



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 675**

51 Int. Cl.:
C07C 235/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01926424 .1**

86 Fecha de presentación : **23.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1265849**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **Compuestos y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer.**

30 Prioridad: **23.03.2000 US 191528 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

73 Titular/es: **ELAN PHARMACEUTICALS, Inc.**
800 Gateway Boulevard
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es: **Hom, Roy;**
Mamo, Shumeye;
Tung, Jay;
Gailunas, Andrea;
John, Varghese y
Fang, Larry

74 Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 275 675 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 métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer.

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la invención según 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional de la solicitud de los EE.UU. número 60/191.528, presentada el 23 de marzo de 2000.

10 Campo de la invención

La presente invención proporciona compuestos y composiciones para inhibir la escisión mediada por θ -secretasa de la proteína precursora de beta-amiloide. Más particularmente, la invención se refiere al uso de los compuestos y las composiciones de la invención para inhibir la producción de beta-péptido beta-amiloide y para tratar o prevenir la enfermedad caracterizada por los depósitos de beta-péptido beta-amiloide. Más particularmente, la invención proporciona compuestos y composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno cerebral degenerativo que se presenta clínicamente mediante pérdida progresiva de memoria, cognición, razonamiento, juicio, y estabilidad emocional, que conduce gradualmente a un deterioro mental profundo y en última instancia, a la muerte. Los individuos con EA presentan en el cerebro depósitos característicos de beta-amiloide (placas de beta-amiloide) y en los vasos sanguíneos cerebrales (angiopatía beta-amiloide) así como marañas neurofibrilares. En la autopsia de pacientes con EA, se encuentra gran número de estas lesiones en áreas del cerebro humano importantes para la memoria y la función cognitiva. Se encuentran números menores en los cerebros de la mayoría de los seres humanos ancianos que no muestran síntomas clínicos de EA. Las placas de beta-amiloide y la angiopatía beta-amiloide también caracterizan los cerebros de los individuos con síndrome de Down (trisomía 21) y hemorragia cerebral hereditaria con beta-amiloidosis de tipo holandés, y otros trastornos de este tipo.

Las placas de beta-amiloide son una característica que define la EA, ahora se cree que es un factor o precursor causante del desarrollo de la enfermedad. Las placas de beta-amiloide se componen predominantemente de beta-péptido beta-amiloide ($A\beta$, algunas veces también designado como b β 4).

Hasta la fecha se conocen varios isotipos de APP, que incluyen APP-695 "normal", APP-751, y APP770, que tienen una secuencia de 695, 751, y 770 aminoácidos, respectivamente. La identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora de beta-amiloide, que origina la EA familiar de aparición temprana, implica el metabolismo de beta-amiloide en la patología de la enfermedad. Mutaciones notificadas de este tipo incluyen la doble mutación sueca (SW), que transforma Lys⁵⁹⁵ y Met⁵⁹⁶ en Asp⁵⁹⁵-Leu⁵⁹⁶, y mutaciones que modifican Val⁷¹⁷ en Gly, Ile, o Phe.

El péptido $A\beta$ proviene de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP) y se compone de 39-42 aminoácidos. Varias proteasas denominadas secretasas están implicadas en el procesamiento de APP. La deposición de $A\beta$ en áreas del cerebro responsables de las actividades cognitivas es un factor principal para el desarrollo de la EA. La escisión de APP en el extremo N-terminal del péptido β A4 por β -secretasa y en el extremo C-terminal por una o más γ -secretasas constituye la ruta beta-amiloidogénica, es decir, la ruta mediante la cual se forma $A\beta$. La escisión de APP por α -secretasa y la misma o una γ -secretasa diferente produce α -sAPP, una forma secretada de APP que no da como resultado la formación de placas de beta-amiloide. Esta ruta alternativa de α -sAPP impide la formación de péptido $A\beta$. Se ha propuesto que $A\beta$ se acumula como resultado del procesamiento de APP por β -secretasa, y que por lo tanto la inhibición de la actividad de esta enzima es deseable para el tratamiento de la EA. Se cree que el procesamiento *in vivo* de APP en el sitio de β -secretasa es la etapa limitante de la velocidad en la producción de $A\beta$, y por tanto es una diana terapéutica para el tratamiento de la EA. Véase, por ejemplo, Sabbagh y cols., 1997, *Alz. Dis. Rev.* 3:1-19). Puede encontrarse una descripción de los fragmentos del procesamiento proteolítico de APP, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. números 5.441.870, 5.721.130, y 5.942.400.

Varias líneas de evidencia indican que la deposición cerebral progresiva de péptidos beta-amiloidogénicos particulares, péptidos β -amiloides, ($A\beta$), desempeña un papel fundamental en la patogenia de la EA y puede preceder a los síntomas cognitivos en años o décadas. Véase, por ejemplo, Selkoe, 1991, *Neuron* 6:487. Recientemente, se ha mostrado que $A\beta$ se libera de las células neuronales que crecen en cultivo y está presente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) tanto de individuos normales como pacientes con EA. Véase, por ejemplo, Seubert y cols., 1992, *Nature* 359:325-327.

Se ha identificado una aspartil proteasa como la enzima responsable del procesamiento de APP en el sitio de escisión por β -secretasa. La enzima β -secretasa se ha descrito usando nomenclatura variada, incluyendo BACE (Beta Amyloid Cleaving Enzyme, enzima β -amiloide de escisión) y Asp. Véase, por ejemplo, Sindha y cols., 1999, *Nature* 402:537-554 (pág. 501) y la solicitud publicada PCT WO00/17369 (hAsp2a y hAsp2b).

En la actualidad, no existen tratamientos eficaces para detener, prevenir o revertir la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, hay una necesidad urgente de agentes farmacéuticos que puedan ralentizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer y/o en primer lugar, prevenirla.

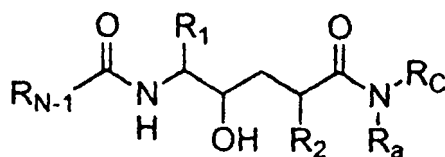
Son necesarios compuestos que sean inhibidores eficaces de β -secretasa, que inhiban la escisión mediada por β -secretasa de APP, que sean inhibidores eficaces de la producción de $A\beta$ y/o sean eficaces para reducir las placas o beta-depósitos de beta-amiloide para el tratamiento o la prevención de la enfermedad caracterizada por placas o beta-depósitos de beta-amiloide, tales como la EA.

Se describen derivados de 5-amino-6-ciclohexil-4-hidroxihexanamida en el documento US 5703129. Como es de esperar, se indica que estos compuestos son eficaces en el tratamiento de pacientes que padecen o son propensos a estados o trastornos relacionados con la acumulación en el cerebro de proteína beta-amiloide.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos y composiciones para inhibir la escisión mediada por β -secretasa de la proteína precursora de beta-amiloide. Más particularmente, los compuestos y composiciones de la invención son eficaces para tratar seres humanos que padecen la enfermedad de Alzheimer, para ayudar a prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer, para tratar a los pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) y prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer en los que avanzarían desde DCL hasta EA, para tratar el síndrome de Down, para tratar seres humanos que padecen hemorragia cerebral hereditaria con beta-amiloidosis de tipo holandés, para tratar la angiopatía beta-amiloide cerebral y prevenir sus posibles consecuencias, es decir, hemorragias lobulares únicas y recurrente, para tratar otras demencias degenerativas, incluyendo demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson, demencia asociada con parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada con degeneración cortico-basal, tipo con cuerpos de Lewy difusos de la enfermedad de Alzheimer.

Se pueden demostrar las actividades inhibitoras de los compuestos de la invención, por ejemplo, usando uno o más de los ensayos descritos en el presente documento o en la técnica anterior. Según la presente invención se proporciona un compuesto A de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R_1 es:

(I) alquilo C_1 - C_6 , no sustituido o sustituido con uno, dos o tres alquilo C_1 - C_3 , -F, -Cl, -Br, -I, -OH, - NH_2 , - $C\equiv N$, - CF_3 , o - N_3 ,

(II) $-(CH_2)_{1-2}-S-CH_3$,

(III) $-CH_2-CH_2-S-CH_3$,

(IV) $-CH_2$ -(alqueno C_2 - C_6) no sustituido o sustituido por un -F,

(V) $-(CH_2)_{0-3}-(R_{1-aro})$ en el que R_{1-aro} es fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, indanilo, indenilo, dihidronaftilo, tetralinilo no sustituido o sustituido independientemente en el anillo de arilo con uno o dos de alquilo C_1 - C_3 , - CF_3 , -F, Cl, -Br, -I, alcoxilo C_1 - C_3 , -O- CF_3 , - NH_2 , -OH, o - $C\equiv N$;

R_2 es:

(I) -H,

(II) alquilo C_1 - C_6 , o

(III) $-(CH_2)_{0-4}-R_{2-1}$ en el que R_{2-1} es cicloalquilo (C_3 - C_6), R_{1-aro} en el que R_{1-aro} es según se definió anteriormente;

R_{N-1} es fenilo que está sustituido independientemente con uno, dos, tres o cuatro de R_{100} en el que R_{100} es

(1) alquilo C_1 - C_6 ,

(2) -F, -Cl, -Br, o -I,

(3) -OH,

ES 2 275 675 T3

(4) $-\text{NO}_2$,

(5) $-\text{CO}-\text{OH}$,

(6) $-\text{C}\equiv\text{N}$,

(7) $-\text{CO}-\text{NR}_{\text{N}-2}\text{R}_{\text{N}-3}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-2}$ y $\text{R}_{\text{N}-3}$ son iguales o diferentes y son:

(a) $-\text{H}$,

(b) $-\text{alquilo C}_1\text{-C}_6$ no sustituido o sustituido con un $-\text{OH}$ o $-\text{NH}_2$,

(c) $-\text{alquilo C}_1\text{-C}_6$ no sustituido o sustituido con de uno a tres $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, o $-\text{I}$,

(d) $-\text{cicloalquilo C}_3\text{-C}_7$,

(e) $-(\text{alquil C}_1\text{-C}_2)-(\text{cicloalquilo C}_3\text{-C}_7)$,

(f) $-(\text{alquil C}_1\text{-C}_6)-\text{O}-(\text{alquilo C}_1\text{-C}_3)$,

(g) $-\text{alqueno C}_1\text{-C}_6$ con uno o dos dobles enlaces,

(h) $-\text{alquino C}_1\text{-C}_6$ con uno o dos triples enlaces,

(i) cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ con un doble enlace y un triple enlace,

(8) $-\text{CO}-(\text{alquilo C}_3\text{-C}_{12})$,

(9) $-\text{CO}-(\text{cicloalquilo C}_3\text{-C}_6)$,

(11) $-\text{CO}-\text{R}_{1-\text{heterociclo}}$ en el que $\text{R}_{1-\text{heterociclo}}$ es morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido de tiomorfolinilo, S,S-dióxido de tiomorfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, tetrahidrofuranilo, o tetrahidrotiofenilo, en el que el grupo $\text{R}_{1-\text{heterociclo}}$ está unido mediante cualquier átomo del grupo $\text{R}_{1-\text{heterociclo}}$ original sustituido por hidrógeno de tal forma que el nuevo enlace al grupo $\text{R}_{1-\text{heteroalilo}}$ sustituye al átomo de hidrógeno y su enlace, en el que el heterociclo no está sustituido o está sustituido con uno o dos $=\text{O}$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{F}$, Cl , $-\text{Br}$, $-\text{I}$, alcóxido $\text{C}_1\text{-C}_3$, $-\text{OCF}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, o $-\text{C}\equiv\text{N}$,

(12) $-\text{CO}-\text{R}_{\text{N}-4}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-4}$ es morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo, piperidinilo o pirrolidinilo en el que cada grupo no está sustituido o está sustituido con uno o dos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$,

(13) $-\text{CO}-\text{O}-\text{R}_{\text{N}-5}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-5}$ es:

(a) alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, o

(b) $-(\text{CH}_2)_{0-2}-(\text{R}_{1-\text{arilo}})$ en el que $\text{R}_{1-\text{arilo}}$ es según se definió anteriormente,

(14) $-\text{SO}_2-\text{NR}_{\text{N}-2}\text{R}_{\text{N}-3}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-2}$ y $\text{R}_{\text{N}-3}$ son según se definieron anteriormente,

(15) $-\text{SO}-(\text{alquilo C}_1\text{-C}_8)$,

(16) $-\text{SO}_2-(\text{alquilo C}_3\text{-C}_{12})$,

(17) $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-\text{R}_{\text{N}-5}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-5}$ es según se definió anteriormente,

(18) $-\text{NH}-\text{CO}-\text{N}(\text{alquilo C}_1\text{-C}_3)_2$,

(19) $-\text{N}-\text{CS}-\text{N}(\text{alquilo C}_1\text{-C}_3)_2$,

(20) $-\text{N}(\text{alquil C}_1\text{-C}_3)-\text{CO}-\text{R}_{\text{N}-5}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-5}$ es según se definió anteriormente,

(21) $-\text{NR}_{\text{N}-2}\text{R}_{\text{N}-3}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-2}$ y $\text{R}_{\text{N}-3}$ pueden ser iguales o diferentes y son según se definieron anteriormente,

(22) $-\text{R}_{\text{N}-4}$ en el que $\text{R}_{\text{N}-4}$ es según se definió anteriormente,

(23) $-\text{O}-\text{CO}-(\text{alquilo C}_1\text{-C}_6)$,

(24) $-\text{O}-\text{CO}-\text{N}(\text{alquilo C}_1\text{-C}_3)_2$,

ES 2 275 675 T3

(25) -O-CS-N(alquilo C₁-C₃)₂,

(26) -O-(alquilo C₁-C₆),

5 (27) -O-(alquil C₂-C₅)-COOH,

(28) -S-(alquilo C₁-C₆),

(29) alquilo C₁-C₆ no sustituido o sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 -F,

10 (30) -O-(alquilo C₁-C₆ no sustituido o sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 -F, o

(31) -O-φ;

15 R_a es hidrógeno o alquilo C₁-C₆;

R_C es

20 (1) R_{CH} en el que R_{CH} es morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido de tiomorfolinilo, S,S-dióxido de tiomorfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, tetrahidrofuranilo, o tetrahidrotiofenilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con oxo, alquilo C₁-C₃, -CF₃, -F, Cl, -Br o -I, alcoxilo C₁-C₃, -O-CF₃, -NH₂, -OH, o -C≡N;

25 (2) R_{CY} en el que R_{CY} es piridinilo, pirimidinilo, quinolinilo, indenilo, indanilo, benzotiofenilo, indolilo, indolinilo, piridazinilo, pirazinilo, isoindolilo, isoquinolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, indazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, indolizínilo, indazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, 1,4-benzodioxanilo, purinilo, oxazolopiridinilo, imidazopiridinilo, isotiazolilo, naftiridinilo, cinolinilo, carbazolilo, β-carbolinilo, isocromanilo, cromanilo, furazanilo, tetrahidroisoquinolina, isoindolinilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienilo, isobenzotiofenilo, benzoxazolilo, o piridopiridinilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₃, -CF₃, -F, Cl, -Br, o I, alcoxilo C₁-C₃, -O-CF₃, -NH₂, -OH, o -C≡N;

(3) alquil (C₁-C₁₀)-R_{CH};

35 (4) alquil (C₁-C₁₀)-R_{CY}; o

(5) alquil (C₁-C₁₀)-K₁₋₃ en el que:

(A) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con un -OH,

40 (B) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con un alcoxilo C₁-C₆ no sustituido o sustituido con 1-5 -F,

(D) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con 1-5 -F

45 (F) cada K es:

(1) H,

50 (2) alquilo C₁-C₃,

(3) alcoxilo C₁-C₃,

(4) alquiltioxilo C₁-C₃,

55 (5) alquilacilamino C₁-C₆,

(6) alquilaciloxilo C₁-C₆,

60 (7) amido

(8) alquilamino C₁-C₆

(9) fenilamino,

65 (10) carbamilo

(11) carboxilo

(12) carboxialcoxilo (C_2-C_5),

(13) carboxialquiltioxilo (C_2-C_5),

(16) amino no sustituido o sustituido con alquilo C_1-C_6 ,

(17) hidroxilo, o

(18) éster carboxi-metílico.

Los compuestos de la presente invención son útiles en un método de tratamiento de un paciente que tiene, o en la prevención de que un paciente llegue a tener una enfermedad o estado seleccionado de enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, angiopatía amiloide cerebral, demencia degenerativa, tipo con cuerpos de Lewy difusos de la enfermedad de Alzheimer o enfermedades amiloides centrales o periféricas y pacientes que necesiten de un tratamiento de este tipo.

La presente invención se refiere también al uso del compuesto definido anteriormente y de sales farmacéuticamente aceptables del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Descripción detallada del procedimiento para preparar los compuestos de la invención

La presente invención proporciona compuestos de hidroxietileno que son útiles en el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer. Los compuestos de hidroxietileno contra la enfermedad de Alzheimer de la presente invención se preparan mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica a partir de compuestos de partida conocidos para los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen bien la química de procesos. El procedimiento más general para preparar los compuestos de la presente invención se expone en el diagrama A, según se define en él. Mientras que el procedimiento se describe con referencia a algunos compuestos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones, el presente documento contiene su discusión para facilitar más la comprensión del procedimiento.

La química es sencilla y en resumen implica las etapas de protección del N de un material de partida de aminoácido (I) para producir el correspondiente aminoácido protegido (II), la amino-deshidroxilación del aminoácido protegido (II) con la amina apropiada en presencia de un agente de acoplamiento para producir la correspondiente amida protegida (III), reducción de la amida protegida al correspondiente aldehído (IV), formación de la olefina terminal (V) según se describe, epoxidación con perácido de la olefina (V) para producir el correspondiente epóxido (VI), apertura del epóxido (VI) con una amida (VII) para producir el correspondiente alcohol protegido (VIII), ciclación del alcohol protegido (VIII) para producir la lactona protegida (IX) de la que se elimina el grupo protector de nitrógeno para producir la correspondiente amina (X), que se hace reaccionar después con una agente de formación de amida de fórmula $(R_{N-1}-X_N)_2O$ o $R_{N-1}-X_N-X_2$ o $R_{N-1}-X_N-OH$, por ejemplo, para producir la lactona (XI), apertura de la lactona (XI) con una amina C-terminal, $RC-NH_2$ para producir los compuestos de hidroxietileno contra la enfermedad de Alzheimer de la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que estas reacciones se conocen bien en química orgánica. Un químico experto en la técnica, que conoce la estructura química de los compuestos de hidroxietileno biológicamente activos de la presente invención, podría prepararlos mediante métodos conocidos a partir de materiales de partida sin información adicional. La explicación a continuación, por tanto, no es necesaria, pero se considera de ayuda para los expertos en la técnica que deseen preparar los compuestos de la presente invención.

La estructura principal de los compuestos de la presente invención es un resto de hidroxietileno. Puede prepararse fácilmente mediante métodos descritos en la bibliografía y conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, Henning, R. "Synthetic Routes to Different Classes of Natural Products and Analogs Thereof. Synthesis of Hydroxyethylene Isosteric Dipeptides". En Organic Synthesis Highlights II; VCH: Weinheim, Alemania, 1995; págs. 251-259 describe procedimientos para preparar compuestos del tipo de hidroxietileno.

El diagrama A, según se define en él, expone un método general usado en la presente invención para preparar los compuestos de hidroxietileno sustituidos de manera apropiada de la presente invención. Los compuestos de hidroxietileno contra la enfermedad de Alzheimer de la presente invención se preparan partiendo del correspondiente aminoácido (I). Los expertos en la técnica conocen bien los aminoácidos (I) que pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos conocidos mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los compuestos de hidroxietileno de la presente invención tienen al menos tres centros enantioméricos que dan 8 enantiómeros, prefiriéndose la estereoquímica S, S, R. El primero de estos centros enantioméricos proviene del material de partida de aminoácido (I). Se prefiere obtener comercialmente o producir el enantiómero deseado (S) en lugar de producir una mezcla enantioméricamente impura y después tener que separar el enantiómero deseado (S). Se prefiere comenzar el procedimiento con el (S)-aminoácido (I) enantioméricamente puro de la misma configuración que la del producto de hidroxietileno. Para los aminoácidos (I), R_1 es:

(I) alquilo C_1-C_6 , no sustituido o sustituido con uno, dos o tres alquilo C_1-C_3 , -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -NH₂, -C≡N, -CF₃, o -N₃,

(II) $-(CH_2)_{1-2}-S-CH_3$,

(III) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$,

(IV) $-\text{CH}_2-(\text{alqueno} \text{C}_2-\text{C}_6)$ no sustituido o sustituido por un -F,

- 5 (V) $-(\text{CH}_2)_{0-3}-(\text{R}_{1-\text{arilo}})$ en el que $\text{R}_{1-\text{arilo}}$ es fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, indanilo, indenilo, dihidronaftilo, tetralinilo no sustituido o sustituido independientemente en el anillo arilo con uno o dos de alquilo C_1-C_3 , $-\text{CF}_3$, -F, Cl, -Br, -I, alcoxilo C_1-C_3 , $-\text{O}-\text{CF}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, o $-\text{C}\equiv\text{N}$;

10 La primera etapa del procedimiento es proteger el grupo amino libre del (S)-aminoácido (I) con un grupo protector de amino para producir el aminoácido (S)-protegido (II) mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen bien los grupos protectores de amino. Véase, por ejemplo, "Protecting Groups in Organic Synthesis" John Wiley and sons, Nueva York, N.Y., 2ª ed., 1991, Capítulo 7; "Protecting Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, New York, N.Y., 1973, Capítulo 2. La función del grupo protector de amino es proteger la funcionalidad amino libre ($-\text{NH}_2$) durante reacciones posteriores en el (S)-aminoácido (I) que no avanzarían bien, bien debido a que el grupo amino reaccionaría y se funcionalizaría de un modo que no concuerda con su necesidad de estar libre para reacciones posteriores, o bien el grupo amino libre interferiría en la reacción. Cuando ya no se necesita el grupo protector de amino, se elimina mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por definición, el grupo protector de amino debe ser fácilmente eliminable, tal como conocen los expertos en la técnica mediante métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. Grupos protectores de amino adecuados incluyen *t*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, formilo, ftalimido, tricloroacetilo, cloroacetilo, bromoacetilo, yodoacetilo, 4-fenilbenciloxicarbonilo, 2-metilbenciloxicarbonilo, 4-etoxibenciloxicarbonilo, 4-fluorobenciloxicarbonilo, 4-clorobenciloxicarbonilo, 3-clorobenciloxicarbonilo, 2-clorobenciloxicarbonilo, 2,4-diclorobenciloxicarbonilo, 4-bromobenciloxicarbonilo, 3-bromobenciloxicarbonilo, 4-nitrobenciloxicarbonilo, 4-cianobenciloxicarbonilo, 2-(4-xenil)isopropoxicarbonilo, 1,1-difenilet-1-iloxicarbonilo, 1,1-difenilprop-1-iloxicarbonilo, 2-fenilprop-2-iloxicarbonilo, 2-(*p*-toluil)prop-2-iloxicarbonilo, ciclopentaniloxicarbonilo, 1-metilciclopentaniloxicarbonilo, ciclohexaniloxicarbonilo, 1-metilciclohexaniloxicarbonilo, 2-metilciclohexaniloxicarbonilo, 2-(4-toluil)tosilil-etoxicarbonilo, 2-(metilsulfonil)etoxicarbonilo, 2-(trifenilfosfino)etoxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 1-(trimetilsililmetil)prop-1-eniloxicarbonilo, 5-bencilisoxazolimetoxicarbonilo, 4-acetoxibenciloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-etinil-2-propoxicarbonilo, ciclopropilmetoxicarbonilo, 4-(deciloxil)benciloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, -fenil- $\text{C}(=\text{N})-\text{H}$, y 1-piperidiloxicarbonilo. Se prefiere que el grupo protector sea *t*-butoxicarbonilo (BOC) y benciloxicarbonilo (CBZ), se prefiere más que el grupo protector sea *t*-butoxicarbonilo. Un experto en la técnica entenderá los métodos preferidos de introducción de un grupo protector de *t*-butoxicarbonilo o benciloxicarbonilo y adicionalmente puede consultar T.W. Green y P.G.M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley and Sons, 2ª ed., 1991, en 327-335 para orientación. El aminoácido (S)-protegido (II) se transforma en el correspondiente compuesto de amida (S)-protegida (III) por medios bien conocidos por los expertos en la técnica para la producción de una amida a partir de un ácido carboxílico y una amina o hidroxilamina. Los medios y condiciones de reacción para producir el compuesto de amida (S)-protegida (III) incluyen, por ejemplo, el uso de un agente de acoplamiento tal como, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida, 1,1-carbonildiimidazol, POCl_3 , TiCl_4 , SO_2Cl_2 , fosfato de benzotriazol-1-il-diethyl, o tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil(succinimido)uronio en presencia de una amina o hidroxilamina. 1,1-Carbonildiimidazol es un agente de acoplamiento preferido y N-metil-O-metilhidroxilamina es una hidroxilamina preferida. La reacción se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de entre 1 hora y 3 días a temperaturas que oscilan desde -78° hasta temperaturas elevadas hasta el punto de reflujo del disolvente empleado. Se prefiere llevar a cabo la reacción entre 0° y 50° .

45 El compuesto de amida (S)-protegida (III) se reduce después por medios bien conocidos para los expertos en la técnica para la reducción de una amida al correspondiente aldehído, proporcionando el correspondiente aldehído (IV). Los medios y las condiciones de reacción para reducir el compuesto de amida (S)-protegida (III) al correspondiente aldehído (IV) incluyen, por ejemplo, borohidruro de sodio, borohidruro de litio, borano, hidruro de diisobutilaluminio e hidruro de litio y aluminio. El hidruro de litio y aluminio es el agente reductor preferido. Las reducciones se llevan a cabo durante un periodo de tiempo de entre 1 hora y 3 días a temperaturas que oscilan desde -78° hasta temperatura ambiente. Se prefiere llevar a cabo la reducción entre -20° y temperatura ambiente. Los expertos en la técnica conocen la combinación preferida de agentes reductores y condiciones de reacción requeridas, véase, por ejemplo, Larock, R.C. in Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, 1989.

55 El aldehído (IV) se transforma en la correspondiente olefina (V) por medios conocidos por los expertos en la técnica. Un ejemplo de reacción de este tipo es la reacción del aldehído (IV) con un iluro de fósforo para producir la olefina deseada. Iluros de fósforo de este tipo incluyen bromuro de metiltrifenilfosfonio. Las condiciones de reacción incluyen temperaturas que oscilan desde -100° hasta la temperatura de reflujo del disolvente empleado; los intervalos de temperatura están entre -100° y 0° .

60 La epoxidación con perácido de la olefina (V) proporciona el epóxido (VI). Los expertos en la técnica conocen otros métodos para la conversión de una olefina en un epóxido. Los medios para producir el epóxido (VI) incluyen, por ejemplo, el uso de un perácido tal como, por ejemplo, ácido peracético, perbenzoico, ácido trifluoroperacético, ácido 3,5-dinitroperoxibenzoico, y ácido *m*-cloroperbenzoico.

65 Después se hace reaccionar el epóxido (VI) con la amida (VII) apropiada por medios conocidos por los expertos en la técnica que abren el epóxido para producir el correspondiente alcohol protegido (VIII) deseado. La reacción del epóxido (VI) con la amida (VII) produce una mezcla de enantiómeros. Después se separa esta mezcla enantiomérica por

ES 2 275 675 T3

medios conocidos por los expertos en la técnica tales como recristalización selectiva a baja temperatura o separación cromatográfica, lo más preferiblemente mediante HPLC, empleando columnas quirales disponibles comercialmente. El enantiómero que se usa en el resto del procedimiento del diagrama A es el (S,S,R)-alcohol (VIII).

5 El alcohol protegido (VIII) se transforma en la correspondiente lactona (IX) por medios conocidos por los expertos en la técnica. Un medio preferido es mediante reacción con un catalizador ácido, por ejemplo, pero no se limita a, ácido p-toluenosulfónico y similares. Las reacciones se llevan a cabo a temperaturas que oscilan desde -78° hasta la temperatura de reflujo del disolvente empleado; los intervalos de temperatura preferidos están entre 0° y 50°.

10 El resto de amina o la lactona protegida (IX) se desprotege para dar la correspondiente amina (X) por medios conocidos por los expertos en la técnica para la eliminación del grupo protector de amina. El medio adecuado para la eliminación del grupo protector de amina depende de la naturaleza del grupo protector. Los expertos en la técnica, que conocen la naturaleza de un grupo protector específico, saben qué reactivo es preferible para su eliminación. Por ejemplo, se prefiere eliminar el grupo protector preferido, BOC, disolviendo la lactona protegida (IX) en una mezcla
15 de ácido trifluoroacético/diclorometano. Cuando se termina, se eliminan los disolventes a presión reducida para dar la correspondiente lactona (como la correspondiente sal, es decir, sal del ácido trifluoroacético) que se usa sin purificación adicional. Sin embargo, si se desea, la lactona puede purificarse adicionalmente por medios bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, recristalización. Además, si se desea la forma que no es sal, puede obtenerse por medios conocidos por los expertos en la técnica, tales como por ejemplo, preparar la amina de base
20 libre mediante tratamiento de la sal en condiciones básicas suaves. Pueden encontrarse condiciones adicionales para la desprotección de BOC y condiciones para la desprotección de otros grupos protectores en T.W. Green y P.G.M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley and Sons, 1991, pág. 309 y siguientes. Sales químicamente adecuadas incluyen trifluoroacetato, y el anión de ácidos minerales tales como cloruro, sulfato, fosfato; se prefiere trifluoroacetato.

25 La amina (X) reacciona después con un agente de formación de amida sustituido de forma apropiada tal como anhídrido, haluro de acilo, o ácido de fórmula $(R_{N-1}-X_N)_2O$ o $R_{N-1}-X_N-X_2$ o $R_{N-1}-X_N-OH$ por medios de acilación de nitrógeno conocidos por los expertos en la técnica para producir la correspondiente lactona (XI). Los expertos en la técnica conocen las condiciones de acilación de nitrógeno para la reacción de la amina (X) con un agente de formación
30 de amida para producir la correspondiente lactona (XI) y pueden encontrarse en R.C. Larock en Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, 1989, pág. 981, 979, y 972.

R_{N-1} es fenilo que está sustituido independientemente con uno, dos, tres o cuatro de R_{100} en el que R_{100} es

- 35 (1) alquilo C_1-C_6 ,
- (2) -F, -Cl, -Br, o -I,
- (3) -OH,
- 40 (4) -NO₂,
- (5) -CO-OH,
- 45 (6) -C≡N,
- (7) -CO-NR_{N-2}R_{N-3} en el que R_{N-2} y R_{N-3} son iguales o diferentes y son:
- (a) -H,
- 50 (b) -alquilo C_1-C_6 no sustituido o sustituido con un -OH o -NH₂,
- (c) -alquilo C_1-C_6 no sustituido o sustituido con de uno a tres -F, -Cl, -Br, o -I,
- 55 (d) -cicloalquilo C_3-C_7 ,
- (e) -(alquil C_1-C_2)-(cicloalquilo C_3-C_7),
- (f) -(alquil C_1-C_6)-O-(alquilo C_1-C_3),
- 60 (g) - alqueno C_1-C_6 con uno o dos dobles enlaces,
- (h) - alquino C_1-C_6 con uno o dos triples enlaces,
- 65 (i) cadena de alquilo C_1-C_6 con un doble enlace y un triple enlace,
- (8) -CO-(alquilo C_3-C_{12}),

(9) -CO-(cicloalquilo C₃-C₆),

(11) -CO-R_{1-heterociclo} en el que R_{1-heterociclo} es morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido de tiomorfolinilo, S,S-dióxido de tiomorfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, tetrahidrofuranilo, o tetrahidrotiofenilo, en los que el grupo R_{1-heterociclo} está unido mediante cualquier átomo del grupo R_{1-heterociclo} original sustituido por hidrógeno de tal forma que el nuevo enlace al grupo R_{1-heteroarilo} sustituye al átomo de hidrógeno y su enlace, en el que el heterociclo no está sustituido o está sustituido con uno o dos =O, alquilo C₁-C₃, -CF₃, -F, Cl, -Br, -I, alcóxido C₁-C₃, -OCF₃, -NH₂, -OH, o -C≡N,

(12) -CO-R_{N-4} en el que R_{N-4} es morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo, piperidinilo o pirrolidinilo en el que cada grupo no está sustituido o está sustituido con uno o dos alquilo C₁-C₃,

(13) -CO-O-R_{N-5} en el que R_{N-5} es:

(a) alquilo C₁-C₆, o

(b) -(CH₂)₀₋₂-(R_{1-arilo}) en el que R_{1-arilo} es según se definió anteriormente,

(14) -SO₂-NR_{N-2}R_{N-3} en el que R_{N-2} y R_{N-3} son según se definieron anteriormente,

(15) -SO-(alquilo C₁-C₈),

(16) -SO₂-(alquilo C₃-C₁₂),

(17) -NH-CO-O-R_{N-5} en el que R_{N-5} es según se definió anteriormente,

(18) -NH-CO-N(alquilo C₁-C₃)₂,

(19) -N-CS-N(alquilo C₁-C₃)₂,

(20) -N(alquil C₁-C₃)-CO-R_{N-5} en el que R_{N-5} es según se definió anteriormente,

(21) -NR_{N-2}R_{N-3} en el que R_{N-2} y R_{N-3} pueden ser iguales o diferentes y son según se definieron anteriormente,

(22) -R_{N-4} en el que R_{N-4} es según se definió anteriormente,

(23) -O-CO-(alquilo C₁-C₆),

(24) -O-CO-N(alquilo C₁-C₃)₂,

(25) -O-CS-N(alquilo C₁-C₃)₂,

(26) -O-(alquilo C₁-C₆),

(27) -O-(alquil C₂-C₅)-COOH,

(28) -S-(alquilo C₁-C₆),

(29) alquilo C₁-C₆ no sustituido o sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 -F,

(30) -O-(alquilo C₁-C₆ no sustituido o sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 -F, o

(31)-O-φ;

La acilación de nitrógeno de aminas primarias para producir amidas secundarias es una de las reacciones conocidas más antiguas. Los expertos en la técnica conocen los agentes de formación de amida, (R_{N-1}-X_N)₂O o R_{N-1}-X_N-X₂ o R_{N-1}-X_N-OH y éstos están disponibles comercialmente o pueden prepararse fácilmente a partir de materiales de partida conocidos mediante métodos conocidos en la bibliografía. X₂ incluye -Cl, -Br; se prefiere que X₂ sea -Cl. Se prefiere usar un agente acilante de ácido isoftálico de fórmula R_{N-2}R_{N-3}N-CO-φ-CO- o un agente acilante de ácido metilisoftálico R_{N-2}R_{N-3}N-CO-(CH₃-)φ-CO- en el que la sustitución sea ácido 5-metil-1,3-isoftálico. El ácido 5-metil-1,3-isoftálico más preferido es ácido 3-[(N,N-dipropilamino)carbonil]-5-metilbenzoico. Estos compuestos se preparan preferiblemente tal como se expone a continuación. Se disuelve un éster, preferiblemente el éster metílico de isoftalato o 5-metil-1,3-isoftalato de metilo, en una mezcla de THF/DMF. Luego se añade 1,1'-carbonildiimidazol a 0-100°. A continuación se añade la amina deseada (H-NR_{N-2}R_{N-3}). Tras agitar a 0-100°, se reparte la mezcla de reacción entre una disolución acuosa saturada con un pH de 3 a 9 y un disolvente orgánico inmiscible en agua. La fase acuosa se separa y se extrae dos veces más con el disolvente orgánico. Los extractos orgánicos se combinan y se lavan después con una disolución acuosa y se secan. La filtración del agente desecante y la eliminación de los disolventes a presión reducida da éster bruto del deseado R_{N-2}R_{N-3}N-CO-φ-CO-O-CH₃ o un agente acilante de ácido metilisoftálico R_{N-2}R_{N-3}N-CO-

(CH₃-) ϕ -CO-O-CH₃. La purificación del éster puede lograrse mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un disolvente adecuado. El éster de isoftalato o el éster de metilisoftalato de la monoalquil o dialquilamida se trata después con una disolución acuosa de base tal como hidróxido alcalino en una cantidad mínima de THF/metanol/agua y se agita a 20-70° con monitorización. Los disolventes se eliminan a presión reducida y posteriormente se reparten entre agua y un disolvente orgánico inmiscible en agua. La fase acuosa se separa y se extrae una vez más con un disolvente orgánico inmiscible en agua. Después se acidificó la fase acuosa hasta pH $\leq$ 3. Luego, se extrajo la mezcla obtenida tres veces con acetato de etilo. Después se secaron estos extractos orgánicos combinados. Se elimina el agente desecante por filtración y el disolvente orgánico se elimina a presión reducida para dar el producto bruto. El isoftalato/metilisoftalato de mono o dialquilamida bruto se usa como tal en la siguiente reacción con la amina (X) para producir la lactona (XI).

Cuando se desea producir una amida primaria, R_{N-2} y R_{N-3} son ambos -H, se prefiere el siguiente procedimiento. Un éster de isoftalato o 5-metil-1,3-isoftalato de metilo se disuelve en una mezcla de THF/DMF. Luego se añade CDI a 0-100°. Después se burbujea gas amoníaco dentro de la mezcla con monitorización. La reacción se enfría hasta 0° durante la duración de la adición de amoníaco. La reacción se deja agitando bajo un globo de amoníaco a 0-100° con monitorización. La reacción se reparte entre una disolución acuosa con un pH de 3 a 9 y un disolvente orgánico inmiscible en agua. Las fases se separan y la fase acuosa se extrae dos veces más con un disolvente orgánico inmiscible en agua. Los extractos orgánicos se lavan con una disolución acuosa y se secan. La eliminación de disolventes a presión reducida da el éster bruto del deseado H₂N-CO- ϕ -CO-O(alquilo) o un agente acilante de ácido metilisoftálico H₂N-CO-(CH₃-) ϕ -CO-O(alquilo). La purificación del éster bruto puede lograrse mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con isopropanol/cloroformo. Luego se trata el éster de isoftalato o éster de metilisoftalato de la amida primaria con una disolución acuosa de base tal como hidróxido alcalino en una cantidad mínima de THF/metanol/agua y se agita a 0-100° con monitorización. Los disolventes se eliminan a presión reducida y posteriormente se reparten entre agua y un disolvente orgánico inmiscible en agua. La fase acuosa se separa y se extrae una vez más con un disolvente orgánico inmiscible en agua. Luego se acidifica la fase acuosa hasta pH $\leq$ 3. Luego se extrae la mezcla obtenida tres veces con un disolvente orgánico inmiscible en agua. Estos extractos orgánicos combinados se secan y el disolvente orgánico se elimina a presión reducida para dar el producto bruto. El isoftalato/metilisoftalato de amida primaria se usa como tal en la siguiente reacción (X) para producir (XI).

Se sigue el siguiente procedimiento cuando se desea que la amina se cicle para dar un grupo tal como morfolinilo, piperazinilo, piperidinilo y pirrolidinilo, etc. Se disuelve un éster de isoftalato o 5-metil-1,3-isoftalato de metilo en un disolvente orgánico adecuado y se añade una cantidad catalítica o DMF. La mezcla se enfría hasta -20° hasta por debajo de la t.a. y después se añade cloruro de oxalilo. La mezcla se agita con monitorización y los disolventes se eliminan a presión reducida. Se deja el cloruro de ácido a vacío durante la noche. Se disuelve el cloruro de ácido en un disolvente orgánico adecuado y se enfría hasta -20° hasta por debajo de la t.a. antes de la adición de la amina cíclica y de N-metilpiperidina. La mezcla de reacción se agita a -20° hasta por debajo de la t.a. con monitorización antes de eliminar los disolventes. Se diluye el residuo con agua y disolvente orgánico inmiscible en agua y se separan las fases. La fase acuosa se extrae dos veces más con disolvente orgánico inmiscible en agua, y los extractos orgánicos combinados se lavan con una disolución acuosa y se secan. La eliminación de los disolventes a presión reducida da el producto bruto. Luego se trata la amida cíclica cruda con una base acuosa tal como hidróxido alcalino en una cantidad mínima de THF/metanol/agua y se agita durante la noche a 0-100°. Los disolventes se eliminan a presión reducida y posteriormente se reparten entre agua y un disolvente orgánico inmiscible en agua. Se extrae la fase acuosa una vez más con un disolvente orgánico inmiscible en agua. La eliminación del agua de la fase acuosa a presión reducida da el producto de amida cíclica deseado.

Después, la lactona (XI) puede reaccionar con la amina C-terminal sustituida de manera apropiada, RC-NH₂ por medios conocidos por los expertos en la técnica que abren la lactona para producir el producto final de hidroxietileno (XII) deseado. Las aminas C-terminales sustituidas de esta invención están disponibles comercialmente o se conocen por los expertos en la técnica y pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos conocidos. R_C incluye:

(1) R_{CH} en el que R_{CH} es morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido de tiomorfolinilo, S,S-dióxido de tiomorfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidropirranilo, piperidinilo, tetrahidrofuranilo, o tetrahidrotiofenilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con oxo, alquilo C₁-C₃, -CF₃, -F, Cl, -Br o -I, alcóxilo C₁-C₃, -O-CF₃, -NH₂, -OH, o -C $\equiv$ N;

(2) R_{CY} en el que R_{CY} es piridinilo, pirimidinilo, quinolinilo, indenilo, indanilo, benzotiofenilo, indolilo, indolinilo, piridazinilo, pirazinilo, isoindolilo, isoquinolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, indazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, indolizínilo, indazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, 1,4-benzodioxanilo, purinilo, oxazolopiridinilo, imidazopiridinilo, isotiazolilo, naftiridinilo, cinolinilo, carbazolilo, β -carbolinilo, isocromanilo, cromanilo, furazanilo, tetrahidroisoquinolina, isoindolinilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienilo, isobenzotiofenilo, benzoxazolilo, o piridopiridinilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₃, -CF₃, -F, Cl, -Br, o I, alcóxilo C₁-C₃, -O-CF₃, -NH₂, -OH, o -C $\equiv$ N;

(3) -alquil(C₁-C₁₀)-R_{CH};

(4) -alquil(C₁-C₁₀)-R_{CY}; o

ES 2 275 675 T3

(5) -alquil(C₁-C₁₀)-K₁₋₃ en el que:

(A) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con un -OH,

5 (B) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con un alcoxilo C₁-C₆ no sustituido o sustituido con 1-5 -F,

(D) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con 1-5 -F

10 (F) cada K es:

(1) H,

(2) alquilo C₁-C₃,

15 (3) alcoxilo C₁-C₃,

(4) alquiltioxilo C₁-C₃,

20 (5) alquilacilamino C₁-C₆,

(6) alquilaciloxilo C₁-C₆,

(7) amido

25 (8) alquilamino C₁-C₆

(9) fenilamino,

30 (10) carbamilo

(11) carboxilo

(12) carboxilalcoxilo (C₂-C₅),

35 (13) carboxilalquiltioxilo (C₂-C₅),

(16) amino no sustituido o sustituido con alquilo C₁-C₆,

40 (17) hidroxilo, o

(18) éster carboxi-metílico.

Condiciones de reacción adecuadas para abrir la lactona (XI) para producir el producto final de hidroxietileno (XII) deseado incluyen las de la reacción de acoplamiento mediada por AlMe₃ descrita en el procedimiento de la bibliografía de S.F. Martin y cols., *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 1517-1520. Cuando la amina C-terminal sustituida es un ciclohexildicarboxilato de 1-amino-3,5-cis-dimetilo se prepara preferiblemente tal como sigue. Se añade rodio en alúmina en una botella a alta presión, a 5-isoftalato de dimetilo en ácido acético y metanol. Se satura la botella con hidrógeno a 380 KPa y se agita durante una semana de tiempo. Luego se filtra la mezcla a través de una capa gruesa de torta de celite y se enjuaga con metanol tres veces, los disolventes se eliminan a presión reducida (con calor) para dar un concentrado. Se tritura el concentrado con éter y se filtra de nuevo para dar la amina C-terminal deseada. Cuando la amina C-terminal sustituida es 1-amino-3,5-cis-dimetoxiciclohexano es preferible seguir el procedimiento general anterior y realizar variaciones no críticas, pero partiendo de 3,5-dimetoxianilina. Cuando la amina C-terminal sustituida es un grupo aminometilo, en el que el sustituyente en el grupo metilo es un grupo arilo, por ejemplo NH₂-CH₂-R_{C-arilo}, y NH₂-CH₂-R_{C-arilo} no está disponible comercialmente, se prepara preferiblemente tal como sigue. Un material de partida adecuado es el compuesto de aralquilo (sustituido de manera apropiada). La primera etapa es la bromación del sustituyente de alquilo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, véase, por ejemplo R.C. Larock en *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, 1989, pág. 313. A continuación, se hace reaccionar el haluro de alquilo con azida para producir la aril-(alquil)-azida. Por último, se reduce la azida a la correspondiente amina mediante hidrógeno/catalizador para dar la amina C-terminal de fórmula NH₂-CH₂-R_{C-arilo}.

El diagrama B, según se define en él, expone un procedimiento para la producción de la amida (VII). La preparación de la amida (VIII) comienza con la reacción de un amino-indanol (XIV) apropiado con una halocetona (XII) apropiada para proporcionar el hidroxindano (XV). Los expertos en la técnica conocen bien el amino-indanol (XIV) y la halocetona (XII), o pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos conocidos mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. El sustituyente X de la halocetona es normalmente F, Cl, Br, o I. X es preferiblemente Cl. Para la amino-halocetona (XII), R₂ es:

(I) -H,

(II) alquilo C₁-C₆, o

5 (III) -(CH₂)₀₋₄-R₂₋₁ en el que R₂₋₁ es cicloalquilo(C₃-C₆), R_{1-arilo} en el que R_{1-arilo} es según se definió anteriormente.

Determinados compuestos de hidroxietileno de la presente invención contienen funcionalidad ácida que puede formar sales de adición de base. Además, determinados compuestos de hidroxietileno de la presente invención contienen funcionalidad básica que puede formar sales de adición de ácido. Por ejemplo, determinados compuestos de hidroxietileno de la presente invención son aminas y como tal forman sales cuando reaccionan con ácidos. Se prefieren sales farmacéuticamente aceptables más que los correspondientes compuestos de hidroxietileno de la presente invención ya que producen compuestos que son más solubles en agua, estables y/o más cristalinos. Sales farmacéuticamente aceptables son cualquier sal que conserva la actividad del compuesto original y no confiere ningún efecto perjudicial o no deseado al sujeto al que se administra y en el contexto en que se administra. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales tanto de ácidos inorgánicos como de ácidos orgánicos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, cítrico, metanosulfónico, CH₃-(CH₂)_{n1}-COOH en el que n₁ es 0 a 4, HOOC-(CH₂)_{n1}-COOH en el que n es según se definió anteriormente, HOOC-CH=CH-COOH, y φ -COOH. Adicionalmente, sales farmacéuticamente aceptables preferidas incluyen sales de las siguientes bases: trietanolamina, N-metilglucamina, dietanolamina, etanolamina, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), amoníaco, y carbonato, bicarbonato, fosfonato, o sales de hidróxido de un metal alcalino o alcalinotérreo. Para otras sales aceptables, véase *Int. J. Pharm.*, 33, 201-217 (1986).

Compuestos preferidos de la presente invención son:

25 N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-(piperidin-1-carbonil)-hexil]-N,N-dipropil-isoftalamida;

N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-(2-morfolin-4-il-etilcarbamoil)-pentil]-5-metil-N,N-dipropil-isoftalamida;

30 N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-[(tetrahidro-furan-2-ilmetil)-carbamoil]-pentil]-5-metil-N,N-dipropil-isoftalamida;

N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-metil-5-morfolin-4-il-5-oxo-pentil]-5-metil-N,N-dipropil-isoftalamida;

35 N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-4-(R)-[(furan-2-ilmetil)-carbamoil]-2-(S)-hidroxi-pentil]-5-metil-N,N-dipropil-isoftalamida.

N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-isobutilcarbamoilpentil]-5-metil-N,N-dipropil-isoftalamida;

40 ácido 3-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]-propionico;

45 ácido 8-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]-octanoico;

éster metílico del ácido 8-[6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]-octanoico;

50 N-[4-(R)-Butilcarbamoil-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-hexil]-N,N-dipropil-isoftalamida;

N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-isobutilcarbamoil-hexil]-N,N-dipropil-isoftalamida;

N-[4-(R)-bencilcarbamoil-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxihexil]-N,N-dipropil-isoftalamida;

55 N-[4-(R)-(ciclohexilmetil-carbamoil)-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-hexil]-N,N-dipropil-isoftalamida;

N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-(piperidin-1-carbonil)-hexil]-N,N-dipropil-isoftalamida; o

60 N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-4-(R)-(2-dimetilamino-etilcarbamoil)-2-(S)-hidroxi-hexil]-N,N-dipropil-isoftalamida.

Los compuestos de hidroxietileno de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles para tratar seres humanos que padecen la enfermedad de Alzheimer.

65 Cuando se trata esta enfermedad, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse o bien individualmente o bien en combinación según sea mejor para el paciente.

Con respecto a estas enfermedades, el término “tratar” significa que los compuestos de la presente invención pueden usarse en seres humanos con la enfermedad existente. Los compuestos de la presente invención retrasarán o ralentizarán la progresión de la enfermedad facilitando así al individuo una longevidad más útil.

5 El término “prevenir” significa que si los compuestos de la presente invención se administran a aquellos que no tienen ahora la enfermedad pero que normalmente enfermarían o correrían un mayor riesgo de tener la enfermedad, no enfermarán. Además, “prevenir” también incluye retrasar el desarrollo de la enfermedad en un individuo que en última instancia enfermaría o correría el riesgo de tener la enfermedad. Retrasando la aparición de la enfermedad, los compuestos de la presente invención han evitado que el individuo enferme durante el periodo en el que el individuo
10 habría enfermado normalmente o reducido la tasa de desarrollo de la enfermedad o algunos de sus efectos si no hubiera sido por la administración de los compuestos de la presente invención hasta el momento en que el individuo enferma en última instancia. La prevención también incluye la administración de los compuestos de la invención a aquellos individuos que se cree que están predispuestos a la enfermedad debido a una historia familiar y/o debido a la presencia de uno o más marcadores biológicos para la enfermedad tal como una mutación genética conocida de APP o mediante
15 análisis de los productos de escisión de APP en tejidos o líquidos corporales.

Al tratar o prevenir la enfermedad, se administran los compuestos de la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto particular usado y de la vía de administración tal como conocen los expertos en la técnica.

20 Al tratar un paciente con la enfermedad de Alzheimer, un médico puede administrar compuestos de la presente invención inmediatamente y continuar indefinidamente.

Al tratar pacientes que actualmente no tienen la enfermedad de Alzheimer, pero que se cree que corren un riesgo sustancial de tener la enfermedad de Alzheimer, el médico debe iniciar el tratamiento cuando el paciente experimenta los síntomas tempranos previos al Alzheimer, tales como, problemas de memoria o cognitivos asociados con el envejecimiento. Además, hay algunos pacientes que pueden diagnosticarse con Alzheimer mediante la detección del marcador genético APOE4 u otros indicadores biológicos que pueden pronosticar la enfermedad de Alzheimer. En estas situaciones, aun cuando el paciente no tenga síntomas de la enfermedad, la administración de los compuestos
30 de la presente invención puede iniciarse antes de que aparezcan y continuarse indefinidamente el tratamiento para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía oral, vía parenteral (i.v., i.m., depósito i.m., s.c. y depósito s.c.), vía sublingual, vía intranasal (inhalación), vía intratecal, vía tópica y vía rectal. Aquí, la invención
35 son los compuestos novedosos de la presente invención. Las formas farmacéuticas conocidas por los expertos en la técnica son adecuadas para la administración de los compuestos novedosos de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía enteral o por vía parenteral. Cuando se administran por vía oral, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en formas farmacéuticas habituales para la administración oral, como conocen bien los expertos en la técnica. Estas formas farmacéuticas incluyen las formas farmacéuticas unitarias sólidas habituales de comprimidos y cápsulas así como las formas farmacéuticas líquidas tales como disoluciones, suspensiones y elixires. Cuando se usan las formas farmacéuticas sólidas, se prefiere que sean del tipo de liberación sostenida, de modo que los compuestos de la presente invención sólo necesitan administrarse una o dos veces al día.

45 Las formas farmacéuticas orales se administran al paciente 1, 2, 3, ó 4 veces al día. Se prefiere que los compuestos de la presente invención se administren o bien tres o bien menos veces, más preferiblemente una o dos veces al día. Así, se prefiere que los compuestos de la presente invención se administren en forma farmacéutica oral. Se prefiere que se use la forma farmacéutica que se use, esté diseñada de modo que proteja los compuestos de la presente invención del entorno ácido del estómago. Los comprimidos con recubrimiento entérico se conocen bien por los expertos en la técnica. Además, también se conocen bien por los expertos en la técnica cápsulas rellenas con pequeñas esferas recubiertas para protegerlas del ácido del estómago. Cuando se administran por vía oral, la cantidad terapéuticamente eficaz es desde aproximadamente 0,1 mg/día hasta aproximadamente 1.000 mg/día. Se prefiere que la dosificación oral sea desde aproximadamente 1 mg/día hasta aproximadamente 100 mg/día. Se prefiere más que la dosificación
50 oral sea desde aproximadamente 5 mg/día hasta aproximadamente 50 mg/día. Se entiende que aunque un paciente puede iniciar el tratamiento con una dosis, esa dosis puede tener que variarse con el tiempo a medida que cambia el estado del paciente.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse ventajosamente en una formulación de dispersión de nanocristales. La preparación de tales formulaciones se describe en el documento US 5.145.684. Y se describen dispersiones nanocrystalinas de, por ejemplo, inhibidores de proteasas de VIH y su método de uso en el documento US 6.045.829. Las formulaciones nanocrystalinas normalmente producen una biodisponibilidad superior de los compuestos farmacológicos.

65 Además, los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía parenteral. Cuando se administran por vía parenteral pueden administrarse i.v., i.m., depósito i.m., s.c. o depósito s.c. Cuando se administran por vía parenteral, los compuestos de hidroxietileno de fórmula (XII) deben suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/día, preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproxima-

5 damente 50 mg al día. Cuando se utiliza una formulación de depósito para inyección una vez al mes o una vez cada dos semanas, la dosis debe ser de aproximadamente 0,5 mg/día a aproximadamente 50 mg/día o en una cantidad mensual, la dosis para un mes debe ser de desde aproximadamente 15 mg hasta aproximadamente 1.500 mg. Debido a la mala memoria de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, se prefiere que la forma farmacéutica parenteral sea una inyección de depósito i.m.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía sublingual. Cuando se administran por vía sublingual, los compuestos deben administrarse de una a cuatro veces al día en la misma cantidad que para la administración i.m.

10 Los compuestos pueden administrarse por vía intranasal. Cuando se administran mediante esta vía de administración, las formas farmacéuticas apropiadas son un aerosol nasal o un polvo seco, tal como conocen los expertos en la técnica. La dosificación de los compuestos para la administración intranasal es la misma que para la administración i.m.

15 Los compuestos pueden administrarse por vía intratecal. Cuando se administran mediante esta vía de administración, la forma farmacéutica apropiada puede ser una forma farmacéutica parenteral tal como conocen los expertos en la técnica. La dosificación de los compuestos para la administración intratecal es la misma que para la administración i.m.

20 Los compuestos pueden administrarse por vía tópica. Cuando se administran mediante esta vía de administración, la forma farmacéutica apropiada es una crema, pomada o parche. Se prefiere el parche debido a la cantidad de los compuestos que es necesario administrar. Además, pueden necesitarse dos o más parches. Cuando se administran por vía tópica, la dosificación es desde aproximadamente 0,5 mg/día hasta aproximadamente 200 mg/día. Sin embargo, la cantidad que puede administrarse mediante un parche es limitada. Por tanto, pueden requerirse dos o más parches. El número y tamaño del parche no es importante, lo que es importante es que se administre una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención, tal como conocen los expertos en la técnica.

30 Los compuestos pueden administrarse por vía rectal mediante supositorio tal como conocen los expertos en la técnica. Cuando se administran mediante supositorio, la cantidad terapéuticamente eficaz es de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 500 mg.

35 Los compuestos pueden administrarse mediante implantes tal como conocen los expertos en la técnica. Cuando se administra un compuesto de la presente invención mediante implante, la cantidad terapéuticamente eficaz es la misma que para la administración con depósito.

Dado un compuesto particular y una forma farmacéutica deseada, un experto en la técnica sabía cómo preparar la forma farmacéutica apropiada para los compuestos de la presente invención.

40 Los compuestos de la presente invención se usan de la misma manera, mediante las mismas vías de administración, usando las mismas formas farmacéuticas de dosificación y en el mismo programa de dosificación para tratar pacientes con DCL (deterioro cognitivo leve) y prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer en aquellos que avanzarían desde DCL hasta EA, para tratar el síndrome de Down, para tratar seres humanos que padecen hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, para tratar la angiopatía amiloide cerebral y prevenir sus posibles consecuencias, es decir, hemorragias lobulares única y recurrente, para tratar otras demencias degenerativas, incluyendo demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson, demencia asociada con parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada con degeneración cortico-basal, tipo con cuerpos de Lewy difusos de la enfermedad de Alzheimer. Los compuestos de la presente invención pueden usarse unos con otros, o con otros agentes usados, para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer. Tales agentes incluyen inhibidores de la gamma-secretasa, vacunas anti-amiloide y agentes farmacéuticos tales como donepezilo clorhidrato (comprimidos ARICEPT®), tacrina clorhidrato (cápsulas COGNEX®) u otros inhibidores de la acetilcolina esterasa y con agentes neurotrópicos directos o indirectos futuros.

Inhibición de la escisión de APP

55 Los compuestos de la invención inhiben la escisión de APP en el sitio de escisión por β -secretasa, Met595-Asp596 para la isoforma APP695. Aunque no se desea restringirse a una teoría particular, se cree que la inhibición de la actividad β -secretasa inhibe la producción de beta-péptido beta-amiloide ($A\beta$). La actividad inhibidora se demuestra en uno de una variedad de ensayos de inhibición, mediante el cual se analiza la escisión de un sustrato de APP en presencia de una enzima β -secretasa, en presencia del compuesto inhibidor, en condiciones suficientes normalmente para dar como resultado la escisión en el sitio de escisión por β -secretasa. La reducción de escisión de APP en el sitio de escisión por β -secretasa comparado con un control no tratado o inactivo está correlacionado con la actividad inhibidora. Se conocen sistemas de ensayo que pueden usarse para demostrar la eficacia de los compuestos inhibidores de la invención. Se describen sistemas de ensayo representativos, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. número 65 5.942.400.

La actividad enzimática de la β -secretasa y la producción de $A\beta$ pueden analizarse *in vitro* o *in vivo*, usando sustratos de APP naturales, mutados y/o sintéticos, enzima natural, mutada y/o sintética, y compuesto de prueba.

Los análisis pueden implicar células primarias o secundarias que expresan APP y la enzima nativos, mutantes y/o sintéticos, o pueden usarse modelos de animales transgénicos que expresan el sustrato y la enzima. La detección de la actividad enzimática puede ser mediante el análisis de uno o más de los productos de escisión, por ejemplo, mediante inmunoensayo, ensayo fluorométrico o cromogénico, HPLC, u otros medios de detección. Los compuestos

5 inhibidores se determinan como aquellos que tienen la capacidad para disminuir la cantidad de producto de escisión por β -secretasa producido en comparación con un control, en el que se observa y mide la escisión mediada por β -secretasa en el sistema de reacción en ausencia de los compuestos inhibidores.

β -secretasa

Se conocen diversas formas de la enzima β -secretasa, y están disponibles y son útiles para el ensayo de la actividad enzimática y la inhibición de la actividad enzimática. Estas incluyen formas nativas, recombinantes y sintéticas de la enzima. Se han caracterizado ASP2a y Asp2B, por ejemplo, en las solicitudes de patente PCT publicadas WO98/22597 y WO00/17369, así como formas sintéticas de la enzima.

Los compuestos de la invención inhiben el 50% de la actividad enzimática β -secretasa a una concentración de desde aproximadamente 0,1 nM hasta aproximadamente 200 μ M, preferiblemente a una concentración de desde aproximadamente 10 nM hasta aproximadamente 100 μ M, más preferiblemente desde aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 50 μ M, y lo más preferiblemente desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 10 μ M.

Sustrato de APP

Los ensayos que demuestran que la inhibición de la escisión mediada por β -secretasa de APP pueden utilizar cualquiera de las formas conocidas de APP, incluyendo el isotipo "normal" de 695 aminoácidos descrito por Kang y cols., 1987, Nature 325:733-6, el isotipo de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi y cols., 1981, Nature 331:530-532, y variantes tales como la mutación sueca (KM670-1NL) (APP-SW), la mutación londinense (V7176F), y otras. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. número 5.766.846 y también Hardy, 1992, Nature Genet. 1:233-234, para una revisión de las mutaciones de variantes conocidas. Los sustratos útiles adicionales incluyen la modificación de aminoácido dibásico, APP-KK descrita, por ejemplo, en el documento WO 00/17369, fragmentos de APP, y péptidos

30 sintéticos que contienen el sitio de escisión por β -secretasa, forma natural (WT, "wild type") o mutada, por ejemplo, SW, según se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. número 5.942.400.

El sustrato de APP también puede ser un péptido de fusión, formado de un péptido que tiene el sitio de escisión por β -secretasa fusionado a un péptido que confiere una característica útil para el ensayo enzimático, por ejemplo, propiedades de aislamiento y/o detección.

Un ensayo útil utiliza un péptido de fusión que tiene proteína de unión a maltosa (MBP) fusionada a los 125 aminoácidos del extremo C-terminal de APP-SW. La parte de MBP se captura sobre un sustrato de ensayo mediante un anticuerpo de captura anti-MBP. La incubación de la proteína de fusión capturada en presencia de la β -secretasa da como resultado la escisión del sustrato en el sitio de escisión por β -secretasa. El análisis de la actividad de escisión puede ser, por ejemplo, mediante inmunoensayo de los productos de escisión. Un inmunoensayo detecta un epítipo único expuesto en el extremo carboxilo-terminal de la proteína de fusión escindida, por ejemplo, usando el anticuerpo SW192. Este ensayo se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. número 5.942.400.

Ensayo celular

Pueden incubarse células que expresan un sustrato de APP y una β -secretasa activa en presencia de un compuesto inhibidor, para demostrar la inhibición de la actividad enzimática en comparación con un control. La actividad de la β -secretasa puede medirse mediante análisis de uno o más productos de escisión de APP. Por ejemplo, se esperaría que

50 la inhibición celular de la actividad β -secretasa disminuyera la liberación del producto de escisión, $A\beta$.

Las líneas celulares humanas que normalmente procesan $A\beta$ a partir de APP proporcionan un medio útil para someter a ensayo las actividades inhibitoras de los compuestos de la invención. Puede medirse la producción y liberación de $A\beta$ y/u otros productos de escisión en el medio de cultivo, por ejemplo, mediante inmunoensayo, tal como inmunotransferencia de tipo Western o inmunoensayo ligado a enzimas (EIA o ELISA).

Los cultivos celulares de neuronas primarias de cerebro humano o de tejido cerebral obtenido de animales transgénicos que expresan APP, particularmente APP humana, y que puede procesar APP en $A\beta$ detectable, son también células útiles para el ensayo de la actividad de escisión por β -secretasa. Por ejemplo, los cultivos celulares de neuronas humanas primarias derivados de tejidos embrionarios humanos expresan β -secretasa endógena y APP endógena. Se somete a ensayo la actividad enzimática en presencia del compuesto inhibidor, y se miden los productos de escisión, tales como $A\beta$. Otro sistema de cultivo celular primario útil emplea células derivadas de tejido cerebral de ratones transgénicos, por ejemplo, de ratones PD-APP que expresan una APP transgénica que tiene una mutación en V717 o la mutación sueca.

Aunque tanto las células neuronales como no neuronales procesan y liberan $A\beta$, los niveles de actividad de la β -endógena son bajos y a menudo es difícil de detectar mediante EIA. Por tanto, se prefiere el uso de los tipos de células que se sabe que tienen una actividad β -secretasa mejorada, un procesamiento mejorado de APP en $A\beta$, y/o una

producción mejorada de A β . Por ejemplo, la transfección de células con la forma mutante sueca de APP (APP-SW); con APP-KK; o con APP-SW-KK proporciona células que tienen una actividad β -secretasa mejorada y que producen cantidades de A β que pueden medirse fácilmente.

5 Anticuerpos

Pueden medirse las características de los productos de la escisión de APP mediante inmunoensayo usando diversos anticuerpos, según se describe, por ejemplo, en Pirttila *et. al.*, 1999, *Neuro. Lett.* 249:21-4, y en la patente de los EE.UU. número 5.612.486. Anticuerpos útiles para detectar A β incluyen, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 6E10 (Senetek, St. Louis, MO) que reconoce específicamente un epítipo en los aminoácidos 1-16 del péptido A β ; anticuerpos 162 y 164 (Instituto de Investigación Básica del Estado de Nueva York, Staten Island, NY) que son específicos para hA β 1-40 y 1-42, respectivamente. Otro anticuerpo útil es SW192, según se trató anteriormente, que reconoce un epítipo no cubierto en el fragmento de escisión C-terminal tras la escisión de APP-SW mediada por la β -secretasa.

15 Modelos de animales

Los modelos de animales útiles en las pruebas de los compuestos de la invención incluyen aquellos que expresan niveles elevados de A β , lo que demuestra un aumento de la cantidad de depósitos de A β , y/o un aumento del número o tamaño de placas de beta-amiloide en comparación con los animales control. Tales modelos de animales incluyen mamíferos transgénicos. Los animales transgénicos adecuados incluyen roedores transformados con una variante o APP modificado que da como resultado una cantidad medida de A β en el animal que es superior que la producida en un control no transformado. Ejemplos de modelos de animales transgénicos adecuados incluyen un ratón transformado con APP-SW, descrito, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. números 5.877.399, 5.612.486, y 5.850.003. Otros animales adecuados se transforman con V717 APP, según se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. número 5.877.015, y en Ganes *et. al.*, 1995, *Nature* 373:523.

La escisión de APP en el sitio de escisión por β -secretasa puede analizarse en estos animales mediante la medición de los fragmentos de escisión en los tejidos cerebrales del animal, y posiblemente los líquidos cerebrales, así como mediante el análisis de las placas de beta-amiloide y la evaluación de la necrosis en los tejidos cerebrales del animal.

Al poner en contacto un sustrato de APP con una enzima β -secretasa en presencia de un compuesto inhibidor de la invención y en condiciones suficientes para permitir la escisión mediada enzimáticamente de APP y/o la liberación de A β desde el sustrato, los de la invención son eficaces para reducir la escisión mediada por β -secretasa de APP en el sitio de escisión por β -secretasa y/o eficaces para reducir las cantidades liberadas de A β . Cuando tal puesta en contacto es la administración de los compuestos inhibidores de la invención a un modelo de animal, por ejemplo, según se describió anteriormente, los compuestos son eficaces para reducir la deposición de A β en los tejidos cerebrales del animal, y para reducir el número y/o tamaño de placas de beta-amiloide. Cuando tal administración es a un sujeto humano, los compuestos son eficaces para inhibir o ralentizar la progresión de la enfermedad caracterizada por un aumento de las cantidades de A β , para ralentizar la progresión de EA en el, y/o para prevenir la aparición o el desarrollo de EA en un paciente en riesgo de tener la enfermedad.

Sistemas de ensayo

Se conocen bien en la técnica los ensayos para determinar la escisión de APP en el sitio de escisión por β -secretasa. Se describen ensayos a modo de ejemplo, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. números 5.744.346 y 5.942.400, y se describen en los ejemplos más adelante.

Ensayos libres de células

Se describen ensayos a modo de ejemplo que pueden usarse para demostrar la actividad inhibidora de los compuestos de la invención, por ejemplo, en el documento WO00/17369 y la patente de los EE.UU. número 5.942.400. Tales ensayos pueden realizarse en incubaciones libres de células o en incubaciones celulares usando células que expresan una β -secretasa y un sustrato de APP que tiene un sitio de escisión por β -secretasa.

Se incuban un sustrato de APP que contiene el sitio de escisión por β -secretasa de APP, por ejemplo, una APP completa o una variante, un fragmento de APP, o un sustrato de APP recombinante o sintético que contiene la secuencia de aminoácidos: KM-DA o NL-DA, en presencia de una enzima β -secretasa, por ejemplo Asp2a humana (h), hAsp2b, un fragmento de las mismas, o una variante de polipéptido sintética o recombinante de hAsp2a o hAsp2b que tiene actividad β -secretasa y es eficaz para escindir el sitio de escisión por β -secretasa de APP, en condiciones de incubación adecuadas para la actividad de escisión de la enzima. Los sustratos adecuados incluyen opcionalmente derivados que pueden ser proteínas o péptidos de fusión que contienen el péptido sustrato y una modificación útil para facilitar la purificación o detección del péptido o sus productos de escisión por β -secretasa. Las modificaciones útiles incluyen la inserción de un epítipo antigénico conocido por la unión de anticuerpos; el enlace de un marcador o un resto detectable, el enlace de un sustrato de unión y similares.

Las condiciones de incubación adecuadas para un ensayo sin células *in vitro* incluyen, por ejemplo: sustrato aproximadamente 200 nM-10 μ M, enzima aproximadamente 10-200 pM, y compuesto inhibidor aproximadamente

0,1 nM-10 μ M, en disolución acuosa, a un pH aproximado de 4-7, a aproximadamente 37°C, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos a 3 horas. Estas condiciones de incubación son solamente a modo de ejemplo, y pueden variarse según se requiera para los componentes del ensayo particular y/o el sistema de medición deseado. La optimización de las condiciones de incubación para los componentes del ensayo particular debe tener en cuenta la b-enzima usada y su pH óptimo, cualquier enzima y/o marcador adicional que podría usarse en el ensayo, y similares. Tal optimización es rutinaria y no requerirá una experimentación excesiva.

Ensayos celulares

Numerosos ensayos basados en células para analizar la actividad β -secretasa y/o el procesamiento de APP para liberar A β . En una realización, se usan células que expresan de manera natural β -secretasa. Alternativamente, se modifican células para expresar una β -secretasa recombinante, por ejemplo, hAsp2a, hAsp2b, o una enzima de variante recombinante o sintética, según se trató anteriormente.

El sustrato de APP puede añadirse al medio de cultivo o expresarse en las células. Pueden usarse células que expresan de manera natural APP, formas de variante o mutantes de APP, o células transformadas para expresar una isoforma de APP, APP mutante o variante, APP recombinante o sintético, fragmento de APP, proteína de fusión o péptido de APP sintético que contiene el sitio de escisión de APP por β -secretasa, siempre que se permita que la APP expresada pueda entrar en contacto con la enzima y pueda analizarse la actividad de escisión enzimática.

El contacto de un sustrato de APP con una enzima β -secretasa dentro de la célula y en presencia o ausencia de un compuesto inhibidor de la invención puede usarse para demostrar la actividad inhibidora. La función o actividad β -secretasa, por ejemplo, según se mide mediante la escisión del sustrato de APP y la detección de fragmentos y/o marcadores, puede tomar numerosas formas, según se trató anteriormente para ensayos no celulares. Preferiblemente, el ensayo en presencia de un compuesto inhibidor útil proporciona al menos aproximadamente el 30%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 50% de inhibición de la actividad enzimática, comparado con un control no inhibido.

En tales ensayos, por ejemplo, se incuban las células que expresan APP y β -secretasa en un medio de cultivo, en condiciones que permiten el procesamiento de la APP por la enzima y la liberación de A β en el medio y la acumulación de otros fragmentos de APP en lisados celulares. La actividad inhibidora de los compuestos de la invención puede demostrarse incubando las células en presencia y ausencia del compuesto. Con la exposición de las células al compuesto inhibidor, la cantidad de A β liberado en el medio y/o la cantidad de fragmentos CTF99 de APP en los lisados celulares se reduce en comparación con el control. Los productos de escisión de APP pueden analizarse, por ejemplo, mediante reacciones inmunitarias con anticuerpos específicos, según se trató anteriormente.

Las células preferidas para el análisis de la actividad β -secretasa incluyen células neuronales humanas primarias, células neuronales animales transgénicas primarias, en las que el transgén es APP, y otras células tales como las de una línea celular 293 que expresa APP, por ejemplo, APP-SW. En el ensayo celular, se incuban células en presencia o ausencia del inhibidor, en condiciones adecuadas para determinar la actividad enzimática β -secretasa en su sitio de escisión en el sustrato de APP. Se recoge el sobrenadante celular, y se analiza para determinar los fragmentos de escisión, por ejemplo, mediante inmunoensayo.

Ensayos in vivo: modelos de animales

Pueden usarse diversos modelos de animales para analizar la actividad β -secretasa y/o el procesamiento de APP para liberar A β , según se describió anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse animales transgénicos que expresan sustrato de APP y enzima β -secretasa para demostrar la actividad inhibidora de los compuestos de la invención. Se prefieren animales que muestran características asociadas con la patofisiología de EA. Se han descrito ciertos modelos de animales transgénicos para EA, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. números: 5.877.399, 5.612.486, 5.387.742, 5.720.936, y 5.811.633.

La administración de los compuestos inhibidores de la invención a los ratones transgénicos descritos en el presente documento proporciona un método alternativo para demostrar la actividad inhibidora de los compuestos inhibidores. Se prefiere la administración del compuesto inhibidor en un vehículo farmacéuticamente aceptable y a través de una vía de administración que alcance el tejido diana y en una cantidad terapéutica apropiada. La inhibición de la escisión mediada por β -secretasa de APP y de la liberación de A β puede medirse mediante análisis de los productos de escisión en los líquidos o tejidos corporales del animal. También se realiza el análisis de los tejidos cerebrales para determinar las placas o depósitos de A β .

Será evidente para un experto en la técnica que la dosificación y la frecuencia exactas de administración dependerán de los compuestos de hidroxietileno particulares de fórmula (XII) administrados, el estado particular que se esté tratando, la gravedad de la afección que se esté tratando, la edad, peso, estado físico general del paciente particular, y otra medicación que el individuo pueda estar tomando tal como conocen bien los médicos que los administran, que son expertos en esta técnica.

Definiciones y convenciones

Las definiciones y explicaciones a continuación son para los términos tal como se usan en todo este documento completo incluyendo tanto la memoria descriptiva como las reivindicaciones.

I. Convenciones para fórmulas y definiciones de variables

Las fórmulas químicas que representan los diversos compuestos o fragmentos moleculares en la memoria descriptiva y las reivindicaciones pueden contener sustituyentes variables además de características estructurales definidas expresamente. Estos sustituyentes variables se identifican por una letra o una letra seguida por un subíndice numérico, por ejemplo, "Z₁" o "R_i" en el que "i" es un número entero. Estos sustituyentes variables son o bien monovalentes o bien bivalentes, es decir, representan un grupo unido a la fórmula mediante uno o dos enlaces químicos. Por ejemplo, un grupo Z₁ representaría un radical bivalente si está unido a la fórmula mediante uno o dos enlaces químicos. Los grupos R_i y R_j representarían sustituyentes variables monovalentes si están unidos a la fórmula CH₃-CH₂-C(R_i)(R_j)H₂. Cuando las fórmulas químicas se dibujan de manera lineal, tal como las anteriores, los sustituyentes variables contenidos entre paréntesis están unidos al átomo inmediatamente a la izquierda del sustituyente variable encerrado entre paréntesis. Cuando dos o más sustituyentes variables consecutivos están encerrados entre paréntesis, cada uno de los sustituyentes variables consecutivos está unido al átomo inmediatamente precedente a la izquierda que no está encerrado entre paréntesis. Por tanto, en la fórmula anterior, tanto R_i como R_j están unidos al átomo de carbono precedente. Además, para cualquier molécula con un sistema establecido de numeración de los átomos de carbono, tal como los esteroides, estos átomos de carbono se designan como C_i, en el que "i" es el número entero correspondiente al número de átomos de carbono. Por ejemplo, C₆ representa la posición 6 o el número de átomos de carbono en el núcleo del esteroide tal como se designaba tradicionalmente por los expertos en la técnica de la química de los esteroides. Asimismo, el término "R₆" representa un sustituyente variable (o bien monovalente o bien bivalente) en la posición C₆.

Las fórmulas químicas o partes de las mismas dibujadas de manera lineal representan los átomos en una cadena lineal. El símbolo "-" representa, en general, un enlace entre dos átomos en la cadena. Por tanto, CH₃-O-CH₂-CH(R_i)-CH₃ representa un compuesto de 2-sustituido-1-metoxipropano. De manera similar, el símbolo "=" representa un doble enlace, por ejemplo, CH₂=C(R_i)-OCH₃, y el símbolo "≡" representa un triple enlace, por ejemplo, HC≡C-CH(R_i)-CH₂-CH₃. Los grupos carbonilo se representan en cualquiera de dos maneras: -CO- o -C(=O)-, prefiriéndose la primera por simplicidad.

Una estructura cíclica (de anillo) rígida para cualquier compuesto en el presente documento define una orientación con respecto al plano del anillo para los sustituyentes unidos a cada átomo de carbono del compuesto cíclico rígido. Para compuestos saturados que tienen dos sustituyentes unidos a un átomo de carbono que es parte de un sistema cíclico, -C(X₁)(X₂)- los dos sustituyentes pueden estar en una posición o bien axial o bien ecuatorial con respecto al anillo y pueden cambiar entre axial / ecuatorial. Sin embargo, la posición de los dos sustituyentes con respecto al anillo y entre sí permanece fija. Mientras cualquier sustituyente a veces puede encontrarse en el plano del anillo (ecuatorial) en lugar de por encima o por debajo del plano (axial), un sustituyente está siempre por encima del otro. En fórmulas estructurales químicas que representan tales compuestos, se identificará un sustituyente (X₁) que está "por debajo" de otro sustituyente (X₂) como que está en la configuración alfa (α) y se identifica mediante una unión con una línea quebrada, discontinua o de puntos al átomo de carbono, es decir, mediante el símbolo "---" o "...". El sustituyente correspondiente unido "por encima" (X₂) del otro (X₁) se identifica como que está en la configuración (β) y la unión al átomo de carbono se indica mediante una línea continua.

Cuando un sustituyente variable es bivalente, las valencias pueden tomarse juntas o por separado o ambas en la definición de la variable. Por ejemplo, una variable R_i unida a un átomo de carbono como -C(=R_i)- podría ser bivalente y definirse como oxo o ceto (formando así un grupo carbonilo (-CO-)) o como dos sustituyentes variables monovalentes unidos por separado α-R_{i-j} y β-R_{i-k}. Cuando se define que una variable bivalente, R_i, consiste en dos sustituyentes variables monovalentes, la convención usada para definir la variable bivalente es de la forma "α-R_{i-j};β-R_{i-k}" o alguna variante de la misma. En tal caso, tanto α-R_{i-j} como β-R_{i-k} se unen al átomo de carbono para dar -C(α-R_{i-j})(β-R_{i-k})-. Por ejemplo, cuando la variable bivalente R₆, -C(=R₆)- se define que consiste en dos sustituyentes variables monovalentes, los dos sustituyentes variables monovalentes son (α-R₆₋₁;β-R₆₋₂, ..., α-R₆₋₉;β-R₆₋₁₀, etc., dando -C(α-R₆₋₁)(β-R₆₋₂)-, ..., -C(α-R₆₋₉)(β-R₆₋₁₀)-, etc. Similarmente, para la variable bivalente R₁₁, -C(=R₁₁)-, dos sustituyentes variables monovalentes son α-R₁₁₋₁;β-R₁₁₋₂. Para un sustituyente de anillo para el que no existen orientaciones α y β separadas (por ejemplo, debido a la presencia de un doble enlace carbono-carbono en el anillo), y para un sustituyente unido a un átomo de carbono que no es parte de un anillo, se sigue usando la convención anterior, pero se omiten las designaciones α y β.

Ya que una variable bivalente puede definirse como dos sustituyentes variables monovalentes separados, los dos sustituyentes variables monovalentes separados pueden definirse para tomarse juntos para formar una variable bivalente. Por ejemplo, en la fórmula -C₁(R_i)H-C₂(R_j)H- (C₁ y C₂ definen arbitrariamente un primer y un segundo átomo de carbono, respectivamente) R_i y R_j pueden definirse para tomarse juntos para formar (1) un segundo enlace entre C₁ y C₂ o (2) un grupo bivalente tal como oxa (-O-) y la fórmula describe así un epóxido. Cuando R_i y R_j se toman juntos para formar una entidad más compleja, tal como el grupo -X-Y-, entonces la orientación de la entidad es tal que C₁ en la fórmula anterior está unido a X y C₂ está unido a Y. por tanto, por convención, la designación "... R_i y R_j se toman juntos para formar -CH₂-CH₂-O-CO-..." significa una lactona en la que el carbonilo está unido a C₂. Sin embargo,

cuando los R_j y R_i designados se toman juntos para formar $-\text{CO}-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$, la convención significa una lactona en la que el carbonilo está unido a C_1 .

El contenido de átomos de carbono de los sustituyentes variables se indica mediante una de dos maneras. El primer método usa un prefijo para el nombre completo de la variable tal como " C_1-C_4 ", en el que tanto "1" como "4" son números enteros que representan el número mínimo y máximo de átomos de carbono en la variable. El prefijo se separa de la variable por un espacio. Por ejemplo, "alquilo C_1-C_4 " representa un alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, (incluyendo las formas isoméricas del mismo a menos que se dé una indicación expresa de lo contrario). Siempre que se dé este prefijo individual, el prefijo indica el contenido completo de átomos de carbono de la variable que se está definiendo. Por tanto, alcóxicarbonilo C_2-C_4 describe un grupo $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CO}-$ en el que n es cero, uno o dos. Mediante el segundo método, sólo se indica el contenido de átomos de carbono de cada parte de la definición, por separado, encerrando la designación " C_i-C_j " entre paréntesis y colocándola inmediatamente (sin espacio intermedio) después de la parte de la definición que se está definiendo. Mediante esta convención opcional, alcóxi(C_1-C_3) carbonilo tiene el mismo significado que alcóxicarbonilo C_2-C_4 porque el " C_1-C_3 " se refiere solamente al contenido de átomos de carbono del grupo alcóxilo. De manera similar, mientras que tanto alcóxialquilo C_2-C_6 como alcóxi(C_1-C_3)alquilo(C_1-C_3) definen grupos alcóxialquilo que contienen desde 2 hasta 6 átomos de carbono, las dos definiciones difieren puesto que la primera definición permite que cualquiera de la parte de alcóxilo o alquilo solas contengan 4 ó 5 átomos de carbono mientras que la última definición limita cualquiera de estos grupos a 3 átomos de carbono.

Cuando las reivindicaciones contienen un sustituyente bastante complejo (cíclico), al final de la frase que nombra/designa ese sustituyente particular, habrá una anotación entre (paréntesis) que corresponderá al mismo nombre/designación en uno de los diagramas que expondrán también la fórmula estructural química de ese sustituyente particular.

Ha de entenderse que la enumeración de los intervalos numéricos mediante los puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, de 1 a 5 incluye 1; 1,5; 2; 2,75; 3; 3,80; 4; y 5).

Ha de entenderse que "un" tal como se usa en el presente documento incluye tanto el singular como el plural.

Las definiciones generales usadas en el presente documento tienen los siguientes significados dentro del alcance de la presente invención.

II. Definiciones

Todas las temperaturas son en grados Celsius.

CCF se refiere a cromatografía en capa fina.

psi se refiere a libras/pulgada².

HPLC se refiere a cromatografía líquida de alta presión.

THF se refiere a tetrahidrofurano.

DMF se refiere a dimetilformamida.

EDC se refiere a etil-1-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida o clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.

NBS se refiere a N-bromosuccinimida.

TEA se refiere a trietilamina.

BOC se refiere a 1,1-dimetiletoxycarbonilo o *t*-butoxycarbonilo, $-\text{CO}-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$.

CBZ se refiere a benciloxycarbonilo, $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\varphi$.

TFA se refiere a ácido trifluoracético, CF_3-COOH .

CDI se refiere a 1,1'-carbonildiimidazol.

Solución salina se refiere a disolución saturada acuosa de cloruro de sodio.

Cromatografía (cromatografía en columna y ultrarrápida) se refiere a purificación/separación de compuestos expresadas como (soporte, eluyente). Se entiende que se reúnen y concentran las fracciones apropiadas para dar los compuesto(s) deseado(s).

ES 2 275 675 T3

RMC se refiere a espectroscopia de resonancia magnética de C-13, los desplazamientos químicos se notifican en ppm (δ) a campo más bajo de TMS.

5 RMN se refiere a espectroscopia de resonancia magnética nuclear (de protón), los desplazamientos químicos se notifican en ppm (δ) a campo más bajo de TMS.

$-\phi$ se refiere a fenilo (C_6H_5).

10 EM se refiere a espectrometría de masas expresado como m/e, m/z o unidad de masa/carga. MH^+ se refiere al ion positivo de un átomo original más uno de hidrógeno. CI se refiere a ionización química. FAB se refiere a bombardeo de átomos rápidos.

EMAR se refiere a espectrometría de masas de alta resolución.

15 Éter se refiere a dietil éter.

“APP”, proteína precursora de amiloide, se define como cualquier polipéptido de APP, incluyendo variantes, mutaciones e isoformas de APP, por ejemplo según se describe en la patente de los EE.UU. número 5.766.846.

20 “ $A\beta$ ”, beta-péptido beta-amiloide, se define como cualquier péptido que resulta de la escisión mediada por beta-secretasa de APP, incluyendo péptidos de 39, 40, 41, 42, y 43 aminoácidos, y extendiéndose desde el sitio de escisión de beta-amilasa hasta los aminoácidos 39, 40, 41, 42, o 43.

25 “ β -secretasa” es una aspartil proteasa que media la escisión de APP en el extremo amino-terminal de $A\beta$. Se describe β -secretasa humana, por ejemplo, en el documento WO00/17369.

30 Un compuesto de la invención es cualquier compuesto descrito en el presente documento que tiene actividad inhibidora frente a una enzima β -secretasa; frente a la producción de $A\beta$; frente a la producción de placas o depósitos de beta-amiloide; o frente al desarrollo o progresión de una enfermedad neurodegenerativa tal como EA, medido, por ejemplo, mediante uno o más de los ensayos descritos en el presente documento.

35 Farmacéuticamente aceptable se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que los fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación por el paciente y biodisponibilidad.

Cuando se utilizan pares de disolventes, las razones de disolventes usados son en volumen/volumen (v/v).

40 Cuando se usa la solubilidad de un sólido en un disolvente, la razón del sólido con respecto al disolvente es en peso/volumen (p/v).

BOP se refiere a hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio.

45 TBDMSCI se refiere a cloruro de *t*-butildimetilsililo.

TBDMSOTf se refiere a éster del ácido *t*-butildimetilsilil-trifluorosulfónico.

Trisomía 21 se refiere a síndrome de Down.

50 Ac = acetil (metilcarbonilo)

ac. = acuoso

55 da = doblete ancho

sa = singlete ancho

c = concentración (g/mL)

60 cc = centímetro cúbico

d = doblete

65 DCM = diclorometano = cloruro de metileno = CH_2Cl_2

ed = exceso diastereomérico

ES 2 275 675 T3

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

eq. = equivalentes

5 EtOAc = acetato de etilo

EtOH = etanol

10 g = gramos

HOBT = 1-hidroxibenzotriazol

h = hora

15 CI_{50} = concentración inhibidora que reduce la actividad enzimática a la mitad.

iso = una cadena de alquilo que tiene el grupo terminal 2-metilpropilo, es decir $-CH(CH_3)_2$.

20 i.m. = por vía intramuscular

i.v. = por vía intravenosa

s.c. = por vía subcutánea

25 L = litro

LDA = diisopropilamida de litio

m = multiplete

30 máx. = máximo

mg = miligramo

35 mL = mililitro

mm = milímetro

mM = milimolar

40 mmol = milimol

pf = punto de fusión

45 MeOH = metanol

meq = miliequivalente

MsOH = ácido metanosulfónico

50 *n* = normal, es decir no ramificado, por ejemplo, *n*-Pr es $-CH_2-CH_2-CH_3$

N = normal

55 ng = nanogramo

nm = nanometros

DO = densidad óptica

60 PEPC = 1-(3-(1-pirrolidinil)propil)-3-etilcarbodiimida

pg = picogramo

65 pM = picoMolar

R_f = razón de movimiento de una sustancia en un cromatograma de capa fina en comparación con el movimiento del frente de disolvente.

ES 2 275 675 T3

δ = unidades de medición en espectroscopia de resonancia magnética nuclear que son relativas a un patrón, por ejemplo, tetrametilsilano.

q = cuartete

quint. = quintete

rpm = rotaciones por minuto

s = singlete

t = triplete

t o *terc* = terciario en una cadena de alquilo, por ejemplo, t-butilo es $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$.

μL = microlitro

μM = micromolar (una expresión de concentración en micromoles/litro)

s = singlete

t = triplete

UV = ultravioleta.

A menos que se indique lo contrario, todos los radicales de grupo funcional (por ejemplo, alquilo, arilo, cicloalquilo, heteroarilo cíclico, heterociclilo, etc.) pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los radicales de grupo funcional sustituidos pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes, a menos que se indique lo contrario. Los sustituyentes adecuados para los radicales de grupo funcional sustituidos incluyen generalmente halógeno, hidroxilo, alcóxido, alquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, arilalcóxido, y similares. Se entenderá que la terminología “radical X sustituido por un/una Y” incluye el radical “X” que está sustituido por dos o más “Y”, a menos que se indique lo contrario.

“Alquilo” se refiere a radicales hidrocarbonados alifáticos saturados, lineales o ramificados, tales como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, octilo, isopropilo, *terc*-butilo, *sec*-pentilo, y similares.

“Cicloalquilo” se refiere a radicales hidrocarbonados alifáticos cíclicos, tales como, por ejemplo, anillos hidrocarbonados de 3 a 8 miembros (por ejemplo, ciclohexilo o ciclopentilo), sistemas cíclicos hidrocarbonados de 4 a 10 miembros bicíclicos, y sistemas cíclicos hidrocarbonados de 8 a 14 miembros tricíclicos. Los grupos cicloalquilo monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclohexano y ciclopentano. Los grupos cicloalquilo multicíclicos incluyen por ejemplo ciclohexilo, ciclopentilo, y 1,2,3,4-tetrahidronaftilo.

“Heterociclo” se refiere a radicales no aromáticos cíclicos que contienen al menos dos átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N, y S como miembros de al menos un anillo. Ejemplos de tales radicales incluyen anillos de 3 a 8 miembros; sistemas cíclicos de 4 a 10 miembros bicíclicos, y sistemas cíclicos de 8 a 14 miembros tricíclicos, en los que al menos un anillo (y en algunos casos cada uno de los anillos) de cualquiera de estos ejemplos contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N, y S como miembros del anillo. Los grupos heterocíclicos monocíclicos incluyen por ejemplo morfolinilo, piperazinilo, y tetrahidrofuranilo. Los grupos heterocíclicos multicíclicos incluyen por ejemplo decahidroquinolina, óxido de ciclohexeno, y 3-amino-3-azabicyclo[3.3.0]octano.

“Alquilenilo” se refiere a radicales hidrocarbonados alifáticos saturados, lineales o ramificados, bivalentes tales como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno, butileno, octileno, isopropileno, *terc*-butileno, *sec*-pentileno, y similares.

“Alquenilo” se refiere a radicales hidrocarbonados alifáticos lineales o ramificados que contienen al menos un doble enlace, tales como, por ejemplo, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-metil-1-propenilo, y similares.

“Alquinilo” se refiere a radicales hidrocarbonados alifáticos lineales o ramificados que contienen al menos un triple enlace, tales como, por ejemplo, etinilo (acetilo), 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, y similares.

“Arilo” se refiere a radicales hidrocarbonados aromáticos cíclicos que tienen un único anillo, tales como fenilo, múltiples anillos, tales como bifenilo, y múltiples anillos condensados, tales como naftilo y antracilo. Los grupos arilo monocíclicos incluyen fenilo, por ejemplo. Los grupos arilo multicíclicos incluyen por ejemplo naftilo y antracilo.

“Amina” incluye aminas primarias, secundarias y terciarias que pueden estar en cadenas lineales o ramificadas o, en el caso de las aminas secundarias y terciarias, dentro de anillos (por ejemplo, morfolina y piperazina).

“Heteroarilo” se refiere a anillos aromáticos cíclicos que tienen de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de S, O, y N; y anillos bicíclicos estables orgánicos, de 7 a 10 miembros, aromáticos que tienen de 1 a 5 heteroátomos seleccionados

ES 2 275 675 T3

de S, O, y N. Ejemplos de tales radicales incluyen anillos de 3 a 8 miembros; sistemas cíclicos de 4 a 10 miembros bicíclicos; y sistemas cíclicos de 8 a 14 miembros tricíclicos, en los que al menos un anillo (y en algunos casos cada uno de los anillos) de cualquiera de estos ejemplos contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N, y S como miembros del anillo.

“Aciloxilo” se refiere a los grupos R-C(O)O-, R-C(O)O- sustituido, cicloalquil-C(O)O-, aril-C(O)O-, y heterociclicil-C(O)O en los que R = alquilo, y alquilo, cicloalquilo, arilo, y heterociclicilo son según se definen en el presente documento.

“Acilamino” se refiere a los grupos R-C(O)N-, R-C(O)N- sustituido, cicloalquil-C(O)N-, aril-C(O)N-, y heterociclicil-C(O)N- en los que R = alquilo, y alquilo, cicloalquilo, arilo, y heterociclicilo según se definen en el presente documento.

“Amida” y “amido” se refieren a un grupo funcional un átomo de carbono unido mediante un doble enlace a un átomo de oxígeno y unido adicionalmente mediante un enlace sencillo a un átomo de nitrógeno [-C(O)-N]. Amida “primaria” describe un grupo amida no sustituido [-C(O)-NH₂]. Las amidas “secundarias” y “terciarias” son amidas en las que el nitrógeno está sustituido con uno o dos grupos distintos de hidrógeno, respectivamente. El término “lactama” se refiere a una amida ciclada, es decir una amida secundaria o terciaria en la que el carbono carbonílico y el átomo de nitrógeno son miembros adyacentes de un anillo.

“Halógeno” se refiere a radicales fluoro, cloro, bromo, y yodo.

“Lactona” se refiere un éster ciclado de un ácido carboxílico.

“Tio” se refiere a la sustitución de oxígeno por azufre en un radical definido. Ejemplos de tio compuesto incluyen compuestos de alquiltioxilo (por ejemplo, alquil-S-).

“Tioxialquilo” se refiere al radical divalente -S-alquil-, en el que el alquilo es según se definió anteriormente. Ejemplos de restos tioxialquilo incluyen restos alquil-S-alquilo, tales como CH₃-S-CH₂CH₂-.

“Alcoxilo” se refiere al radical -O-alquilo con alquilo según se definió anteriormente. Los grupos alcoxilo incluyen, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, y similares.

“Arilalquilo” y “aralquilo” se refieren a un radical alquilo sustituido con un arilo.

“Alquilarilo” se refiere a un radical arilo sustituido con un alquilo. Todos los términos “carboxilo”, “ácido carboxílico”, “carboxilato” y “carbamoilo” son términos que se refieren a grupos funcionales que contienen un átomo de carbono unido mediante un doble enlace a un átomo de oxígeno [C=O, también denominado un grupo acilo o carbonilo, representado en notación lineal como -C(O)-] y unido adicionalmente mediante un enlace sencillo a otro átomo de oxígeno [-C(O)-O-], y en el caso de carbamoilo, también se une adicionalmente un átomo de nitrógeno al carbono carbonílico para dar -N-C(O)-O-. Carboxilo, carboxilato y carbamato incluyen las amidas secundarias y terciarias y los ésteres alquílicos C₁-C₆ y arílicos C₆-C₁₀ farmacéuticamente aceptables.

También se usan combinaciones de estos términos para radicales de grupo funcional. Normalmente, el último término en la designación contiene el radical que se une al resto de la estructura química. Por ejemplo, “haloalquilo” se refiere a un radical alquilo sustituido por un halógeno, “cicloalquilalquilo” se refiere a un radical alquilo sustituido por un cicloalquilo, y “alquilcicloalquilo” se refiere a un radical cicloalquilo sustituido por un alquilo.

(Diagrama pasa a página siguiente)

Diagrama A

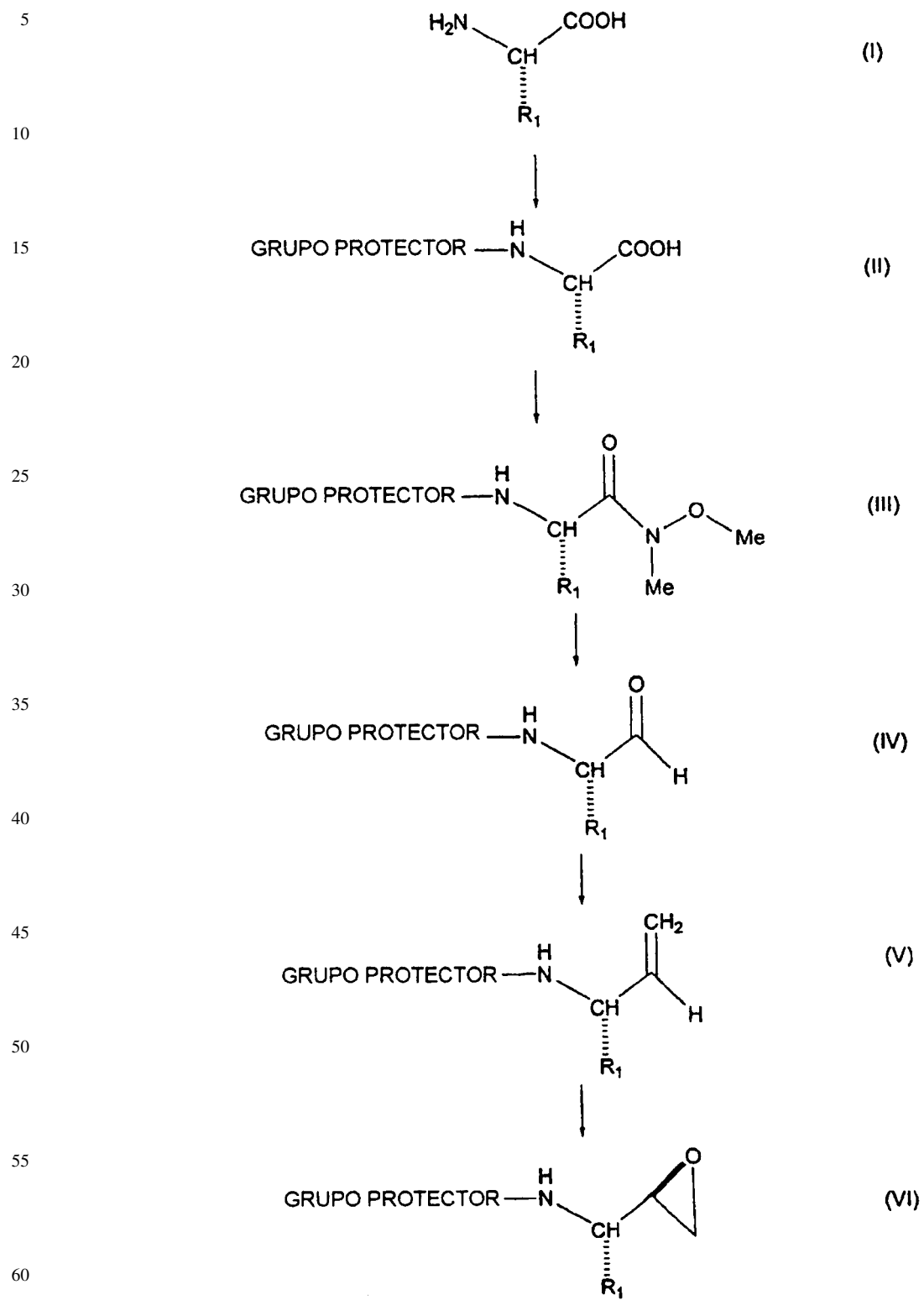
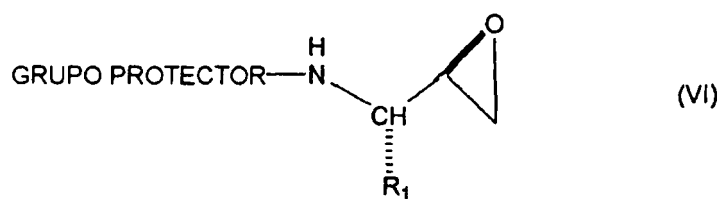


Diagrama A (continuación)



+

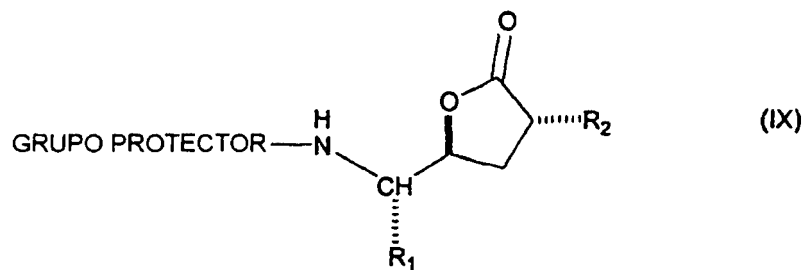
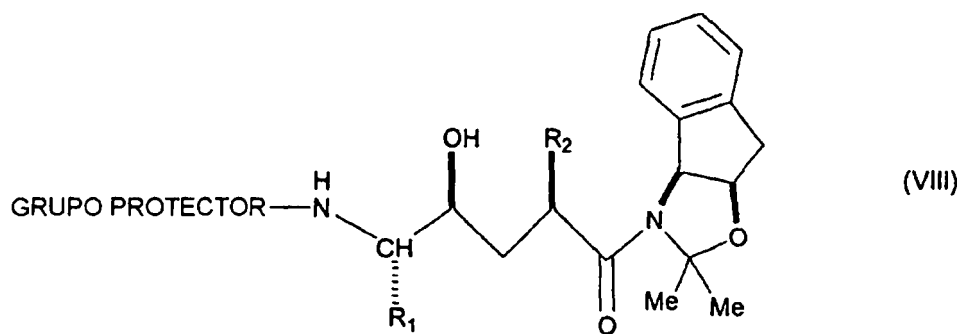
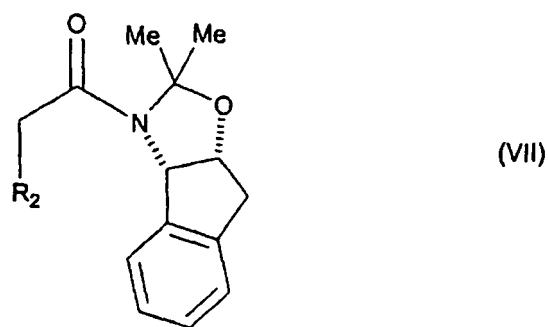


Diagrama A (continuación)

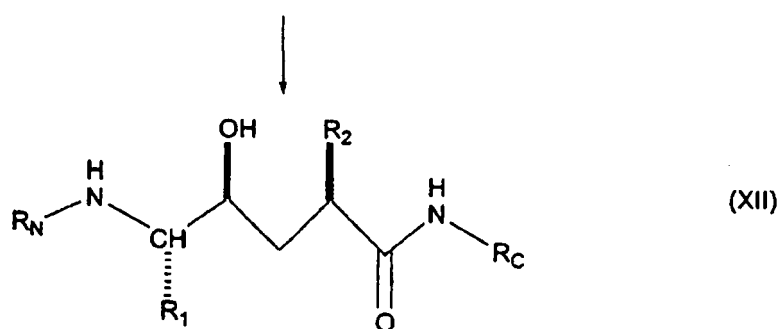
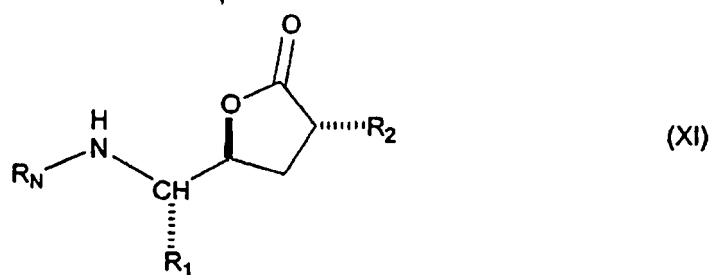
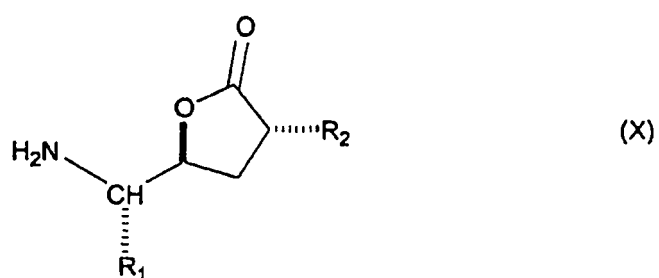
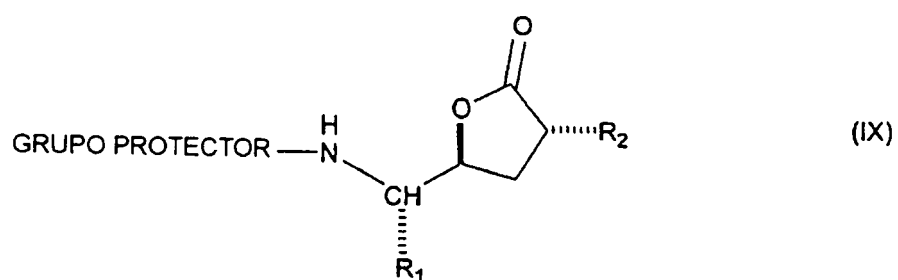
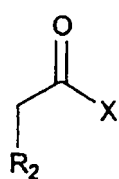
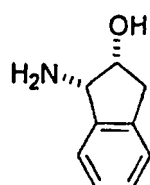


Diagrama B

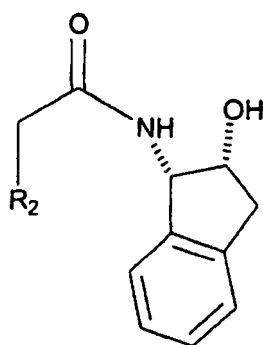


(XIII)

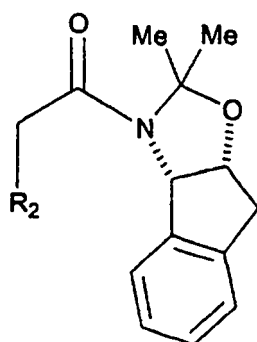
+



(XIV)



(XV)



(VII)

Ejemplos

Se cree que, un experto en la técnica puede, sin elaboración adicional y usando la descripción precedente, practicar la presente invención en su extensión más completa. Los siguientes ejemplos detallados, describen cómo preparar los diversos compuestos y/o realizar los diversos procedimientos y han de interpretarse de manera meramente ilustrativa, y sin limitaciones de la descripción precedente de ningún modo que sea. Los expertos en la técnica reconocerán inmediatamente variaciones apropiadas de los procedimientos tanto como para reactivos como para condiciones y técnicas de reacción.

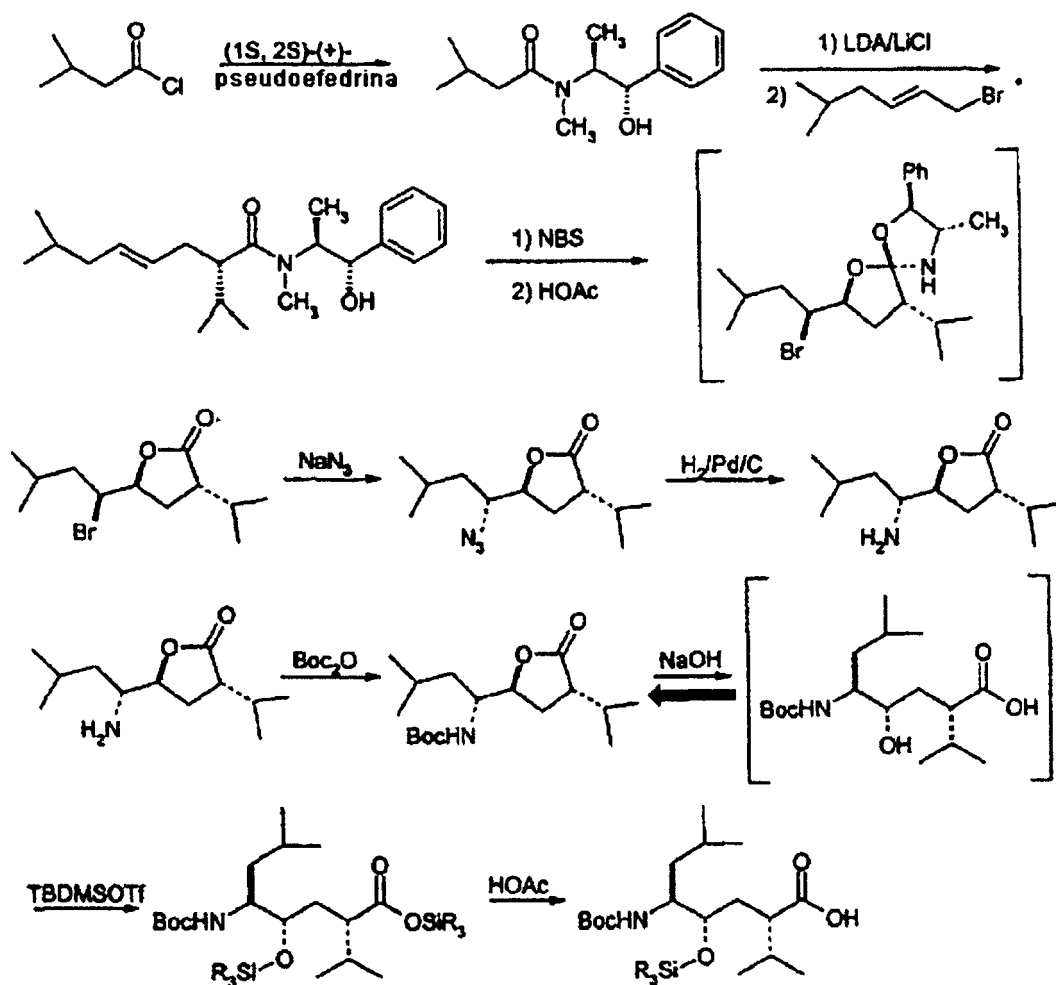
A continuación se ilustran en los siguientes ejemplos las preparaciones de los compuestos novedosos de la presente invención que usan el isómero de hidroxietileno.

Se conservan los ejemplos que no están dentro del alcance de la reivindicación, para fines de información.

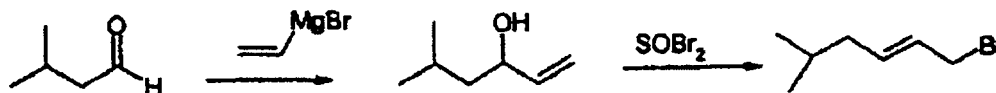
Métodos de síntesis

Los siguientes esquemas de reacción ilustran métodos de construcción de los isómeros de dipéptido de hidroxietileno proporcionados en los ejemplos 1-13. En estas reacciones pueden usarse variaciones de materiales de partida para preparar núcleos de hidroxietileno que tienen otros grupos de cadena lateral. Las sustituciones de materiales de partida disponibles, para conseguir variantes de cadena lateral deseadas, serán evidentes para un experto habitual en la técnica.

Esquema I

Síntesis de un resto de hidroxietileno adecuado para acoplamiento en el C-terminal

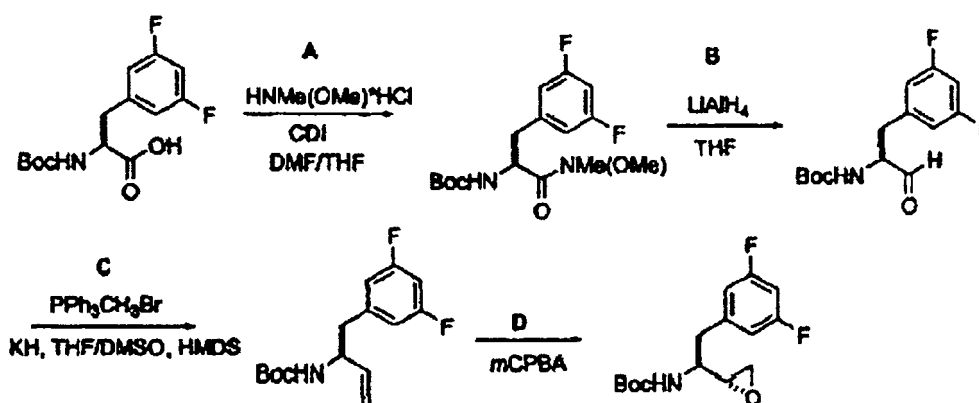
*Procedimiento para la preparación de 1-bromo-5-metilhex-2-eno:



Alternativamente, pueden prepararse hidroxietilenos mediante los métodos descritos a continuación. Se adaptó la síntesis del material de partida de epóxido *trans* de Boc-3,5-difluorofenilalanina del procedimiento de Luly, JR, y cols. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1487-1492 para la síntesis del epóxido *trans* de Boc-fenilalanina (esquema II). El material de partida utilizado en la preparación del epóxido *trans* de Boc-3,5-difluorofenilalanina fue 1-3,5-difluorofenilalanina protegida con Boc disponible de Synthetech, Inc. (1290 Industrial Way, P. O. Box 646, Albany, OR 97321 EE.UU.).

Esquema II

Formación de un precursor de epóxido quiral representativo



Se lograron la síntesis de amina quiral, la etapa de alquilación inicial y la manipulación adicional para dar la lactona, basándose en los procedimientos de la bibliografía, tal como sigue: Dragovich, PS, y cols. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1203-1222; Askin, D., y cols. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2771-2773. Se logró la escisión del grupo protector Boc y el posterior acoplamiento del ácido usando los procedimientos para la desprotección de la amina y el acoplamiento con EDC dados a continuación. Se logró la apertura del anillo de la lactona para dar el producto final usando una etapa de acoplamiento mediada por AlMe₃ según el procedimiento de la bibliografía de S.F. Martin y cols., *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1517-1520.

Eliminación de un grupo protector Boc de una amina protegida para generar amina libre

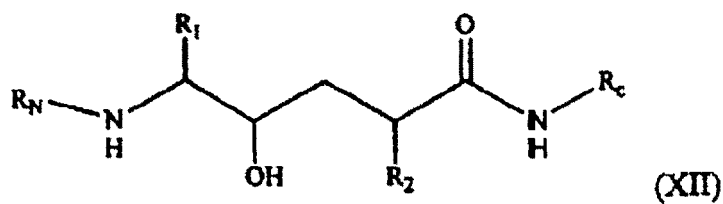
Por ejemplo, se disolvió el producto intermedio de alfa-amino-lactona protegida con Boc del esquema I o II en una disolución de ácido trifluoroacético/diclorometano (1/1). Se monitorizó la reacción mediante CCF para confirmar el consumo de material de partida en el momento en que los disolventes se eliminaron a presión reducida para producir la amina libre, que se usó sin purificación adicional.

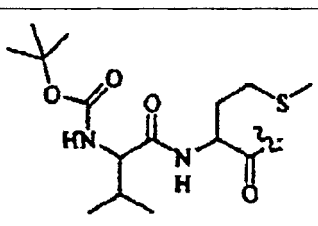
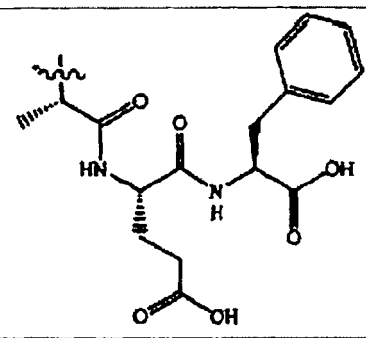
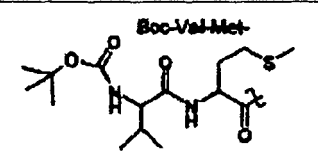
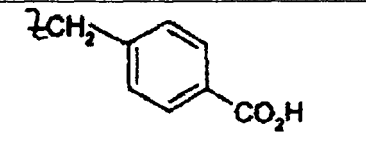
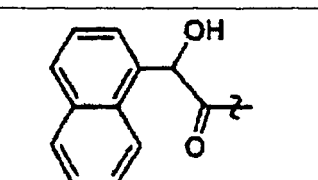
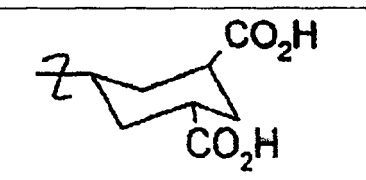
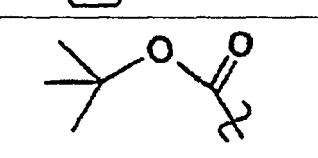
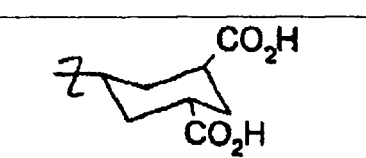
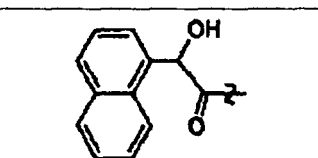
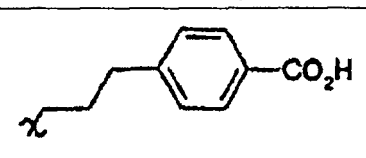
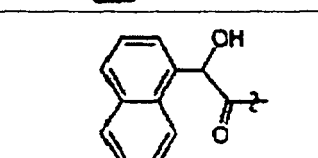
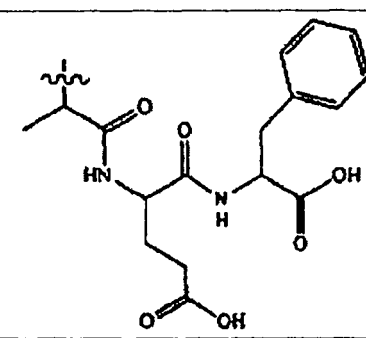
Acoplamiento de amina desprotegida con un grupo de ocupación de extremos ("capping") N-terminal

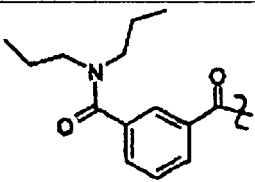
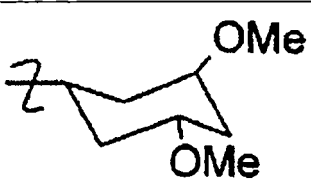
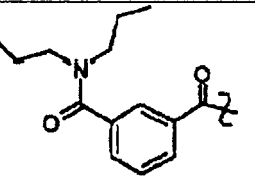
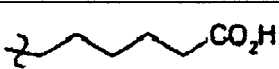
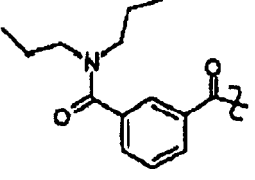
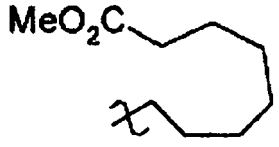
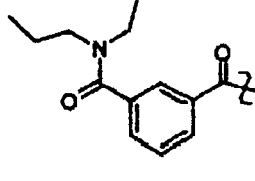
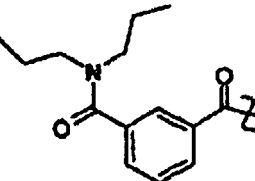
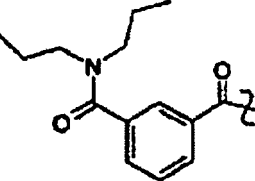
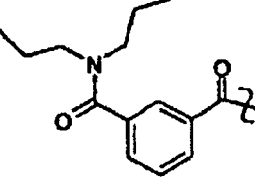
Por ejemplo, se disolvió ácido 2-(N,N-dipropil)amidobenzoico (1,0 equiv.) en 30 mL de diclorometano anhidro, después se añadieron HOBT (2,0 equiv.), α -amino-lactona funcionalizada de la etapa anterior (1,0 equiv.) y TEA (5 equiv.) y se agitó todo durante 20 minutos. Se añadió EDC (1,2 equiv.) y se agitó la mezcla durante la noche bajo una atmósfera de nitrógeno. Después se diluyó la reacción con agua y se extrajo con EtOAc (3x). Se lavaron las fases orgánicas con ácido cítrico acuoso (2x), NaHCO₃ sat. (2x), salmuera, luego se secaron sobre MgSO₄, y se eliminó el disolvente a vacío. Después, el producto de esta etapa puede someterse a la aminólisis del anillo de lactona para proporcionar el enlace de amida deseado.

TABLA I

Resultados del ensayo de inhibición enzimática para estructuras que tienen la estructura principal peptídica



Ejemplo	R _N	R _C
Ejemplos 1-6: R ₂ = -CH(CH ₃) ₂ y R ₁ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
*Procedimiento de ensayo descrito en el ejemplo 70		
Ejemplos 7-10: R ₂ = -CH ₂ CH ₃ y R ₁ = -CH ₂ -3,5-difluorofenilo		

7		
8		
9		
10		
Ejemplo 11: R ₂ = bencilo y R ₁ = -CH ₂ -3,5-difluorofenilo		
11		
Ejemplo 12: R ₂ = propilo y R ₁ = -CH ₂ -3,5-difluorofenilo		
12		
Ejemplo 13: R ₁ = metilo y R ₂ = -CH ₂ -3,5-difluorofenilo		
13		

ES 2 275 675 T3

Ejemplo 1

Se preparó este compuesto empleando el hidroxietileno con amino e hidroxilo protegidos preparado mediante el esquema I. Se preparó el compuesto mediante métodos sintéticos de péptido soportado sobre resina habitual usando procedimientos de acoplamiento con HOBt, EDC habituales descritos en el esquema II. Se esterificó Boc-Phe al soporte de resina. Se eliminó el grupo protector Boc del Phe mediante tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano (TFA/DCM) y después se acopló con Boc-Glu (monoéster) según se describió anteriormente. Se repitió el ciclo de desprotección de amino y el acoplamiento con HOBt/EDC, con Boc-Ala, después con el resto de hidroxietileno protegido del esquema I y después Boc-Met y finalmente Ac-Val. Se eliminó el éster de glutamilo mediante hidrólisis con LiOH. Se eliminó el grupo sililo de la función hidroxilo mediante tratamiento con fluoruro de tetra-*t*-butilamonio [(*t*-Bu)₄NF] en THF.

Fórmula molecular	C ₄₁ H ₆₈ N ₆ O ₉ S
Peso molecular	821,10
Espectrometría de masas (MH ⁺)	821

Ejemplo 2

Se acopló el éster metílico del ácido p-aminometilbenzoico (disponible comercialmente) con el resto de hidroxietileno del esquema I usando el acoplamiento con EDC/HOBt habitual. Se eliminó el grupo protector Boc del extremo N-terminal y luego, se acopló posteriormente con Boc-Val-Met. Se hidrolizó el éster metílico según se describió anteriormente y se eliminó el grupo sililo de la función hidroxilo mediante tratamiento con fluoruro de tetra-*t*-butilamonio [(*t*-Bu)₄NF] en THF.

Fórmula molecular	C ₃₅ H ₅₈ N ₄ O ₉ S
Peso molecular	694,927
CCF R _f (disolvente)	R _f = 0,28 en metanol al 5% / diclorometano
Purificación	Metanol al 5% / diclorometano
Espectrometría de masas (MH ⁺)	695

Ejemplo 3

Se acopló el resto de hidroxietileno del esquema con el éster dimetílico de 3,5-dicarboxiciclohexilamina según se preparó en el esquema VI A. A su vez se desprotegió este producto intermedio en el extremo N-terminal con TFA/DCM y después se acopló con el ácido alfa-hidroxi-naftilacético. Se hidrolizaron los ésteres metílicos con LiOH y después se eliminó el grupo sililo de la función hidroxilo mediante tratamiento con fluoruro de tetra-*t*-butilamonio [(*t*-Bu)₄NF] en THF.

Peso molecular	584,7
CCF R _f (disolvente)	0,15 (MeOH al 10%/CH ₂ Cl ₂)
Purificación:	Cromatografía ultrarrápida
Espectrometría de masas (M+H ⁺)	(CI) 584,7

Ejemplo 4

Se acopló el hidroxietileno protegido, según se produjo en el esquema I, con el éster dimetílico de 3,5-dicarboxiciclohexilamina (esquema VI A). Se hidrolizó el diéster con LiOH y se eliminó el grupo protector de sililo mediante tratamiento con fluoruro de tetra-*t*-butilamonio [(*t*-Bu)₄NF] en THF.

ES 2 275 675 T3

Fórmula molecular	C ₂₅ H ₄₄ N ₂ O ₈
Peso molecular	500,6
CCF Rf (disolvente)	0,15 (MeOH al 5%/CH ₂ Cl ₂)
Purificación:	extracción ácido/base
Espectrometría de masas (M-H ⁺)	(CI) 498,7

Ejemplo 5

Diastereomérico en el α-hidroxi-naftilacetilo

Se acopló el resto de hidroxietileno del esquema I con el 3-(1-aminopropil)-4-benzoato de metilo (disponible comercialmente). A su vez se desprotegió este producto intermedio en el extremo N-terminal con TFA/DCM (1:1) y después se acopló con el ácido alfa-hidroxi-naftilacético. Se hidrolizó el éster metílico con LiOH y luego se eliminó el grupo sililo de la función hidroxilo mediante tratamiento con fluoruro de tetra-*t*-butilamonio [(*t*-Bu)₄NF] en THF.

Fórmula molecular	C ₃₄ H ₄₄ N ₂ O ₆
Peso molecular	576,73
CCF Rf (disolvente)	Rf = 0,12 en metanol al 10%/diclorometano
Purificación:	Metanol al 10%/diclorometano
Espectrometría de masas (MH ⁺)	577

Ejemplo 6

Se preparó este isómero de pentapéptido para probar la eficacia del ácido α-hidroxi-naftilacético como un peptidomimético de grupo N-terminal en una secuencia de oligopéptido que demostraba buena actividad (véase el ejemplo 1). Se preparó el resto de hidroxietileno mediante el método del esquema I. Se empleó la síntesis soportada sobre resina para preparar la molécula uniendo Boc-Phg a un soporte de resina y después se construyó de manera secuencial mediante eliminación del grupo protector Boc y el acoplamiento con HOBt/EDC a su vez con éster metílico del ácido glutámico, valina, el isómero de hidroxietileno del esquema I y finalmente con ácido α-hidroxi-naftilacético. Luego se escindió el producto del soporte sólido y se eliminaron los grupos protectores según se describió en los ejemplos anteriores.

Fórmula molecular	C ₄₁ H ₅₄ N ₄ O ₁₀
Peso molecular	762,9
Purificación:	perfil analítico de HPLC 500 (gradiente: 20-50% de [B] en 30 minutos, [A] Tampón = TFA al 0,1%/H ₂ O; [B] Tampón = TFA al 0,1% /acetonitrilo) reveló dos diastereómeros que eluían a 19,4 y 21,0 minutos
Espectrometría de masas (M+Na ⁺) [M+K ⁺]	763,6 (785,6) [801,6]

En el esquema I se explica la preparación de los ejemplos 1-6, según se describe en la tabla 1 anterior.

ES 2 275 675 T3

Ejemplo 7

Después de conseguir el acoplamiento en el extremo C-terminal según se describió anteriormente, se sometió la lactona a aminólisis a temperaturas de reflujo con 3,5-dimetilciclohexilamina en presencia de AlMe_3 y un disolvente orgánico adecuado para proporcionar el compuesto objeto.

Fórmula molecular	$\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_6$
Peso molecular	659
CCF Rf (disolvente)	0,15 (iPrOH al 5%/CHCl ₃)
Purificación:	Cromatografía ultrarrápida
Espectrometría de masas (M+H ⁺)	(CI) 660,4

Ejemplo 8

Después de conseguir el acoplamiento en el extremo C-terminal según se describió anteriormente, se sometió la lactona a aminólisis a temperaturas de reflujo con ácido 6-aminohexanoico en presencia de AlMe_3 y un disolvente orgánico adecuado para proporcionar el compuesto objeto.

Fórmula molecular	$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_6$
Peso molecular	631
CCF Rf (disolvente)	0,15 (MeOH al 5%/CH ₂ Cl ₂)
Purificación:	Cromatografía ultrarrápida
Espectrometría de masas (M+H ⁺)	(CI) 632,2

Ejemplo 9

Después de conseguir el acoplamiento en el extremo C-terminal según se describió anteriormente, se sometió la lactona a aminólisis a temperaturas de reflujo con ácido 8-amino-octanoico en presencia de AlMe_3 y un disolvente orgánico adecuado que se disolvió después en MeOH y se trató con gas HCl para proporcionar el éster metílico deseado.

Fórmula molecular	$\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_6$
Peso molecular	673
CCF Rf (disolvente)	0,4 (iPrOH al 5%/CHCl ₃)
Purificación:	Cromatografía ultrarrápida
Espectrometría de masas (M+H ⁺)	(CI) 674,4

Ejemplo 10

Después de conseguir el acoplamiento en el extremo C-terminal según se describió anteriormente, se sometió la lactona a aminólisis a temperaturas de reflujo con 4-carboxiciclohexilmetilamina en presencia de AlMe_3 y un disolvente orgánico adecuado para proporcionar el compuesto objeto.

ES 2 275 675 T3

Fórmula molecular	C ₃₆ H ₄₉ F ₂ N ₃ O ₆
Peso molecular	657
CCF Rf (disolvente)	0,3 (MeOH al 10%/CH ₂ Cl ₂)
Purificación:	Cromatografía ultrarrápida
Espectrometría de masas (M+H ⁺)	(CI) 658,4

Ejemplo 11

El compuesto objeto se preparó como en el ejemplo 10 excepto porque en la primera etapa de preparación del producto intermedio de oxazolidina quiral, se substituyó cloruro de 3-fenilpropionilo (Aldrich Chemical) por cloruro de *n*-butanoílo.

Fórmula molecular	C ₄₁ H ₅₁ F ₂ N ₃ O ₆
Peso molecular	719,86
Espectrometría de masas (M+Na ⁺)	743

Ejemplo 12

El compuesto objeto se preparó como en el ejemplo 10 excepto porque en la primera etapa de preparación del producto intermedio de oxazolidina quiral, se substituyó cloruro de *n*-pentanoílo por cloruro de *n*-butanoílo.

Fórmula molecular	C ₃₇ H ₅₁ F ₂ N ₃ O ₆
Peso molecular	671,37
Espectrometría de masas (M+Na ⁺)	694,37

Ejemplo 13

El compuesto objeto se preparó como en el ejemplo 10 excepto porque en la primera etapa de preparación del producto intermedio de oxazolidina quiral, se substituyó cloruro de *n*-propionilo por cloruro de *n*-butanoílo.

Fórmula molecular	C ₃₅ H ₄₇ F ₂ N ₃ O ₆
Peso molecular	643,34
Espectrometría de masas (M+Na ⁺)	666,34

Las fórmulas de los compuestos referidos en los ejemplos 14-22 se corresponden con los enumerados en el diagrama A. Además, los siguientes ejemplos se refieren a los compuestos enumerados en el diagrama A, en los que R₁ = -(CH₂)₃-5-difluorobencilo, R₂ = Et, R_N = N',N'-dipropilisofetalamida, R_C = ácido *anti*-4-aminometilciclohexanocarboxílico, y el grupo protector es Boc. La identidad del sustituyente R₂ está determinado por el material de partida (es decir, compuestos de fórmula (XIII)) usados en la síntesis del producto intermedio (VII) tal como se explica en el diagrama B. Después se incorpora el producto intermedio (VII), preparado según el diagrama B, al esquema sintético para la preparación de compuestos de hidroxietileno de fórmula (XII), según se explica en el diagrama A, mediante reacción con el epóxido (VI).

ES 2 275 675 T3

Ejemplo 14

Éster terc-butilico del ácido (L)-[2-(3,5-difluorofenil)-1-(metoximetilcarbamoil)-etil]-carbámico (III)

- 5 Se disolvió ácido (L)-2-terc-butoxicarbonilamino-3-(3,5-difluorofenil)-propiónico (Synthetech Inc., II, 2,66 g, 8,83 mmol) en una mezcla de THF anhidro (5 mL) y DMF anhidro (2 mL) a t.a. Se añadió 1,1-carbonildiimidazol (1,71 g, 10,6 mmol) en una porción a esta disolución. Después de cesar el desprendimiento de gas, se añadió una disolución de clorhidrato de N-metil-O-metilhidroxilamina (0,955 g, 9,79 mmol) y diisopropiletilamina (1,6 mL, 9,19 mmol) en DMF (4 mL) a t.a. con una jeringuilla. Ésta se agitó a t.a. durante 17 h, tras lo cual se extinguió la reacción con ácido cítrico al 10%. Se extrajo la mezcla con EtOAc. Se lavó el extracto orgánico (NaHCO₃ saturado, NaCl saturado), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (elución con EtOAc al 30%/hexanos) para dar como producto un aceite: M+Na+ 367,1.

15 Ejemplo 15

Éster terc-butilico del ácido (L)-[1-(3,5-difluorobencil)-2-oxoetil]-carbámico (IV)

- 20 Se disolvió éster terc-butilico del ácido (L)-[2-(3,5-difluorofenil)-1-(metoximetilcarbamoil)-etil]-carbámico (III, 2,56 g) en THF anhidro (50 mL) y se enfrió hasta 0°C. Se añadió a esta mezcla hidruro de litio y aluminio en polvo (285 mg) en porciones durante 5 min. Se agitó la suspensión resultante a 0°C durante 1 h. Se extinguió la reacción a 0°C mediante adición lenta de ácido cítrico saturado hasta que cesó el desprendimiento de gas, seguido de la adición gota a gota de ácido cítrico acuoso al 10% (30 mL). Entonces se dejó calentar esto hasta t.a. Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con Et₂O. Se lavaron los extractos orgánicos combinados (NaHCO₃ saturado, NaCl saturado), se secaron (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron a presión reducida para dar un sólido, que se usó sin purificación adicional.

Ejemplo 16

- 30 *Éster terc-butilico del ácido (L)-[1-(3,5-difluorobencil)alil]-carbámico (V)*

- 35 Se suspendió hidruro de potasio (suspensión al 35% en aceite mineral, 1,76 g) en una mezcla de THF anhidro (20 mL) y DMSO (4 mL), y se enfrió hasta 0°C. Se añadió con una jeringuilla 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (4,0 mL), y se agitó la mezcla durante 45 min. a 0°C. Se añadió bromuro de metiltrifenilfosfonio (5,57 g), y se agitó la suspensión amarilla resultante a 0°C durante 1 h, tras lo cual se enfrió la mezcla hasta -78°C. Se añadió con una cánula una disolución de éster terc-butilico del ácido (L)-[1-(3,5-difluorobencil)-2-oxoetil]-carbámico (IV, 2,2 g) en THF (15 mL) a -78°C. Se agitó la suspensión resultante a -78°C durante 15 min., después se dejó calentar hasta t.a. durante 16 h. Se añadieron MeOH (2 mL) y disolución semisaturada de bicarbonato de sodio (100 mL), y se extrajo la mezcla con EtOAc (2 X 50 mL). Se lavaron los extractos orgánicos combinados (agua, NaCl saturado), se secaron (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (Et₂O al 10-20%/hexanos) para dar como producto un sólido: M+Na+ 306,1.

45 Ejemplo 17

Éster terc-butilico del ácido (1S,2R)-[2-(3,5-difluorofenil)-1-oxiraniletíl]-carbámico (VI)

- 50 Se disolvió éster terc-butilico del ácido (L)-[1-(3,5-difluorobencil)alil]-carbámico (V, 3,3 g) en CH₂Cl₂ (130 mL) y se añadió ácido m-cloroperbenzoico (50-55% puro, 16,0 g) con agitación a t.a. Tras 23 h, se diluyó la mezcla de reacción con Et₂O, se lavó (Na₂SO₃ al 10%, NaHCO₃ saturado, NaCl saturado), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró a presión reducida para dar un sólido: M+Na+ 322,1.

55 Ejemplo 18

Éster terc-butilico del ácido (1S,2S,4R)-[1-(3,5-difluorobencil)-4-((3aS,8aR)-2,2-dimetil-8,8a-dihidro-3aH-indeno[1,2-d]oxazol-3-carbonil)-2-hidroxihexil]-carbámico (VIII)

- 60 Se combinaron éster terc-butilico del ácido (1S, 2S)-[2-(3,5-difluorofenil)-1-oxiraniletíl]-carbámico (VI, 113 mg) y 1-((3aS,8aR)-2,2-dimetil-8,8a-dihidro-3aH-indeno[1,2-d]oxazol-3-il)-butan-1-ona (VII, 94 mg) en THF anhidro (3 mL), y se enfriaron hasta -78°C. Se añadió a esta disolución BuLi (2,5 M en hexanos, 0,32 mL) durante 5 min., tras lo cual se dejó calentar la disolución hasta 0°C durante 1,5 h. Se repartió la mezcla de reacción entre HCl 0,5 N (4 mL) y EtOAc/hexanos 1:1 (2 X 4 mL). Se secaron (MgSO₄) las fases orgánicas combinadas, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 20-30%/hexanos) para dar un aceite: MH+559,1.

ES 2 275 675 T3

Ejemplo 19

Éster terc-butílico del ácido [2-(3,5-difluorofenil)-1-(S)-(4-(R)-etil-5-oxo-tetrahidrofuran-2-(S)-il)-etil]-carbámico (IX)

Se disolvió éster terc-butílico del ácido (1S,2S,4R)-[1-(3,5-difluorobencil)-4-((3aS,8aR)-2,2-dimetil-8,8a-dihidro-3aH-indeno[1,2-d]oxazol-3-carbonil)-2-hidroxi-hexil]-carbámico (VIII, 60 mg) en tolueno/CH₂Cl₂ 5:1 (3 mL), y se añadió ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (23 mg). Se agitó esto a t.a. durante 18 h. Después se filtró la mezcla, y se repartió entre NaHCO₃ semisaturado (3 mL) y EtOAc/hexanos 1:1 (2 X 3 mL). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron a presión reducida. La cromatografía ultrarrápida del residuo proporcionó el producto deseado como un sólido: MH+370,2.

Ejemplo 20

5S-[1S-Amino-2-(3,5-difluorofenil)etil]-3R-etildihidrofuran-2-ona (X)

Se disolvió éster terc-butílico del ácido [2-(3,5-difluorofenil)-1-(S)-(4-(R)-etil-5-oxo-tetrahidrofuran-2-(S)-il)-etil]-carbámico (IX, 313 mg) en CH₂Cl₂ (1 mL) a t.a., tras lo cual se añadió CF₃COOH (1 mL). Se agitó esta disolución a t.a. durante 1 h, después se concentró a presión reducida. Ésta se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Ejemplo 21

N-[2-(3,5-difluorofenil)-(1S,2S,4R)-[1-(4-etil-5-oxotetrahidrofuran-2-il)]etil]-N',N'-dipropilisofalamida (XI)

Se combinó 5S-[1S-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil]-3R-etildihidrofuran-2-ona (X, 228 mg teóricos) con trietilamina (0,7 mL) en DMF anhidro (2 mL) a 0°C. Se añadió ácido N,N-dipropilisofalámico (242 mg) y se disolvió. Se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (224 mg) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (320 mg) uno tras otro. Se agitó la mezcla a 0°C durante 5 min., después se dejó calentar hasta t.a. durante 4 h. Después, ésta se diluyó con ácido cítrico al 10%, y se extrajo 3X con EtOAc. Se lavaron los extractos orgánicos combinados (NaHCO₃ saturado, NaCl saturado), se secaron (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (elución con EtOAc al 40%/hexanos) para dar un sólido: MH+501,3.

Ejemplo 22

Ácido 4-(anti)-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxi-hexanoilamino]-metil]ciclohexanocarboxílico (XII)

Se suspendió ácido anti-4-aminometilciclohexanocarboxílico (57 mg) en 1,2-dicloroetano (2 mL), y se enfrió hasta 0°C. Se añadió trimetilaluminio (2,0 M en tolueno, 0,21 mL), seguido de una disolución de N-{2-(3,5-difluorofenil)-(1S,2S,4R)-[1-(4-etil-5-oxotetrahidrofuran-2-il)]etil}-N',N'-dipropilisofalamida (XI, 30 mg) en 1,2-dicloroetano (1 mL). Después esto se calentó a reflujo durante 1,5 h, tras lo cual la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y la reacción se extinguió con HCl 3 N (2 mL). Se agitó la suspensión a 0°C durante 30 min., y luego se extrajo con 3 X 5 mL de iPrOH al 10%/CHCl₃. Se secaron (MgSO₄) los extractos orgánicos combinados, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (elución con MeOH al 5-10%/CH₂Cl₂) para dar un sólido: MH+658,4.

Las fórmulas de los compuestos referidos en los ejemplos 23-24 se corresponden con los enumerados en el diagrama B. Además, los siguientes ejemplos se refieren a los compuestos enumerados en el diagrama B, R₂ = Et.

Ejemplo 23

N-(1S,2R)-(2-Hidroxi-indan-1-il)-butiramida (XV)

Se disolvió (1S,2R)-cis-1-amino-2-indanol (XIV, 1,5 g) con trietilamina (1,5 mL) en THF anhidro (45 mL), y se enfrió hasta 0°C. Se añadió cloruro de butirilo (XIII, 1,05 mL) con una jeringuilla, y se agitó la disolución resultante a 0°C durante 20 min., tras lo cual, la mezcla de reacción se repartió entre NH₄Cl semisaturado (45 mL) y EtOAc (2 X 45 mL). Se secaron (MgSO₄) las fases orgánicas combinadas, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un sólido, que se tomó para la reacción siguiente sin purificación adicional.

Ejemplo 24

1-((3aS,8aR)-2,2-Dimetil-8,8a-dihidro-3aH-indeno[1,2-d]oxazol-3-il)-butan-1-ona (VII)

Se combinaron N-(1S,2R)-(2-hidroxiindan-1-il)-butiramida (XV, 2,2 g) y 2-metoxipropeno (5 mL) con CH₂Cl₂ (70 mL) a t.a., y se añadió ácido metanosulfónico (0,05 mL). Después de 20 min. a t.a., se repartió la mezcla de reacción entre NaHCO₃ semisaturado (30 mL) y CH₂Cl₂ (2 X 30 mL). Se secaron (MgSO₄) las fases orgánicas combinadas, se filtraron, y se concentraron a presión reducida para dar como producto un aceite: MH+ 260,1.

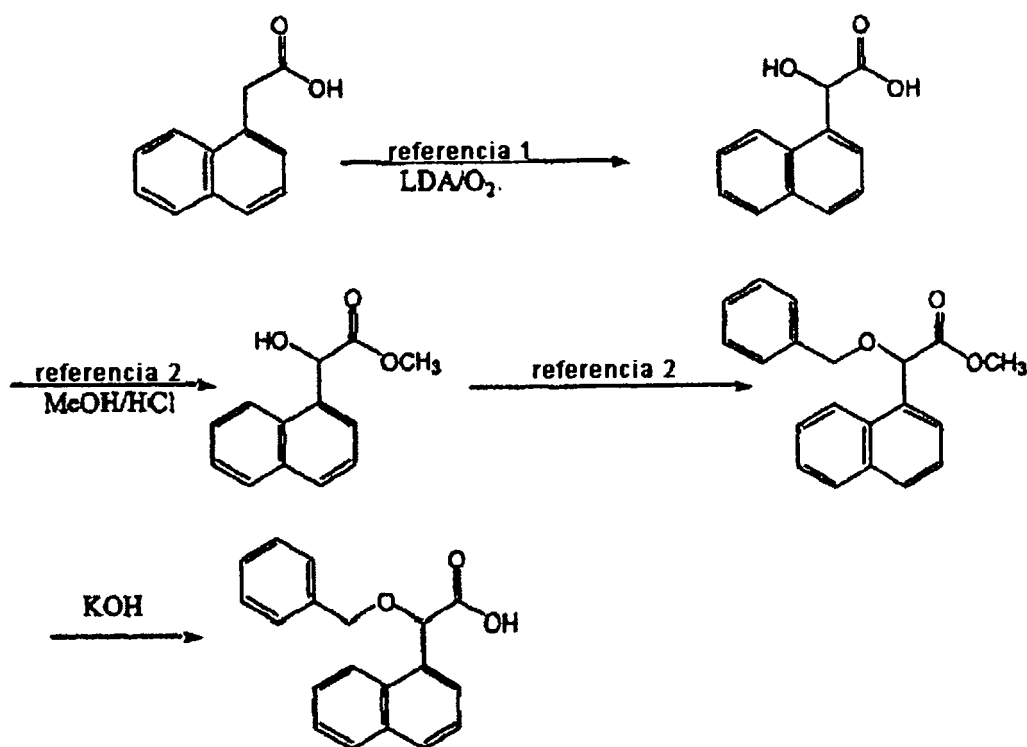
Los ejemplos 25-30 enumerados a continuación se refieren a la síntesis de los grupos de ocupación de extremos N-terminal.

Ejemplo 25

Grupos de ocupación de extremos N-terminal hidroxilados y bencilados

En el esquema III a continuación, se ilustra la forma de preparar grupos de ocupación de extremos N-terminal hidroxilados y bencilados a partir de materiales de partida de ácido acético aromáticos. Moersch, GW y Zwiesler, ML. (*Synthesis*, 1971, 647-648, ref. 1 en el esquema III) demuestran una síntesis útil para preparar un grupo de ocupación de extremos N-terminal de ácido arilalquilhidroxicarboxílico. El procedimiento del presente ejemplo proporciona hidroxilación alfa del ácido 1-naftilacético, usando dietilamina de litio y oxígeno. Hon, Yung-Son, Chang, Rong-Chi, Chau, Tay-Yuan (*Heterocycles*, 1990, Vol. 31, n° 10, 1745-1750, ref. 2 en el esquema III) demostraron una síntesis del correspondiente éter bencilico a partir del compuesto α -hidroxiaromático mediante esterificación de la función carboxilo y eterificación con bromuro de bencilo. O bien el α -hidroxiácido, o bien el derivado de éter es adecuado como un grupo de ocupación de extremos N-terminal.

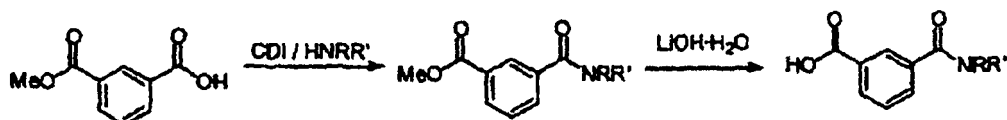
Esquema III



Ejemplo 26

Preparación de carboxibenzamidas

Esquema IV A



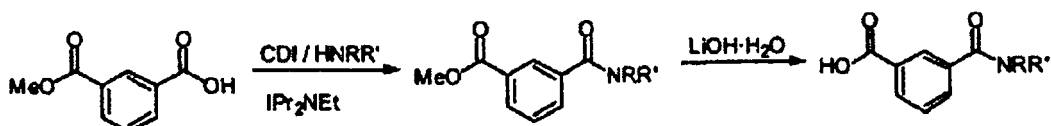
Se disolvió isoftalato de metilo (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, (1 equiv., 11,1 mmol) en THF:DMF 50:50 (20 mL) antes de la adición de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (1,2 equiv., 13,3 mmol) a temperatura ambiente. Durante la adición de CDI, se observó un desprendimiento de gas (CO_2). Después de pararse el desprendimiento de gas (aproximadamente un minuto o menos), se añadió la amina (1,2 equiv., 13,3 mmol). Después de 12 h de agitación a temperatura ambiente, se repartió la reacción entre NH_4Cl acuoso saturado y acetato de etilo, y se extrajo la fase acuosa dos veces más con acetato de etilo. Después se lavaron los extractos orgánicos con disoluciones acuosas saturadas NaHCO_3 y NaCl , y se secaron sobre MgSO_4 o NaSO_4 anhidro. La filtración del agente desecante y la eliminación de disolventes a vacío dio el sólido blanco o aceite transparente bruto. La purificación de estos compuestos, si fuera necesaria, se consiguió mediante cromatografía de gel de sílice con acetato de etilo al 30-40% en hexanos.

Se trató la monoalquil o dialquil amida de isoftalato de metilo con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3 equiv., 33,3 mmol) en una cantidad mínima de THF:MeOH:H₂O 1:2:1 y se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. Después de 12 h, se eliminaron los disolventes a vacío y posteriormente se repartieron entre H₂O y acetato de etilo. Si las emulsiones impiden la separación de las dos fases, se añadió una cantidad pequeña de salmuera para ayudar a la separación. Se extrajo la fase acuosa una vez más con acetato de etilo (para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar). Se acidificó entonces la fase acuosa con HCl concentrado hasta $\text{pH} \leq 3$. Después se extrajo la disolución acuosa ácida blanca turbia, tres veces con acetato de etilo. Se secaron estos extractos orgánicos combinados sobre MgSO_4 o NaSO_4 anhidro. La filtración del agente desecante y la eliminación de disolventes a vacío dio un sólido. Se usó bruto el isoftalato de mono o dialquilamida en la siguiente reacción.

Ejemplo 27

Preparación de carboxibenzamidas

Esquema IV B



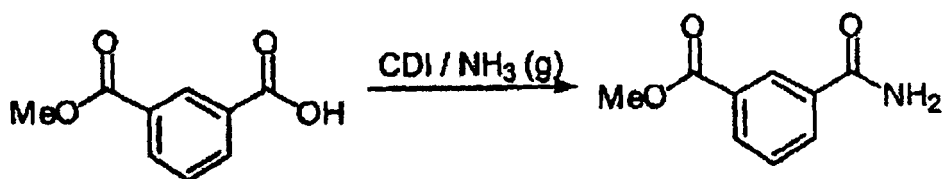
Se disolvió isoftalato de metilo (1 equiv., 11,1 mmol) en THF:DMF 50:50 (20 mL) antes de la adición de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (1,2 equiv., 13,3 mmol) a temperatura ambiente. Durante la adición de CDI, se observó desprendimiento de gas (CO_2). Después de pararse el desprendimiento de gas, (aproximadamente un minuto o menos), se disolvió la amina (1,2 equiv., 13,3 mmol) en DMF y se añadió diisopropiletilamina (1,2 equiv., 13,3 mmol). Después de 12 h de agitación a temperatura ambiente, se repartió la reacción entre NH_4Cl acuoso saturado y acetato de etilo, y se extrajo la fase acuosa dos veces más con acetato de etilo. Después se lavaron los extractos orgánicos con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl , y se secaron sobre MgSO_4 o NaSO_4 anhidro. La filtración del agente desecante y la eliminación de disolventes a vacío dio un sólido o aceite. La purificación de estos compuestos, si fuera necesaria, se consiguió mediante cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30-40% en hexanos.

Después se trató la monoalquil o dialquilamida de isoftalato de metilo (1 equiv., 11,1 mmol) con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3 equiv., 33,3 mmol) en una cantidad mínima de THF:MeOH:H₂O 1:2:1 y se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. Después de 12 h, se eliminaron los disolventes a vacío y posteriormente se repartieron entre H₂O y acetato de etilo. Si las emulsiones impiden la separación de las dos capas, se añadió una pequeña cantidad de salmuera para ayudar a la separación. Se extrajo la fase acuosa una vez más con acetato de etilo (para eliminar el material de partida sin reaccionar). Se acidificó la fase acuosa con HCl concentrado hasta $\text{pH} \leq 3$. Después se extrajo la disolución acuosa ácida blanca turbia así obtenida tres veces con acetato de etilo. Se secaron estos extractos orgánicos combinados sobre MgSO_4 o Na_2SO_4 anhidro. La filtración del agente desecante y la eliminación de disolventes a vacío dio un sólido. El isoftalato de mono o dialquilamida se usó bruto en la siguiente reacción.

Ejemplo 28

Preparación de amida primaria

Esquema IV C



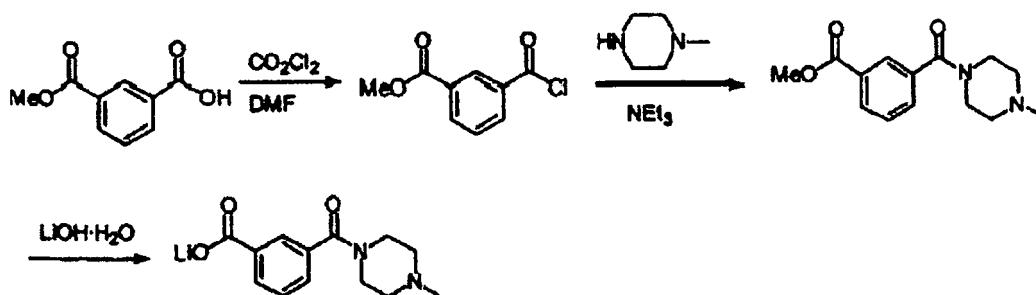
Se disolvió isoftalato de metilo (1 equiv., 11,1 mmol) en THF:DMF 50:50 (20 mL) antes de la adición de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (1,2 equiv., 13,3 mmol) a temperatura ambiente. Con la adición de CDI, se observó un desprendimiento de gas (CO_2). Después de cinco minutos, se burbujeó amoníaco gas en la disolución a través de una
 5 aguja de una jeringuilla durante 1 h. Ya que se calentó la reacción debido a una exoterma, se enfrió la reacción hasta 0°C en la duración de una hora. Después se dejó agitar la reacción bajo un globo de amoníaco durante la noche a temperatura ambiente. Después de 12 h, se repartió la reacción entre NH_4Cl acuoso saturado y acetato de etilo, y se extrajo la fase acuosa dos veces más con acetato de etilo. Después se lavaron los extractos orgánicos con disoluciones
 10 acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl , y se secaron sobre MgSO_4 o NaSO_4 anhidro. La filtración del agente desecante y la eliminación de disolventes a vacío dio un sólido o aceite. La purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice con isopropanol al 5% en cloroformo dio la amida primaria deseada.

Luego se trató la amida primaria de isoftalato de metilo (7,26 mmol) con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3 equiv., 21,8 mmol) en una cantidad mínima de THF:MeOH: H_2O 1:2:1 y se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. Después
 15 de 12 h, se eliminaron los disolventes a vacío y posteriormente se repartieron entre H_2O y acetato de etilo. Se extrajo la fase acuosa una vez más con acetato de etilo (para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar). Después se acidificó la fase acuosa con HCl concentrado hasta $\text{pH} \leq 3$. Después se extrajo la disolución acuosa ácida blanca turbia así obtenida, tres veces con acetato de etilo. Se secaron estos extractos orgánicos combinados sobre MgSO_4 o NaSO_4 anhidro. La filtración del agente desecante y la eliminación de disolventes a vacío dio un sólido. Se usó bruto
 20 el isoftalato de mono o dialquilamida en la siguiente reacción.

Ejemplo 29

Preparación de amidas heterocíclicas

Esquema IV D



Se disolvió isoftalato de metilo (1,2 equiv., 2,78 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro y tres gotas de DMF (catalítico). Se
 45 enfrió la disolución hasta 0°C antes de la adición gota a gota de cloruro de oxalilo (2 equiv., 4,63 mmol). Se agitó la mezcla a 0°C durante 1 h. La mezcla nunca se disolvió. Después de 1 h, se eliminaron los disolventes a vacío. Se dejó el cloruro de ácido a vacío durante la noche.

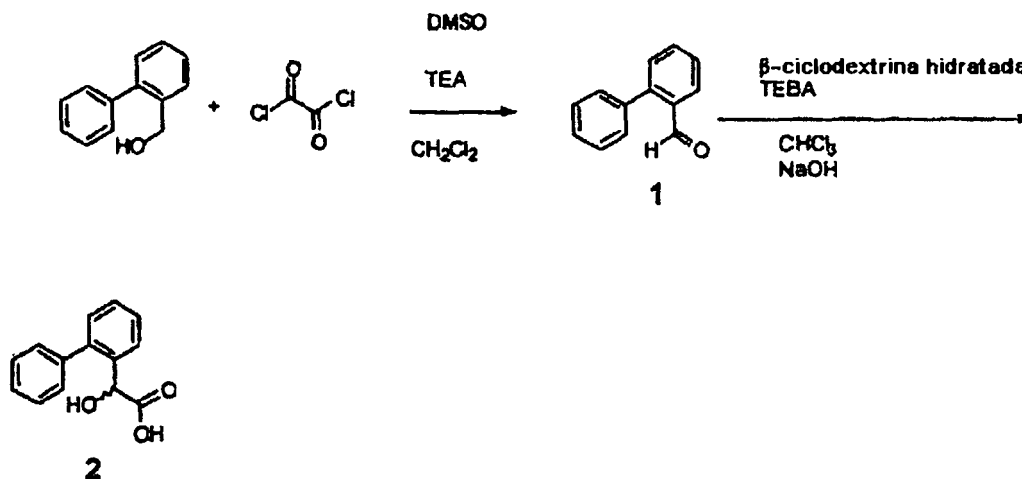
Se disolvió el cloruro de ácido bruto (1 equiv., 2,78 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro y se enfrió hasta 0°C antes de la
 50 adición de NEt_3 (5 equiv., 11,6 mmol) y N-metilpiperidina (6 equiv., 13,9 mmol). Se agitó la reacción a 0°C durante 2 h antes de eliminar los disolventes a vacío. Se diluyó el residuo con H_2O y acetato de etilo y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa dos veces más con acetato de etilo, y se lavaron los extractos orgánicos combinados con NaHCO_3 acuoso saturado, y se secó sobre MgSO_4 anhidro. La filtración del agente desecante y la eliminación de
 55 disolventes a vacío dio el producto bruto.

Después se trató la amida bruta (1 equiv., 2,19 mmol) con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1 equiv., 2,19 mmol) en una cantidad mínima
 60 de THF:MeOH: H_2O 1:2:1 y se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. Después de 12 h, se eliminaron los disolventes a vacío y posteriormente se repartieron entre H_2O y acetato de etilo. Se extrajo la fase acuosa una vez más con acetato de etilo (para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar). La eliminación de H_2O de la fase
 65 acuosa a vacío dio un sólido.

Ejemplo 30

Preparación de α -hidroxiácidos aromáticos (ilustrado mediante la preparación con ácido α -hidroxi- α -(2-bifenil)acético

Esquema V



Se colocó una disolución de CH_2Cl_2 (25 mL) y cloruro de oxalilo (2 mL, 21,16 mmol) en un matraz de fondo redondo de 100 mL mantenido bajo nitrógeno. Se agitó la disolución de cloruro de oxalilo a de -50 a -60°C . Se disolvió Me_2SO (2,5 mL, 35,82 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL). Se añadió el Me_2SO gota a gota a la disolución de cloruro de oxalilo agitada a de -50 a -60°C . Se agitó la mezcla de reacción durante 2 min. y se añadió el alcohol 2-fenilbencílico (16,28 mmol en 10 mL de CH_2Cl_2) en un plazo de 5 min.; se continuó la agitación durante 60 min. adicionales. Se añadió TEA (11,30 mL, 81,4 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 60 min. y después se dejó calentar a temperatura ambiente. Después se añadió agua (60 mL) y se volvió a extraer la fase acuosa con CH_2Cl_2 adicional (60 mL). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con disolución saturada de NaCl (120 mL), y se secaron sobre MgSO_4 anhidro. Se concentró la disolución filtrada en un evaporador rotatorio hasta sequedad. Se realizó la cromatografía sobre gel de sílice del aceite (hexanos:EtOAc 98:2) para dar 1.

Se agitó durante 20 minutos a 50°C una mezcla de 5,46 mmol de aldehído aromático (1) en 10 mL de CHCl_3 y β -ciclodextrinas (CD) (0,11 mmol) y cloruro de trietilbencilamonio (TEBA) (0,273 mmol) en un matraz equipado con un agitador magnético y un embudo de goteo. Después se añadió al matraz, gota a gota, con agitación, 10 g de hidróxido de sodio disueltos en 10 mL de agua. Tras la finalización de esta adición, se continuó la reacción durante 8 h con la temperatura mantenida a 50°C . Después se añadió suficiente agua destilada para disolver el precipitado formado durante la reacción, y la disolución resultante se lavó a fondo con éter, se ajustó a pH 3 con ácido clorhídrico diluido y se extrajo con 3 x 30 mL de éter. Se secó el extracto con sulfato de sodio anhidro, luego se evaporó hasta sequedad y el precipitado que quedaba se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice usando DCM:MeOH:AcOH (95:5:1) para dar 2.

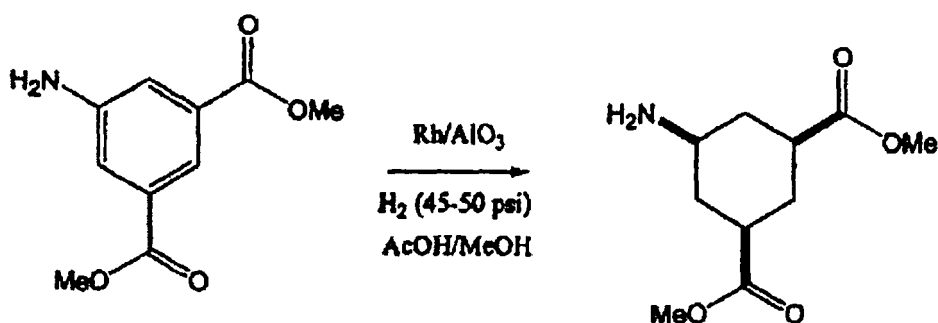
Los ejemplos 31 y 32 enumerados a continuación se refieren a la síntesis para grupos de ocupación de extremos N-terminal.

Ejemplo 31

Ciclohexildicarboxilato de 1-amino-3,5-cis,cis-dimetilo

Se añadió 5 g de rodio al 5% en alúmina a 10 g (47,85 mmol) de 5-isoftalato de dimetilo en 25 mL de ácido acético y 50 mL de metanol en una botella de alta presión, que se saturó con nitrógeno a 380 kPa y se agitó durante una semana de tiempo.

Esquema VI A



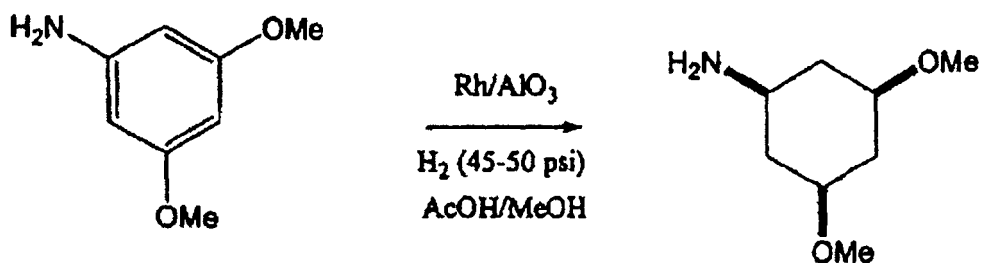
Después se filtró la mezcla a través de una capa gruesa de torta de celite y se enjuagó tres veces con metanol, se concentraron los disolventes y se trituró el sólido bruto con éter dietílico y se filtró de nuevo, lo que proporcionó ciclohexildicarboxilato de 1-amino-3,5-cis,cis-dimetilo, HPLC en fase inversa ha mostrado una pureza del 94,4%.

Ejemplo 32

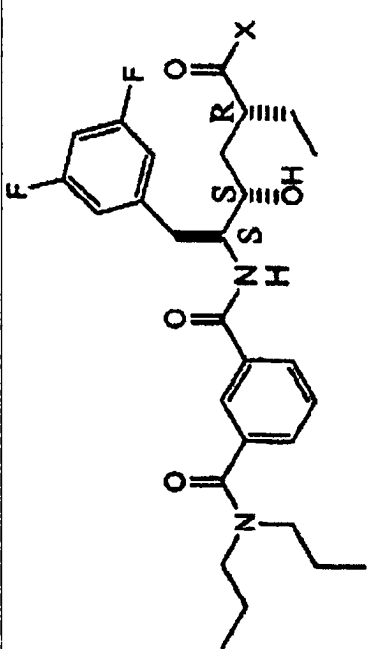
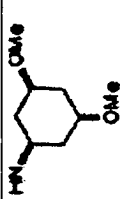
1-Amino-3,5-cis,cis-dimetoxiciclohexano

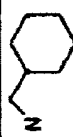
Se hicieron reaccionar 10 g (65,36 mmol) de 3,5-dimetoxianilina según se describió en el procedimiento anterior, y se proporcionó 1-amino-3,5-cis,cis-dimetoxiciclohexano.

Esquema VI B



Siguiendo el procedimiento general tal como se explicó en los ejemplos 14-22, y haciendo variaciones no críticas, se obtienen las siguientes aminas sustituidas de fórmula (XII). Estas aminas sustituidas de fórmula (XII) se recogen como ejemplos en las tablas 2, 3 y 4.

	Ejemplo	MH+	Extremo C-terminal (X)
N-[(1S,2S,4R)-1-(3,5-difluorobencil)-4-(sin,sin)-(3,5-dimetoxiciclohexilcarbamoil)-2-hidroxihexil]-N,N-dipropilisoftalamida	33	660, 4	
ácido 6-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]hexanoico	34	632	NH(CH ₂) ₅ CO ₂ H
ácido 5-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]pentanoico	35	618, 3	NH(CH ₂) ₄ CO ₂ H
ácido 4-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]-butírico	36	603, 7	NH(CH ₂) ₃ CO ₂ H

ácido	3-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]propiónico	37	590,3	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$
ácido	8-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]octanoico	38	660,4	$\text{NH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
éster metílico del ácido	8-[6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxihexanoilamino]octanoico	39	674,4	$\text{NH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{ Me}$
N-[4-(R)-butilcarbamoil-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxihexil]-N,N-dipropilisoftalamida		40	574,3	NHBu
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxihexil]-isobutilcarbamoil-hexil]-N,N-dipropilisoftalamida		41	574,5	NHiBu
N-[4-(R)-bencilcarbamoil-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxihexil]-N,N-dipropilisoftalamida		42	608,3	NHBn
N-[4-(R)-(ciclohexilmetil-carbamoil)-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxihexil]-N,N-dipropilisoftalamida		43	614,3	
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxihexil]-piperidin-1-carbonil]-N,N-dipropilisoftalamida		44	586,3	
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-4-(R)-(2-dimetilamino-etilcarbamoil)-2-(S)-hidroxihexil]-N,N-dipropil-isoftalamida		45	589,3	

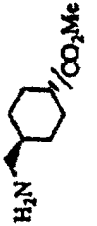
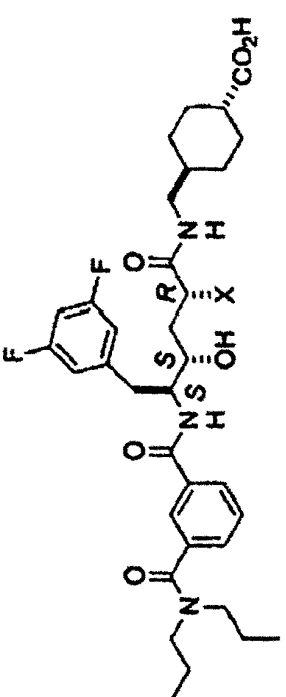
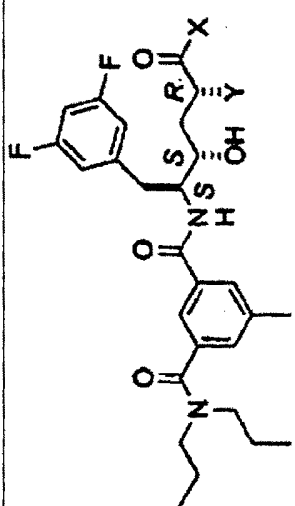
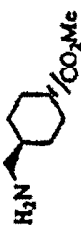
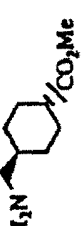
N-[4-(R)-(butil-metil-carbamoil)-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-hexil]-N,N-dipropilisoftalamida	46	588,1	
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-(3-hidroxi-propilcarbamoil)-hexil]-N,N-dipropilisoftalamida	47	576,3	
éster metílico del ácido 4-([6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxi-hexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	48	672,0	
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-4-(R)-(3-dimetilamino-propilcarbamoil)-2-(S)-hidroxi-hexil]-N,N-dipropilisoftalamida	49	608,0	

Tabla 3

	Ejemplo	MH ⁺	Extremo C-terminal (X)
	50	658, 4	Et
ácido 4-(anti)-([6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxi-hexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	51	644, 3	Me
ácido 4-(anti)-([6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-4-(S)-hidroxi-2-(R)-metil-hexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	52	672, 3	nPr
ácido 4-(anti)-([6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-4-(S)-hidroxi-2-(R)-propil-hexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	53	686, 3	iBu

ácido 4-(<i>anti</i>)-([6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(<i>S</i>)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-4-(<i>S</i>)-hidroxihexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	54	630,3	H
ácido 4-(<i>anti</i>)-([2-(<i>R</i>)-Bencil-6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(<i>S</i>)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-4-(<i>S</i>)-hidroxi-hexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	55	720,3	Bn

Tabla 4

				
Ejemplo	MH ⁺	X	Y	
ácido 4-(anti)-([6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-5-metil-benzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxi-hexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	56		Et	
éster metílico del ácido 4-(anti)-([6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(S)-(3-dipropilcarbamoil-5-metil-benzoilamino)-2-(R)-etil-4-(S)-hidroxi-hexanoilamino]-metil)-ciclohexanocarboxílico	57		Et	
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-(2-morfolin-4-il-etilcarbamoil)-pentil]-5-metil-N,N-	58		Me	

dipropilisoftalamida						
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-isobutilcarbamoil-pentil]-5-metil-N,N-dipropilisoftalamida	59	574, 3		Me		
N-[4-(R)-(2-dietilamino-etilcarbamoil)-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-pentil]-5-metil-N,N-dipropilisoftalamida	60	617, 3		Me		
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-[(tetrahydro-furan-2-ilmetil)-carbamoil]-pentil]-5-metil-N,N-dipropil-isoftalamida	61	602, 3		Me		
N-[4-(R)-(adamantan-2-ilcarbamoil)-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-pentil]-5-metil-N,N-dipropilisoftalamida	62	652, 3		Me		
N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-4-(R)-metil-5-morfolin-4-il-5-oxo-pentil]-5-metil-N,N-dipropilisoftalamida	63	588, 3		Me		
N-[4-(R)-bencilcarbamoil-1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(S)-hidroxi-pentil]-5-metil-N,N-dipropilisoftalamida	64	608, 3	NHBn	Me		

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

N-[1-(S)-(3,5-difluoro-bencil)-4-(R)-(4-fluoro-bencilcarbamoil)-2-(S)-hidroxi-pentil]-5-metil-N,N-dipropilisoftalamida	65	626,3	NH-(4-F)-Bn	Me
--	----	-------	-------------	----

Ejemplo 69

(1S)-2-(3,5-difluorofenil)-1-[(2R)-oxiranil]etilcarbamato de bencilo (VI)

- 5 Siguiendo el procedimiento general del ejemplo 17 y haciendo variaciones que no son críticas pero partiendo del alcohol (IV) (1S,2R)-3-cloro-1-(3,5-difluorobencil)-2-hidroxiopropilcarbamato de bencilo, se obtiene el compuesto del título.

Ejemplo 70

10 *Ensayo de inhibición enzimática*

- Se analizaron los compuestos de la invención para determinar la actividad inhibidora mediante el uso del ensayo MBP-C125. Este ensayo determina la inhibición relativa de la escisión por β -secretasa de un sustrato de APP modelo, MPB-C125SW, mediante los compuestos sometidos a ensayo en comparación con un control no tratado. Puede encontrarse una descripción detallada de los parámetros del ensayo, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. número 5.942.400. Brevemente, el sustrato es un péptido de fusión formado de una proteína de unión a maltosa (MBP) y los 125 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal de APP-SW, la mutación sueca. Se preparó β -secretasa de cerebro humano a partir de tejido cerebral humano concentrado, purificado parcialmente según se describe en Sindha y cols., 20 1999, Nature 402: 537-554 y se mantuvo en Triton al 0,20%. Alternativamente, se preparó la enzima de longitud completa recombinante (aminoácidos 1-501) a partir de células 293 que expresan la enzima transgénica.

- Se obtuvieron los datos de inhibición a partir de un ensayo ELISA que usa un anticuerpo de captura anti-MBP depositado sobre placas de alta unión de 96 pocillos recubiertos previamente y bloqueados, seguido por incubación con sobrenadante de la reacción enzimática diluido, incubación con el anticuerpo indicador biotinilado específico anti-SW192, e incubación con estreptavidina/fosfatasa alcalina. La escisión de la proteína de fusión MBP-C125SW intacta da como resultado la generación de un fragmento amino-terminal truncado, con el nuevo epítipo positivo para el anticuerpo SW-192 expuesto en el extremo carboxilo-terminal. Se efectuó la detección mediante una señal fluorescente del sustrato con la escisión por la fosfatasa. El ensayo ELISA sólo detectó la escisión tras Leu 596 en el sitio de mutación APP-SW 751 del sustrato.

Los compuestos se diluyeron en una serie de dilución 1:1 para dar una curva de concentración de seis puntos (dos pocillos por concentración) que tomó una fila de una placa de 96 pocillos por compuesto sometido a prueba.

35 *Procedimiento*

- Se pesó cada uno de los compuestos de prueba en un vial y se añadió DMSO hasta preparar una disolución 10 mM. Para obtener una concentración final de compuesto de 200 μ M en el punto más alto de una curva de dilución de 6 puntos, se añadieron 100 μ L de la disolución 10 mM a un pocillo C1 de una placa de fondo en V de 96 pocillos. Se añadieron cincuenta μ L de DMSO a los pocillos impares de la fila C a lo largo de la placa y se prepararon diluciones en serie 1:1. Se añadieron 10 μ L de cada dilución a cada uno de dos pocillos en la fila C de una placa de fondo en V correspondiente a la que se añadieron previamente 190 μ L de NaOAc 52 mM/DMSO al 7,9%, pH 4,5. La placa con compuesto diluido en NaOAc se centrifugó hasta obtener un sedimento precipitante y se transfirieron 20 μ L/pocillo a una placa de fondo plano correspondiente a la que se añadieron 30 μ L de mezcla de enzima-sustrato enfriada en hielo (2,5 μ L de sustrato MBP-C125SW, 0,03 μ L de enzima y 24,5 de TX100 al 0,09% enfriado en hielo por 30 μ L). Por tanto, la concentración de compuesto en la reacción enzimática final fue 50 veces inferior a la concentración de partida. La mezcla de reacción final de compuesto 200 μ M para el punto más alto de la curva era en DMSO al 5%, NaAc 20 mM, TX100 al 0,06%, a pH 4,5. Se inició la reacción enzimática calentando las placas hasta 37°C. Tras 90 minutos a 37°C, se añadieron 200 μ L/pocillo de diluyente de muestra frío para detener la reacción y se transfirieron 20 50 μ L/pocillo a una placa de ELISA recubierta con anticuerpo anti-MBP correspondiente para captura, que contenía 80 μ L/pocillo de diluyente de muestra. Esta reacción se incubó durante la noche a 4°C y el ensayo ELISA se reveló al día siguiente tras incubación de 2 h. con anticuerpo anti-192SW, seguido por conjugado de estreptavidina-FA y sustrato fluorescente. Se leyó la señal en un lector de placas fluorescentes.

55 *Resultados*

Se determinó la potencia relativa de la inhibición del compuesto calculando la concentración del compuesto que mostraba una reducción del cincuenta por ciento en la señal detectada (CI_{50}) comparado con la señal de la reacción enzimática en los pocillos de control sin compuesto añadido.

Con el fin de agrupar las actividades inhibidoras de los compuestos de la presente invención descritos en las tablas de datos de esta memoria descriptiva, las actividades inhibidoras se han clasificado según sus concentraciones CI_{50} , según el siguiente orden:

- 65 Grupo I: compuestos que tienen una CI_{50} inferior a 10 μ M;

Grupo II: compuestos que tienen una CI_{50} de desde 10 μ M hasta e incluyendo 100 μ M;

ES 2 275 675 T3

Grupo III: compuestos que tienen una CI_{50} de desde 100 μM hasta e incluyendo 200 μM ;

Grupo IV: compuestos que tienen una CI_{50} superior a 200 μM .

5 Ejemplo 71

Ensayo de inhibición sin células usando APP-KK

Se usó el sustrato de APP sintético, Biotin-KVEANY-EVEGERC(Oregon green)KK, que tiene biotina en el extremo N-terminal y se hizo fluorescente mediante la unión covalente de Oregon green en el residuo de Cys. Se usa la biotina en el extremo N-terminal para anclar el péptido a una placa de ensayo de sustrato. Se realizó la incubación en las siguientes condiciones: sustrato de APP 10 μM ; enzima 50 nM (hAsp2a), pH 4,5, 37°C, durante 2 horas. Se detectó la actividad de la enzima β -secretasa como la pérdida del fluoróforo Oregon green, en el lado opuesto al sitio de escisión desde que se libera el anclaje de biotina con la escisión del sustrato.

La incubación en presencia o ausencia del compuesto inhibidor demuestra la inhibición específica de la escisión enzimática por β -secretasa de su sustrato de APP.

20 Ejemplo 72

Inhibición de β -secretasa: ensayo P26-P4'SW

El sustrato P26-P4'sw es un péptido de la secuencia: (biotina)CGGADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVNLDAEF (ID SEC N°:1).

El patrón P26-P1 tiene la secuencia: (biotina)CGGADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVNL (ID SEC N°: 2).

Se prepararon los péptidos por Anaspec, Inc. (San José, CA) usando síntesis en fase sólida de boc-aminoácidos. Se acopló la biotina al sulfhidrilo de la cisteína terminal por Anaspec, Inc. tras la síntesis del péptido, usando EZ-link Iodoacetyl-LC-Biotin (Pierce). Se almacenaron los péptidos como disoluciones madre 0,8-1,0 mM en Tris 5 mM, con el pH ajustado a aproximadamente neutro (pH 6,5-7,5) con hidróxido de sodio.

Para el ensayo enzimático, la concentración de sustrato puede variar desde 0 - 200 μM . Específicamente para someter a prueba los compuestos para determinar la actividad inhibidora, la concentración de sustrato puede ser de 1,0 μM . Se añaden los compuestos que van a someterse a prueba en DMSO, con una concentración final de DMSO del 5%; en tales experimentos, los controles también recibieron DMSO al 5%. La concentración de enzima se varía, para dar concentraciones de producto en el intervalo lineal del ensayo ELISA (125 - 2000 pM, tras la dilución).

Estos componentes se incuban en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, Triton X-100 al 0,06%, a 37 grados C durante de 1 a 3 horas. Se diluyen las muestras 5 veces con diluyente de muestra (por ejemplo, cloruro de sodio 145,4 mM, fosfato de sodio 9,51 mM, azida de sodio 7,7 mM, Triton X-405 al 0,05%, albúmina de suero bovino 6 gm/litro, pH 7,4) para extinguir la reacción, luego se diluyen adicionalmente para el ensayo ELISA, según sea necesario.

Para el ensayo ELISA, se recubren placas de ensayo de 96 pocillos de alta unión Costar (Corning, Inc., Corning, NY) con anticuerpo monoclonal SW 192 del clon 16A7, o un clon de afinidad similar. Se diluyen los patrones P26-P1 con diluyente de muestra hasta una concentración final de 0 a 2 nM. Se incuban las muestras y los patrones diluidos (100 μL) en las placas con SW192 a 4 grados C durante 24 horas. Se lavan las placas 4 veces con tampón TTBS (cloruro de sodio 150 mM, Tris 25 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 7,5), luego se incuban con 0,1 mL/pocillo de estreptavidina-fosfato alcalino (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) diluido 1:3000 in con diluyente de muestra. Tras incubar durante una hora a temperatura ambiente, se lava la placa 4 veces con TTBS, y se incuba con disolución A de sustrato fluorescente (31,2 gm/litro de 2-amino-2-metil-1-propanol, 30 mg/litro, ajustado hasta pH 9,5 con HCl). Se leen los valores de fluorescencia tras 30 minutos.

Los compuestos que son inhibidores eficaces de la actividad β -secretasa demuestran una escisión reducida en comparación con un control.

Ejemplo 36

Ensayos que utilizan sustratos de oligopéptidos sintéticos

Se preparan oligopéptidos sintéticos que incorporan el sitio de escisión conocido de β -secretasa, y opcionalmente colas detectables, tales como restos fluorescentes o cromogénicos. Ejemplos de tales péptidos, así como sus métodos de producción y detección se describen en la patente admitida de los EE.UU. número: 5.942.400, incorporada al presente documento como referencia. Los productos de escisión pueden detectarse usando cromatografía líquida de alta resolución, o métodos de detección fluorescente o cromogénica apropiados para el péptido que vaya a detectarse, según métodos bien conocidos en la técnica.

ES 2 275 675 T3

A modo de ejemplo, un péptido de este tipo tiene la secuencia SEVNL DAEF (ID SEC N°: 3), y el sitio de escisión está entre los residuos 5 y 6. Otro sustrato preferido tiene la secuencia ADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVNLDAE F (ID SEC N°: 4), y el sitio de escisión está entre los residuos 26 y 27.

- 5 Estos sustratos de APP sintéticos se incuban en presencia de β -secretasa en condiciones suficientes para dar como resultado la escisión mediada por β -secretasa del sustrato. La comparación de los resultados de la escisión en presencia de los resultados del compuesto inhibidor con respecto a un control proporciona una medida de la actividad inhibidora del compuesto.

10 Ejemplo 73

Inhibición de la actividad β -secretasa - ensayo celular

- 15 Un ensayo a modo de ejemplo para el análisis de la inhibición de la actividad β -secretasa utiliza la línea celular de riñón embrionario humano HEKp293 (n° de registro ATCC CRL-1573) transfectada de manera estable con APP751 que contiene la doble mutación que se produce de manera natural Lys651Met52 a Asn651Leu652 (numerado para APP751), denominada comúnmente la mutación sueca y demuestra que sobreproduce $A\beta$ (Citron y cols., 1992, Nature 360:672-674). Se cultivaron en placas de 96 pocillos las células y en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma D-6546) que contenía suero bovino fetal al 10%. Tras establecerse las células (1 día tras el cultivo en placa), se incubaron las células en presencia/ausencia del compuesto inhibidor (diluido en DMSO) a la concentración deseada, generalmente desde 0,25 hasta 5,0 $\mu\text{g/mL}$, y con una concentración final de DMSO que oscila entre el 0,1 y el 0,5%. Tras incubación a 37° C durante dos horas, se aspira el medio de las células y se sustituye por compuesto nuevo durante una incubación de 2 horas adicionales. Al final del periodo de tratamiento, se centrifuga cada placa de células a 1100 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se analiza el medio condicionado para determinar la actividad β -secretasa mediante el análisis de la liberación del fragmento peptídico $A\beta$ en el medio de cultivo mediante inmunoensayo. Usando anticuerpos específicos para detectar el producto de escisión, por ejemplo, $A\beta$, se mide la actividad enzimática β -secretasa en presencia y ausencia de los compuestos inhibidores para demostrar la inhibición específica de la escisión mediada por β -secretasa del sustrato de APP.

30 Ejemplo 74

Inhibición de la actividad β -secretasa en células neuronales primarias y tejido cerebral fetal humano

- 35 Se somete a ensayo la inhibición de la actividad β -secretasa en células neuronales primarias en ratones y tejido cerebral fetal en seres humanos, tal como sigue.

Preparación de medios

- 40 Se complementa medio neuronal de ratón sin KCl con lo siguiente: 25 mL de suero bovino fetal (FBS, Sigma F-2422 o JRH Biosciences, 12103-78P), inactivado por calor durante 1 hora a 56°C; y 25 mL de complemento de Chang (Irvine Scientific C104). Las concentraciones finales en 500 mL de medio neuronal de ratón sin KCl son de FBS al 5%, complemento de Chang al 5%.

- 45 Se complementa el medio neuronal humano sin KCl con lo siguiente: 10 mL de disolución madre B27 50x (Gibco 17504-036). La concentración final en 500 mL de medio neuronal humano sin KCl es de 1x B27.

Preparación de placas de cultivo celular

- 50 Se diluye 1:10 una disolución de polietilenimina (PEI) (al 50% p/v, obtenida de Sigma, P-3143) con agua con calidad para cultivo tisular para dar una disolución diluida al 5% (p/v). La disolución diluida de PEI se esteriliza entonces por filtración, usando un filtro de 0,45 μm . La PEI esterilizada por filtración se diluye adicionalmente 1:100 con tampón borato de sodio (150 mM, pH 8,5, estéril) para obtener una disolución de trabajo al 0,05% (p/v).

- 55 Se preparan placas de cultivo celular (de fondo plano de 24 pocillos, Corning 25820, o de fondo plano de 6 pocillos, Corning 25810) para el cultivo tal como sigue. Se añade la disolución de trabajo de PEI en una cantidad de 300 $\mu\text{L/pocillo}$ en placas de 24 pocillos, o 1,5 mL/pocillo en placas de 6 pocillos para recubrir a aproximadamente 80 $\mu\text{g/cm}^2$. Se incuban las placas recubiertas durante la noche a temperatura ambiente. Luego, se aspiran las placas y se lavan dos veces con 500 $\mu\text{L/pocillo}$ (para placas de 24 pocillos) o 2,5 $\mu\text{L/pocillo}$ (para placas de 6 pocillos) de PBS (1X solución salina tamponada con fosfato, pH 7,5, estéril). Entonces se aspiran las placas y se incuban con medio neuronal sin KCl más PBS al 10% (500 $\mu\text{L/pocillo}$, 24 pocillos; o 2,5 mL/pocillo, 6-pocillos) a 37°C durante al menos una hora. Tras la incubación, las placas pueden usarse inmediatamente, almacenarse en condiciones estériles a 37°C durante hasta una semana (el medio debe desecharse antes de la siembra).

Preparación de cultivos corticales de ratón PDAPP

- 65 Se aparean ratones hembra Swiss Webster, de tipo natural con ratones macho PDAPP homocigóticos. De dieciséis a diecisiete días después del apareamiento, se sacrifican las hembras preñadas mediante asfixia con dióxido de carbono. En condiciones estériles, se extraen los fetos y se decapitan. Se extraen los cerebros y se diseccionan las cortezas

ES 2 275 675 T3

cerebrales del resto del tejido cerebral usando un microscopio de disección. Se transfieren los tejidos corticales a una placa de cultivo tisular de 35 mm (Coming 25000) que contiene solución salina tamponada de Hank enfriada en hielo (HBSS, Sigma H9269).

- 5 Se reúnen los tejidos corticales de diez cerebros de ratón transfiriéndolos a un tubo cónico de polipropileno de 50 mL (Falcon 2070), y se lavan dos veces con 25 mL de HBSS frío. Se resuspenden los tejidos en 5 mL de CMF-HBSS frío (HBSS sin calcio ni magnesio, Sigma H-9394) más 0,5 mL de disolución madre de ADNasa (Sigma D-4527, 1 mg/mL en CMF-HBSS) para producir una concentración final de ADNasa de aproximadamente 100 µg/mL. Se tritura el tejido con una pipeta de 5 mL hasta que la suspensión se vuelve homogénea (aproximadamente 20-30
10 veces). Se centrifuga la suspensión celular en una centrífuga clínica durante tres minutos a aproximadamente 600 x g. Se resuspende el sedimento celular en 2,5 mL de tripsina-EDTA (1X tripsina-EDTA, Sigma T-3924), y se incuba a 37°C durante cinco minutos.

- 15 Se añade medio neuronal más FBS al 10% (Sigma F-2422 o JRH Biosciences 12103-78P) en una cantidad de 10 mL a 1 mL de disolución madre de ADNasa. Se mezcla suavemente la disolución y se incuba a temperatura ambiente durante tres minutos. Se filtra la suspensión celular mediante su paso a través de un tamiz de nylon estéril (100 µm de tamaño de poro, Falcon 2360). Se centrifuga el filtrado en una centrífuga clínica durante tres minutos a aproximadamente 600 x g.

- 20 Se recubre el sedimento celular y se resuspende en 5 mL de medio de ratón completo, preparado según se describió anteriormente. Se cuentan las células con un hemocitómetro mezclando 50 µL de suspensión celular con 450 µL de disolución de azul tripano (al 0,4%, Sigma T-8154). Se diluyen las células hasta $1,2 \times 10^6$ células/mL con medio de ratón. Entonces se cultivan en placas las células con 0,5 mL/pocillo en placas de 24 pocillos recubiertas con PEI, preparadas según se describió anteriormente. Se alimentan los cultivos dos veces a la semana para el intercambio
25 completo de los medios.

Preparación de cultivos corticales fetales humanos

- 30 Se obtiene tejido cerebral fetal humano de Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA). Se usa el tejido cerebral fetal inmediatamente tras su recogida, y se realiza el trabajo en una campana de clase II. Se procesa el tejido identificando la corteza cerebral y eliminando todas las trazas de las meninges con pinzas estériles.

- 35 Se reúnen los tejidos corticales transfiriéndolos a un tubo cónico de 50 mL. Entonces se lavan dos veces los tejidos corticales reunidos con 25 mL de HBSS frío. Luego, se resuspenden los tejidos en 10 mL de CMF-HBSS frío (Sigma H-9394) más 1 mL de disolución madre de ADNasa (Sigma D-4527) para producir aproximadamente una concentración final de ADNasa de 100 µg/mL. Se tritura el tejido con una pipeta de 10 mL hasta que la suspensión se vuelve homogénea (aproximadamente 20-30 veces). Se centrifuga la suspensión celular en una centrífuga clínica durante tres minutos a aproximadamente 600 x g. Se resuspende el sedimento celular en 10 mL de tripsina-EDTA (1X tripsina-EDTA, Sigma T-3924), y se incuba a 37°C durante cinco minutos. Se añade medio neuronal más FBS al 10%
40 en una cantidad de 10 mL a 1 mL de disolución madre de ADNasa. Se mezcla suavemente la disolución y se incuba a temperatura ambiente durante tres minutos.

- 45 Entonces, se filtra la suspensión celular mediante su paso a través de un tamiz de nylon estéril (según se describió anteriormente). Luego, se centrifuga el filtrado como anteriormente. Se resuspende el sedimento celular en 5 mL de medio humano (preparado según se describió anteriormente). Se cuentan las células con un hemocitómetro mezclando 50 µL de suspensión celular con 450 µL de disolución de azul tripano. Se diluyen las células hasta $1,2 \times 10^6$ células/mL con medio completo (preparado según se describió anteriormente). Entonces se cultiva en placas la suspensión celular con 2 mL/pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con PEI, preparadas según se describió anteriormente.
50

No se perturban las células durante la primera semana. Tras ese tiempo, se alimentan los cultivos dos veces a la semana mediante intercambio completo de los medios.

Ensayos de Aβ de cultivo neuronal

- 55 Se incuban cultivos maduros con 300 µL/pocillo (ratón) o 750 µL/pocillo (ser humano) de medio nuevo durante 24 horas para generar valores iniciales de Aβ. Se recogen y almacenan a -20°C los medios condicionados hasta que se someten a ensayo.

- 60 Entonces, se tratan los cultivos con 300 µL/pocillo (ratón) o 750 µL/pocillo (ser humano) de medio nuevo que contiene el compuesto en el intervalo deseado de concentraciones durante 24 horas. Se recogen y almacenan a -20°C los medios condicionados hasta que se someten a ensayo.

- 65 Para las mediciones de Aβ total y las mediciones de Aβ₁₋₄₂, se analizan 100 µL/pocillo mediante ensayo ELISA. Se determina la inhibición de la producción tanto para Aβ total como para Aβ₁₋₄₂ mediante la diferencia entre los valores de Aβ para los periodos inicial y de tratamiento con compuesto. Se representan las curvas de dosis-respuesta como la inhibición en porcentaje frente a la concentración de compuesto.

ES 2 275 675 T3

Al final de este periodo de tratamiento, se somete a prueba la viabilidad celular mediante el ensayo de citotoxicidad MTT. Tras eliminarse el medio condicionado de las placas con células para la medición de $A\beta$ mediante ensayo ELIA, se añaden 25 μ L de disolución madre de MTT (Sigma M-5655 a 5 mg/mL en 1x PBS, se toma una alícuota y se almacena -20°C) a todos los pocillos. Se incuban las placas con células a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 1 hora. Se añade tampón de lisis MTT en una cantidad de 125 μ L a cada pocillo, y se sitúan las placas en un agitador de placas de titulación en una posición baja durante la noche. Se leen las placas en un lector de microplacas a 562-650 nm. Se calcula la viabilidad celular mediante el porcentaje de densidad óptica (DO) de las células de control.

Ejemplo 75

Inhibición de β -secretasa en modelos de animales de EA

Pueden usarse varios modelos de animales para detectar la inhibición de la actividad β -secretasa. Ejemplos de modelos de animales útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, ratón, cobaya, y similares. Los animales usados pueden ser modelos de tipo natural, transgénicos o deficientes ("knockout"). Se describen ejemplos de modelos de mamíferos no humanos transgénicos en las patentes de los EE.UU. números 5.912.410 y 5.811.633. Además, los modelos de mamíferos pueden expresar mutaciones en APP, tales como APP695-SW y similares descritas en el presente documento.

Se administra a los animales una cantidad del compuesto inhibidor formulado apropiadamente en PBS. Los animales de control no se tratan o se tratan con un compuesto inactivo. Se repite la administración diaria durante un periodo de días. Empezando en el día 0, se obtiene tejido o líquido cerebral de animales seleccionados y se analiza para determinar la presencia de péptidos de escisión de APP, incluyendo $A\beta$, usando los anticuerpos específicos frente a $A\beta$. Al final del periodo de prueba, se sacrifican los animales y se analiza el tejido o líquido cerebral para determinar la presencia de placas de beta-amiloide y/o $A\beta$. También se analiza el tejido para determinar necrosis.

Se espera que los animales a los que se les administran los compuestos inhibidores demuestren una reducción de $A\beta$ en los tejidos y líquidos cerebrales y una reducción de las placas de beta-amiloide en el tejido cerebral, en comparación con los controles no tratados.

Ejemplo 76

Inhibición de la producción de $A\beta$ en pacientes humanos

Los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer (EA) demuestran un aumento de la cantidad de $A\beta$ en el cerebro. A los pacientes con EA se les administra una cantidad del compuesto inhibidor diluido en PBS. Se repite diariamente la administración en la duración del periodo de prueba. Comenzando en el día 0, se realizan pruebas cognitivas y de memoria una vez a la semana.

Se espera que los pacientes a los que se les administran los compuestos inhibidores demuestren puntuaciones cognitivas y de memoria que se ralentizan y/o estabilizan en comparación con los pacientes no tratados.

Ejemplo 77

Prevención de la producción de $A\beta$ en pacientes en riesgo de desarrollar EA

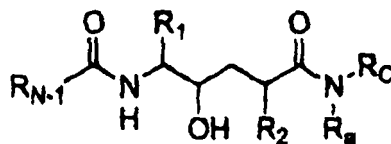
Se identifican los pacientes predispuestos o en riesgo de desarrollar EA mediante el reconocimiento de un patrón de herencia familiar, por ejemplo, la presencia de la mutación sueca, y/o monitorizando parámetros de diagnóstico. A los pacientes identificados como predispuestos o en riesgo de desarrollar EA se les administra una cantidad del compuesto inhibidor diluido en PBS. Se repite diariamente la administración en la duración del periodo de prueba. Comenzando en el día 0, se realizan pruebas cognitivas y de memoria una vez al mes.

Se espera que los pacientes a los que se les administran los compuestos inhibidores demuestren puntuaciones cognitivas y de memoria que permanecen estables en comparación con los pacientes no tratados.

Esta invención se ha descrito con respecto a diversos ejemplos y realizaciones específicos.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en el que R_1 es:

(I) alquilo C_1-C_6 , sustituido o no sustituido con uno, dos o tres alquilo C_1-C_3 , -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -NH₂, -C≡N, -CF₃, o -N₃,

(II) -(CH₂)₁₋₂-S-CH₃,

(III) -CH₂-CH₂-S-CH₃,

(IV) -CH₂-(alquenilo C_2-C_6) sustituido o no sustituido por un -F,

(V) -(CH₂)₀₋₃-(R_{1-arilo}) en el que R_{1-arilo} es fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, indanilo, indenilo, dihidronaftilo, tetralinilo no sustituido o sustituido independientemente en el anillo de arilo con uno o dos de alquilo C_1-C_3 , -CF₃, -F, Cl, -Br, -I, alcoxilo C_1-C_3 , -O-CF₃, -NH₂, -OH, o -C≡N;

R_2 es:

(I) -H,

(II) alquilo C_1-C_6 , o

(III) -(CH₂)₀₋₄-R₂₋₁ en el que R₂₋₁ es cicloalquilo (C_3-C_6), R_{1-arilo} en el que R_{1-arilo} es según se definió anteriormente;

R_{N-1} es fenilo que está sustituido independientemente con uno, dos, tres o cuatro de R₁₀₀ en el que R₁₀₀ es

(1) alquilo C_1-C_6 ,

(2) -F, -Cl, -Br, o -I,

(3) -OH,

(4) -NO₂,

(5) -CO-OH,

(6) -C≡N,

(7) -CO-NR_{N-2}R_{N-3} en el que R_{N-2} y R_{N-3} son iguales o diferentes y son:

(a) -H,

(b) -alquilo C_1-C_6 no sustituido o sustituido con un -OH o -NH₂,

(c) -alquilo C_1-C_6 no sustituido o sustituido con de uno a tres -F, -Cl, -Br, o -I,

(d) -cicloalquilo C_3-C_7 ,

(e) -(alquil C_1-C_2)-(cicloalquilo C_3-C_7),

(f) -(alquil C_1-C_6)-O-(alquilo C_1-C_3),

(g) -alquenilo C_1-C_6 con uno o dos dobles enlaces,

(h) -alquinilo C_1-C_6 con uno o dos triples enlaces,

ES 2 275 675 T3

(i) cadena de alquilo C_1-C_6 con un doble enlace y un triple enlace,

(8) $-CO-(\text{alquilo } C_3-C_{12})$,

(9) $-CO-(\text{cicloalquilo } C_3-C_6)$,

(11) $-CO-R_{1-\text{heterociclo}}$ en el que $R_{1-\text{heterociclo}}$ es morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido de tiomorfolinilo, S,S-dióxido de tiomorfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, tetrahidrofuranilo, o tetrahidrotiofenilo, en el que el grupo $R_{1-\text{heterociclo}}$ está unido mediante cualquier átomo del grupo $R_{1-\text{heterociclo}}$ original sustituido por hidrógeno de tal forma que el nuevo enlace al grupo $R_{1-\text{heteroalilo}}$ sustituye al átomo de hidrógeno y su enlace, en el que el heterociclo no está sustituido o está sustituido con uno o dos $=O$, alquilo C_1-C_3 , $-CF_3$, $-F$, Cl , $-Br$, $-I$, alcóxido C_1-C_3 , $-OCF_3$, $-NH_2$, $-OH$, o $-C\equiv N$,

(12) $-CO-R_{N-4}$ en el que R_{N-4} es morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo, piperidinilo o pirrolidinilo en el que cada grupo no está sustituido o está sustituido con uno o dos alquilo C_1-C_3 ,

(13) $-CO-O-R_{N-5}$ en el que R_{N-5} es:

(a) alquilo C_1-C_6 , o

(b) $-(CH_2)_{0-2}-(R_{1-\text{arilo}})$ en el que $R_{1-\text{arilo}}$ es según se definió anteriormente,

(14) $-SO_2-NR_{N-2}R_{N-3}$ en el que R_{N-2} y R_{N-3} son según se definieron anteriormente,

(15) $-SO-(\text{alquilo } C_1-C_8)$,

(16) $-SO_2-(\text{alquilo } C_3-C_{12})$,

(17) $-NH-CO-O-R_{N-5}$ en el que R_{N-5} es según se definió anteriormente,

(18) $-NH-CO-N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$,

(19) $-N-CS-N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$,

(20) $-N(\text{alquil } C_1-C_3)-CO-R_{N-5}$ en el que R_{N-5} es según se definió anteriormente,

(21) $-NR_{N-2}R_{N-3}$ en el que R_{N-2} y R_{N-3} pueden ser iguales o diferentes y son según se definieron anteriormente,

(22) $-R_{N-4}$ en el que R_{N-4} es según se definió anteriormente,

(23) $-O-CO-(\text{alquilo } C_1-C_6)$,

(24) $-O-CO-N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$,

(25) $-O-CS-N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$,

(26) $-O-(\text{alquilo } C_1-C_6)$,

(27) $-O-(\text{alquil } C_2-C_5)-COOH$,

(28) $-S-(\text{alquilo } C_1-C_6)$,

(29) alquilo C_1-C_6 no sustituido o sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 $-F$,

(30) $-O-(\text{alquilo } C_1-C_6)$ no sustituido o sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 $-F$, o

(31) $-O-\varphi$;

R_a es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 ;

R_c es

(1) R_{CH} en el que R_{CH} es morfolinilo, tiomorfolinilo, S-óxido de tiomorfolinilo, S,S-dióxido de tiomorfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, tetrahidrofuranilo, o tetrahidrotiofenilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con oxo, alquilo C_1-C_3 , $-CF_3$, $-F$, Cl , $-Br$ o $-I$, alcóxido C_1-C_3 , $-O-CF_3$, $-NH_2$, $-OH$, o $-C\equiv N$;

(2) R_{CY} en el que R_{CY} es piridinilo, pirimidinilo, quinolinilo, indenilo, indanilo, benzotiofenilo, indolilo, indolinilo, piridazinilo, pirazinilo, isoindolilo, isoquinolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, indazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, indolizínilo, indazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, 1,4-benzodioxanilo, purinilo, oxazolopiridinilo, imidazopiridinilo, isotiazolilo, naftiridinilo, cinolinilo, carbazolilo, β -carbolinilo, isocromanilo, cromanilo, furazanilo, tetrahidroisoquinolina, isoindolinilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienilo, isobenzotiofenilo, benzoxazolilo, o piridopiridinilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con alquilo C_1-C_3 , $-CF_3$, $-F$, Cl , $-Br$, o I , alcoxilo C_1-C_3 , $-O-CF_3$, $-NH_2$, $-OH$, o $-C\equiv N$;

(3) alquil (C_1-C_{10})- R_{CH} ;

(4) alquil (C_1-C_{10})- R_{CY} ; o

(5) alquil (C_1-C_{10})- K_{1-3} en el que:

(A) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con un $-OH$,

(B) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con un alcoxilo C_1-C_6 no sustituido o sustituido con 1-5 $-F$,

(D) la cadena de alquilo no está sustituida o está sustituida con 1-5 $-F$

(F) cada K es:

(1) H ,

(2) alquilo C_1-C_3 ,

(3) alcoxilo C_1-C_3 ,

(4) alquiltioxilo C_1-C_3 ,

(5) alquilacilamino C_1-C_6 ,

(6) alquilaciloxilo C_1-C_6 ,

(7) amido

(8) alquilamino C_1-C_6

(9) fenilamino,

(10) carbamilo

(11) carboxilo

(12) carboxialcoxilo (C_2-C_5),

(13) carboxialquiltioxilo (C_2-C_5),

(16) amino no sustituido o sustituido con alquilo C_1-C_6 ,

(17) hidroxilo, o

(18) éster carboxi-metílico.

2. Compuesto según la reivindicación 1, que es:

N-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-4-(*R*)-(piperidin-1-carbonil)-hexil]-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

N-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-4-(*R*)-(2-morfolin-4-il-etilcarbamoil)-pentil]-5-metil-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

N-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-4-(*R*)-[(tetrahydro-furan-2-ilmetil)-carbamoil]-pentil]-5-metil-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

N-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-4-(*R*)-metil-5-morfolin-4-il-5-oxo-pentil]-5-metil-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

ES 2 275 675 T3

N-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-4-(*R*)-[(furan-2-ilmetil)-carbamoil]-2-(*S*)-hidroxipentil]-5-metil-*N,N*-dipropil-isoftalamida.

3. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en combinación con un
5 vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. Uso del compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o de la composición farmacéutica en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

10 5. Compuesto según la reivindicación 1, que es:

N-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-4-(*R*)-isobutilcarbamoil-pentil]-5-metil-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

15 ácido 3-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(*S*)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(*R*)-etil-4-(*S*)-hidroxihexanoilamino]-propiónico;

ácido 8-[6-(3,5-difluorofenil)-5-(*S*)-(3-dipropilcarbamoilbenzoilamino)-2-(*R*)-etil-4-(*S*)-hidroxihexanoilamino]-octanoico;

20 éster metílico del ácido 8-[6-(3,5-difluoro-fenil)-5-(*S*)-(3-dipropilcarbamoil-benzoilamino)-2-(*R*)-etil-4-(*S*)-hidroxi-hexanoilamino]-octanoico;

N-[4-(*R*)-butilcarbamoil-1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-hexil]-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

25 *N*-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-4-(*R*)-isobutilcarbamoil-hexil]-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

N-[4-(*R*)-bencilcarbamoil-1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-hexil]-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

N-[4-(*R*)-(ciclohexilmetil-carbamoil)-1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-hexil]-*N,N*-dipropil-isoftalamida;

30 *N*-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-2-(*S*)-hidroxi-4-(*R*)-(piperidin-1-carbonil)-hexil]-*N,N*-dipropil-isoftalamida; o

N-[1-(*S*)-(3,5-difluoro-bencil)-4-(*R*)-(2-dimetilamino-etilcarbamoil)-2-(*S*)-hidroxi-hexil]-*N,N*-dipropil-isoftalamida.

35

40

45

50

55

60

65