



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 243 131**

② Número de solicitud: 200401104

⑤ Int. Cl.:

C07C 327/38 (2006.01)

C07C 327/48 (2006.01)

C07C 233/64 (2006.01)

C07K 5/02 (2006.01)

A61K 31/145 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **07.05.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

Fecha de la concesión: **15.12.2006**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.02.2007

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Herradón García, Bernardo;
Alonso Giner, Mercedes;
Benito Cano, Esperanza;
Chana López, Antonio y
Montero Aguado, Ana**

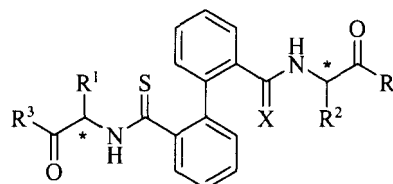
⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Tiamidas derivadas de bifenilo como inhibidores de calpaína.**

㉑ Resumen:

Tiamidas derivadas de bifenilo como inhibidores de calpaína.

La presente invención se refiere a compuestos derivados de bifenilo con actividad como inhibidores de calpaína. Un compuesto de la presente invención es un bifenilo 2,2'-disustituido, siendo los sustituyentes en las posiciones 2 y 2' del esqueleto de bifenilo cadenas conteniendo estructuras relacionadas con los aminoácidos, incluyendo fragmentos de compuestos aminocarbonílicos, donde al menos uno de los sustituyentes en dichas posiciones 2- ó 2'- está unido al esqueleto de bifenilo por un grupo tiocarbonilo, siendo compuestos con funcionalidad de tioamida. La presente invención también engloba cualquiera de los isómeros conformacionales (atropisómeros) de dicho compuesto de fórmula I. Los compuestos de fórmula I tienen aplicación en el tratamiento preventivo o terapéutico de una enfermedad degenerativa.



I

ES 2 243 131 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Tiamidas derivadas de bifenilo como inhibidores de calpaína.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se enmarca en el campo de los inhibidores de enzimas con actividad terapéutica, más específicamente de los inhibidores de calpaína.

10 **Antecedentes**

Las calpaínas, o proteasas neutras activadas por calcio (II) (CANP, E.C. 3.4.22.17) son una familia de proteasas con cisteína (“cysteine proteases”) con un papel metabólico muy activo. Aunque su sustrato natural no está claramente determinado, estas enzimas catalizan la hidrólisis de una variedad de proteínas implicadas en la transducción de señales, en la reconstrucción del citoesqueleto, en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis (*Adv. Pharmacol.* **1996**, 37, 117). En mamíferos, la familia de calpaínas comprende diversas isoformas específicas de tejido y dos isoenzimas ubicuas: la μ -calpaína (o calpaína I) y la m -calpaína (o calpaína II), que requieren cantidades micromolares y milimolares, respectivamente, de calcio (II) para su activación. Estudios estructurales por difracción de rayos X han mostrado que cada isoforma está compuesta por una subunidad grande (~ 80 kDa), que presenta un dominio de proteasa con cisteína del tipo de la papaína, y una subunidad pequeña (~ 30 kDa), que es común a cada isoenzima. Los extremos C-terminales de cada subunidad tienen dominios capaces de unirse a Ca (II) (dominio tipo calmodulina) (*FEBS Lett.* **2001**, 501, 111).

La sobreactivación de las calpaínas, lo que puede ocurrir al aumentar la concentración intracelular de calcio (II), está implicada en numerosas enfermedades, tales como las isquemias cerebral y cardiaca, Alzheimer, Parkinson, distrofia muscular, cataratas, enfermedades desmielinizantes (como la esclerosis múltiple) y otras enfermedades degenerativas (*Pathophysiology* **1999**, 6, 91; *Brain Res. Rev.* **2003**, 42, 169).

La principal aplicación de inhibidores selectivos de calpaína es como agentes neuroprotectores. En el área terapéutica relacionada con la neuroprotección se han empleado hasta ahora diversas estrategias. Se han usado a gentes que actúan sobre la despolarización de membrana y la entrada de calcio en las células, o que evitan la producción de radicales libres (antioxidantes), o que son antagonistas de la acción de neurotransmisores (*J. Clinical Neurosci.* **2002**, 9, 4). Recientemente se ha prestado mucha atención a los fármacos capaces de bloquear los receptores NMDA para el glutamato; sin embargo, el bloqueo de receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatorios puede no ser un método ideal para impedir la acción excitotóxica, ya que estos fármacos tienen efectos secundarios psicomiméticos (*Pharmacol. Ther.* **1999**, 81, 163; *Neurobiol. Disease* **2003**, 12, 82). Una alternativa interesante para conseguir neuroprotección es el bloqueo de fenómenos celulares “post-receptor” que están silenciados fisiológicamente; es decir, la búsqueda de bloqueantes selectivos de cascadas catabólicas inducidas por los agentes excitotóxicos. Es previsible que estos fármacos potenciales de acción intracelular, al actuar sobre rutas metabólicas que se activan durante la neurodegeneración, podrían permitir una acción neuroprotectora más eficaz y selectiva.

La sobreactivación de calpaína requiere un aumento continuado de las concentraciones intracelulares de Ca (II), y esta enzima está latente en las células en reposo [es decir, con niveles de Ca (II) “normales”]. Por ello, la inhibición de calpaína se presenta como un tratamiento adecuado en enfermedades neurodegenerativas. En base a sus características, es previsible que la inhibición de calpaína tenga menos efectos secundarios en terapéutica humana que el bloqueo de procesos metabólicos previos a su activación en los procesos patológicos, como es el caso del antagonismo del receptor NMDA de glutamato y aspartato, debido a que la calpaína no se activa en condiciones fisiológicas “normales” y a que la acción de aminoácidos excitatorios es imprescindible para el funcionamiento normal del sistema nervioso.

Además, los inhibidores potentes y selectivos de calpaína son muy útiles como herramientas de trabajo para estudiar el mecanismo de acción de esta proteasa, así como su papel en ciertos procesos fisiológicos.

Por otra parte, bifenilos diferentemente sustituidos se han usado como farmacóforos en compuestos con diversas actividades biológicas (*J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3443). Adicionalmente, los derivados de bifenilo se han usado como fragmentos mesógenos para la preparación de cristales líquidos (EP-743293). Por otro lado, los aminoácidos y los compuestos relacionados, tales como, los compuestos aminocarbonílicos, poseen diversas propiedades biológica (*J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4762; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1497).

Se han descrito inhibidores reversibles e irreversibles de calpaína (*Trends Mol. Medicine* **2001**, 7, 355; US-5541290). Los rasgos estructurales más frecuentes de estos inhibidores es que son péptidos o peptidomiméticos con pocos aminoácidos (entre 2 y 6) hidrófobos y alguna funcionalidad electrófila, entre las que cabe mencionar α -cetofosfonatos, α -cetofosfinatos, óxidos de α -cetofosfinas, α -cetoésteres, α -cetoácidos, α -cetoamidas, trifluorometilcetonas, aldehidos, sales de metilsulfonio, epóxidos, etc. Aparentemente, estos compuestos actúan sobre el dominio tipo papaína de la calpaína, lo que se traduce en una selectividad relativamente baja, por lo que frecuentemente también son inhibidores de otras proteasas con cisteína (por ejemplo, papaína) e incluso de proteasas con serina (*serine protease*). En parte debido a estos inconvenientes, aun no se ha encontrado un inhibidor de calpaína con utilidad terapéutica.

ES 2 243 131 B1

Existe la necesidad de encontrar inhibidores de calpaína con utilidad terapéutica. Un tipo de inhibidores de calpaína no descritos previamente y que no han sido investigado anteriormente está constituido por derivados de bifenilo 2,2'-disustituidos, dónde los sustituyentes en las posiciones 2- y 2'- son fragmentos derivados de aminoácidos y compuestos relacionados, tales como los compuestos aminocarbonílicos, dónde, al menos, uno de los sustituyentes en dichas posiciones 2,2'- está unido a través de un grupo tiocarbonilo, formando la funcionalidad de tioamida, los cuales son el objeto de la presente invención.

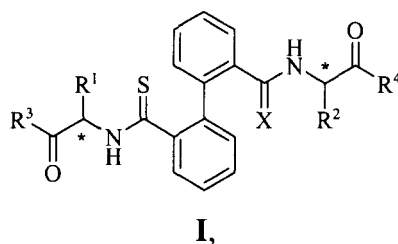
Recientemente en la solicitud española (P-200301125) se describió la síntesis y evaluación biológica de inhibidores de calpaína que estructuralmente son derivados de bifenilo con sustituyentes aminocarbonil (carbamolío) o carbonilamino, indistintamente, en posiciones 2- y 2'- del sistema de bifenilo (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2753; *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 442).

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a compuestos derivados de bifenilo con actividad como inhibidores de calpaína. Un compuesto de la presente invención es un bifenilo 2,2'-disustituido, siendo los sustituyentes en las posiciones 2 y 2' del esqueleto de bifenilo cadenas conteniendo estructuras relacionados con los aminoácidos, incluyendo fragmentos de compuestos aminocarbonílicos, dónde al menos uno de los sustituyentes en dichas posiciones 2- ó 2'- está unido al esqueleto de bifenilo por un grupo tiocarbonilo, siendo compuestos con funcionalidad de tioamida.

Descripción

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, que tiene estructura de bifenilo 2,2'-disustituido,



en la que:

- el grupo X es oxígeno (O) o azufre (S), indistintamente,
- el asterisco (*) representa un centro estereogénico, de configuración (*R*) ó (*S*), indistintamente,
- los grupos R^1 y R^2 son iguales o distintos, y están independientemente seleccionados entre los grupos H, alquilo entre 1 y 10 átomos de carbono, arilo, ó arilalquilo,
- los grupos R^3 y R^4 son iguales o distintos, y están independientemente seleccionados entre los grupos
 - H,
 - alquilo entre 1 y 6 átomos de carbono,
 - arilo,
 - arilalquilo,
 - NH_2 ,
 - NHR^5 en el que R^5 representa un grupo alquilo o arilo,
 - NR^6R^7 en el que R^6 y R^7 representan dos grupos alquilo o arilo, idénticos o diferentes, o formando un sistema cíclico,
 - OH,
 - OR^8 en el que R^8 representa un grupos alquilo o arilo;

y cualquiera de los isómeros conformacionales (atropisómeros) de dicho compuesto de fórmula I.

ES 2 243 131 B1

Son compuestos especialmente preferidos:

- (S,S)-3-Fenil-2-([2'-(2-fenil-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbotioil]-amino)-propionato de metilo (1).

- (S,S)-3-Fenil-2-([2'-(2-fenil-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino)-propionato de metilo (2).

- (S,S)-3-(1H-Indol-3-il)-2-([2'-(2-(1H-indol-3-il)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbotioil]-amino)-propionato de metilo (3).

- (S,S)-3-(1H-Indol-3-il)-2-([2'-(2-(1H-indol-3-il)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino)-propionato de metilo (4).

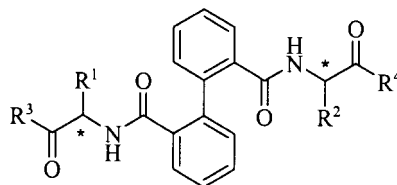
- (S,S)-2-([2'-(1-Metoxicarbonil-2-metil-propiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbotioil]-amino)-3-metil-butirato de metilo (5).

- (S,S)-2-([2'-(1-Metoxicarbonil-2-metil-propiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino)-3-metil-butirato de metilo (6).

- (S,S)-3-(4-Hidroxi-fenil)-2-([2'-(2-(4-hidroxi-fenil)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbotioil]-amino)-propionato de metilo (7).

- (S,S)-3-(4-Hidroxi-fenil)-2-([2'-(2-(4-hidroxi-fenil)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino)-propionato de metilo (8).

La síntesis de los compuestos de fórmula general I de la presente invención se ha llevado a cabo por métodos habituales en síntesis orgánica los cuales son conocidos por los expertos en la técnica, que implican la reacción de tionación de las correspondientes amidas usando algunos de los métodos descritos en la bibliografía para la síntesis de tioamida (*Topics Current Chemistry* **1999**, 204, 127; *Comprehensive Organic Synthesis*, vol 6, pg 419, Pergamon Press, 1991), entre los que cabe mencionar el uso del reactivo de Laweson ([2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3-ditia-2,4-difosfetano-2,4-disulfuro] (*Bull. Soc. Chim. Belg.* **1978**, 87, 229). Como sustratos de la reacción de tionación se usan las correspondientes amidas II,



II,

las cuales se preparan por reacción de vacilación entre un ácido o derivado de ácido, como electróforo, y una ramina, como cervantófilo usando metodologías habituales en síntesis orgánica y las cuales son conocidos por los expertos en la técnica (*Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Ratón, 1997; *Comprehensive Organic Synthesis*, vol 6, Pergamon Press, 1991).

Una característica esencial de los compuestos de la presente invención es que son inhibidores de calpaína. Existen diversas isoformas de calpaína, las cuales son muy parecidas estructuralmente y, por lo que es conocido, comparten el mismo mecanismo de acción. Las dos más abundantes son la micro-calpaína (o calpaína I) y la mili-calpaína (o calpaína-II), las cuales se diferencian en ensayos *in vitro*, en la concentración de calcio necesaria para su activación. Como las dos isoformas de la enzima son muy similares, se ha encontrado en muchos ejemplos de la bibliografía que los inhibidores de calpaína lo son de ambas isoenzimas (*Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344, 855). De esta forma, en la presente invención cuando mencionemos a la calpaína, hacemos referencia a las dos isoformas (o isoenzimas) que están incluías en la definición de calpaínas. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula I como inhibidor de calpaína.

La capacidad de inhibición de calpaína se ha cuantificado por el valor de IC₅₀, que se define como la concentración de inhibidor que reduce a la mitad la actividad catalítica de una enzima. Cuanto más bajo sea el valor de IC₅₀, más potente es el inhibidor. Resultados de inhibición de calpaína I (la más relevante desde un punto de vista fisiológico) de algunos compuestos de la presente invención se indican en la tabla 1 y en la figura 1. Dado que la calpaína II, también denominada mili-calpaína, necesita más cantidad de calcio para la activación, posiblemente no tenga un papel fisiológico tan relevante; pues dicha concentración de calcio causaría la muerte celular antes de que se pudiera activar la mili-calpaína. Por esta razón, los ensayos de inhibición se han realizado para calpaína I, pero son extrapolables para calpaína II.

ES 2 243 131 B1

TABLA 1

Resultados de inhibición de calpaína de compuestos objetos de esta invención

Compuestos	IC ₅₀
1	94 μM
2	63 μM
3	38 pM (= 0'038 nM)
4	69 nM
5	71 nM
6	52 pM (= 0'052 nM)
7	796 nM
8	12 μM

Algunas de las tioamidas representadas en la figura 1 son los inhibidores de calpaína más potentes descritos, y marcan un camino para el diseño de compuestos útiles terapéuticamente. Debido a que se ha encontrado que la sobre-activación de la calpaína está implicada en numerosas enfermedades degenerativas, un objeto adicional de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula I para el tratamiento o prevención de enfermedades degenerativas así como para preparar un medicamento para el tratamiento preventivo o terapéutico de una enfermedad degenerativa, y en especial cuando la enfermedad degenerativa está seleccionada entre isquemia cerebral, isquemia cardíaca, Alzheimer, Parkinson, distrofia muscular, cataratas y enfermedades desmielinizantes, y en especial si la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple.

Breve descripción de la figura

La figura 1 muestra resultados del estudio de las tioamidas derivadas de bifenilo objetos de la presente invención y su actividad biológica como inhibidores de calpaína I.

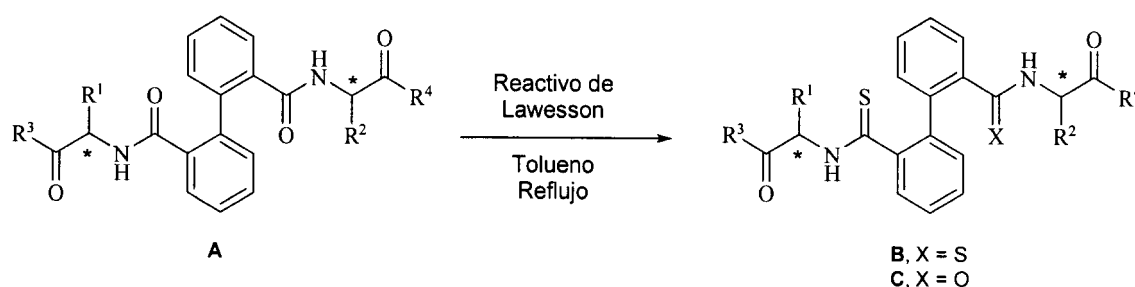
Ejemplos

Como ejemplos ilustrativos, aunque no limitantes, se indican los procedimientos experimentales, datos espectroscópicos y analíticos de algunas tioamidas de fórmula I, así como ensayos de la actividad biológica de los mismos.

Ejemplo 1

Procedimiento general para la síntesis de tioamidas

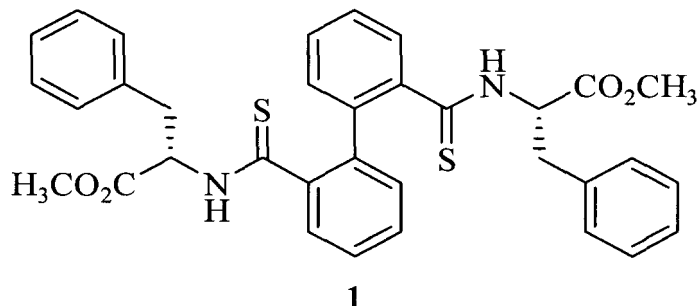
Sobre una disolución de la correspondiente bisamida derivada de bifenilo (compuestos del tipo A, 0'35 mol, 1 equiv.) en confluente (10 ml), se añadió en pequeñas porciones el reactivo de Lawesson (0'78 mmol, 1'1 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 2 horas. La evaporación del disolvente dio lugar a un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna para dar lugar a las correspondientes ditioamidas (compuestos del tipo B) junto con las monotioamidas (compuestos del tipo C), las cuales se purificaron mediante cromatografía en columna tal y como se indica en cada caso.



ES 2 243 131 B1

Ejemplo 2

(S,S)-3-Fenil-2-([2'-(2-fenil-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbotioil]-amino)-propionato de metilo (1)



Seguendo el procedimiento general, se sintetizó, junto al compuesto 2, con un 54% de rendimiento tras cromatografía en columna (gradiente hexano/AcOEt: 9/1 hasta hexano/AcOEt: 1/1). Sólido amarillo pálido.

$[\alpha]_D^{25} = -3$ (c = 0'33, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , 30°C, mezcla de conformeros A+a, 1'2:1) δ : 9'00 (d, 1'1H, $J_{\text{NH,CH}\alpha} = 7'0$, NH, a), 9'89 (d, 1'1H, $J_{\text{NH,CH}\alpha} = 7'0$, NH, A), 7'47-7'23 (m, 12H, $\text{H}_{\text{arom.}}$, A+a), 7'23-7'05 (m, 6H, $\text{H}_{\text{arom.}}$, A+a), 5'40 (m, 0'9H, CH_α -Phe, a), 5'24 (m, 1'1H, CH_α -Phe, A), 3'67 (s, 3'2H, CO_2CH_3 , A), 3'58 (s, 2'8H, CO_2CH_3 , a), 3'25 (A de ABX, 0'9H, $J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta} = 13'9$, $J_{\text{H}\alpha,\text{CH}\alpha} = 8'1$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)$ -Phe, a), 3'14 (B de ABX, 0'9H, $J_{\text{H}\beta,\text{H}\alpha} = 13'9$, $J_{\text{H}\beta,\text{CH}\alpha} = 5'2$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)$ -Phe, a), 2'95 (A de ABX, 1'1H, $J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta} = 13'9$, $J_{\text{H}\alpha,\text{CH}\alpha} = 8'1$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)$ -Phe, A), 2'81 (B de ABX, 1'1H, $J_{\text{H}\beta,\text{H}\alpha} = 13'9$, $J_{\text{H}\beta,\text{CH}\alpha} = 5'2$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)$ -Phe, A) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , 30°C, mezcla de conformeros A+a) δ : 200'2 (s, CS, a), 200'0 (s, CS, A), 170'8 (s, CO, A), 170'7 (s, CO, a), 141'7 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 141'6 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 137'2 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 137'0 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 135'6 (s, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A+a), 130'1 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 129'7 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 129'2 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 129'1 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 129'0 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 128'6 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 127'9 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 127'7 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 127'5 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 127'4 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 127'2 (d $\text{C}_{\text{arom.}}$), 59'2 (d, CH_α -Phe, A), 59'0 (d, CH_α -Phe, a), 52'5 (c, CO_2CH_3 , a), 52'3 (c, CO_2CH_3 , A), 36'8 (t, CH_2 -Phe, a), 36'4 (t, CH_2 -Phe, A) ppm.

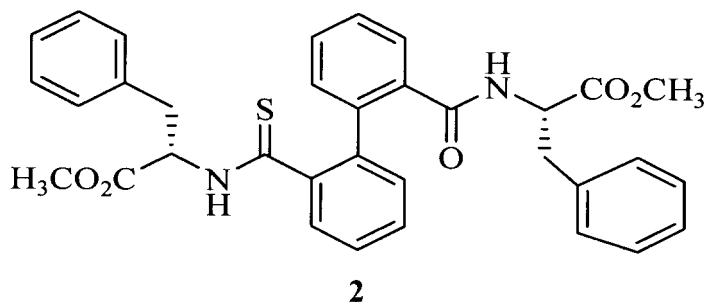
IR ν 3436, 3025, 2951, 1743, 1631, 1530, 1496, 1434, 1374, 1215, 956, 749, 700 cm^{-1}

EM (ES^+) m/e = 597 ($[\text{MH}]^+$, 100%).

AE Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: C, 68'43; H, 5'40; N, 4'69; S, 10'75.
Encontrado: C, 68'25; H, 5'19; N, 4'61; S, 10'51.

Ejemplo 3

(S,S)-3-Fenil-2-([2'-(2-fenil-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino)-propionato de metilo (2)



Se sintetizó, junto al compuesto 2, siguiendo el procedimiento general indicado en el ejemplo 1. Se obtuvo con un 45% de rendimiento tras purificación en columna (gradiente hexano/AcOEt : 9/1 hasta hexano/AcOEt : 1/1). Sólido amarillo pálido.

$[\alpha]_D = -10$ (c = 0'11, MeOH).

ES 2 243 131 B1

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, mezcla de conforméros A+a, 4:3) δ: 10'02 (d, 0'57H, J_{NH,CH α} = 7'5, NH-Phe₂, A), 9'89 (d, 0'43H, J_{NH,CH α} = 7'5, NH-Phe₂, a), 7'61 (dd, 0'57H, J_{orto} = 7'7, J_{meta} = 1'5, H_{arom.}, A), 7'49 (dd, 0'43H, J_{orto} = 7'7, J_{meta} = 1'5, H_{arom.}, a), 7'44-7'15 (m, 15H, H_{arom.}, A+a), 7'11 (dd, 0'57H, J_{orto} = 8'1, J_{meta} = 1'5, H_{arom.}, A), 7'07 (dd, 0'43H, J_{orto} = 7'8, J_{meta} = 1'8, H_{arom.}, a), 7'05 (dd, 0'43H, J_{orto} = 7'8, J_{meta} = 1'9, H_{arom.}, a), 6'96 (dd, 0'57H, J_{orto} = 8'1, J_{meta} = 1'4, H_{arom.}, A), 6'93 (d, 0'43H, J_{NH,CH α} = 7'4, NH-Phe₁, a), 6'93 (d, 0'57H, J_{NH,CH α} = 7'4, NH-Phe₁, A), 5'24 (X de ABX, 0'57H, CH _{α} -Phe₂, A), 5'12 (X de ABX, 0'43H, CH _{α} -Phe₂, a), 4'84 (X' de A'B'X', 1H, CH _{α} -Phe₁, A+a), 3'71 (s, 1'71H, CO₂CH₃-Phe₂, A), 3'66 (s, 1'29H, CO₂CH₃-Phe₂, a), 3'52 (s, 1'71H, CO₂CH₃-Phe₁, A), 3'40 (s, 1'29H, CO₂CH₃-Phe₁, a), 3'23 (A' de A'B'X', 0'57H, J_{H α ,H β} = 13'9, C(H _{α} H _{β})-Phe₁, A), 3'04 (m, 0'57H, C(H _{α} H _{β})-Phe₁, A; 0'86H, CH₂-Phe₁, a; 0'86H, CH₂-Phe₂, a), 2'43 (A de ABX, 0'57H, J_{H β ,H α} = 13'7, J_{H β ,CH α} = 7'8, C(H _{α} H _{β})-Phe₂, A), 2'31 (B de ABX, 0'57H, J_{H β ,H α} = 13'7, J_{H β ,CH α} = 52, C(H _{α} H _{β})-Phe₂, A) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, 30°C, mezcla de conforméros A+a, 4:3) δ: 200'4 (s, CS, a), 199'8 (s, CS, A), 171'9 (s, CO, a), 171'6 (s, CO, A), 170'7 (s, CO, A), 170'5 (s, CO, a), 169'7 (s, CO, a), 169'6 (s, CO, A), 142'3 (s, C_{arom.}, a), 142'2 (s, C_{arom.}, A), 139'7 (s, C_{arom.}, a), 139'2 (s, C_{arom.}, a), 136'2 (s, C_{arom.}, a), 136'1 (s, C_{arom.}, A), 136'0 (s, 2C, C_{arom.}, A), 135'7 (s, 2C, C_{arom.}, a), 134'9 (s, C_{arom.}, a), 134'5 (s, C_{arom.}, A), 130'4 (d, C_{arom.}, A), 130'34 (d, C_{arom.}, A), 130'0 (d, C_{arom.}, A), 129'9 (d, C_{arom.}, A), 129'4 (d, C_{arom.}, A), 129'3 (d, C_{arom.}, A), 129'22 (d, C_{arom.}, A), 129'1 (d, C_{arom.}, A), 128'9 (d, C_{arom.}, A), 128'8 (d, C_{arom.}, A), 128'7 (d, C_{arom.}, A), 128'65 (d, C_{arom.}, A), 128'62 (d, C_{arom.}, A), 128'5 (d, C_{arom.}, A), 128'4 (d, C_{arom.}, A), 128'2 (d, C_{arom.}, A), 127'9 (d, C_{arom.}, A), 127'8 (d, C_{arom.}, A), 127'7 (d, C_{arom.}, A), 127'5 (d, C_{arom.}, A), 127'3 (d, C_{arom.}, A), 127'1 (d, C_{arom.}, A), 126'9 (d, C_{arom.}, A), 126'8 (d, C_{arom.}, A), 127'6 (d, C_{arom.}, A), 126'4 (d, C_{arom.}, A), 59'6 (d, CH _{α} -Phe₂, A), 59'5 (d, CH _{α} -Phe₂, a), 53'6 (d, CH _{α} -Phe₁, a), 53'4 (d, CH _{α} -Phe₁, A), 52'45 (c, CO₂CH₃-Phe₂, A), 52'42 (c, CO₂CH₃-Phe₂, a), 52'2 (c, CO₂CH₃-Phe₁, a), 52'0 (c, CO₂CH₃-Phe₁, A), 37'7 (t, CH₂-Phe₁, a), 37'4 (t, CH₂-Phe₁, A), 37'3 (t, CH₂-Phe₂, a), 36'5 (t, CH₂-Phe₂, A) ppm.

IR ν 3436, 3027, 2950, 1744, 1639, 1535, 1436, 1368, 1219, 754, 701 cm⁻¹.

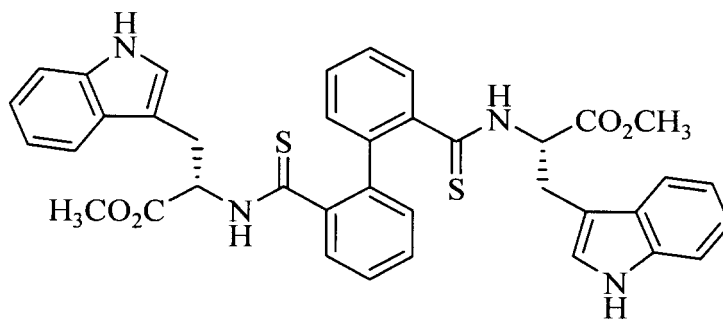
EM (ES⁺) m/e = 581 ([MH]⁺, 100%), 603 ([MH]⁺, 36%).

AE Calculado para C₃₄H₃₂N₂O₅S: C, 70'32; H, 5'55; N, 4'82; S, 5'52.

Encontrado: C, 70'25; H, 5'49; N, 4'69; S, 5'81.

Ejemplo 4

(*S,S*)-3-(1*H*-Indol-3-il)-2-([2'-(2-(1*H*-indol-3-il)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-biphenil-2-carbotioil]-amino}-propionato de metilo (3)



Se obtuvo, junto al compuesto 4, siguiendo el procedimiento general, con un rendimiento del 37% tras cromatografía en columna (gradiente hexano/AcOEt : 9/1 hasta hexano/AcOEt : 3/7). Sólido amarillo pálido.

P.f. = 125-127°C.

[α]_D = -31 (c = 0'25, MeOH).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10'82 (s, 2H, 2-NH-Indol), 10'71 (s ancho, 2H, 2-NH-Trp), 7'46-7'20 (m, 10H, H_{arom.}, 7'10-6'97 (m, 8H, H_{arom.}), 5'07 (m, 2H, CH _{α} -Trp), 3'50 (s, 6H, CO₂CH₃), 2'97 (m, 1H, C(H _{α} H _{β})-Trp), 2'73 (m, 1H, C(H _{α} H _{β})-Trp) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 199'3 (s, 2C, CS), 170'1 (s, 2C, CO), 141'1 (s, 2C, C_{arom.}), 136'1 (s, 6C, C_{arom.}), 128'9 (d, 2C, C_{arom.}), 127'6 (d, 2C, C_{arom.}), 126'8 (d, 2C, C_{arom.}), 123'6 (d, 4C, C_{arom.}), 121'1 (d, 4C, C_{arom.}), 118'5 (s, 2C, C_{arom.}), 117'9 (d, 2C, C_{arom.}), 111'5 (d, 2C, C_{arom.}), 59'1 (d, 2C, CH _{α} -Trp), 51'0 (c, 2C, CO₂CH₃), 26'5 (t, 2C, CH₂-Trp) ppm.

IR ν 3413, 3012, 2949, 2846, 1737, 1621, 1513, 1457, 1434, 1373, 1216, 1095, 1009, 957, 743 cm⁻¹.

ES 2 243 131 B1

EM (ES⁺) m/e = 675 ([MH]⁺, 100%), 697 ([MNa]⁺, 9%).

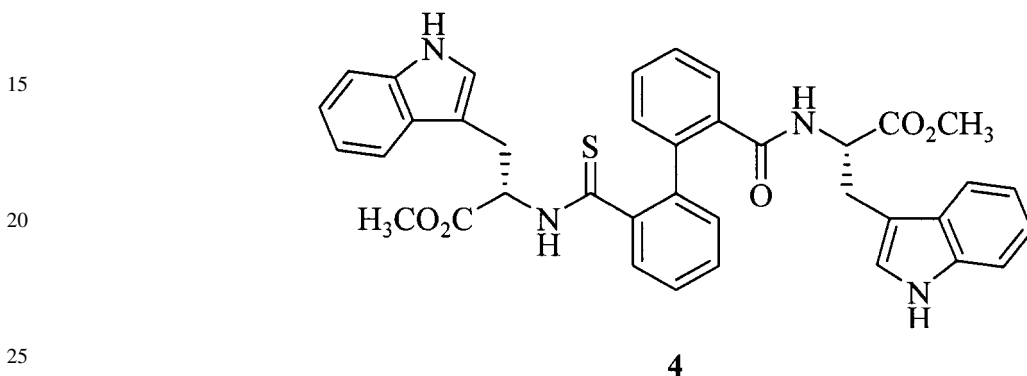
AE Calculado para C₃₈H₃₄N₄O₄S₂: C, 67'63; H, 5'08; N, 8'30; S, 9'50.
 Encontrado: C, 67'51; H, 5'32; N, 8'04; S, 9'21.

5

Ejemplo 5

(*S,S*)-3-(1*H*-Indol-3-il)-2-[[2'-(2-(1*H*-indol-3-il)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino]-propionato de metilo (4)

10



25

Se obtuvo junto al compuesto 3, siguiendo el procedimiento general, con un rendimiento del 35% tras cromatografía en columna (gradiente hexano/AcOEt : 9/1 hasta hexano/AcOEt : 3/7). Sólido amarillo pálido.

30

$[\alpha]_D^{25} = -12$ (c = 0'15, MeOH).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 10'80 (s, 1H, NH-Indol), 10'72 (s, 1H, NH-Indol), 10'70 (s ancho, 1H, NH-Trp₂), 8'80 (d, 1H, J_{NH,CH_α} = 6'8, NH-Trp₁), 7'67 (m, 2H, H_{arom.}), 7'59-7'29 (m, 8H, H_{arom.}), 7'28-7'03 (m, 8H, H_{arom.}), 5'32 (m, 1H, CH_α-Trp₂), 4'86 (m, 1H, CH_α-Trp₁), 3'77 (s, 3 H, CO₂CH₃), 3'72 (s, 3 H, CO₂CH₃), 3'37 (m, 1H, CH_αH_β-Trp₂; 1H, CH_αH_β-Trp₁), 3'12 (m, 1H, CH_αH_β-Trp₁), 3'02 (m, 1H, CH_αH_β-Trp₂) ppm.

35

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 202'0 (s, CS), 173'6 (s, CO), 172'4 (s, CO), 172'3 (s, CO), 143'4 (s, 2C, C_{arom.}), 138'0 (s, 4C, C_{arom.}), 136'4 (s, C_{arom.}), 130'8 (d, C_{arom.}), 130'7 (d, C_{arom.}), 130'5 (d, C_{arom.}), 129'8 (d, C_{arom.}), 129'0 (d, C_{arom.}), 128'5 (d, C_{arom.}), 128'6 (d, C_{arom.}), 124'4 (d, C_{arom.}), 122'4 (d, 2C, C_{arom.}), 119'8 (d, C_{arom.}), 119'3 (d, C_{arom.}), 119'2 (d, C_{arom.}), 112'4 (d, 2C, C_{arom.}), 110'7 (s, C_{arom.}), 110'4 (s, C_{arom.}), 60'7 (d, CH_α-Trp₂), 55'2 (d, CH_α-Trp₁), 52'7 (c, 2C, CO₂CH₃), 28'3 (t, CH₂-Trp₁), 27'9 (t, CH₂-Trp₂) ppm.

40

IR ν 3413, 3054, 2949, 1737, 1640, 1522, 1491, 1457, 1436, 1354, 1217, 1094, 1009, 744 cm⁻¹.

45

EM (ES⁺) m/e = 659 ([MH]⁺, 100%), 681 ([MNa]⁺, 16%).

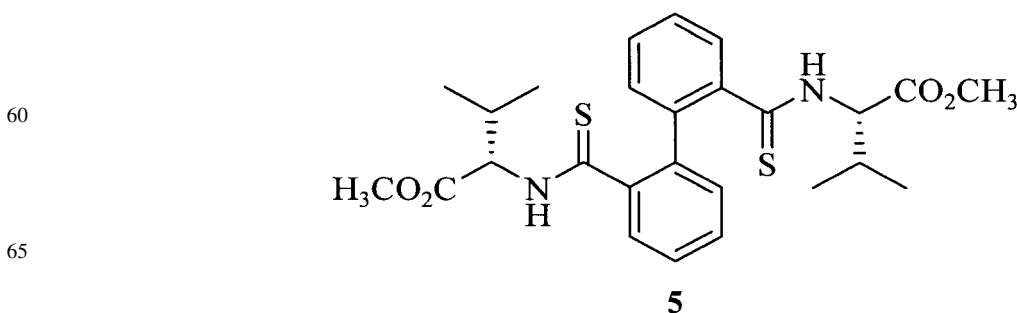
AE Calculado para C₃₈H₃₄N₄O₅S: C, 69'28; H, 5'20; N, 8'50; S, 4'87.
 Encontrado: C, 69'13; H, 5'41; N, 8'58; S, 5'01.

50

Ejemplo 6

(*S,S*)-2-[[2'-(1-Metoxicarbonil-2-metil-propiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbotoil]-amino]-3-metil-butirato de metilo (5)

55



65

ES 2 243 131 B1

Se obtuvo, junto al compuesto 6, con un rendimiento del 67% tras cromatografía en columna (gradiente hexano/AcOEt : 9/1 hasta hexano/AcOEt : 4/6), empleando el método general descrito. Sólido amarillo pálido.

$[\alpha]^{25}_D = +3$ (c = 0'28, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10'45 (s ancho, 2H, 2-NH-Val), 7'36 (m, 6H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7'11 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4'72 (m, 2H, CH_α -Val), 3'60 (s, 6H, CO_2CH_3), 2'03 (m, 1H, CH -Val), 0'81 (s ancho, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val), 0'72 (s ancho, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 200'3 (s, 2C, CS), 169'7 (s, 2C, CO), 141'3 (s, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 136'5 (s, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 129'3 (d, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 128'8 (d, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 128'0 (d, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 127'4 (d, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 64'2 (d, 2C, CH_α -Val), 51'7 (c, 2C, CO_2CH_3), 29'8 (d, 2C, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ -Val), 18'8 (c, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val), 18'5 (c, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val) ppm.

IR ν 3437, 3005, 2965, 2873, 1742, 1633, 1525, 1467, 1434, 1376, 1260, 1207, 1152, 1111, 1004, 748 cm^{-1} .

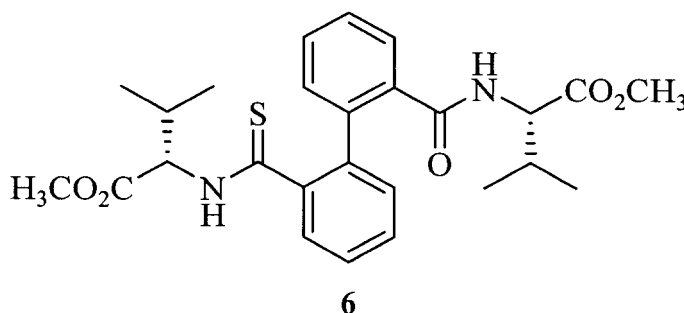
EM (ES^+) m/e = 501 ($[\text{MH}]^+$, 100%), 523 ($[\text{MH}]^+$, 35%).

AE Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: C, 62'37; H, 6'44; N, 5'60; S, 12'81.

Encontrado: C, 62'18; H, 6'61; N, 5'58; S, 12'68.

Ejemplo 7

(*S,S*)-2- $\{[2'-(1\text{-Metoxicarbonil-2-metil-propiltiocarbamoil})\text{-bifenil-2-carbonil}]\text{-amino}\}$ -3-metil-butirato de metilo (6)



Se obtuvo junto al compuesto 5, siguiendo el procedimiento general, con un rendimiento del 11% tras cromatografía en columna (gradiente hexano/AcOEt : 9/1 hasta hexano/AcOEt : 4/6). Sólido amarillo pálido.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 10'57 (s ancho, 1H, NH-Val₂), 8'67 (d, 1H, $J_{\text{NH,CH}_\alpha} = 8'3$, NH-Val₁), 7'54 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7'41 (m, 5H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7'27-7'09 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4'85 (m, 1H, CH_α -Val₂), 4'27 (m, 1H, CH_α -Val₁), 3'69 (s, 3H, CO_2CH_3), 3'67 (s, 3H, CO_2CH_3), 2'06 (m, 2H, CH -Val), 0'87 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ -Val), 0'75 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ -Val) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD) δ : 203'0 (s, CS), 173'2 (s, CO), 172'8 (s, CO), 172'0 (s, CO), 143'8 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 140'4 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 138'7 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 136'8 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 131'2 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 130'9 (d, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 130'0 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 128'9 (d, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 128'8 (d, 2C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 65'4 (d, CH_α -Val₂), 59'8 (d, CH_α -Val₁), 52'4 (c, 2C, CO_2CH_3), 32'1 (d, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ -Val), 31'8 (d, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ -Val), 19'4 (c, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val), 19'2 (c, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val), 19'1 (c, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val), 18'6 (c, $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$ -Val) ppm.

IR ν 3430, 3021, 2963, 2923, 2873, 1742, 1642, 1532, 1468, 1435, 1376, 1315, 1262, 1207, 1155, 1100, 1020, 801, 756 cm^{-1} .

EM (ES^+) m/e = 485 ($[\text{MH}]^+$, 100%).

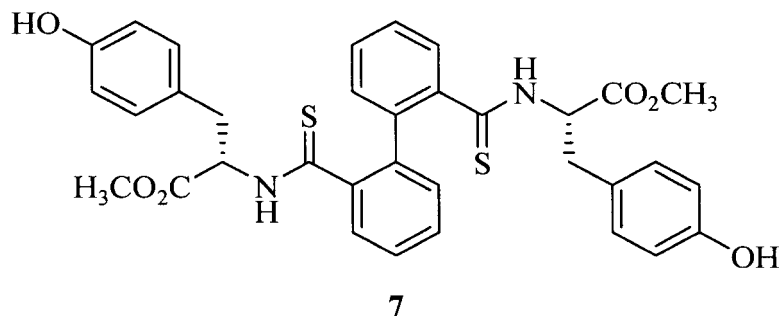
AE Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 64'44; H, 6'66; N, 5'78; S, 6'62.

Encontrado: C, 64'68; H, 6'76; N, 5'53; S, 6'65.

ES 2 243 131 B1

Ejemplo 8

(S,S)-3-(4-Hidroxi-fenil)-2-({2'-[2-(4-hidroxi-fenil)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil]-bifenil-2-carbotioil}-amino)-propionato de metilo (7)



7

Se obtuvo junto al compuesto 8, siguiendo el procedimiento general, con un rendimiento del 3% tras cromatografía en columna (gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 9/1 hasta $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 1/1). Sólido amarillo pálido.

P.f. = 62-65°C.

$[\alpha]_D^{25} = -4$ (c = 0.15, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , 30°C, mezcla de conforméros A+a, 3:2) δ : 8.97 (d, 0.8H, $J_{\text{NH,CH}\alpha} = 8.0$, NH, a), 7.80 (d, 1.2H, $J_{\text{NH,CH}\alpha} = 7.0$, NH, A), 7.46-7.02 (m, 8H, $\text{H}_{\text{arom.}}$, A+a), 6.97 (d, 1.6H, $J_{\text{orto}} = 8.3$, $\text{H}_{\text{arom.}}-\text{Tyr}$, a), 6.88 (d, 2.4H, $J_{\text{orto}} = 8.3$, $\text{H}_{\text{arom.}}-\text{Tyr}$, A), 6.71 (d, 2.4H, $J_{\text{orto}} = 8.3$, $\text{H}_{\text{arom.}}-\text{Tyr}$, A), 6.70 (d, 1.2H, $J_{\text{orto}} = 8.3$, $\text{H}_{\text{arom.}}-\text{Tyr}$, A), 5.32 (m, 1.2H, $\text{CH}_\alpha-\text{Tyr}$, A), 5.22 (m, 0.8H, $\text{CH}_\alpha-\text{Tyr}$, a), 3.67 (s, 3.6H, CO_2CH_3 , A), 3.56 (s, 2.4H, CO_2CH_3 , a), 3.15 (A de ABX, 0.8H, $J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta} = 14.1$, $J_{\text{H}\alpha,\text{CH}\alpha} = 8.1$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)-\text{Tyr}$, a), 3.14 (B de ABX, 0.8H, $J_{\text{H}\beta,\text{H}\alpha} = 14.1$, $J_{\text{H}\beta,\text{CH}\alpha} = 5.2$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)-\text{Tyr}$, a), 2.92 (A de ABX, 1.2H, $J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta} = 14.1$, $J_{\text{H}\alpha,\text{CH}\alpha} = 8.1$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)-\text{Tyr}$, A), 2.74 (B de ABX, 1.2H, $J_{\text{H}\beta,\text{H}\alpha} = 14.1$, $J_{\text{H}\beta,\text{CH}\alpha} = 5.2$, $\text{C}(\text{H}_\alpha\text{H}_\beta)-\text{Tyr}$, A) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , 30°C, mezcla de conforméros A+a, 3:2) δ : 200.2 (s, CS, a), 200.0 (s, CS, A), 170.9 (s, CO, A), 170.7 (s, CO, a), 154.7 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 153.7 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 141.6 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 141.5 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 137.2 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 137.0 (s, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 130.4 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 130.2 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 129.9 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 129.8 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 129.2 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 129.1 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 127.8 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 127.7 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 127.7 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 127.6 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 127.5 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 115.5 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, A), 115.4 (d, $\text{C}_{\text{arom.}}$, a), 59.3 (d, $\text{CH}_\alpha-\text{Tyr}$, a), 59.1 (d, $\text{CH}_\alpha-\text{Tyr}$, A), 52.5 (c, CO_2CH_3 , a), 52.4 (c, CO_2CH_3 , A), 36.0 (t, CH_2-Tyr , A), 35.7 (t, CH_2-Phe , a) ppm.

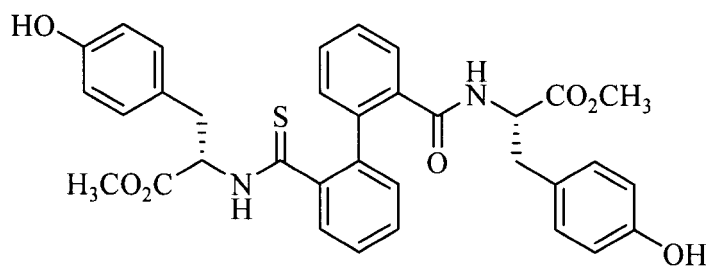
IR ν 3436, 3025, 2951, 1743, 1631, 1530, 1496, 1434, 1374, 1215, 956, 749, 700 cm^{-1}

EM (ES^+) m/e = 629 ($[\text{MH}]^+$, 100%), 651 ($[\text{MNa}]^+$, 15%).

AE Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$: C, 64.95; H, 5.13; N, 4.46; S, 10.20.
Encontrado: C, 65.21; H, 5.28; N, 4.61; S, 10.51.

50 Ejemplo 9

(S,S)-3-(4-Hidroxi-fenil)-2-({2'-[2-(4-hidroxi-fenil)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil]-bifenil-2-carbonil}-amino)-propionato de metilo (8)



8

ES 2 243 131 B1

Se obtuvo junto al compuesto 7, siguiendo el procedimiento general, con un rendimiento del 9% tras cromatografía en columna (gradiente CH₂Cl₂/AcOEt : 9/1 hasta CH₂Cl₂/AcOEt: 1/1). Sólido amarillo pálido.

P.f. = 87-91°C.

[α]_D²⁵ = -12 (c = 0.51, MeOH).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 10.72 (*s* ancho, 1H, NH-Tyr₂), 8.78 (*d* ancho, 1H, NH-Tyr₁), 7.32 (*m*, 8H, H_{arom.}), 7.02-6.76 (*m*, 4H, H_{arom.}-Tyr), 6.68 (*d*, 4H, *J*_{orto} = 8.0, H_{arom.}-Tyr), 5.06 (*m*, 1H, CH _{α} -Tyr₂), 4.55 (*m*, 1H, CH _{α} -Tyr₁), 3.57 (*s*, 3H, CO₂CH₃-Tyr₂), 3.55 (*s*, 3H, CO₂CH₃-Tyr₁), 3.02-2.59 (*m*, 2H, C(H _{α} H _{β})-Tyr₂; 1H, C(H _{α} H _{β})-Tyr₁), 2.37 (*m*, 1H, C(H _{α} H _{β})-Tyr₁) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ : (75 MHz, CD₃OD) δ : 202.2 (*s*, CS), 171.3 (*s*, CO), 170.2 (*s*, CO), 170.1 (*s*, CO), 155.5 (*s*, C_{arom.}), 155.4 (*s*, C_{arom.}), 141.7 (*s*, C_{arom.}), 141.5 (*s*, C_{arom.}), 138.4 (*s*, 3C, C_{arom.}), 136.4 (*s*, C_{arom.}), 134.4 (*d*, C_{arom.}), 129.3 (*d*, 2C, C_{arom.}), 129.0 (*d*, 2C, C_{arom.}), 128.7 (*d*, C_{arom.}), 128.0 (*d*, C_{arom.}), 127.0 (*d*, C_{arom.}), 126.7 (*d*, 2C, C_{arom.}), 114.4 (*d*, 2C, C_{arom.}), 59.7 (*d*, CH _{α} -Tyr₂), 53.9 (*d*, CH _{α} -Tyr₁), 50.8 (*c*, CO₂CH₃), 50.7 (*c*, CO₂CH₃), 35.6 (*t*, CH₂-Tyr₂), 35.1 (*t*, CH₂-Tyr₁) ppm.

IR ν 3427, 3014, 2949, 1735, 1635, 1515, 1437, 1363, 1223, 755, 701 cm⁻¹.

EM (ES⁺) *m/e* = 613 ([MH]⁺, 100%), 635 ([MNa]⁺, 25%).

AE Calculado para C₃₄H₃₂N₂O₇S: C, 66.65; H, 5.26; N, 4.57; S, 5.23.
Encontrado: C, 66.86; H, 5.39; N, 4.61; S, 5.51.

Ejemplo 10

Ensayo de actividad enzimática: Inhibición de calpaína

La capacidad de inhibición de calpaína se ha cuantificado por el valor de IC₅₀, que se define como la concentración de inhibidor que reduce a la mitad la actividad catalítica de una enzima. Cuanto más bajo sea el valor de IC₅₀, más potente es el inhibidor. Resultados de inhibición de calpaína I (la más relevante desde un punto de vista fisiológico) de algunos compuestos de la presente invención se indican en la tabla 1 y en la figura 1.

TABLA 1

Resultados de inhibición de calpaína de compuestos objetos de esta invención

Compuestos	IC ₅₀
1	94 μ M
2	63 μ M
3	38 pM (= 0.038 nM)
4	69 nM
5	71 nM
6	52 pM (= 0.052 nM)
7	796 nM
8	12 μ M

Para realizar el ensayo de inhibición de calpaínas, utilizamos el kit EnzCheck[®] Protease Assay Kit E-338 de Molecular Probes. Este kit contiene caseína marcada con BODIPY FL[®], liofilizada desde tampón fosfato. Además se utiliza como tampón de digestión Tris-HCl a pH 7.8, conteniendo 2 mM de azida sódica.

La calpaína I de eritrocitos porcinos o calpaína II de riñón porcino utilizadas son productos comerciales de CALBIOCHEM[®]. La disolución stock de enzima contiene 20 mM de tampón imidazol-HCl, PH 6.8, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM β -mercaptoetanol 30% en glicerol.

ES 2 243 131 B1

Los inhibidores sintéticos se disolvieron en 250 μL de DMSO. Los ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos en un volumen final de 200 μL . Para realizar los ensayos se añadieron alícuotas de solución *stock* de calpaína a 150 μL de solución 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en tampón de digestión para obtener una concentración final 50 ng/mL de enzima. Se añadieron cantidades mínimas, entre 5 y 20 μL de solución de inhibidor en DMSO, previamente diluidas para conseguir la concentración final de inhibidor deseada, y se añade tampón de digestión hasta conseguir un volumen final de 190 μL . El ensayo se inicia añadiendo 10 μL de solución de CaCl_2 0.05 M. Para cada inhibidor se tomó como blanco medidas separadas excluyendo, inhibidor, calpaína y disolución de calcio. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Las medidas de fluorescencia se realizan en un espectro fluorímetro SPECTRAFLUOR TECAN Corp 93382. Excitando a 485 nm y realizando la lectura a 530 nm. La medida se realizó durante 20 ciclos hasta completar la medida de todos los pocillos. La agitación es de tipo orbital y tiene lugar entre cada ciclo.

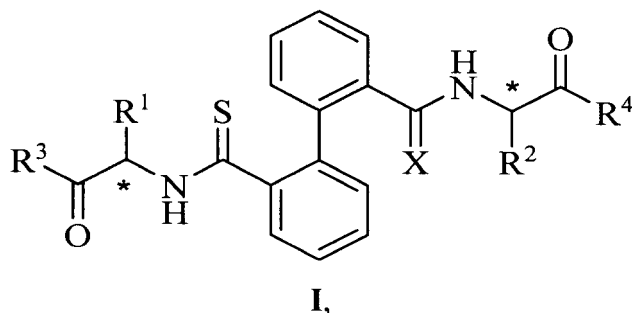
Abreviaturas

A continuación se indica el significado de las abreviaturas usadas.

- AE: Análisis elemental.
- CANP: Proteasa neutra activada por calcio.
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EGTA: Ácido etilen-*bis*-(oxietilennitrilo)tetraacético.
- EM: Espectro de masas.
- ES: *Electro-spray*.
- IR: Infrarrojo.
- NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato.
- P.f.: Punto de fusión.
- Tris: Tris(hidroxmetil)aminometano.
- ^1H -RMN: Resonancia magnética nuclear de protón.
- ^{13}C -RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono-13.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I, que tiene estructura de bifenilo 2,2'-disustituido,

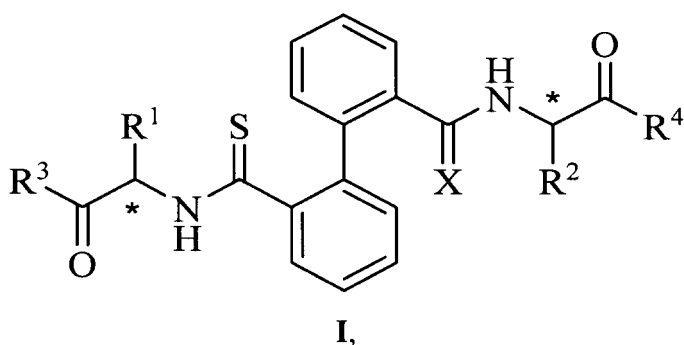


20 en la que:

- el grupo X es oxígeno (O) o azufre (S), indistintamente,
- el asterisco (*) representa un centro estereogénico, de configuración (*R*) ó (*S*), indistintamente,
- los grupos R^1 y R^2 son iguales o distintos, y están independientemente seleccionados entre los grupos H, alquilo entre 1 y 10 átomos de carbono, arilo, ó arilalquilo,
- los grupos R^3 y R^4 son iguales o distintos, y están independientemente seleccionados entre los grupos
 - H,
 - alquilo entre 1 y 6 átomos de carbono,
 - arilo,
 - arilalquilo,
 - NH_2 ,
 - NHR^5 en el que R^5 representa un grupo alquilo o arilo,
 - NR^6R^7 en el que R^6 y R^7 representan dos grupos alquilo o arilo, idénticos o diferentes, o formando un sistema cíclico,
 - OH,
 - OR^8 en el que R^8 representa un grupos alquilo o arilo;

50 y cualquiera de los isómeros conformacionales (atropisómeros) de dicho compuesto de fórmula I.

2. Un compuesto de fórmula I, que tiene estructura de bifenilo 2,2'-disustituido,



ES 2 243 131 B1

en la que:

- el grupo X es oxígeno (O) o azufre (S), indistintamente,
- el asterisco (*) representa un centro estereogénico, de configuración (R) ó (S), indistintamente,
- los grupos R¹ y R² son iguales o distintos, y están independientemente seleccionados entre los grupos H, alquilo entre 1 y 10 átomos de carbono, arilo, ó arilalquilo,
- los grupos R³ y R⁴ son iguales o distintos, y están independientemente seleccionados entre los grupos
 - H,
 - alquilo entre 1 y 6 átomos de carbono,
 - arilo,
 - arilalquilo,
 - NH₂,
 - NHR⁵ en el que R⁵ representa un grupo alquilo o arilo,
 - NR⁶R⁷ en el que R⁶ y R⁷ representan dos grupos alquilo o arilo, idénticos o diferentes, o formando un sistema cíclico,
 - OH,
 - OR⁸ en el que R⁸ representa un grupos alquilo o arilo;

y cualquiera de los isómeros conformacionales (atropisómeros) de dicho compuesto de fórmula I;

y por que es un inhibidor de calpaína.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es de fórmula I y está seleccionado entre

- (S,S)-3-Fenil-2-{{2'-(2-fenil-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-biphenil-2-carbotioil]-amino}-propionato de metilo (1),

- (S,S)-3-Fenil-2-{{2'-(2-fenil-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino}-propionato de metilo (2),

- (S,S)-3-(1H-Indol-3-il)-2-{{2'-(2-(1H-indol-3-il)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-biphenil-2-carbotioil]-amino}-propionato de metilo (3),

- (S,S)-3-(1H-Indol-3-il)-2-{{2'-(2-(1H-indol-3-il)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil)-biphenil-2-carbonil]-amino}-propionato de metilo (4),

- (S,S)-2-{{2'-(1-Metoxicarbonil-2-metil-propiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbotioil]-amino}-3-metil-butirato de metilo (5),

- (S,S)-2-12'-(1-Metoxicarbonil-2-metil-propiltiocarbamoil)-bifenil-2-carbonil]-amino}-3-metil-butirato de metilo (6),

- (S,S)-3-(4-Hidroxi-fenil)-2-({2'-[2-(4-hidroxi-fenil)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil]-bifenil-2-carbotioil]-amino)-propionato de metilo (7),

y

- (S,S)-3-(4-Hidroxi-fenil)-2-({2'-[2-(4-hidroxi-fenil)-1-metoxicarbonil-etiltiocarbamoil]-bifenil-2-carbonil]-amino)-propionato de metilo (8);

y por que es un inhibidor de calpaína.

4. Uso de un compuesto inhibidor de calpaína de fórmula I, definido en la reivindicación 1, para preparar un medicamento para el tratamiento preventivo o terapéutico de una enfermedad degenerativa.

ES 2 243 131 B1

5. Uso de un compuesto inhibidor de calpaína de fórmula I según la reivindicación 4 en el que la enfermedad degenerativa está seleccionada entre isquemia cerebral, isquemia cardiaca, Alzheimer, Parkinson, distrofia muscular, cataratas y enfermedades desmielinizantes.

5 6. Uso de un compuesto inhibidor de calpaína de fórmula I según la reivindicación 5 en el que la enfermedad degenerativa desmielinizante es la esclerosis múltiple.

10

15

20

25

30

35

40

45

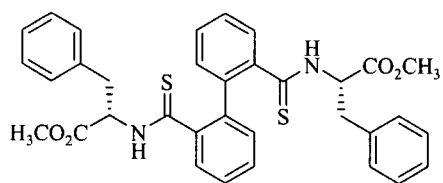
50

55

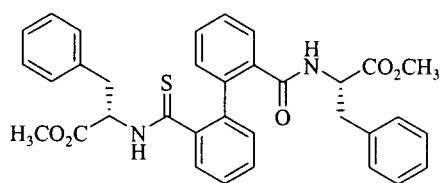
60

65

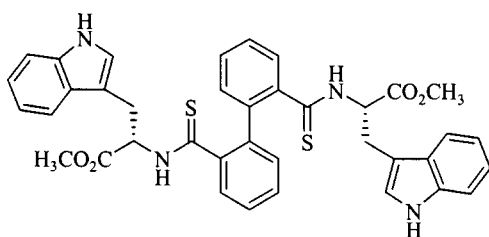
Figura 1.



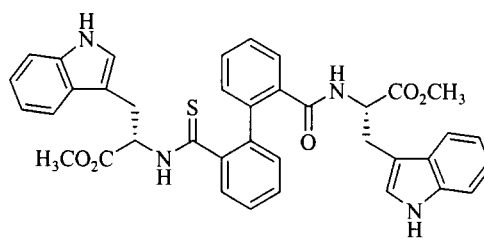
1, $IC_{50} = 94 \mu M$



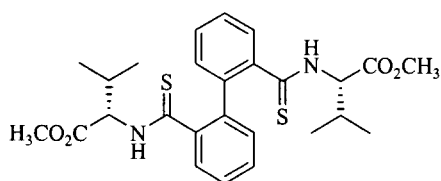
2, $IC_{50} = 63 \mu M$



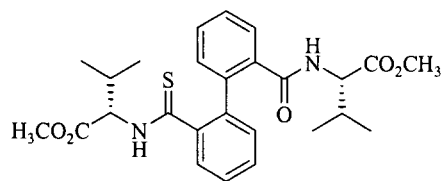
3, $IC_{50} = 38 \mu M$



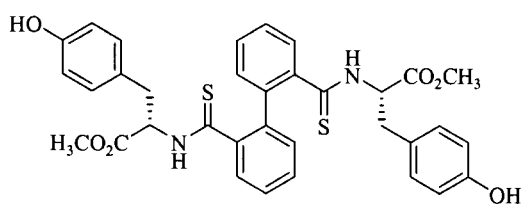
4, $IC_{50} = 69 \mu M$



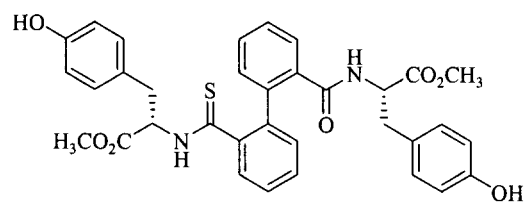
5, $IC_{50} = 71 \text{ nM}$



6, $IC_{50} = 52 \mu M$



7, $IC_{50} = 796 \text{ nM}$



8, $IC_{50} = 12 \mu M$



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 243 131

② Nº de solicitud: 200401104

③ Fecha de presentación de la solicitud: **07.05.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C07C 327/38, 327/48, 233/64, C07K 5/02, A61K 31/145, 31/165, 38/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	A. MONTERO et al. "Peptide-Biphenyl Hybrids as Calpain Inhibitors", Chemistry & Biodiversity, marzo 2004, Vol. 1, Nº 3 páginas 442-457, figura 7, compuestos 1,3,5,6.	1-6
X	E. MANN et al. "Synthesis and Crystal Structure of peptide-2-2'-Biphenyl Hybrids", Helv. Chim. Acta, 2002, Vol. 85, Nº 11, páginas 3624-3638, compuesto 6.	1-3
A	WO 03014088 A1 (MERCK PATENT) 20.02.2003, reivindicaciones.	1
A	US 5554767 A (K.K. WANG et al.) 10.09.1996, todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.06.2005

Examinador

E. Dávila Muro

Página

1/1