereochemistry of Carbon Compounds by E. L. Eliel (Mcgraw Hill, 1962) y Tables of Resolving Agents por S. H. Wilen.

El experto en la técnica reconocerá que los compuestos de la invención pueden contener al menos una carga positiva y una negativa de tal manera que los compuestos de la invención incluyen formas zwitteriónicas de los mismos. En química, un zwitterión (también llamado sal interna), es una molécula con dos o más grupos funcionales, de los cuales al menos uno tiene una carga eléctrica positiva y el otro negativa y las cargas de los diferentes grupos funcionales se equilibran entre sí, y la molécula en su conjunto es eléctricamente neutra. El pH donde esto sucede se conoce como punto isoeléctrico. De acuerdo con lo anterior, cualquier forma zwitteriónica de los compuestos de la invención, que incluyen profármacos de los mismos, está dentro del alcance de la presente invención.

El especialista en la técnica de la química orgánica apreciará que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con los solventes en los que reaccionan o de los que se precipitan o cristalizan. Estos complejos se conocen como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como "hidrato". Los solvatos del compuesto de fórmula (I) o (II) están dentro del alcance de la presente invención.

El especialista en química orgánica también apreciará que muchos compuestos orgánicos pueden existir en más de una forma cristalina. Por ejemplo, la forma cristalina puede variar de un solvato a otro. Por tanto, todas las formas cristalinas de los compuestos de la invención o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

Las referencias en el presente documento a un compuesto de acuerdo con la invención incluyen tanto compuestos de la fórmula (I) o (II) como sus sales, solvatos, formas zwitteriónicas o profármacos farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con una realización particular, los compuestos de la presente invención corresponden a la fórmula general (I) y más específicamente a la fórmula (II), en la que R₁ y R₂ representan independientemente H o un alquilo C₁₋₆, cada grupo alquilo se sustituye opcionalmente por al menos uno de los siguientes radicales escogidos del grupo arilo, heterociclo o

cicloalquilo; dicho grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo se sustituye opcionalmente con uno o más radicales escogidos de un átomo de halógeno, un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo haloalquilo, un grupo haloalcoxi, un grupo acilo, un grupo O-cicloalquilo, un grupo heteroalquilo, un grupo O-arilo, un grupo O-arilalquilo, un grupo arilo, un grupo heterociclo o un grupo arilalquilo.

5

De acuerdo con otra realización particular, los compuestos de la presente invención corresponden a la fórmula general (I) y más específicamente a la fórmula (II), en la que R_1 y R_2 son ambos H, o, alternativamente, R_1 es H y R_2 es un grupo bencilo (es decir $-\text{CH}_2$ -fenilo) o fenetilo (es decir $-(\text{CH}_2)_2$ fenilo).

10 De acuerdo con realizaciones preferidas, los compuestos de la presente invención corresponden a la fórmula general (I) y más específicamente a la fórmula (II), en la que se cumplen una, dos, tres o cuatro de las siguientes características, preferiblemente se cumple cada característica:

- 15 - m es 2 o 3; y/o
 - AH es CO_2H o SO_3H ; y/o
 - R_1 es H; y/o
 - R_2 es H o un alquilo, preferiblemente un alquilo sustituido por un grupo fenilo.

20 De acuerdo con realizaciones más preferidas, los compuestos de la presente invención corresponden a la fórmula general (I) y más específicamente a la fórmula (II), en la que se cumplen una, dos o tres de las siguientes características, preferiblemente se cumple cada característica:

- m es 2; y/o
 - AH es SO_3H ; y/o
 25 - R_1 y R_2 son ambos H, o, alternativamente, R_1 es H y R_2 es un grupo fenetilo (es decir $-(\text{CH}_2)_2$ fenilo).

De acuerdo con las realizaciones específicas, el compuesto de la invención se selecciona del grupo que consiste en:

- 30 Ácido (2R)-2-amino-3-[(2S)-2-amino-4-sulfobutil]disulfanil}propanoico,
 Ácido (2R)-2-amino-3-[(3S,4S)-4-amino-1-fenil-6-sulfohexan-3-il]disulfanil} propanoico
 y una sal farmacéutica, solvato, forma zwitteriónica o cualquier profármaco de los mismos.

De acuerdo con una realización específica, los compuestos de la invención son para uso como medicina.

35 Los compuestos de la invención se administran convenientemente en forma de composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones se pueden presentar convenientemente para uso de manera convencional en mezcla con uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. El(los) portador(es) debe(n) ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el sujeto que los recibe.

40 Si bien es factible que los compuestos de la presente invención se puedan administrar terapéuticamente como una sustancia química sin procesar, también es posible presentar el ingrediente activo como una formulación farmacéutica.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención en asociación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y,
 45 opcionalmente, otros ingredientes activos.

Las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración oral, parenteral (que incluyen subcutánea, por ejemplo, mediante inyección o comprimido de depósito), intradérmica, intratecal, intraocular, intramuscular, por ejemplo, de depósito e intravenosa), ocular, rectal y tópica (que incluyen dérmica (es decir, en la piel),
 50 bucal y sublingual) o en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación, aunque la ruta más adecuada puede depender, por ejemplo, de la afección y trastorno del receptor. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar los compuestos de la invención, opcionalmente con al menos un otro ingrediente activo, con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios.
 55 En general, las formulaciones se preparan al asociar uniforme e íntimamente el ingrediente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y luego, si es necesario, conformar el producto en la formulación deseada.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables en particular para administración pediátrica), cada uno contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también se puede presentar como un bolo, electuario o
 60 pasta.

65

Se puede preparar un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos que se comprimen se pueden preparar al comprimir en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma fluida, como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con otros excipientes convencionales, como agentes aglutinantes (por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón, polivinilpirrolidona o hidroximetilcelulosa), agentes de carga (por ejemplo, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio o sorbitol), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol o sílice), disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio) o agentes humectantes, tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos moldeados se pueden elaborar al moldear en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos se pueden recubrir o ranurar y se pueden formular de tal manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo que contienen. Los comprimidos se pueden recubrir de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Alternativamente, los compuestos de la presente invención se pueden incorporar en preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, soluciones, emulsiones acuosas u oleosas y jarabes o elixires, por ejemplo. Más aún, las composiciones (o formulaciones) farmacéuticas que contienen estos compuestos se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión tales como jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes tales como lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábica; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) tales como aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol o alcohol etílico; y conservantes tales como p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico. Estas preparaciones también se pueden formular como supositorios, por ejemplo, que contienen excipientes de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición de un portador líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyección, inmediatamente antes de uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Las composiciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con los portadores habituales tales como manteca de cacao, grasa dura o polietilenglicol.

Las formulaciones para administración tópica en la boca, por ejemplo por vía bucal o sublingual, incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en un excipiente aromatizado tal como sacarosa y goma arábica o tragacanto, y pastillas que comprenden el ingrediente activo en un excipiente tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica. Para administración tópica sobre la piel, los compuestos se pueden formular como cremas, geles, ungüentos o lociones o como un parche transdérmico. Para la administración ocular, las composiciones pueden ser una solución líquida (tal como una solución de gotas para los ojos), un gel, una crema o cualesquier tipos de composiciones oftálmicas.

Los compuestos también se pueden formular como preparaciones de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Para la administración intranasal, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, como un aerosol líquido, como un polvo o en forma de gotas.

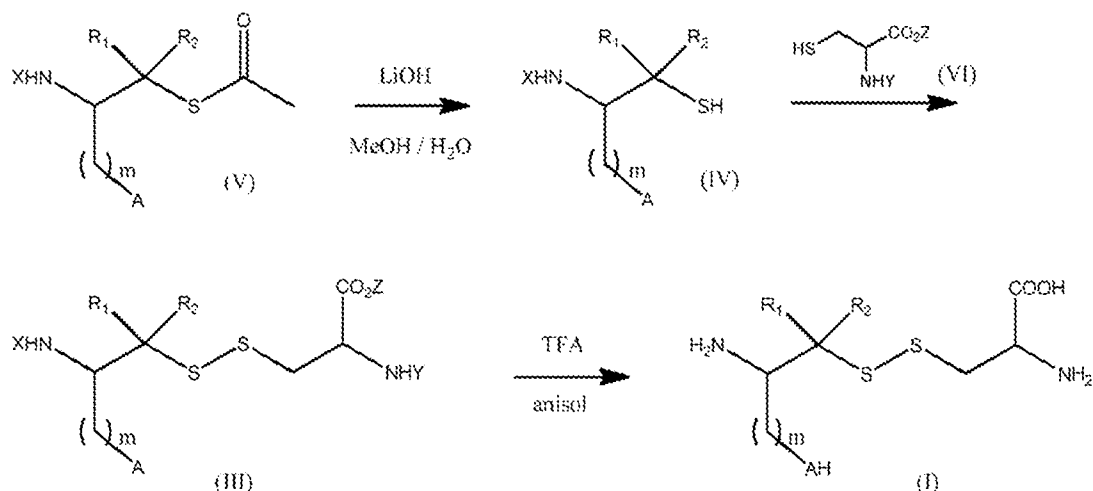
Para la administración por inhalación, los compuestos de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de presentación en aerosol desde un recipiente presurizado o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, 1,1,1,2-trifluoroetano (HFA 134A) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosificación exacta se puede determinar al proporcionar una válvula adaptada para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se puede formular de tal manera que contenga una mezcla en polvo de un compuesto de la presente invención y un excipiente en polvo adecuado tal como lactosa o almidón.

Además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellos adecuados para administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

El experto en la técnica apreciará que la referencia en el presente documento al tratamiento se extiende tanto a la profilaxis como al tratamiento de enfermedades o síntomas establecidos. Más aún, se apreciará que la cantidad de un compuesto

- de la presente invención requerida para uso en el tratamiento variará con la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y la afección del paciente y quedará, en última instancia, a discreción del médico tratante o veterinario. El paciente puede ser cualquier mamífero, que incluye un mamífero humano o no humano. La invención está dirigida más específicamente a mamíferos humanos, más específicamente a adultos. En general, las dosis empleadas para el tratamiento de humanos adultos estarán normalmente en el rango de 0.02-5000 mg por día, preferiblemente de 1-1500 mg por día. La dosis deseada se puede presentar convenientemente en una dosis única o en dosis divididas administradas a rangos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. Las formulaciones de acuerdo con la presente invención pueden contener entre 0.1-99 % del ingrediente activo, convenientemente de 30-95 % para comprimidos y cápsulas y 3-50 % para preparaciones líquidas.
- Los compuestos de la presente invención para uso en la presente invención se pueden utilizar en asociación con uno o más agentes terapéuticos activos, por ejemplo, antagonistas de los receptores beta-adrenérgicos, agentes bloqueantes de los canales de calcio, diuréticos de tiazida, antagonistas de los receptores de angiotensina e inhibidores de enzima convertidora de angiotensina. La presente invención proporciona de esta manera en un aspecto adicional el uso de una combinación que comprende un compuesto de la invención con un agente terapéutico adicional en el tratamiento de la hipertensión arterial.
- Cuando los compuestos de la presente invención se utilizan en asociación con otros agentes terapéuticos, los compuestos se pueden administrar secuencial o simultáneamente por cualquier ruta adecuada.
- Las asociaciones mencionadas anteriormente se pueden presentar adecuadamente para uso en forma de una formulación farmacéutica y, por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas que comprenden una asociación como se definió anteriormente de manera óptima junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable son un aspecto adicional de la presente invención. Los componentes individuales de dichas asociaciones se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas.
- Cuando se combinan en la misma formulación, se apreciará que los dos compuestos deben ser estables y compatibles entre sí y con los otros componentes de la formulación y se pueden formular para administración. Cuando se formulan por separado, se pueden proporcionar en cualquier formulación adecuada, adecuadamente de una manera conocida para dichos compuestos en la técnica.
- Cuando se utiliza un compuesto de la presente invención en asociación con un segundo agente terapéutico activo contra la misma enfermedad, la dosis de cada compuesto puede diferir de la administrada cuando el compuesto se utiliza solo. El experto en la técnica determinará fácilmente las dosis apropiadas.
- En otro aspecto, un objeto de la presente invención es un método para la prevención o tratamiento de la hipertensión arterial y de enfermedades directa e indirectamente relacionadas, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos de la presente invención para uso en productos terapéuticos, y en particular en medicina veterinaria o humana.
- La invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o (II), como inhibidor selectivo con respecto de la aminopeptidasa A.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para producir o preparar un producto medicinal para uso en el tratamiento de la hipertensión arterial y de enfermedades directa e indirectamente relacionadas.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un paciente que padece hipertensión arterial y enfermedades directa e indirectamente relacionadas, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.
- La presente invención proporciona métodos para la prevención o el tratamiento de la hipertensión arterial y de enfermedades a las que la hipertensión arterial contribuye directa o indirectamente. Estas enfermedades comprenden enfermedades cardíacas, falla cardíaca, apoplejía, enfermedades del sistema vascular periférico y/o cerebral, enfermedades cerebrales, oculares y renales. En particular, las enfermedades comprenden hipertensión arterial primaria y secundaria, un ictus, isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca o insuficiencia renal, infarto de miocardio, una enfermedad vascular periférica, proteinuria diabética, síndrome X, glaucoma, enfermedades neurodegenerativas y trastornos de la memoria.
- Los compuestos de la fórmula (I), o preferiblemente (II), se pueden preparar mediante varios métodos. Los productos de partida son productos comerciales o productos preparados de acuerdo con síntesis conocida a partir de compuestos comerciales o conocidos por un experto en la técnica. Más específicamente, el método para preparar los compuestos de la invención es el que se describe a continuación y comprende, por tanto, las siguientes etapas sucesivas.

Los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar a partir del intermedio (V) mediante el siguiente proceso:



5 En la que:

R_1 , R_2 , m y AH son como se definieron anteriormente,

X , Y Z son grupos protectores de funciones amino o ácidas y,

10

A representa $-SO_3-CO_2W$ o $-P(O)(OW)_2$, W se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo y arilalquilo;

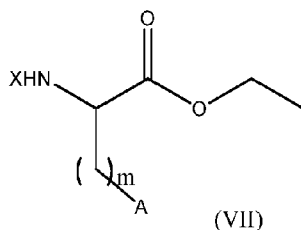
De acuerdo con esta ruta de síntesis, el intermedio (V) se hidroliza en condiciones básicas con reactivo litino ($LiOH \cdot H_2O$), por ejemplo en una mezcla de metanol y agua, dando lugar al intermedio (IV). El intermedio (IV) puede reaccionar con ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico protegido de la fórmula (VI) para proporcionar el compuesto de fórmula (III). Entonces, la desprotección del compuesto (III) puede ocurrir mediante reflujo de ácido trifluoroacético en presencia de anisol para conducir a la formación del compuesto de la presente invención de la fórmula (I).

15

En el caso en que $R_1 = R_2 = H$, el compuesto de fórmula (I) se puede obtener a partir del intermedio (V), cuya síntesis se describe en la patente WO2012/045849.

20

En el caso en que $R_1 \neq R_2 \neq H$, el compuesto de fórmula (I) se puede obtener a partir del precursor de las siguientes fórmulas (VII) que conducen al intermedio (V),



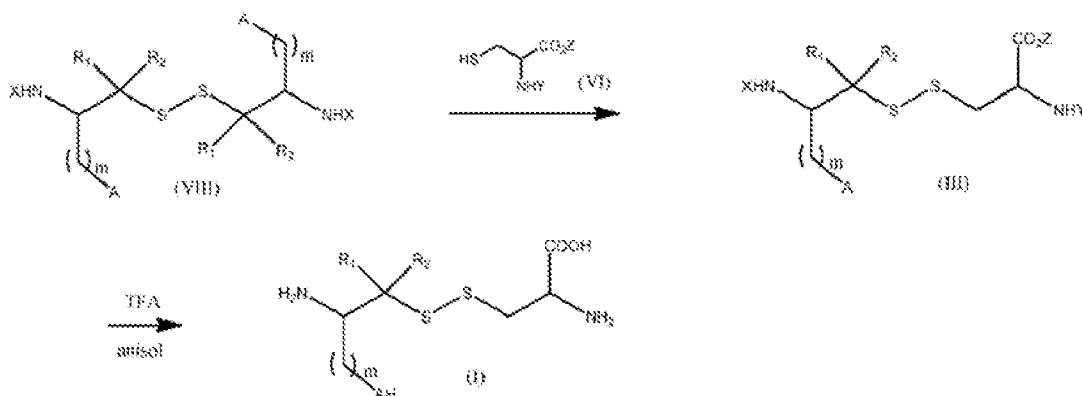
25

En la que X y A se definieron anteriormente.

La síntesis del precursor (VII) también se describe en la patente. WO2012/045849.

30

Alternativamente, los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar a partir del intermedio (VIII) mediante el siguiente proceso:



De acuerdo con esta ruta sintética alternativa, el homodímero de fórmula (VIII) puede reaccionar con el ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico protegido de fórmula (VI) para proporcionar el compuesto de fórmula (III). Entonces, la desprotección del compuesto (III) puede ocurrir mediante reflujo de ácido trifluoroacético en presencia de anisol para conducir a la formación del compuesto de la presente invención de fórmula (I).

El intermedio (VIII) también se describe en la patente WO2012/045849.

Los siguientes Ejemplos dan más detalles de la invención; sin embargo, no se deben interpretar como una limitación de la misma.

Ejemplos

Los productos de partida utilizados son productos comerciales o productos preparados de acuerdo con síntesis conocida a partir de compuestos comerciales o conocidos por el experto en la técnica. La preparación ejemplificada conduce a intermedios de síntesis útiles para preparar los compuestos de la invención. Las estructuras de los compuestos descritos en los ejemplos se determinaron de acuerdo con las técnicas espectrofotométricas habituales (resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas incluyendo ionización por electropulverización (ESI)...) y la pureza se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los intermedios de síntesis y los compuestos de la invención se denominan de acuerdo con la nomenclatura IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) y se describen en su forma neutra.

Se han utilizado las siguientes abreviaturas:

(Boc)₂O: dicarbonato de di-*tert*-butilo

AcSK: tioacetato de potasio

AcOH: ácido acético

Cbz: carboxibencilo

CH₂Cl₂ o DCM: diclorometano

CHCl₃: cloroformo

cHex: ciclohexano

DMF: dimetilformamida

DIPEA: N,N-diisopropiletilamina

Et₂O: éter de dietilo

EtOAc: acetato de etilo

EtOH: etanol

HCl: ácido clorhídrico

I₂: yodo

i-PrOH: isopropanol

K₂CO₃: Carbonato de potasio

LiAlH(OtBu)₃: hidruro de litio tri-*tert*-butoxialuminio

LiAlH₄: hidruro de litio y aluminio

LiOH.H₂O: monohidrato de hidróxido de litio (litino)

MeOH: metanol

MTBE: éter de metil *tert*-butilo

Na₂S₂O₃: tiosulfato de sodio

Na₂SO₄: sulfato de sodio

NaBH₄: borohidruro de sodio

NaHCO₃: bicarbonato de sodio

NEt₃: trietilamina

NH₄Cl: cloruro de amonio

TBTU: Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamino

TFA: ácido trifluoroacético

THF: tetrahidrofurano

Eq.: equivalente

5 ESI: Ionización por electropulverización

HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Preparación de (2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}-3-sulfanilpropanoato de tert-butilo

10

Etapas 1: Ácido (2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}-3-[[2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}-2-carboxietil]disulfanil]propanoico

15

Se agregó dicarbonato de di-tert-butilo (12.7 g, 58.2 mmol) a una solución enfriada a 0 °C de L-cistina, también llamada ácido (2R)-2-amino-3-[[2R)-2-amino-2-carboxietil]disulfanil]propanoico (5.0 g, 20.8 mmol) en una mezcla de solución acuosa de carbonato de sodio (10 %, 72 ml) y dioxano (72 ml). Se dejó calentar el medio a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, la mezcla se concentró bajo vacío. El residuo se sometió a partición entre EtOAc y agua. La mezcla enfriada a 0 °C se acidificó cuidadosamente hasta pH 1 con solución de HCl 2 N. La capa acuosa se extrajo (EtOAc), la capa orgánica combinada se lavó con solución salina, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (10.1 g, rendimiento cuantitativo) como un sólido blanco.

20

MS (ESI⁺): [M-H]⁺ = 439.3

25

Etapas 2: (2R)-3-[[2R)-3-(tert-butoxi)-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}-3-oxopropil]disulfanil]-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}propanoato de tert-butilo

30

A una suspensión del compuesto obtenido en la etapa anterior (5.0 g, 11.3 mmol) en DCM (150 ml) se le agregó gota a gota tricloroacetimidato (13.2 ml, 79.4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y luego se concentró bajo vacío. El residuo se recogió en DCM (30 ml), la suspensión resultante se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida. La purificación del residuo mediante cromatografía en columna proporcionó el compuesto del título (5.10 g, 81 %) como un sólido blanco.

35

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 553.5

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 5.31 (bs, 2H); 4.44 (m, 2H); 3.19 (dd, 2H, J = 13.7 y 4.5 Hz); 3.11 (dd, 2H, J = 13.7 y 5.4 Hz); 1.47 (s, 18H); 1.44 (s, 18H)

Etapas 3: (2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}-3-sulfanilpropanoato de tert-butilo

40

A una solución del compuesto anterior (5.0 g, 9.0 mmol) en THF (50 ml) se le agregó gota a gota tributilfosfina (3.35 ml, 13.6 mmol) seguido de agua (5 ml). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y luego se concentró bajo presión reducida. La purificación del residuo mediante cromatografía en columna proporcionó el compuesto del título (2.51 g, 60 %) como un sólido blanco.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 278.3

45

Ejemplo 1: Ácido (2R)-2-amino-3-[[2S)-2-amino-4-sulfobutil]disulfanil]propanoico

Etapas 1: (2R)-3-[[2S)-2-[[benciloxi]carbonil]amino}-4-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]butil]disulfanil]-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}propanoato de tert-butilo

50

A una solución de N-[(2S)-1-[[2S)-2-[[benciloxi]carbonil]amino}-4-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]butil]disulfanil]-4-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]butan-2-il]carbamatato de bencilo (intermedio E descrito en la patente WO2012/045849) (2.0 g, 2.57 mmol) en DMF (35 ml) se agregó gota a gota una solución de (2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino}-3-sulfanilpropanoato de tert-butilo (1.43 g, 5.15 mmol) en DMF (15 ml). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla se evaporó hasta secado. El residuo se recogió en EtOH (15 ml) y se agregó gota a gota una solución de yodo en EtOH (380 mg en aproximadamente 4 ml) hasta que persistió una coloración naranja intensa (~2 ml). La mezcla se concentró bajo vacío. La purificación del residuo mediante dos cromatografías ultrarrápidas consecutivas proporcionó el compuesto del título (1.20 g, 35 %) como un sólido blanco.

55

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 665.7

60

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.37-7.30 (m, 5H); 5.30 (m, 1H); 5.18 (m, 1H); 5.11 (m, 2H); 4.46 (m, 1H); 3.99 (m, 1H); 3.85 (s, 2H); 3.21-3.16 (m, 3H); 3.073.04 (m, 1H); 2.93 (m, 2H); 2.26-2.18 (m, 1H); 2.07-2.04 (m, 1H); 1.46 (s, 9H); 1.44 (s, 9H); 0.97 (s, 9H)

Etapas 2: Ácido (2R)-2-amino-3-[[2S)-2-amino-4-sulfobutil]disulfanil]propanoico

65

A una solución del compuesto anterior (1.1 g, 1.65 mmol) en anisol (400 µl) se le agregó gota a gota TFA (2 ml). La mezcla se calentó a 75 °C tras la conversión completa (3 h) y se concentró *in vacuo*. El residuo se disolvió en agua y se extrajo con DCM (seis veces) y la capa acuosa se concentró bajo presión reducida. La cristalización del residuo en EtOH/H₂O (95/5) proporcionó el compuesto del título (302 mg, 59 %) como un sólido blanco.

Pureza estimada: 95 % (basado en RMN)

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 305.2.

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ (ppm): 4.14 (dd, 1H, J = 7.5 y 4.2 Hz); 3.90 (quint, 1H, J = 6.5 Hz); 3.40 (dd, 1H, J = 14.9 y 4.2 Hz); 3.29-3.22 (m, 2H); 3.15-3.11 (m, 2H); 3.08 (dd, 1H, J = 14.9 Hz y 7.5 Hz); 2.35-2.23 (m, 2H)

Ejemplo 2: Ácido (2R)-2-amino-3-[[[(3S,4S)-4-amino-1-fenil-6-sulfohexan-3-il]disulfanil]propanoico

Etapas 1: Ácido (2S)-2-[[[(benciloxi)carbonil]amino]-4-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]butanoico

A una solución de (2S)-2-[[[(benciloxi)carbonil]amino]-4-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]butanoato de etilo (intermedio A descrito en la patente WO2012/045849) (5.9 g, 14.2 mmol, 1.0 eq.) en THF/agua (5/1, 60 ml) a temperatura ambiente, se agregó LiOH·H₂O (425 mg, 17.8 mmol, 1.25 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se acidificó con solución de HCl 1 N hasta pH = 1. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (dos veces). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (5.9 g, rendimiento cuantitativo) como un aceite incoloro.

MS (ESI⁺): [M-H]⁻ = 386.1; [(Mx2)-H]⁻ = 773.3

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.43-7.28 (m, 5H); 5.47 (d, J = 6.9 Hz, 1H); 5.13 (s, 2H); 4.51 (s, 1H); 3.87 (s, 2H); 3.47-3.05 (m, 2H); 2.51 (s, 1H); 2.27 (s, 1H); 0.98 (s, 9H)

Etapas 2: N-[(1S)-3-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]-1-[metoxi(metil)carbamoil]propil]carbamato de bencilo

A una solución del compuesto anterior (5.5 g, 14.2 mmol, 1.0 eq.) en DMF (50 ml) a 0 °C, se le agregaron sucesivamente TBTU (5.01 g, 15.6 mmol, 1.1 eq.) y DIPEA (4.95 ml, 28.4 mmol, 2.0 eq.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min y luego se agregó clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (1.52 g, 15.6 mmol, 1.1 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se diluyó con MTBE y la solución orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NH₄Cl. La fase acuosa se extrajo con MTBE (3 veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con una solución acuosa semisaturada de NaHCO₃ (3 veces) y solución salina, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título (5.15 g, 84 %) como un aceite incoloro.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 431.1

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.42-7.28 (m, 5H); 5.63 (d, J = 8.5 Hz, 1H); 5.20-5.01 (m, 2H); 4.92-4.67 (m, 1H); 3.85 (s, 2H); 3.78 (s, 3H); 3.29-3.06 (m, 5H); 2.49-2.24 (m, 1H); 2.16-2.05 (m, 1H); 0.97 (s, 9H)

Etapas 3: N-[(3S)-1-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]-4-oxo-6-fenilhexan-3-il]carbamato de bencilo

A una solución del compuesto anterior (5.15 g, 12.0 mmol, 1.0 eq.) en THF (60 ml) a 0 °C, se agregó gota a gota una solución comercialmente disponible de cloruro de fenetilmagnesio (solución 1 M en THF, 35.9 ml, 35.9 mmol, 3.0 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 3 h antes de agregar más cloruro de fenetilmagnesio (8 ml, 8 mmol, 0.63 eq.). Después de agitar durante 1 hora más a 0 °C, la mezcla de reacción se vertió lentamente en una solución acuosa saturada de NH₄Cl. Se agregó EtOAc y se separaron las capas. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (dos veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución salina, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título (4.75 g, 84 %) como un aceite incoloro.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.43-7.02 (m, 10H); 5.53 (d, J = 7.5 Hz, 1H); 5.10 (s, 2H); 4.44 (s, 1H); 3.83 (s, 2H); 3.32-2.99 (m, 1H); 2.99-2.67 (m, 5H); 2.43 (td, J = 10.2, 5.4 Hz, 1H); 1.99 (m, 1H); 0.96 (s, 9H)

Etapas 4: N-[(3S,4R)-1-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]-4-hidroxi-6-fenilhexan-3-il]carbamato de bencilo

A EtOH absoluto (170 ml) a -78 °C, se le agregó LiAlH(Ot-Bu)₃ (5.08 g, 20.0 mmol, 2.0 eq.) en forma de porciones, monitorizando que la temperatura interna no subiera por encima de -50 °C (no se observó disolución completa). Después de agitar durante 40 min a -78 °C, se agregó gota a gota una solución del compuesto obtenido en la etapa anterior (4.75 g, 10.0 mmol, 1.0 eq.) en EtOH absoluto (20 ml) durante 10 min, monitorizando que la temperatura interna no superara -60 °C. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 1.5 h y luego se agregó una solución de HCl 1 N (25 ml). La mezcla resultante se sometió a partición entre EtOAc y agua. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título (4.51 g, 95 %) como un aceite incoloro.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 478.2

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.53-6.94 (m, 10H); 5.18 (d, J = 9.0 Hz, 1H); 5.09 (s, 2H); 3.84 (s, 2H); 3.79-3.54 (m, 2H); 3.29-3.00 (m, 2H); 2.91-2.74 (m, 1H); 2.74-2.54 (m, 1H); 2.21-2.09 (m, 1H); 2.02-1.91 (m, 1H); 1.87-1.71 (m, 2H); 0.96 (s, 9H)

Etapa 5: N-[(3S,4R)-1-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]-4-(metanosulfonilo)-6-fenilhexan-3-il]carbamato de bencilo

A una solución del compuesto anterior (2.0 g, 4.19 mmol, 1.0 eq.) en DCM (42 ml) a 0 °C, se le agregaron sucesivamente gota a gota cloruro de metanosulfonilo (389 µl, 5.02 mmol, 1.2 eq.) y DIPEA (1.48 ml, 8.37 mmol, 2.0 eq.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se sometió a partición entre MTBE y una solución de HCl 1 N. Se separaron las capas y la fase acuosa se extrajo con MTBE. Los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con solución de HCl 1 N y solución salina y luego se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (2.45 g, rendimiento cuantitativo) como una espuma blanca.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 556.2

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.32-7.20 (m, 7H); 7.18-7.07 (m, 3H); 5.31 (d, J = 9.7 Hz, 1H); 5.10-4.98 (m, 2H); 4.85-4.76 (m, 1H); 4.04-3.89 (m, 1H); 3.78 (s, 2H); 3.13-2.98 (m, 2H); 2.94 (s, 3H); 2.78-2.58 (m, 2H); 2.17-1.94 (m, 2H); 1.94 -1.79 (m, 2H); 0.90 (s, 9H)

Etapa 6: N-[(3S,4S)-4-(acetilsulfanil)-1-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]-6-fenilhexan-3-il]carbamato de bencilo

A una solución del compuesto de mesilato en bruto obtenido en la etapa anterior (4.19 mmol, 1.0 eq.) en acetona (21 ml) a temperatura ambiente, se le agregó AcSK (957 mg, 8.38 mmol, 2.0 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se sometió a partición entre MTBE y una solución acuosa saturada de NaHCO₃. Se separaron las capas y la fase acuosa se extrajo con MTBE. Los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, solución salina, luego se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó en columna para proporcionar el compuesto del título (2.02 g, 90 % en dos etapas) como un aceite de color naranja claro.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 536.1

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.42-7.29 (m, 7H); 7.25-7.18 (m, 1H); 7.15 (d, J = 7.4 Hz, 2H); 5.20-5.06 (m, 2H); 4.81 (d, J = 10.1 Hz, 1H); 4.09 (tt, J = 9.6, 4.2 Hz, 1H); 3.86 (s, 2H); 3.68-3.60 (m, 1H); 3.20 (td, J = 11.2, 10.4, 5.5 Hz, 1H); 3.10 (ddd, J = 14.0, 11.2, 4.5 Hz, 1H); 2.84-2.65 (m, 2H); 2.38 (s, 3H); 2.17-1.78 (m, 4H); 1.00 (s, 9H)

Etapa 7: N-[(3S,4S)-1-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]-6-fenil-4-sulfanihexan-3-il]carbamato de bencilo

A una solución del compuesto tioacetato obtenido en la etapa anterior (2.02 g, 3.77 mmol, 1.0 eq.) en MeOH desgasificado (15 ml, 3 ciclos de vacío - purga de argón) a temperatura ambiente, se agregó una solución de LiOH.H₂O (181 mg, 7.54 mmol, 2.0 eq.) en agua (1.6 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se sometió a partición entre MTBE y una solución acuosa saturada de NH₄Cl. Se separaron las capas y la fase acuosa se extrajo con MTBE. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución salina, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título (1.72 g, 92%) como un aceite de color amarillo claro.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 494.1

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7.44-7.29 (m, 7H); 7.26-7.15 (m, 3H); 5.24-5.02 (m, 3H); 4.03 (ddt, J = 10.4, 6.2, 3.5 Hz, 1H); 3.88 (s, 2H); 3.29-3.10 (m, 2H); 2.96-2.73 (m, 3H); 2.23-2.08 (m, 1H); 2.03-1.88 (m, 2H); 1.88-1.74 (m, 1H); 1.35-1.24 (m, 1H); 1.00 (s, 9H)

Etapa 8: (2R)-3-[[[(3S,4S)-4-[(benciloxi)carbonil]amino]-6-[(2,2-dimetilpropoxi)sulfonil]-1-fenilhexan-3-il]disulfanil]-2-[[[(tert-butoxi)carbonil]amino}propanoato de tert-butilo

A una solución de N-cloro benzotriazol (774 mg, 5.04 mmol, 1.5 eq.) y benzotriazol (400 mg, 3.36 mmol, 1.0 eq.) en DCM (25 ml) a -78 °C, se agregó gota a gota una solución de compuesto de tiol obtenido en la etapa anterior (1.66 g, 3.36 mmol, 1.0 eq.) en DCM (5 ml). La mezcla se agitó a -78 °C durante 2 h. Luego se agregó gota a gota una solución de (2R)-2-[[[(tert-butoxi)carbonil]amino]-3-sulfanilpropanoato de tert-butilo (1.40 g, 5.04 mmol, 1.5 eq.) en DCM (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 4 h. Se agregaron sucesivamente solución acuosa de Na₂S₂O₃ (1.2 g en 20 ml de agua) y solución acuosa saturada de NaHCO₃ (30 ml) y la mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se separaron las capas y la fase acuosa se extrajo con DCM (dos veces). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar un aceite de color naranja. El residuo se purificó mediante cromatografía en dos columnas para proporcionar el compuesto del título como una espuma de color amarillo claro obtenida en dos fracciones de diferente pureza (1.21 g, rendimiento del 47 % de la fracción pura) y (0.91 g, rendimiento del 35 % de la fracción pura del 80 %).

MS (ESI⁺): [M+H]⁺ = 769.4

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 7.51-7.04 (m, 10H); 5.08 (s, 2H); 4.52-4.29 (m, 1H); 4.11 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H); 3.90 (s, 2H); 3.31-3.12 (m, 3H); 3.05-2.85 (m, 3H); 2.84-2.69 (m, 1H); 2.33-2.22 (m, 1H); 2.12-1.94 (m, 2H); 1.83-1.65 (m, 1H); 1.54-1.43 (m, 18H); 1.00 (s, 9H)

5 Etapa 9: Ácido (2R)-2-amino-3-[[[(3S,4S)-4-amino-1-fenil-6-sulfohexan-3-il]disulfanil]propanoico

A una solución de disulfuro obtenida en la etapa anterior (1.2 g, 1.56 mmol, 1.0 eq.) en anisol (4.26 ml, 39.0 mmol, 25 eq.) a temperatura ambiente, se agregó ácido trifluoroacético (6.19 ml, 78 mmol, 50 eq.). La mezcla se agitó a reflujo durante 16 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El sólido/pasta resultante se disolvió en agua (120 ml) y la solución acuosa se lavó con DCM (4 x 50 ml). La fase acuosa se liofilizó. El residuo se purificó mediante Cromatografía Ultrarrápida de Fase Inversa y las fracciones de interés se combinaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto del título (500 mg, 78 %) obtenido como un sólido blanco brillante en una mezcla 93/7 de diastereómeros (R,S,S)/(R,R,R).

15 Pureza estimada: > 97 % (basado en LCMS) y 95 % (basado en RMN)

MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 409.0$

MS (ESI^-): $[\text{M}-\text{H}]^- = 407.1$

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) δ (ppm): 7.40-7.28 (m, 4H); 7.28-7.22 (m, 1H); 4.04 (dd, $J = 8.4, 4.0$ Hz, 1H); 3.77 (dt, $J = 7.9, 5.0$ Hz, 1H); 3.34 (dd, $J = 14.8, 4.1$ Hz, 1H); 3.10 (dd, $J = 14.8, 8.4$ Hz, 1H); 3.04 (ddd, $J = 10.6, 5.0, 3.6$ Hz, 1H); 3.00-2.88 (m, 3H); 2.82-2.74 (m, 1H); 2.43-2.31 (m, 1H); 2.13-1.98 (m, 2H); 1.94-1.80 (m, 1H)

Ejemplo 3: Medición de la actividad APA *in vitro*

La medición de la actividad APA *in vitro* se basa en el protocolo de Goldberg ajustado a la escala de ensayo sobre microplacas (Pro BindTM 3915) (Chauvel et al., 1994). *In vitro*, en presencia de iones calcio, la APA hidroliza un sustrato sintético α -L-glutamyl- β -naftilamida (Glu β Na) a glutamato y β -naftilamina (β Na). Una reacción de diazotación en medio ácido permite revelar la β -naftilamina mediante la formación de un complejo de color violeta: la medición espectrofotométrica permite entonces conocer la cantidad de complejo formado y, con referencia a una curva estándar producida con concentraciones crecientes de β -naftilamina, deducir la actividad enzimática de la muestra.

Reactivos

El sustrato Glu- β Na (Bachem) y la β -naftilamina (Sigma) se disuelven en DMSO (dimetilsulfóxido) al 50 % y HCl 0.1 N respectivamente, y se conservan a -20 °C a una concentración de 10^{-2} M. La reacción de diazotación se lleva a cabo en presencia de nitrito de sodio (87 mM), sulfamato de amonio (130 mM) y diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (23 mM en etanol al 95 %).

Reacción enzimática

La reacción tiene lugar a pH 7.4 en tampón tris-HCl 50 mM, en presencia de ditiotreitól (100 eq por eq de inhibidor) y calcio (CaCl_2 4 mM); se incubó APA de ratón recombinante a 37 °C en presencia del sustrato (Glu- β Na 200 μM) y en presencia o ausencia de diversas concentraciones del inhibidor que se va a probar, en un volumen final de 100 μl . La reacción se detiene al agregar 10 μl de HCl 3 N. Se preparó en paralelo una curva estándar de β -naftilamina al diazotizar concentraciones crecientes (hasta 0.2 mM) de 2-naftilamina en HCl 0.1 N.

Revelación del producto formado

A cada pocillo se le agrega lo siguiente: 25 μl de nitrito de sodio (NaNO_2) (mezclar, esperar 5 minutos a temperatura ambiente), 50 μl de sulfamato de amonio (mezclar, esperar 5 minutos a temperatura ambiente), luego agregar 25 μl de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (mezclar, esperar la estabilización del color violeta durante aproximadamente 30 minutos a 37 °C).

Luego se mide la absorbancia a 540 nm.

El compuesto EC33 (ácido (S)-3-amino-4-mercapto-butilsulfónico) descrito en la solicitud WO 99/36066 se utilizó como compuesto de referencia.

Los resultados informados en la Tabla 1 muestran que el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 exhiben la actividad inhibidora de APA.

Tabla 1. inhibición *in vitro* de la aminopeptidasa A para los inhibidores ejemplificados

Ejemplos	Resultados (μM)
1	0.81 ± 0.05
2	0.18 ± 0.02

Ejemplo 4: Medición de la actividad de APA cerebral (experimentos *ex vivo*)

La actividad de APA cerebral se determinó como se describió anteriormente.

In vivo, en ratones (machos, 18-20 g Charles River), Ejemplo 1 se administró i.v. (50 mg/kg, en un volumen de 200 µl).

In vivo, en ratas DOCA-sal (macho, 250 g de Charles River), Ejemplo 2 se administró p.o. (8 mg/kg, en un volumen de 400 µl).

Para cada condición, se utilizaron de cuatro a dieciséis ratones y de cinco a siete ratas. Los animales se sacrificaron 180 min después de la administración. Los cerebros se retiraron inmediatamente y se homogeneizaron mediante sonicación en 10 vol de tampón Tris-HCl 50 mM enfriado con hielo (pH 7.4). La actividad enzimática de APA se midió sobre homogeneizados de cerebro. Para ello, se incubaron alícuotas del homogeneizado de tejido (16 µl) durante 30 min a 37 °C con 200 µM de Glu-βNa, CaCl₂ 4 mM e inhibidor de bestatina 1 µM, con o sin EC33 5 µM, en un volumen total de 100 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.4). Luego se prosiguió el ensayo como se describe anteriormente.

La Figura 1 demuestra la capacidad del Ejemplo 1 dado por ruta i.v. para cruzar la barrera hematoencefálica y entrar al cerebro al medir la inhibición de la actividad de APA cerebral en ratones conscientes. El Ejemplo 1 (50 mg/kg, i.v., 3285 nmol por ratón) disminuyó significativamente la actividad de APA cerebral en un 45 % después de 180 min (39.6 ± 5.2 nmol de Glu-βNa hidrolizado por mg de proteína por h frente a 72.3 ± 3.7, P < 0.001, Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn).

La Figura 2 demuestra la capacidad del Ejemplo 2 dada por la ruta p.o. para cruzar la barrera hematoencefálica y entrar al cerebro al medir la inhibición de la actividad de APA cerebral en ratas conscientes con sal DOCA. El Ejemplo 2 (8 mg/kg, p.o., 4895 nmol por rata) disminuyó significativamente la actividad de APA cerebral en un 29 % después de 180 min (46.1 ± 2.4 nmol de Glu-βNa hidrolizado por mg de proteína por h frente a 65.4 ± 5.1, P < 0.01, prueba de Mann-Whitney).

Ejemplo 5: Medición de la presión arterial media (MABP) y la frecuencia cardíaca (HR) (experimentos *in vivo*)

Se anestesiaron ratas macho con sal DOCA con isoflurano al 3 % (Iso-vet®, Piramal, Reino Unido) para inducción e isoflurano al 1.5-2 % para mantenimiento. Se insertó un catéter en la arteria femoral derecha para monitorizar MABP y HR. El catéter se tunelizó por vía subcutánea para salir del cuello. Los animales se mantuvieron durante 2 días en la sala de animales, bajo observación frecuente, antes del registro de MABP y HR. La MABP y la HR de referencia se registraron durante al menos 60 min antes del Ejemplo 2 se administró p.o. (8 mg/kg, en un volumen de 400 µl). MABP y HR se registraron continuamente durante 6 h después del tratamiento.

Las Figuras 3a y 3b demuestran la capacidad del Ejemplo 2 dada por la ruta p.o. para disminuir la presión arterial de ratas hipertensas mediante el registro de MABP y HR en ratas conscientes con sal DOCA.

En la figura 3a, el Ejemplo 2 (8 mg/kg, p.o., 4895 nmol por rata) disminuyó la MABP en ratas hipertensas con sal DOCA a partir de 3 h después de la administración (con una disminución de la MABP de -27 ± 11 mmHg), que persistió 6 h después del tratamiento (con una disminución de la MABP de -44 ± 8 mmHg).

En la figura 3b, la administración p.o. del Ejemplo 2 (8 mg/kg) no tuvo efecto sobre la HR en ratas con sal DOCA, independientemente del tiempo transcurrido entre la administración y el registro (0 a 6 h).

Ejemplo 6: Evaluación de la función cardíaca al medir la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) mediante procedimientos experimentales de ecocardiografía (experimentos *in vivo*)

Se anestesiaron ratones CD1 machos adultos con una mezcla de 100 mg/kg de ketamina (Imalgène 1000, Merial, Lyon, Francia) y 10 mg/kg de xilazina (Rompun al 2 %, Bayer Healthcare, Loos, Francia), a través de inyección intraperitoneal, se intubaron y ventilaron a una tasa de 200 insuflaciones/min, con un volumen medio de insuflación de 0.2 ml (Bioseb, Francia). La piel se desinfectó y se hizo una incisión entre el 2º y 3º espacio intercostal y el corazón quedó expuesto mediante toracotomía izquierda. Se abrió el pericardio y se ligó permanentemente el infarto de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) entre el tronco de la arteria pulmonar y el apéndice auricular izquierdo, con sutura de seda 8/0. (Monofilamento de PVDF, 8-0, Peters Surgical, Bobigny, Francia). La isquemia se confirmó mediante blanqueamiento visible del ventrículo izquierdo (LV) abajo de la ligadura. Luego se cerró el tórax mediante tres puntos discontinuos (PVDF monofil, 6/0, Peters Surgical, Bobigny, Francia) y luego los ratones recibieron una inyección subcutánea de meloxicam 1 mg/kg (Metacam, Boehringer Ingelheim, Alemania) para una analgesia prolongada. Se drenó el neumotórax. Luego se suturaron los músculos y la piel (hilo de prolene 6-0, Peters Surgical, Francia) y los animales se rehidrataron con solución salina a 37 °C. Los animales se extubaron tan pronto como pudieron respirar espontáneamente. El animal se colocó en una jaula y se monitorizó regularmente durante 48 horas. Los ratones recibieron una inyección de Meloxicam 1 mg/kg, 24 horas después de la cirugía y hasta 72 horas. El mismo procedimiento quirúrgico se realizó sin ligadura de la arteria coronaria LAD en ratones operados de forma simulada.

Los ratones post-MI recibieron tratamiento oral crónico con fribastat (RB150 utilizado como una referencia del inhibidor de APA cerebral) a 150 mg/kg, ramipril (inhibidor de la ACE como tratamiento estándar) a 1.25 mg/kg, o el ejemplo 2 a

25 mg/kg con vehículo de mantequilla de maní. Se implementó una fase de adaptación antes del inicio del tratamiento, en la que los ratones recibieron una dosis de mantequilla de maní, aplicada en la pared de la jaula, todas las mañanas durante una semana. El tratamiento comenzó dos días después del MI y los diferentes fármacos se administraron una vez al día, por la mañana, durante cuatro semanas consecutivas. La función cardíaca se evaluó regularmente mediante ecocardiografía transtorácica 4 semanas después del MI para analizar los efectos de diferentes tratamientos orales crónicos sobre la contractilidad del corazón.

Resultados

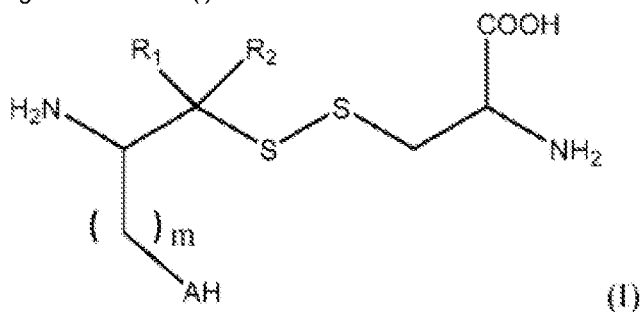
La Figura 4 muestra los efectos de la administración oral crónica de fribastat, ramipril o el ejemplo 2 sobre la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) en ratones 4 semanas después del MI. Los valores se expresan como media $\pm$ EEM de $n=9$ a $n=15$. ANOVA unidireccional seguido de pruebas de Dunnett. Cuatro semanas después del MI, la LVEF en ratones tratados con vehículo se redujo significativamente en comparación con el grupo simulado (Figura 4) de $58 \pm 1.5 \%$ $n=11$ a $44.5 \pm 1 \%$, $n=12$ ($p < 0.0001$) en ratones con MI + vehículo frente a ratones operados de forma simulada). La fuerte disminución de la LVEF refleja el deterioro de la contractilidad cardíaca después del MI. Ramipril y fribastat se incluyeron como controles positivos en este estudio. Los tratamientos orales crónicos con fribastat y ramipril a 1.25 y 150 mg/kg respectivamente durante 4 semanas mejoraron la función cardíaca de los ratones después del MI con un aumento significativo de la LVEF en los ratones MI + fribastat y MI + ramipril en comparación con los ratones MI + vehículo ($50.9 \pm 1 \%$, $n=14$ ($p = 0.0002$) en MI + fribastat, $48.4 \pm 1.2 \%$, $n=9$ ($p = 0.0874$) en ratones MI + ramipril versus $44.5 \pm 1 \%$, $n=12$ en ratones MI + vehículo. En la Figura 4, el tratamiento del Ejemplo 2 crónico oral (a 25 mg/kg durante 4 semanas) aumentó significativamente la LVEF de los ratones después del MI en comparación con el tratamiento con vehículo, con la misma eficacia que el fribastat $50.6 \pm 0.9 \%$, $n = 15$ ($p = 0.0007$).

Conclusión

El Ejemplo 2 en una dosis oral 6 veces menor que la utilizada para fribastat, dada durante 4 semanas, exhibe la misma eficacia que el fribastat y es incluso mejor que el tratamiento de referencia con ramipril para mejorar la función cardíaca en ratones después de un MI.

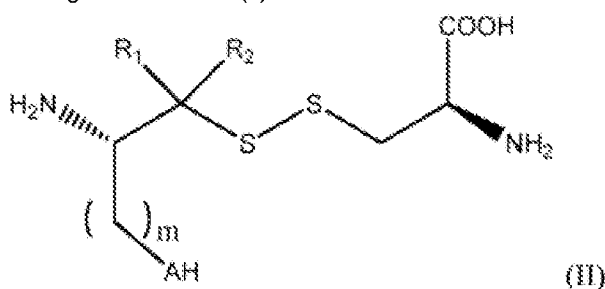
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente fórmula (I):



5

y más específicamente que tiene la siguiente fórmula (II):



10

En la que:

AH representa -CO₂H, -SO₃H, -PO₃H₂;

m es 1, 2 o 3;

R₁ y R₂ representan independientemente H, un grupo alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆, cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo que se sustituye opcionalmente por al menos uno de los siguientes radicales escogidos del grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo, O-arilo, O-arilalquilo o O-cicloalquilo; dicho grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo, O-arilo, O-arilalquilo, O-cicloalquilo se sustituye opcionalmente con uno o más radicales escogidos de un átomo de halógeno, un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo haloalquilo, un grupo haloalcoxi, un grupo acilo, un grupo O-cicloalquilo, un grupo heteroalquilo, un grupo O-arilo, un grupo O-arilalquilo, un grupo arilo, un grupo heterociclo o un grupo arilalquilo; una sal farmacéutica, solvato, forma zwitteriónica o cualquier profármaco de los mismos, dicho profármaco se selecciona de ésteres formados con una función de ácido fosfónico, ácido carboxílico o ácido sulfónico presente en la fórmula (I) o (II) o un carbamato formado con la función amino en la fórmula (I) o (II) con [(2-metilpropanoil)oxi]etoxicarbonilo].

25

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ representan independientemente H o un alquilo C₁₋₆, cada grupo alquilo se sustituye opcionalmente por al menos uno de los siguientes radicales escogidos del grupo arilo, heterociclo o cicloalquilo; dicho grupo arilo, heterociclo, cicloalquilo se sustituye opcionalmente con uno o más radicales escogidos de un átomo de halógeno, un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo haloalquilo, un grupo haloalcoxi, un grupo acilo, un grupo O-cicloalquilo, un grupo heteroalquilo, un grupo O-arilo, un grupo O-arilalquilo, un grupo arilo, un grupo heterociclo o un grupo arilalquilo.

30

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ son ambos H, o, alternativamente, R₁ es H y R₂ es un grupo bencilo o fenilo.

35

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto corresponde a la fórmula general (I) y más específicamente la fórmula (II), en la que se cumplen una, dos, tres o cuatro de las siguientes características, preferiblemente se cumple cada característica:

- m es 2 o 3; y/o

- AH es CO₂H o SO₃H; y/o

- R₁ es H; y/o

- R₂ es H o un alquilo, preferiblemente un alquilo sustituido por un grupo fenilo.

40

5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el compuesto corresponde a la fórmula general (I) y más específicamente la fórmula (II), en la que se cumplen una, dos o tres de las siguientes características, preferiblemente se cumple cada característica:

45

- m es 2; y/o
- AH es SO₃H; y/o
- R₁ y R₂ son ambos H, o, alternativamente, R₁ es H y R₂ es un grupo fenetilo.

5 6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se selecciona del grupo que consiste en:

10 Ácido (2R)-2-amino-3-{[(2S)-2-amino-4-sulfobutil]disulfanil} propanoico,
Ácido (2R)-2-amino-3-{[(3S,4S)-4-amino-1-fenil-6-sulfohexan-3-il]disulfanil}propanoico, y una sal farmacéutica, solvato, o forma zwitteriónica del mismo.

7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso como medicina.

15 8. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, preferiblemente en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 9. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-6 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de hipertensión arterial tal como hipertensión arterial primaria y secundaria.

25 10. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-6 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de trastornos relacionados directa o indirectamente con hipertensión arterial que se seleccionan en el grupo que consiste en enfermedad cardíaca, falla cardíaca, apoplejía, enfermedades del sistema vascular periférico y/o cerebral, enfermedades cerebrales, oculares y/o renales.

30 11. El compuesto o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en el tratamiento de trastornos seleccionados en el grupo que consiste en un ictus, isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, infarto del miocardio, una enfermedad vascular periférica, proteinuria diabética, síndrome X, glaucoma, enfermedades neurodegenerativas y trastornos de memoria.

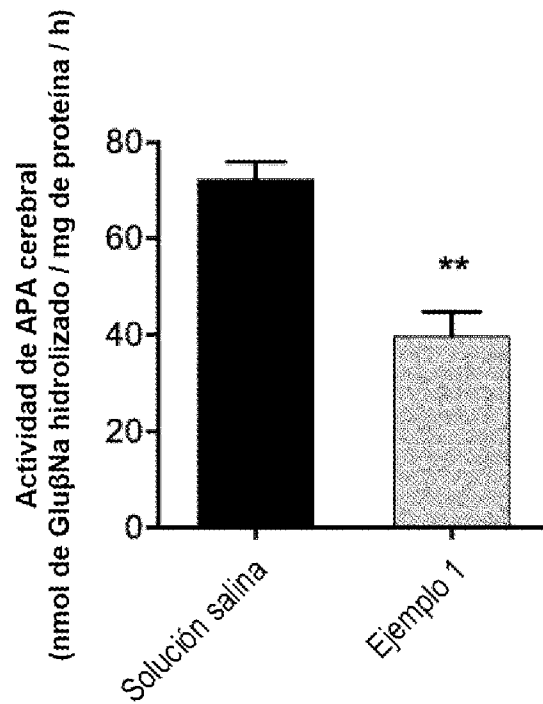


Figura 1

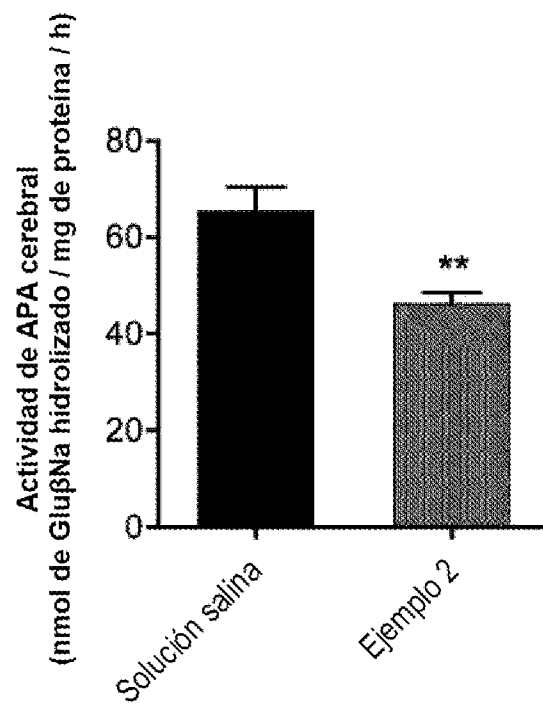


Figura 2

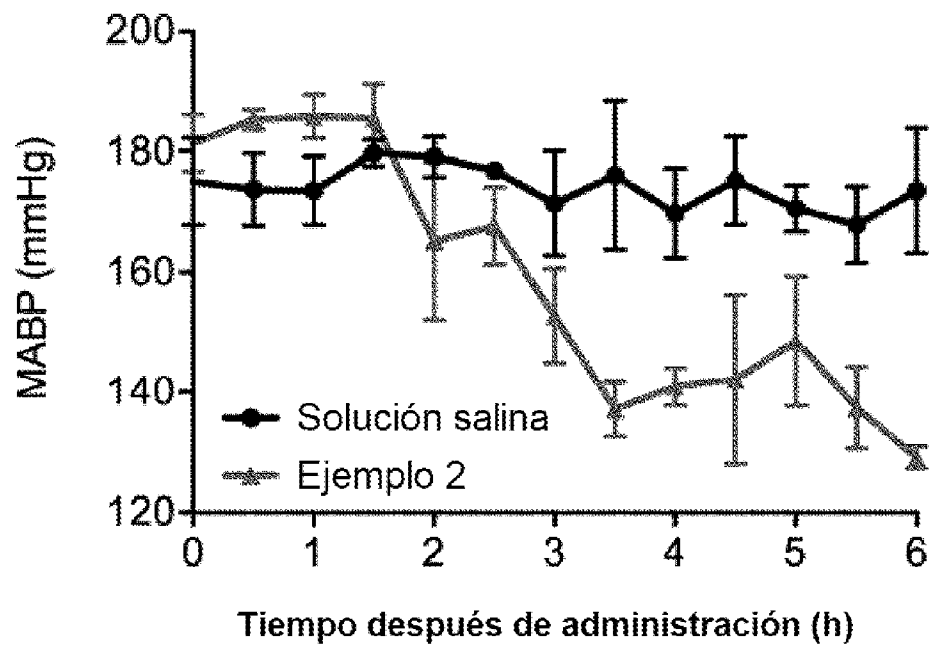


Figura 3a

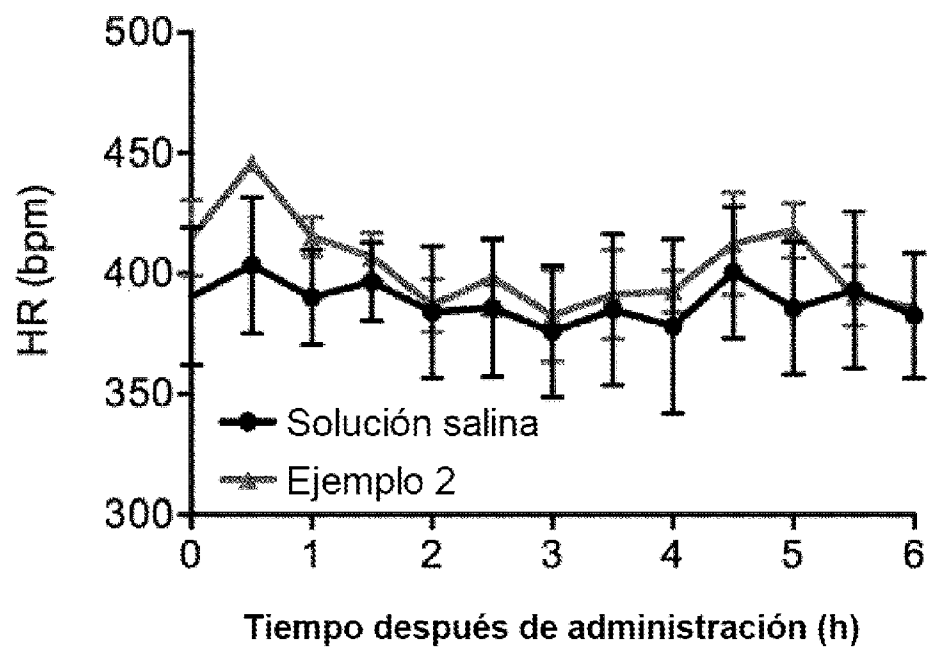
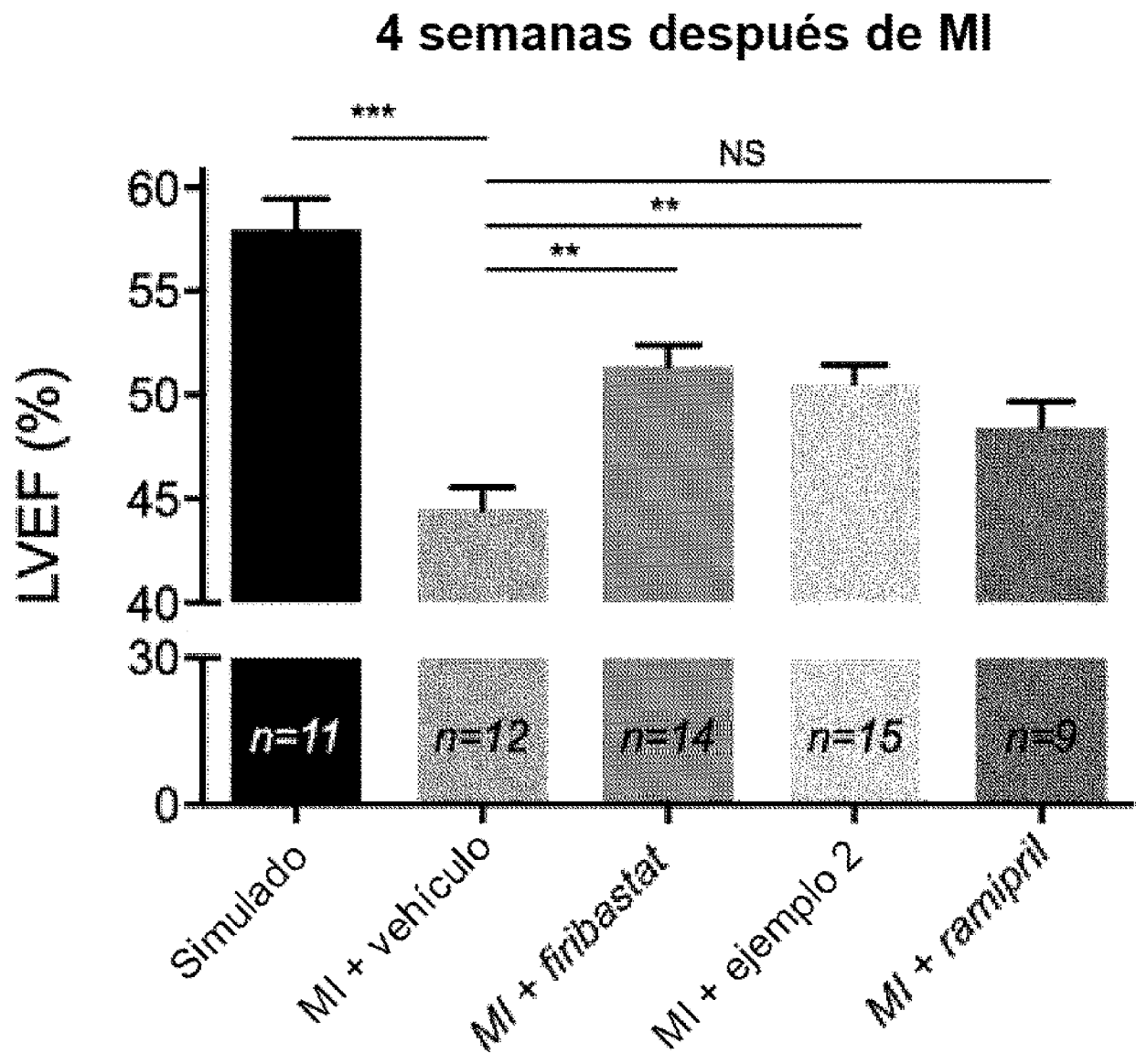


Figura 3b

**Figura 4**