



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 690**

51 Int. Cl.:
C07D 311/56 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05733799 .0**
96 Fecha de presentación : **08.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1735296**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **Materiales y métodos para tratar trastornos de coagulación.**

30 Prioridad: **08.04.2004 US 561121 P**
08.04.2004 US 822129

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2010

73 Titular/es: **Aryx Therapeutics**
6300 Dumbarton Circle
Fremont, California 94555, US

72 Inventor/es: **Druzgala, Pascal y**
Becker, Cyrus

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 340 690 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).

ES 2 340 690 T3

DESCRIPCIÓN

Materiales y métodos para tratar trastornos de coagulación.

5 Antecedentes de la invención

La warfarina (cumarina) es un anticoagulante que actúa inhibiendo factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Los compuestos a base de warfarina son, normalmente, derivados de 4-hidroxicumarina, tales como 3-(α -acetoniobencil)-4-hidroxicumarina (COUMADIN). COUMADIN y otros anticoagulantes de cumarina inhiben la síntesis de factores de coagulación dependientes de la vitamina K, que incluyen los factores II, VII, IX y X. Las proteínas anticoagulantes C y S se inhiben también por anticoagulantes de warfarina. Se cree que la warfarina interfiere con la síntesis de factores de coagulación inhibiendo la vitamina K epóxido reductasa, inhibiendo de ese modo la regeneración de la vitamina K.

Generalmente se observa un efecto de anticoagulación aproximadamente 24 horas tras la administración de una única dosis de warfarina y es eficaz durante de 2 a 5 días. Aunque los anticoagulantes no tienen un efecto directo sobre un trombo creado y no invierten el daño tisular isquémico, el tratamiento con anticoagulantes está destinado a evitar la extensión de coágulos formados y/o evitar complicaciones tromboembólicas secundarias. Estas complicaciones pueden dar como resultado secuelas graves y posiblemente mortales.

La FDA ha aprobado la warfarina para las siguientes indicaciones: 1) el tratamiento o la profilaxis de trombosis venosa y embolia pulmonar, 2) complicaciones tromboembólicas asociadas con fibrilación auricular y/o sustitución de válvula cardíaca, y 3) reducción del riesgo de fallecimiento, infarto de miocardio recurrente y accidente cerebrovascular o embolia sistémica tras infarto de miocardio.

Varios efectos adversos están asociados con la administración de warfarina. Éstos incluyen hemorragia mortal o no mortal de cualquier tejido u órgano y complicaciones hemorrágicas tales como parálisis. Otros efectos adversos incluyen parestesia que incluye sensación de frío y escalofríos; cefalea; dolor de pecho, abdominal, articular, muscular u otro dolor; mareo; disnea; dificultad para respirar o tragar; hipotensión, debilidad, sudoración idiopática o choque idiopático. Otras reacciones adversas notificadas incluyen reacciones de hipersensibilidad/alérgicas, microembolia de colesterol sistémica, síndrome de dedos púrpura, hepatitis, lesión hepática colestásica, ictericia, enzimas del hígado elevadas, vasculitis, edema, fiebre, exantema, dermatitis, incluyendo erupciones ampollosas, urticaria, dolor abdominal incluyendo cólicos, flatulencia/hinchazón, fatiga, letargo, malestar, astenia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor, cefalea, mareo, disgeusia, prurito, alopecia e hipersensibilidad al frío.

La toxicidad de fármacos es una consideración importante en el tratamiento de seres humanos y animales. Los efectos secundarios tóxicos que resultan de la administración de fármacos incluyen una variedad de estados que van desde febrícula hasta la muerte. El tratamiento con fármacos se justifica sólo cuando los beneficios del protocolo de tratamiento son mayores que los posibles riesgos asociados con el tratamiento. Los factores sopesados por el médico incluyen el impacto cualitativo y cuantitativo del fármaco que va a usarse así como el desenlace resultante si no se administra el fármaco al individuo. Otros factores considerados incluyen el estado físico del paciente, el estadio de enfermedad y su historial de progresión y cualquier efecto adverso conocido asociado con un fármaco.

La eliminación del fármaco es el resultado de la actividad metabólica sobre el fármaco y la posterior excreción del fármaco del organismo. La actividad metabólica puede tener lugar dentro del suministro vascular y/o dentro de órganos o compartimentos celulares. El hígado es un sitio principal del metabolismo de fármacos. El proceso metabólico puede degradarse en metabolismo primario y secundario, también denominado metabolismo de fase 1 y de fase 2. En el metabolismo de fase 1, el fármaco se altera químicamente mediante oxidación, reducción, hidrólisis o cualquier combinación de los procesos mencionados anteriormente y habitualmente proporciona un producto más polar que el fármaco original. En el metabolismo de fase 2, los productos de la reacción de fase 1 se combinan con sustratos endógenos, por ejemplo, ácido glucurónico, para proporcionar un producto de adición o de conjugación que es incluso más hidrófilo que el producto de fase 1 y que se elimina fácilmente en la bilis o en la orina. En algunos casos, un fármaco puede experimentar sólo metabolismo de fase 2 (conjugación), en otros casos un fármaco puede eliminarse sin modificar. La primera etapa en tales reacciones sintéticas es con frecuencia una conjugación oxidativa realizada mediante el sistema citocromo (CYP450). Los metabolitos formados en reacciones de fase 2 son normalmente el producto de una reacción de conjugación realizada mediante una enzima transferasa. Estas reacciones incluyen glucuronidación, conjugación de aminoácidos, acetilación, sulfoconjugación y metilación.

Las enzimas citocromo P450 (CYP450) de mamífero, incluyendo CYP450 humano, son proteínas que contienen un grupo hemo unidas a la membrana que se descubrieron originariamente en microsomas de hígado de rata. Con el fin de funcionar, las enzimas CYP450 necesitan una fuente de electrones. Existen dos clases diferentes de cadenas de transferencia de electrones para los CYP450. Éstas dependen de la ubicación de la enzima en la célula. Algunos P450 se encuentran en la membrana interna mitocondrial y algunos se encuentran en el retículo endoplasmático (RE). La proteína que dona electrones a los CYP450 en el RE se denomina NADPH citocromo P450 reductasa. La ferredoxina es el donador inmediato de electrones para los CYP450 en la mitocondria (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP24, CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1). NADPH es la fuente de electrones que fluye desde la ferredoxina reductasa hasta la ferredoxina y luego al CYP450. Algunos P450 pueden aceptar también electrones del citocromo b5.

ES 2 340 690 T3

Polimorfismos (diferencias en la secuencia de ADN halladas en el 1% o superior de una población) pueden conducir a diferencias en el metabolismo de fármacos, de modo que son características importantes de los genes de CYP450 en seres humanos. El CYP2C19 tiene un polimorfismo que cambia la capacidad de la enzima para metabolizar mefenitoína (un fármaco marcador). En personas caucásicas, el polimorfismo para el fenotipo metabolizador lento sólo se observa en el 3% de la población. Sin embargo, se observa en el 20% de la población asiática. Debido a esta diferencia, es importante ser consciente de la raza de una persona cuando se administran fármacos que se metabolizan de manera diferente por poblaciones diferentes. Algunos fármacos que tienen un intervalo estrecho de dosis eficaz antes de volverse tóxicos podrían sobredosificarse en un metabolizador lento.

El CYP2D6 es quizás el P450 mejor estudiado con un polimorfismo de metabolismo de fármacos. Esta enzima es responsable de oxidaciones de más de 70 fármacos diferentes. Puesto que puede que no haya otro modo de eliminar estos fármacos del sistema, los metabolizadores lentos pueden correr un grave riesgo de reacciones adversas a fármacos. Los sustratos de CYP2D6 incluyen antiarrítmicos (flecainida, mexiletina, propafenona), antidepresivos (amitriptilina, paroxetina, venlafaxina, fluoxetina, trazadona), antipsicóticos (clorpromazina, haloperidol, tioridazina), beta-bloqueantes (labetalol, timolol, propanolol, pindolol, metoprolol), analgésicos (codeína, fentanilo, meperidina, oxicodona, propoxifeno) y muchos otros fármacos. El CYP2E1 se induce en los alcohólicos. Existe un polimorfismo asociado con este gen que es más común en los chinos.

La subfamilia CYP3A es una de las familias más importantes de metabolización de fármacos en seres humanos. El CYP3A4 es “el CYP450 expresado más abundantemente en el hígado humano”. (Arch. Biochem. Biophys. 369, 11-23 1999) Se sabe que el CYP3A4 metaboliza más de 120 fármacos diferentes, por ejemplo, acetaminofeno, codeína, ciclosporina A, diazepam, eritromicina, lidocaína, lovastatina, taxol, cisaprida, terfenadina y warfarina, por nombrar algunos.

El número de reacciones adversas a fármacos (ADR) en Los Estados Unidos ha ascendido drásticamente en los últimos años y ahora representa un problema de salud nacional crítico. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define una ADR como “una respuesta a un fármaco que es nociva e imprevista y que se produce normalmente a dosis usadas normalmente en el hombre para la profilaxis, el diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad, o para la modificación de una función fisiológica”. Para destacar la importancia del error en el origen de las ADR y el hecho de que la mayoría (30-80%) de las ADR pueden evitarse, una definición más reciente de una ADR es “una reacción perceptiblemente dañina o desagradable, que resulta de una intervención relacionada con el uso de una especialidad farmacéutica, que predice el peligro de una futura administración y garantiza la prevención o el tratamiento específico, o la alteración del régimen de dosificación, o la retirada del producto”.

Debido a que las ADR son una fuente principal de morbilidad y mortalidad en nuestro sistema sanitario, reducir la incidencia de las ADR se ha convertido en una prioridad nacional (FDA, Center for Drug Evaluation and Research (Centro para la evaluación e investigación de fármacos)). Según cálculos formales, cada año se producen más de 2,5 millones de ADR en hospitales, unidades para pacientes en consulta externa y residencias de ancianos, dando como resultado más de 106.000 muertes y teniendo un coste para la economía estadounidense de 136 mil millones de dólares anuales en morbilidad relacionada con fármacos. Este gasto es mayor que el coste anual de enfermedad cardiovascular y diabetes en Los Estados Unidos. Además, la tasa de mortalidad calculada asociada con las ADR hace de ellas la cuarta causa principal de muerte en este país.

Muchas ADR surgen del hecho de que la mayoría de los fármacos desarrollados por la industria farmacéutica interactúan significativamente con componentes del sistema CYP, o bien basándose en ellos para su metabolismo y/o bien inhibiendo o induciendo diversas fracciones del CYP. En otras palabras, debido a que tantas clases de fármacos importantes (por ejemplo, antihipertensores, antihistamínicos, antidepresivos, inmunosupresores, estatinas) interactúan con el sistema CYP, éste puede actuar como “cuello de botella” para el metabolismo seguro y la eliminación de estos agentes y puede conducir a efectos tóxicos. Con respecto al metabolismo de fármacos, dos fracciones del sistema CYP merecen especial mención: CYP3A4 y CYP2D6. Aproximadamente una mitad de todos los fármacos conocidos interactúan con CYP3A4. Asimismo CYP2D6, una fracción enzimática cuya actividad depende mucho de la genética (polimorfismos genéticos), metaboliza un tercio de los fármacos de uso clínico. Estas dos enzimas están implicadas en el metabolismo de compuestos similares a warfarina.

La inmensa mayoría (70-90%) de las ADR se producen como extensiones de sus efectos farmacológicos esperados (farmacología exagerada). Esto es particularmente relevante para el uso de warfarina puesto que la extensión del efecto farmacológico de la warfarina es la hemorragia. Aunque muchos factores diferentes pueden contribuir al desarrollo de las ADR, un metabolismo de fármacos alterado que conduce a niveles elevados del fármaco, o bien debido a interacciones del fármaco a nivel enzimático, alteraciones genéticas en la actividad enzimática, y/o bien disfunción de órganos (hígado, riñón), desempeña un papel particularmente importante en el origen de las ADR.

El tratamiento con fármacos usando warfarina es particularmente difícil debido a que el metabolismo de la warfarina es complejo y está sometido a interacciones con una gran cantidad de otros fármacos, incluyendo fármacos que se recetan comúnmente en pacientes que padecen fibrilación auricular, tal como amiodarona, por ejemplo. La warfarina es una mezcla de enantiómeros que tienen diferentes actividades intrínsecas en la enzima vitamina K epóxido reductasa (VKER). Estos enantiómeros tienen diferentes rutas metabólicas que usan diferentes isoenzimas CYP450. El sistema metabólico CYP450 puede inducirse o reprimirse mucho mediante una gran cantidad de factores externos tales como la dieta y otras medicaciones. Además, el sistema CYP450 está sometido a muchas variaciones genéticas y

tiene una baja capacidad y puede saturarse fácilmente. Por estos motivos, el metabolismo de la warfarina está sometido a variaciones impredecibles y cada enantiómero tiene un destino metabólico diferente y diferentes potencias en la enzima VKER.

5 Además, la actividad de warfarina en la enzima VKER da como resultado la inhibición de los factores de coagulación II, VII, IX y X, que tienen diferentes semividas propias, que oscilan desde horas (factor VII) hasta días (factor X). Debido a esta compleja situación, el efecto farmacológico (aumento del tiempo de coagulación) de la warfarina se vuelve evidente sólo de 5 a 10 días tras una dosis. Por tanto es fácil entender porqué el tratamiento con warfarina es extremadamente difícil de predecir y porqué los pacientes corren el riesgo de complicaciones por hemorragia, 10 incluyendo la muerte. En el estado actual del tratamiento con warfarina, los pacientes que están tomando warfarina deben informar a un laboratorio de coagulación una vez a la semana con el fin de monitorizarse y con el fin de detectar cualquier riesgo temprano de complicaciones por hemorragia. Incluso con este estricto sistema de monitorización, muchos pacientes que están tomando warfarina mueren cada año de complicaciones por hemorragia.

15 Los posibles problemas clínicos y riesgo comercial asociados con fármacos en desarrollo, que deben pasar la "prueba de fuego" del metabolismo de P450, ha aumentado notablemente en Los Estados Unidos por los dos hechos siguientes: 1) el número de recetas encargadas en este país ha aumentado hasta aproximadamente 3 mil millones al año o 10 por persona, y 2) pacientes, particularmente aquéllos con una vida más larga y que tienen problemas médicos más complejos, tienden a tomar múltiples medicaciones. La última cuestión es importante porque la incidencia de las 20 ADR aumenta exponencialmente cuando los sujetos toman más de cuatro fármacos. Aunque es una buena práctica evitar la polifarmacia, en muchos casos esto no es posible porque los pacientes requieren diferentes clases de fármacos para tratar eficazmente afecciones complejas.

El ámbito de la investigación y desarrollo de fármacos está plagado de fármacos que fallaron que se retiraron por la FDA debido a que produjeron ADR mortales que implicaban el metabolismo de CYP. Estos fármacos eran clínicamente eficaces y en muchos casos comercialmente satisfactorios. Fármacos notables que se retiraron debido a 25 muertes relacionadas con ADR que implicaban el metabolismo de CYP450 incluyen terfenadina (febrero de 1998), astemizol (julio de 1999) y cisaprida (enero de 2000). En cada uno de estos casos, las interacciones de los fármacos que implicaban CYP3A4 hicieron que las concentraciones del agente farmacéutico aumentaran hasta tal punto que inhibían 30 significativamente un tipo particular de canal de potasio en el corazón denominado I_{Kr} , que, a su vez, prolongaba el intervalo QT y producía una forma potencialmente mortal de taquiarritmia ventricular denominada *torsade de pointes* (taquicardia ventricular en entorchado).

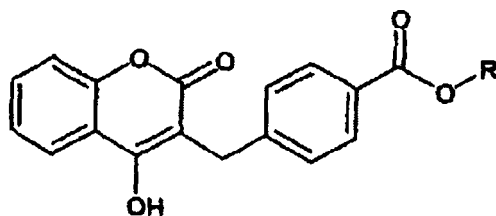
Por tanto, es altamente deseable un análogo de warfarina que tenga un destino metabólico controlable y predecible, 35 que no dependa de CYP450, y sería una incorporación importante al arsenal de fármacos disponibles para tratar a los pacientes con fibrilación auricular. Anteriormente se han notificado ciertos análogos de warfarina. Véase, por ejemplo, el documento WO 02/085882, que se incorpora al presente documento como referencia.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas que son útiles como anticoagulantes o útiles en el tratamiento con anticoagulantes.

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula:

45



55

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que

60

R es alquilo C₁-C₈ sustituido con al menos un halógeno;

R es alquilo C₂-C₈ sustituido con al menos un halógeno;

65

R es alquilo C₃-C₇ sustituido con al menos un halógeno; o

R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos un halógeno.

ES 2 340 690 T3

Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto según la reivindicación 1, en el que:

5 R es alquilo C₁-C₈ sustituido con al menos un grupo cloro;

R es alquilo C₂-C₈ sustituido con al menos un grupo cloro;

R es alquilo C₃-C₇ sustituido con al menos un grupo cloro; o

10 R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos un grupo cloro;

Estos compuestos interactúan con VKER y/o son útiles como anticoagulantes y/o en el tratamiento con anticoagulantes. La invención también abarca composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y el uso de tales compuestos o composiciones en el tratamiento de trastornos de coagulación.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1 muestra la actividad inhibidora VKER de ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-propiónico.

La figura 2 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 2,2,3,3,3-pentafluoro-propílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

25 La figura 3 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 3,3,3-trifluoro-propílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

La figura 4 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-metil-propílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

La figura 5 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 4-fluoro-bencílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

35 La figura 6 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 2-(4-fluoro-fenoxi)-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

La figura 7 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 2,2,2-trifluoro-1-metil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

40 La figura 8 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 2,2,2-trifluoro-1-trifluorometil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

La figura 9 muestra la actividad inhibidora VKER de éster 2,2,2-trifluoro-1-metil-1-trifluorometil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico.

La figura 10 muestra la actividad inhibidora VKER de warfarina.

La figura 11 muestra la actividad inhibidora VKER de ácido 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoico.

50 La figura 12 muestra el efecto de la fluoración sobre el metabolismo por el citocromo P450 y esterasa en microsomas humanos combinados. Se muestran razones de área pico para incubaciones de microsomas en presencia (barras en negro) o ausencia (barras en blanco) de NADPH. Las barras en negro representan CYP450 + esterasa y las barras en blanco representan esterasa sola.

55 La figura 13 muestra el efecto de la fluoración sobre el metabolismo por el citocromo P450 y la esterasa en microsomas humanos combinados. Se muestran razones de área pico para incubaciones de microsomas en presencia (barras en negro) o ausencia (barras en blanco) de NADPH. Las barras en negro representan CYP450 + esterasa y las barras abiertas representan esterasa sola.

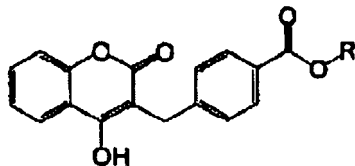
60 La figura 14 muestra la desaparición de un compuesto original en microsomas humanos combinados que contienen NADPH, en ausencia (barras en negro) de paraoxón, o en presencia (barras en blanco) de paraoxón, un inhibidor de esterasa conocido.

65 Siempre que cualquier compuesto identificado en las figuras no esté dentro del alcance de las reivindicaciones, lo está para información.

Descripción detallada

La invención proporciona compuestos de fórmula:

5



10

15

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; en los que R es alquilo C₁-C₈ sustituido con al menos un halógeno.

20

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona compuestos en los que R es alquilo C₂-C₈ sustituido con al menos un halógeno.

25

Aún todavía en otro aspecto, la invención proporciona compuestos en los que R es alquilo C₃-C₇ sustituido con al menos un halógeno.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona compuestos en los que R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos un halógeno.

30

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona compuestos en los que R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos un grupo flúor.

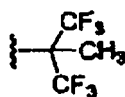
Aún en otro aspecto, la invención proporciona compuestos en los que R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos dos grupos flúor.

35

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona compuestos en los que R es un grupo terc-butilo sustituido con seis grupos flúor.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona compuestos en los que R es

40



45

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

50

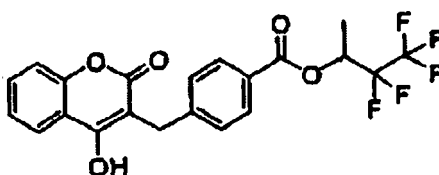
Todavía en otro aspecto, la invención proporciona 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo.

55

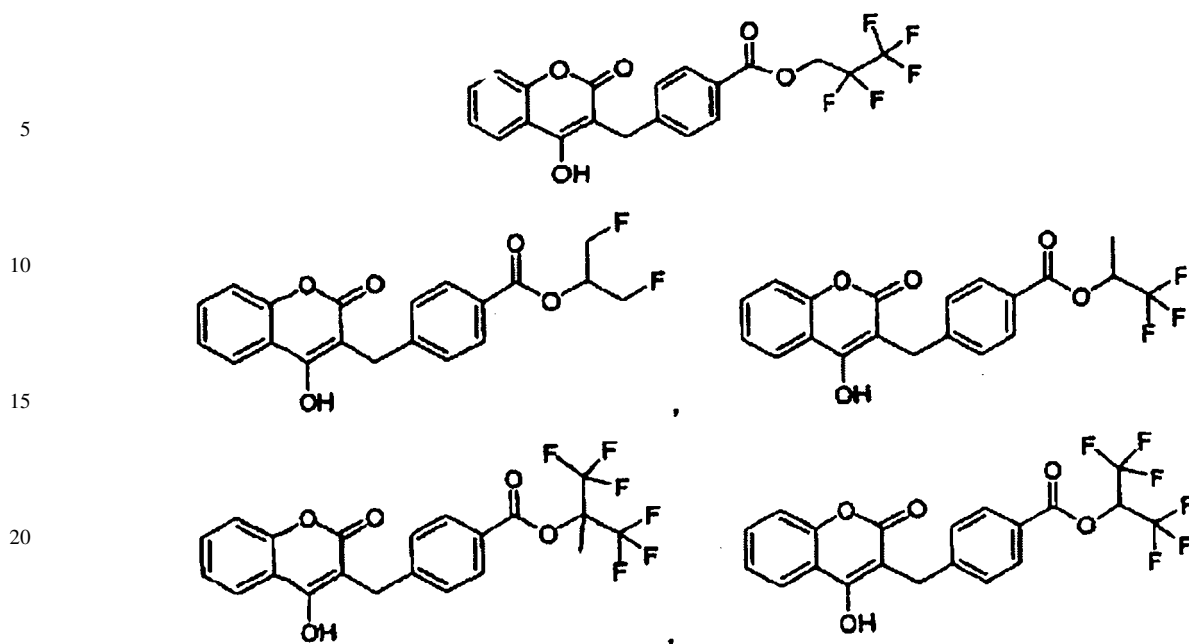
Todavía en otro aspecto, la invención proporciona la sal de sodio o de potasio de 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo, prefiriéndose la sal de sodio.

Realizaciones específicas de la presente invención incluyen los siguientes compuestos:

60



65



Por "alquilo" se quiere decir un hidrocarburo no cíclico lineal o ramificado. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, 2-pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 3-metilpentilo, heptilo y octilo. "Alquilo C₁-C₆" indica grupos alquilo no cíclicos lineales o ramificados que tienen de 1-6 átomos de carbono. Asimismo, "alquilo C₁-C₄" indica grupos alquilo no cíclicos lineales o ramificados que tienen de 1-4 átomos de carbono.

Los términos "halógeno" o "halo" indican flúor, cloro, bromo y yodo.

La presente invención proporciona materiales y métodos para el tratamiento con anticoagulantes. De manera ventajosa, los compuestos terapéuticos de la presente invención son estables en almacenamiento pero tienen una semivida más corta en el entorno fisiológico que otros fármacos que están disponibles para el tratamiento con anticoagulantes; por tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse con una menor incidencia de efectos secundarios y toxicidad. En una realización preferida, la presente invención proporciona compuestos anticoagulantes terapéuticos. Los compuestos de la presente invención pueden usarse para tratar poblaciones que corren riesgo, proporcionando de ese modo alivio de los síntomas, mejorando la calidad de vida, evitando complicaciones agudas y a largo plazo, reduciendo la mortalidad y tratando trastornos que los acompañan.

De manera ventajosa, la presente invención proporciona compuestos que se metabolizan fácilmente por los sistemas de desintoxicación de fármacos metabólica fisiológica. Específicamente, en una realización preferida, los compuestos terapéuticos de la presente invención contienen un grupo éster halogenado, que no perjudica la capacidad de estos compuestos para proporcionar un beneficio terapéutico, sino que hace a estos compuestos más susceptibles frente a la degradación por hidrolasas, particularmente esterasas séricas y/o citosólicas. De manera ventajosa, se ha encontrado que los compuestos inhiben la enzima vitamina K epóxido reductasa (VKER).

Además de su actividad en la enzima VKER, la presencia de al menos un átomo de halógeno en el resto éster proporciona a estos compuestos ciertas propiedades ventajosas. Específicamente, la adición de halógeno a estos compuestos reduce o elimina enormemente su metabolismo por CYP450, mientras que al mismo tiempo aumenta enormemente la hidrólisis mediada por esterasa. Por tanto, la halogenación confiere de manera inesperada una predilección por el metabolismo de esterasa cuando en ausencia de tal halogenación existe una predilección por el metabolismo de CYP450. Esta propiedad proporciona a los compuestos de éster halogenados importantes ventajas terapéuticas con respecto a análogos no halogenados.

Debido a que los compuestos halogenados de la presente invención no dependen de las enzimas CYP450 para su metabolismo, no es probable que interactúen con otros fármacos en el sitio de CYP450 y por tanto son seguros para su uso en pacientes que ya están tomando otras medicaciones, a diferencia de sus análogos no halogenados. Los compuestos de la presente invención son útiles en métodos de tratamiento que comprenden la administración de estos compuestos a individuos que necesitan un tratamiento con anticoagulantes.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a productos de degradación que se forman cuando esterasas actúan sobre los compuestos terapéuticos de la presente invención. Estos productos de degradación pueden usarse, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, para monitorizar la eliminación de los compuestos terapéuticos de un paciente.

ES 2 340 690 T3

Los compuestos de la presente invención son útiles en métodos para el tratamiento de trastornos de coagulación. Específicamente, la presente invención proporciona compuestos que se metabolizan fácilmente por los sistemas de desintoxicación de fármacos hidrolítica preferiblemente con respecto al sistema de desintoxicación de fármacos oxidativa. Específicamente, esta invención proporciona compuestos que son sensibles frente a la degradación por hidrolasas, particularmente esterasas séricas y/o citosólicas.

Esta invención se refiere a compuestos que se metabolizan más fácilmente por los sistemas de desintoxicación de fármacos hidrolítica. Específicamente, esta invención proporciona análogos de fármacos que se han diseñado para ser más sensibles frente a la degradación por hidrolasas, particularmente esterasas séricas y/o citosólicas y métodos de tratamiento que comprenden la administración de estos análogos a individuos.

De manera ventajosa, el uso de los compuestos de la presente invención puede dar como resultado una reducción de las interacciones metabólicas clínicamente relevantes que implican el sistema CYP (particularmente la fracción CYP3A4) y ayuda a evitar las ADR. Estos compuestos no se basan en el sistema de la enzima CYP450, sino que, en su lugar, explotan esterasas ampliamente distribuidas para el metabolismo y la generación de un metabolito que sustancialmente es farmacológicamente inactivo. Este enfoque hace a los agentes anticoagulantes más seguros mientras mantiene la eficacia, y también reduce significativamente el riesgo económico del desarrollo de fármacos.

En una realización preferida de la presente invención, se proporcionan compuestos terapéuticos que son útiles para proporcionar un tratamiento con anticoagulantes y que contienen un grupo éster halogenado sobre el que actúan enzimas hidrolíticas, degradando de ese modo el compuesto para dar un metabolito sustancialmente inactivo y soluble en agua y facilitando su eliminación eficaz del individuo tratado. Tal como se hace referencia en el presente documento, un metabolito “sustancialmente inactivo” puede mostrar, por ejemplo, menos de o igual a aproximadamente el 10% (y más preferiblemente menos de o igual a aproximadamente el 5%; incluso más preferiblemente menos de o igual a aproximadamente el 2%; y lo más preferiblemente menos de o igual a aproximadamente el 1%) de la actividad del compuesto original. En una realización preferida, los compuestos terapéuticos se metabolizan por esterasas plasmáticas, esterasas tisulares y/o esterasas microsómicas no oxidativas/hidrolíticas.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a los productos de degradación que se producen cuando esterasas actúan sobre los compuestos terapéuticos de la presente invención. La presencia de estos productos de degradación en la orina o el suero puede usarse para monitorizar la tasa de eliminación del compuesto terapéutico de un paciente.

El enlace éster puede introducirse en el compuesto en un sitio que sea conveniente en el proceso de fabricación para el fármaco objetivo. Adicionalmente, la sensibilidad del enlace éster puede manipularse mediante la adición de grupos laterales que impiden o promueven la actividad hidrolítica de las hidrolasas o esterasas responsables de la escisión del fármaco en el sitio del éster. El experto conoce bien métodos de adición de tales grupos laterales, así como los propios grupos laterales, y pueden llevarse a cabo fácilmente utilizando la orientación proporcionada en el presente documento.

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento con anticoagulantes que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de éster halogenados a un individuo que necesita tratamiento. Por consiguiente, la presente invención proporciona ésteres halogenados y composiciones farmacéuticas de estos compuestos de éster. En una realización preferida, el paciente es un ser humano; sin embargo, también pueden tratarse animales no humanos.

Las interacciones fármaco-fármaco (DDI) adversas, el aumento de los valores de las pruebas funcionales hepáticas (LFT) y la prolongación del QT que conduce a *torsades de pointes* (TDP) son los tres motivos principales de por qué candidatos de fármaco no obtienen la aprobación de la FDA. Todas estas causas se basan, hasta cierto punto, en el metabolismo. En la industria farmacéutica se desea mucho un fármaco que tenga dos rutas metabólicas, una oxidativa y una no oxidativa, incorporadas en su estructura. Una ruta metabólica no oxidativa alternativa le proporciona al sujeto tratado una ruta de desintoxicación de fármacos alternativa (una ruta de escape) cuando una de las rutas metabólicas oxidativas se satura o se vuelve no funcional. Aunque se desea un ruta metabólica dual y es necesaria con el fin de proporcionar una ruta metabólica de escape en el caso de que la ruta primaria esté bloqueada, en el caso de los inhibidores de VKER tales como los compuestos dados a conocer de la presente invención, es muy importante que la ruta de metabolismo primaria sea no oxidativa, debido a que el metabolismo oxidativo es especialmente sensible a interacciones fármaco-fármaco. Los ésteres halogenados de esta invención se metabolizan principalmente, si no solamente, por esterasas, un sistema enzimático no oxidativo y, por tanto, son especialmente útiles para tratar pacientes que están tomando otras medicaciones.

Los expertos en la técnica pueden realizar fácilmente modificaciones adicionales de los compuestos dados a conocer en el presente documento. Por tanto, los análogos y las sales de los compuestos mostrados a modo de ejemplo están dentro del alcance de la presente invención. Con el conocimiento de los compuestos de la presente invención, los químicos expertos pueden usar procedimientos conocidos para sintetizar estos compuestos a partir de sustratos disponibles. Tal como se usa en esta solicitud, el término “análogos” se refiere a compuestos que son sustancialmente iguales que otro compuesto pero que se han modificado mediante, por ejemplo, la adición de grupos laterales adicionales. El término “análogos” tal como se usa en esta solicitud puede referirse también a compuestos que son sustancialmente iguales a otro compuesto pero que tienen sustituciones atómicas o moleculares en ciertas ubicaciones en el compuesto.

ES 2 340 690 T3

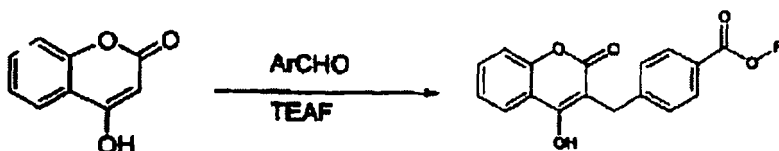
Pueden prepararse fácilmente análogos de los compuestos mostrados a modo de ejemplo usando reacciones convencionales, comúnmente conocidas. Estas reacciones convencionales incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hidrogenación, metilación, acilación, halogenación y acidificación. Por ejemplo, pueden prepararse nuevas sales dentro del alcance de la invención añadiendo bases minerales, por ejemplo, NaOH, etc., o bases orgánicas fuertes, por ejemplo, trietanolamina, etc., en cantidades apropiadas para formar la sal del compuesto original o su derivado. Además, pueden usarse reacciones de tipo síntesis de conformidad con procedimientos conocidos para añadir o modificar diversos grupos en los compuestos mostrados a modo de ejemplo para producir otros compuestos dentro del alcance de la invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables no tóxicas incluyen, pero no se limitan a sales de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, difosfórico, bromhídrico y nítrico, o sales de ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, cítrico, málico, maleico, fumárico, tartárico, succínico, acético, láctico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico, 2-hidroxiethylsulfónico, salicílico y esteárico. De manera similar, los cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio. Los expertos en la técnica reconocerán una amplia variedad de sales de adición farmacéuticamente aceptables no tóxicas. La presente invención abarca también profármacos de los compuestos de la presente invención.

De manera ventajosa, los compuestos halogenados son sustratos menos favorables para el citocromo CYP450 que sus análogos no halogenados. Por tanto, es más probable que se metabolicen por estererasas, lo que es deseable para eliminar interacciones fármaco-fármaco según la presente invención.

La síntesis de los compuestos de la presente invención puede conseguirse tal como se muestra en el esquema 1.

Esquema 1



En el esquema 1, se calientan 4-hidroxycumarina y un aldehído aromático opcionalmente sustituido en una mezcla de trietilamina y ácido fórmico (razón molar 2:5) para dar la 3-bencil-4-hidroxycumarina sustituida de manera correspondiente en la que R se define tal como anteriormente.

La presente invención se refiere además a compuestos enantioméricamente enriquecidos, y a composiciones que comprenden los compuestos, útiles para el tratamiento de trastornos de coagulación. Las formas enantioméricas aisladas de los compuestos de la invención están sustancialmente libres una de otra (es decir, en exceso enantiomérico). En otras palabras, las formas "R" de los compuestos están sustancialmente libres de las formas "S" de los compuestos y están, por tanto, en exceso enantiomérico de las formas "S". A la inversa, las formas "S" de los compuestos están sustancialmente libres de formas "R" de los compuestos y están, por tanto, en exceso enantiomérico de las formas "R". En una realización de la invención, los compuestos enantioméricos aislados están al menos aproximadamente en el 80% de exceso enantiomérico. En una realización preferida, los compuestos están en al menos aproximadamente el 90% de exceso enantiomérico. En una realización más preferida, los compuestos están en al menos aproximadamente el 95% de exceso enantiomérico. En una realización incluso más preferida, los compuestos están en al menos aproximadamente el 97,5% de exceso enantiomérico. En una realización lo más preferida, los compuestos están en al menos el 99% de exceso enantiomérico.

Los compuestos de la presente invención son útiles en métodos para tratar trastornos de coagulación que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los ésteres halogenados de esta invención a un individuo que necesita tratamiento. Los compuestos terapéuticos de esta invención tienen aplicabilidad en contextos clínicos tanto veterinarios como humanos. Además, los compuestos de esta invención tienen propiedades terapéuticas similares a las del compuesto original no modificado (COUMADIN). Por consiguiente, las tasas de dosificación y las vías de administración de los compuestos dados a conocer son similares a las ya usadas en la técnica y conocidas por el experto (véase, por ejemplo, Physicians' Desk Reference, 54ª Ed., Medical Economics Company, Montvale, NJ, 2000 o patente estadounidense 5.856.525).

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía oral, por vía tópica, por vía parenteral, mediante inhalación o pulverización o por vía rectal en formulaciones unitarias de dosificación que contienen adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye técnicas de infusión e inyección percutánea, subcutánea, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular o intratecal y similares. Además, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Uno o más compuestos de la presente invención pueden estar presentes en asociación con uno o más vehículos y/o diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos y, si se desea, otros principios activos. Las composiciones farmacéuticas que

ES 2 340 690 T3

contienen compuestos de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos o polvos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires.

5 Las formulaciones se describen en detalle en varias fuentes que son muy conocidas y que están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science de E. W. Martin describe formulaciones que pueden usarse en relación con la presente invención. En general, las composiciones de la presente invención se formularán de manera que se combina una cantidad eficaz del/de los compuesto(s) bioactivo(s) con al menos un vehículo, disolvente, excipiente y/o adyuvante adecuado con el fin de facilitar una administración eficaz de la composición.

10 Según la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos de la invención y uno o más vehículo(s) y/o diluyente(s) farmacéuticamente aceptable(s) no tóxico(s). Ejemplos de tales vehículos para su uso en la invención incluyen etanol, dimetilsulfóxido, glicerol, sílice, 15 alúmina, almidón, y vehículos y diluyentes equivalentes.

Además, los vehículos aceptables pueden ser o bien sólidos o bien líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, obleas, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, 20 agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos o un material de encapsulación.

Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer pueden subdividirse en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, tal como comprimidos, cápsulas y polvos envasados en recipientes de papel o de plástico o en viales o ampollas. Además, la dosificación unitaria puede ser una preparación a base de líquido o puede formularse para incorporarse en productos alimenticios sólidos, goma de mascar o pastilla para chupar.

El término "individuo(s)" se define como un único mamífero al que se le administra un compuesto de la presente invención. El mamífero puede ser un roedor, por ejemplo un ratón o una rata, o un no roedor, por ejemplo un cerdo, un caballo, un conejo, una cabra, una vaca, un gato, un perro, o puede ser un ser humano. En una realización preferida, el individuo es un ser humano.

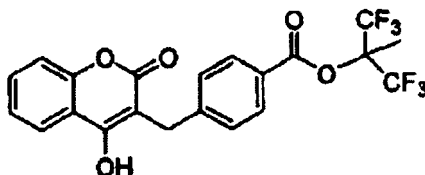
A continuación se encuentran ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son en volumen a menos que se indique de otro modo. Las reacciones se realizaron en disolventes anhidros bajo una atmósfera de nitrógeno a menos que se especifique de otro modo, y se siguieron mediante cromatografía de capa fina (CCF) sobre placas de gel de sílice prerrecubiertas empaquetadas de vidrio Analtech (0,25 mm) que se visualizaron mediante luz UV de onda corta o en una cámara de yodo. La expresión "tratamiento convencional" se refiere a la adición de agua a la mezcla de reacción, extracción con EtOAc (3x), lavado de las fases orgánicas combinadas sucesivamente con agua y salmuera, secado sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado en un rotavapor Buchi R-114. Las separaciones cromatográficas se realizaron sobre columnas de gel de sílice (gel de sílice Aldrich 70-230 de malla, 60 A) o sobre un manipulador de líquidos Gilson que usa una columna C18 Polaris de fase inversa (5 μ, 100x212). Los espectros de ¹H RMN se registraron en un espectrómetro Nicolet/GE NT 300.

45

Ejemplo 1

50 *Preparación de éster 2,2,2-trifluoro-1-metil-1-trifluorometil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico*

55



60

Se prepara formato de trietilamonio (TEAF) añadiendo TEA (20,0 ml) a ácido fórmico (16,5 ml) con enfriamiento con hielo. A TEAF se le añade 4-(2,2,2-trifluoro-1-metil-1-trifluorometil-etoxicarbonil)benzaldehído (3,78 ml) y 4-hidroxi-cromen-2-ona (6,0 g) y se calienta la mezcla resultante hasta 130-140°C durante 3 horas, se enfría hasta temperatura ambiente, se diluye con agua y se extrae con EtOAc.

65

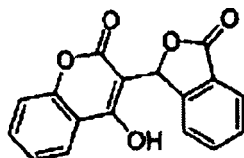
ES 2 340 690 T3

Se lava la fase orgánica con salmuera, se seca sobre MgSO₄ y se concentra a vacío para dar un sólido amarillo claro. Se recrystaliza el sólido bruto en EtOH para dar éster 2,2,2-trifluoro-1-metil-1-trifluorometil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico (1,95 g).

5 Ejemplo de información 2

Preparación de 4-hidroxi-3-(3-oxo-1,3-dihidro-isobenzofuran-1-il)-cromen-2-ona

10



15

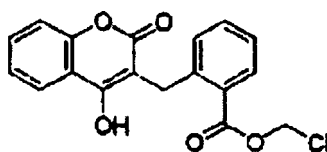
20 Se calienta a reflujo una disolución de 4-hidroxi-cromen-2-ona (650 mg) y 2-carboxibencilaldehído (300 mg) en EtOH durante 4 horas, se enfría hasta temperatura ambiente, luego se concentra a vacío para dar un aceite bruto, que se diluye con agua.

25 Se recoge la 4-hidroxi-cromen-2-ona precipitada mediante filtración (490 mg). Se recoge una segunda tanda de sólido de las aguas madre y se tritura con EtOAc caliente y se filtra para proporcionar 4-hidroxi-3-(3-oxo-1,3-dihidro-isobenzofuran-1-il)-cromen-2-ona como un sólido blanco.

Ejemplo de información 3

30 *Preparación de éster clorometílico del ácido 2-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico*

35



40 A una disolución de 4-hidroxi-3-(3-oxo-1,3-dihidro-isobenzofuran-1-il)-cromen-2-ona (60 mg) en etanol se le añade Pd al 10%/C (10 mg), luego se agita bajo un globo de hidrógeno durante 12 horas. Se filtra la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se concentra a vacío para dar ácido 2-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico como un sólido blanco (50 mg). EM: 295[M-H].

45 Se añade una disolución de ácido 2-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico en una disolución de bicarbonato de sodio al 5% a una disolución de 1,5 equivalentes de clorosulfato de clorometilo en cloruro de metileno. Se añade hidrogensulfato de tetrabutilamonio (cantidad catalítica), y se agita la mezcla enérgicamente durante 5 horas. Se seca la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentra a vacío para dar éster clorometílico del ácido 2-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico como un sólido blanco.

50

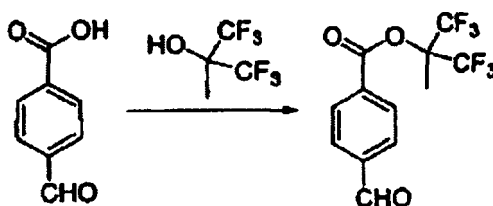
Ejemplo 4

55 *Preparación de 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo*

Etapa 1

La preparación de 4-formilbenzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo

60



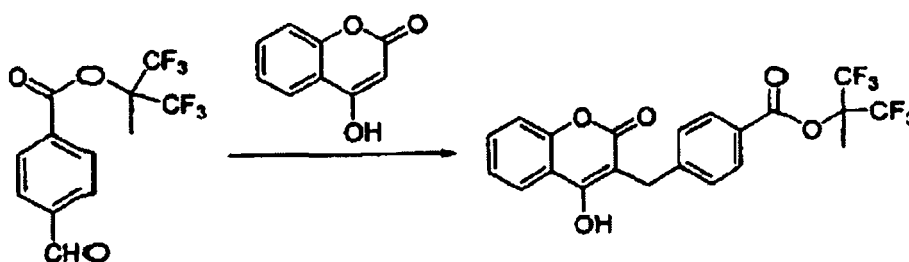
65

ES 2 340 690 T3

Se agitó una mezcla de 41,1 g (274 mmoles) de 4-carboxibenzaldehído, 50 g (274 mmoles) de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metil-2-propanol y 33,4 g (274 mmoles) de DMAP en 700 ml de DCM hasta que fue homogénea (aproximadamente 0,5 h). Se enfrió la disolución sobre un baño de hielo, bajo Ar, y se añadieron en porciones 52,3 g (274 mmoles) de EDCI. Se agitó la reacción a t.a. durante 48 h. y se concentró hasta obtener un aceite en el rotavapor. Se llevó el aceite a AE y se lavó con agua, 2X con ácido cítrico diluido, 2X con bicarbonato de sodio diluido, y salmuera. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se concentró para dar 25,5 g de sólido amarillo pálido.

Etapa 2

Preparación del compuesto del título



25

Se calentó una mezcla de 22 g (70 mmoles) del benzaldehído, 11,3 g (70 mmoles) de 4-hidroxycumarina y 70 ml de 1,2:1 (v/v) TEA/ácido fórmico hasta 140°C bajo nitrógeno durante 2 h. (3 h hubiera sido mejor). Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF usando 1:1 (HOAc al 1%/AE)/hexano. Se dejó enfriar la mezcla brevemente y se trató con 50 ml de THF (para inhibir la cristalización) y se vertió en 500 ml de AE. Se lavó la capa de AE 3X con agua, una vez con salmuera y luego se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y la concentración proporcionaron un sólido blanco que puede recristalizarse en AE o acetona.

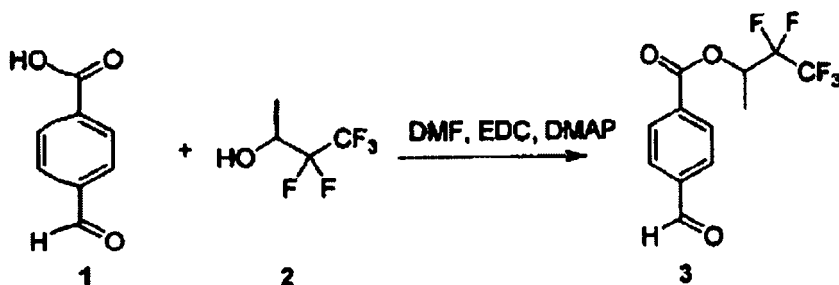
Si se desea, puede convertirse el compuesto del título en una sal farmacéuticamente aceptable, tal como la sal de sodio.

Ejemplo 5

Preparación de 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo

Etapa 1

Preparación de 4-formilbenzoato de 3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo (3)



Se disolvió una mezcla de 4-carboxibenzaldehído (21,9 g, 145,9 mmoles), 3,3,4,4,4-pentafluoro-2-butanol (24,1 g, 146,9 mmoles), EDC (33,5 g, 174,8 mmoles) y DMAP (18,1 g, 148,1 mmoles) en DMF (60 ml) a t.a. Se agitó durante 36 h a t.a. Se añadió hexano, se lavó con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Se extrajeron las fases acuosas tres veces con hexano. Se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se concentró, y se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:hexano 1:10) para proporcionar el aldehído deseado como un aceite amarillo (67%).

ES 2 340 690 T3

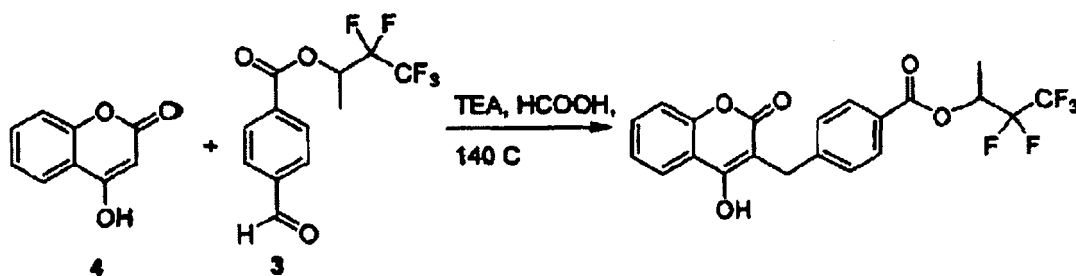
Etapa 2

Preparación del compuesto del título

5

10

15



20

Se añadió ácido fórmico (35,8 ml) a 4-hidroxycumarina (15,8 g, 97,5 mmoles) y el aldehído 3 (28,9 g, 97,6 mmoles). Se añadió trietilamina (43 ml) (exotérmica) a 0°C. Se calentó hasta 140°C y se agitó durante 4 h a esta temperatura. Se enfrió la disolución amarilla hasta ta, se añadió acetato de etilo, se lavó con HCl 1 N y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se eliminó el disolvente. Se cristalizó el sólido ligeramente amarillo en acetato de etilo proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco con una pureza del 98% (rendimiento del 60%).

25

Se preparó la sal de sodio tal como sigue: se disolvieron el ácido libre (21,39 g, 48,35 mmoles) y NaHCO₃ (4,06 g, 48,30 mmoles) en acetonitrilo (400 ml) y agua (100 ml) y se liofilizaron proporcionando la sal de Na, como un sólido blanco.

Ejemplo 6

30

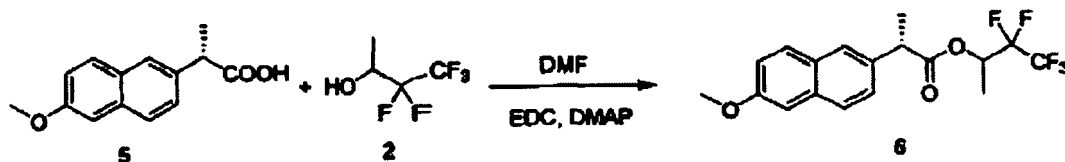
Preparación de 2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanoato de (S)-((R)-3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo)

Etapa 1

35

Preparación de 2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanoato de (2S)-3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo (mezcla de diastereómeros) (6)

40



45

50

Se disolvió una mezcla de (S)-naproxeno (9,23 g, 40,1 mmoles), 3,3,4,4,4-pentafluoro-2-butanol racémico (6,58 g, 40,1 mmoles), EDC (9,20 g, 48,0 mmoles) y DMAP (4,89 g, 40,0 mmoles) en CH₂Cl₂ (40 ml) a temperatura ambiente. Tras agitar durante 8 h a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla con CH₂Cl₂, luego se lavó sucesivamente con HCl 1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera. Tras secar sobre Na₂SO₄ y concentrar, se obtuvo una mezcla de ésteres de naproxeno diastereoméricos como un sólido blanco.

Etapa 2

55

Se separaron pequeñas cantidades de los diastereómeros por medio de HPLC de fase inversa (columna C₁₈, con CH₃CN del 50% al 70%/agua).

60

Éster de (S,S)-naproxeno (diastereómero individual) ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,70 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,65 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,37 (dd J = 1,8,8,6 Hz, 1H), 7,15 (dd, J = 2,8, 8,8 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 5,35-5,42 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,90 (q, J = 7,2 Hz, 1H), 1,60 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,39 (d, J = 6,0 Hz, 3H); ¹⁹F RMN (CDCl₃, 376 MHz) δ -82,0 (s, 3F), -122,7 (dd, J = 7,0,278,2 Hz, 1F), -128,6 (dd, J = 16,0, 278,9 Hz, 1F).

65

Éster de (S,R)-naproxeno (diastereómero individual) ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,71 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,66 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,38 (dd, J = 1,8, 8,6 Hz, 1H), 7,15 (dd, J = 2,4, 8,8 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 5,39-5,47 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,90 (q, J = 7,2 Hz, 1H), 1,59 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,27 (d, J = 6,4 Hz, 3H); ¹⁹F RMN (CDCl₃, 376 MHz) δ -82,0 (s, 3F), -122,7 (dd, J = 7,0,278,2 Hz, 1F), -128,6 (dd, J = 16,0, 279,1 Hz, 1F).

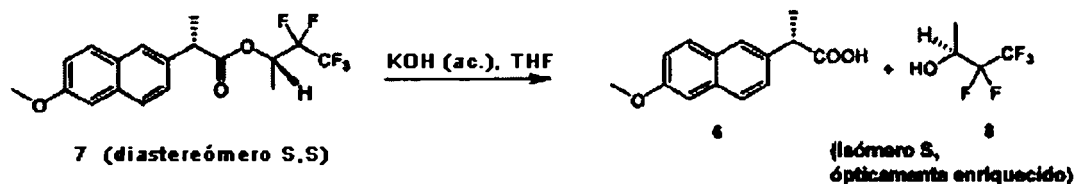
ES 2 340 690 T3

Etapa 3

Se eliminó hidrolíticamente el agente de resolución del naproxeno.

5

10



15

20

Se trató el éster de (S,S)-naproxeno (3,83 g, 10,18 mmoles) de la etapa 2 con KOH 1 N (19 ml) y THF (19,5 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la emulsión a temperatura ambiente y se volvió una disolución transparente tras 3 h. Tras agitar durante una hora adicional, se añadió CH_2Cl_2 (50 ml) y se lavó la disolución con NaHCO_3 saturado (cuatro veces) y se secó sobre Na_2SO_4 y se filtró proporcionando una disolución del isómero S del alcohol. Se usó la disolución directamente en la etapa siguiente, sin purificación.

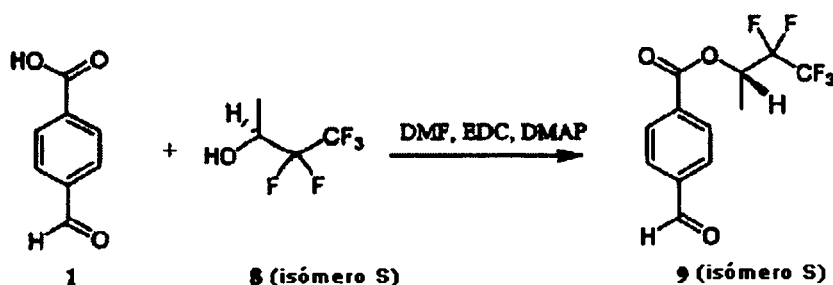
Etapa 4

25

Se forma el éster.

30

35



40

45

A una disolución del isómero S del alcohol de la etapa 3 se le añadió 4-carboxibenzaldehído (3,35 g, 22,3 mmoles), EDC (5,14 g, 26,8 mmoles) y DMAP (2,70 g, 22,1 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción durante 16 h a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo y se lavó la fase orgánica sucesivamente con NaHCO_3 (ac) saturado y salmuera. Tras secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar, se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo:hexano 1:10) proporcionando éster 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-metil-propílico del ácido (S)-4-formil-benzoico como un aceite amarillo (82%).

50

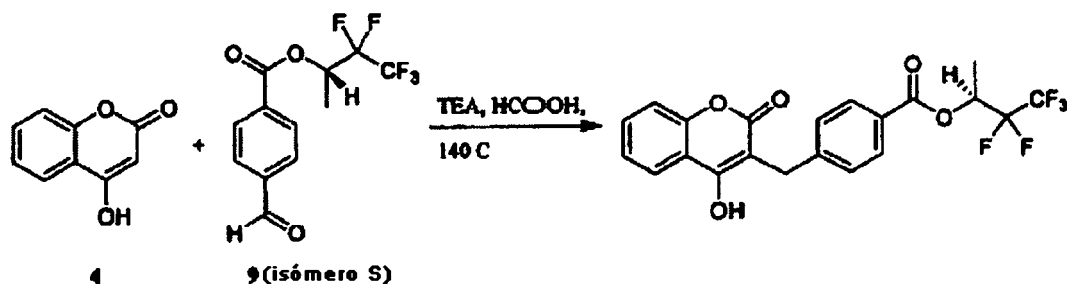
Etapa 5

55

El acoplamiento final - preparación de 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de (S)-3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo

60

65



ES 2 340 690 T3

Se disolvieron 4-hidroxycumarina (1,367 g, 8,44 mmoles) y éster 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-metil-propílico del ácido (S)-4-formil-benzoico (2,505 g, 8,46 mmoles) en ácido fórmico (3,0 ml) y Et₃N (3,6 ml) a 0°C. Tras agitar a 140°C durante 4 h, se enfrió la disolución amarilla hasta ta, se añadió EtOAc y se lavó la fase orgánica sucesivamente con HCl 1 N y salmuera. Tras secar sobre Na₂SO₄ y concentrar, se purificó el sólido amarillo pálido dos veces mediante cromatografía en gel de sílice (DCM:MeOH 100:6 y DCM:MeOH 100:5) proporcionando el compuesto del título con el 92,5% de ee tal como se determinó mediante HPLC quiral.

Se preparó la sal de sodio tal como sigue: Se disolvieron el ácido libre (1,60 g, 3,62 mmoles) y NaHCO₃ (303 mg, 3,62 mmoles) en acetonitrilo (25 ml) y agua (5 ml), y luego se liofilizaron proporcionando la sal de Na deseada, como un sólido blanco. EM m/e 465 (MNa⁺), 441 (M-H); ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 7,76-7,80 (m, 3H), 7,43 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,31 (dt, 1H), 7,02-7,08 (m, 2H), 5,71-5,79 (m, 1H), 3,70 (s, 2H), 1,48 (d, J= 6,9 Hz, 3H); ¹⁹F RMN (DMSO-d₆) δ -81,3 (s, 3F), -121,2 (dd, J = 7,0,276,7 Hz, 1F), -128,2 (d, J= 17,1, 276,7 Hz, 1F).

15 Ejemplo 7

Preparación de 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de (R)-3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo

Usando métodos y procedimientos esencialmente análogos a los del ejemplo 6, se hidrolizó el diastereómero (S,R) del ejemplo 6, etapa 2 proporcionando el isómero (R) deseado del alcohol, que luego se acopló con 4-carboxibenzaldehído proporcionando 4-formilbenzoato de (R)-3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo, que luego se acopló con 4-hidroxycumarina proporcionando el compuesto del título.

Se preparó la sal de sodio tal como sigue: se disolvieron el ácido libre (1,605 g, 3,63 mmoles) y NaHCO₃ (303 mg, 3,62 mmoles) en acetonitrilo (20 ml), agua (5 ml), y luego se liofilizaron proporcionando la sal de Na, como un sólido blanco. EM m/e 465 (MNa⁺), 441 (M-H); ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 7,81 (dd, J= 1,1, 7,9 Hz, 1H), 7,77-7,80 (m, 2H), 7,43 (d, J= 8,3 Hz, 2H), 7,32-7,36 (m, 1H), 7,05-7,11 (m, 2H), 5,71-5,80 (m, 1H), 3,72 (s, 2H), 1,49 (d, J = 6,1 Hz, 3H); ¹⁹F RMN (DMSO-d₆) δ -81,3 (s, 3F), -121,2 (dd, J = 6,0, 265,6 Hz, 1F), -128,2 (dd, J= 16,2, 265,8 Hz, 1F).

Ejemplo 8

Se prepararon los siguientes compuestos esencialmente según los métodos y esquemas descritos en el presente documento.

Se prepararon los siguientes compuestos esencialmente según los métodos y esquemas descritos en el presente documento. Cualquier compuesto que no entre dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona para fines de información.

Nombre
ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoico
3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de metilo
3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de etilo

ES 2 340 690 T3

	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanamida
5	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 2-hidroxietilo
10	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 2,2,3,3,3-pentafluoropropilo
15	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 3,3,3-trifluoropropilo
20	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 2-(fenilsulfonil)etilo
25	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 2-(metilsulfonil)etilo
30	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 2-(4-fluorofenil)etilo
35	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 2,2,2-trifluoro-1,1-dimetiletilo
40	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-fenilpropanoato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletilo
45	ácido 2-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoico
50	ácido {4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenil}acético
55	ácido {(4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenil)}acético
60	2-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de metilo
65	ácido 3-{2-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenil}propanoico
	3-{2-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenil}propanoato de etilo
	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(4-metoxifenil)propanoico
	3-[3-etoxi-1-(4-metoxifenil)-3-oxopropil]-2-oxo-2H-cromen-4-olato de sodio
	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)butanoico
	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)butanoato de etilo

ES 2 340 690 T3

5	ácido 4-[3-etoxi-1-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropil]benzoico
	4-[3-etoxi-1-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropil]benzoato de etilo
10	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)hexanoico
	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)hexanoato de etilo
15	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-5-metilhexanoico
	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-5-metilhexanoato de etilo
20	ácido 3-(4-clorofenil)-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico
25	ácido 3-(3,4-diclorofenil)-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico
30	ácido 3-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico
	3-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoato de etilo
35	ácido 4-[bis(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoico
	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico
	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoato de etilo
40	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoato de ciclohexilo
	4-[bis(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de metilo
45	ácido 5-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-2-metoxibenzoico
50	5-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-2-metoxibenzoato de metilo
55	ácido 5-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-2-isopropoxibenzoico
	5-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-2-isopropoxibenzoato de metilo
60	5-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-2-isopropoxibenzoato de isopropilo

65

ES 2 340 690 T3

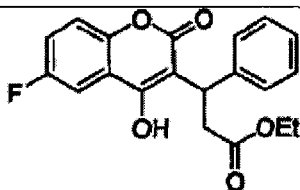
2-{4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenoxi}-2-
metilpropanoato de etilo

N-{4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoil}-L-
valinato de metilo

N-{4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-
il)metil]benzoil}glicinato de metilo

N-{4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoil}-N-
metilglicinato de metilo

ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-[4-
(trifluorometoxi)fenil]propanoico



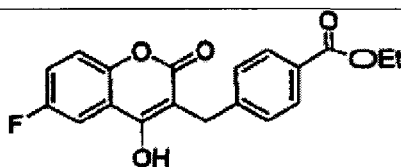
3-(6-fluoro-4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-
fenilpropanoato de etilo

N-[3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(4-
metoxifenil)propanoil]glicinato de metilo

ácido {4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-
il)metil]fenoxi}acético

{4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenoxi}acetato de
metilo

2-[bis(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de
etilo



4-[(6-fluoro-4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato
de etilo

ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(1-
naftil)propanoico

3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(1-naftil)propanoato
de metilo

ES 2 340 690 T3

5	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(2-naftil)propanoico
	3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(2-naftil)propanoato de metilo
10	ácido 3-{4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenil}propanoico
15	3-{4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenil}propanoato de metilo
	4-hidroxi-3-(4-hidroxibencil)-2H-cromen-2-ona
20	propionato de 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenilo
	pivalato de 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenilo
25	benzoato de 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenilo
	2,6-dimetilbenzoato de 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenilo
30	2-metilbenzoato de 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]fenilo
35	ácido 6-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-2-naftoico
	6-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-2-naftoato de etilo
40	3-(bencilamino)-4-hidroxi-2H-cromen-2-ona
	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-[4-(trifluorometoxi)fenil]propanoico
45	4-hidroxi-3-(3-oxo-1,3-dihidro-2-benzofuran-1-il)-2H-cromen-2-ona
50	3-bencil-4-hidroxi-2H-cromen-2-ona
	4-hidroxi-3-(3-hidroxi-1-fenilpropil)-2H-cromen-2-ona
55	ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-[4-(trifluorometoxi)fenil]propanoico
	ácido (3S)-3-(3,4-diclorofenil)-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico
60	ácido (3R)-3-(3,4-diclorofenil)-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico
65	ácido 2-bencil-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico

ES 2 340 690 T3

5	2-bencil-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoato de etilo
	ácido 3-ciclohexil-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoico
10	3-ciclohexil-3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)propanoato de etilo
	2-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)butanoato de etilo
15	ácido (4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il) (fenil)acético
	(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il) (fenil)acetato de etilo
	ácido 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoico
20	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de metilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de etilo
25	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de butilo
	3-{4-[(2-hidroxietoxi) carbonil]bencil}-2-oxo-2H-cromen-4-olato de sodio
30	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de isopropilo
35	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2-dimetilpropilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-metoxietilo
40	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-pirrolidin-1-iletilo
45	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,3,3,3-pentafluoropropilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-(metilsulfonil)etilo
50	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 3,3,3-trifluoropropilo
55	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-metilpropilo
60	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 4-fluorobencilo

65

ES 2 340 690 T3

5	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-(4-fluorofenoxi)etilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-(fenilsulfonyl)etilo
10	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de ciclopropilmetilo
15	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-fluoro-1-(fluorometil)etilo
20	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,2-trifluoro-1-metiletilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil)etilo
25	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de fenilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,3-dimetilfenilo
30	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-metilfenilo
35	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,2-trifluoro-1-metil-1-(trifluorometil)etilo
40	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,6-dimetilfenilo
45	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2-(fenilsulfinil)etilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 4-fluoro-2-metilfenilo
50	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-metilpropilo
55	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-metilpropilo
60	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de (1S)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietilo
	4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de (1R)-2,2,2-trifluoro-1-hidroxietilo
65	4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-2H-cromen-2-ona

ES 2 340 690 T3

Ejemplo 9

Efectos de los compuestos sobre la actividad vitamina K epóxido reductasa

5 Se sometieron a prueba los compuestos de la presente invención frente a la vitamina K epóxido reductasa.

En resumen: se incubaron concentraciones crecientes de los compuestos en presencia de vitamina K epóxido y en presencia de una preparación microsómica de bovino que contenía vitamina K epóxido reductasa. La cantidad de vitamina K epóxido residual al final del periodo de incubación era directamente proporcional a la actividad inhibidora de los compuestos de prueba sobre la enzima.

Las pruebas se realizaron tal como sigue:

15 Se prepararon microsomas a partir de hígado de vaca fresco según el método descrito en: "Purification of gamma-glutamyl carboxilase from bovine liver. Wu SM, Mutucumarana VP, y Stafford DW. *Methods in Enzymology* (1997) 282:346-57".

20 Se prepararon diluciones en serie de los compuestos de prueba tal como sigue: disolver los compuestos de prueba hasta una dilución final de 10 mM o bien en agua o bien en DMSO (si no es soluble en agua). A partir de esta disolución madre, preparar 2 diluciones adicionales diluyéndola con agua: una disolución 200 μM y una disolución 5 mM. Preparar una serie de tubos tal como sigue:

25 TABLA 1

	n.º de tubo	Sustrato	Agua (μl)
30	1	30 μl de disolución 200 μM	0
	2	20 μl de disolución 200 μM	10
35	3	10 μl de disolución 200 μM	20
	4	45 μl de disolución 5 μM	--
	5		30
40	6		30
	7		30
	8		30
45	9		30

50 Retirar 15 μl del tubo 4 y añadir al tubo 5, agitar con vórtex, luego retirar 15 μl del tubo 5 y añadir al tubo 6, agitar con vórtex, etc... hasta que se añaden 15 μl al tubo 9. Agitar con vórtex y luego retirar 15 μl del tubo 9.

Preparar otro conjunto de 4 tubos y añadir 30 μl de agua.

55 Se preparó una mezcla de reacción que consistía en 600 μl de tampón (NaCl 2,5 M, MOPS 0,125 M, pH 7,5), 520 μl de agua y 150 μl de CHAPS al 10%. Se mantuvieron los tubos sobre hielo durante 5 minutos y luego se añadieron 500 μl de preparación microsómica. Se mezcló la mezcla mediante agitación con vórtex y se mantuvo sobre hielo durante 10 min. para una solubilización suficiente. A esto se le añadieron 150 μl de disolución de vitamina K epóxido (1,5 mg/ml en isopropanol), luego se agitó con vórtex de nuevo y se mantuvo sobre hielo durante 5 minutos. Se añadió una alícuota (70 μl) de esta mezcla de reacción a cada una de las series de tubos preparada tal como anteriormente y que contenía diluciones en serie de los compuestos de prueba en 30 μl de agua. Luego se agitaron con vórtex los tubos y luego se mantuvieron sobre hielo durante 5 min. A 2 de los tubos que contenían agua se les añadieron 500 μl de un reactivo de parada que consistía en 5 volúmenes de AgNO_3 50 mM y 5 volúmenes de isopropanol. Se usaron estos 2 tubos para medir un valor cero.

65 Se colocaron los tubos en una mezcladora 30C durante 3 min. y se añadieron 5 μl de disolución de DTT 100 mM en agua. Luego se agitaron los tubos con vórtex y se mantuvieron en la oscuridad sin agitación durante otros 20 min., al final de los cuales se añadieron 500 μl del reactivo de parada.

ES 2 340 690 T3

Luego se añadieron a cada tubo 600 μ l de una disolución 100 μ g/ml de vitamina E en hexano, se taparon los tubos y luego se agitaron con vórtex durante 1 minuto. Luego se centrifugaron los tubos durante 5 min. a 5.000 g, y se transfirió la fase superior (la fase de hexano) a una serie de tubos recientes. Se evaporó el hexano a temperatura ambiente en la oscuridad usando un aparato Speed Vac, y se resuspendió el sedimento resultante en 100 μ l de metanol.

Luego se midió la cantidad de vitamina K epóxido en cada muestra usando un método de determinación mediante HPLC. Luego se representó gráficamente la vitamina K epóxido residual frente a la concentración de los compuestos de prueba. Los resultados se muestran en las figuras 1-9.

Ejemplo 10

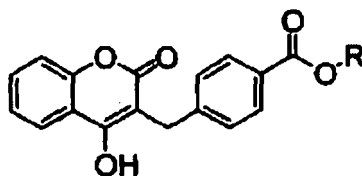
Metabolismo en microsomas humanos combinados

Se usaron microsomas de hígado humano combinados como modelo *in vitro* del metabolismo de fármacos. Estos microsomas contienen enzimas de metabolización de fármacos esterasas y CYP450. Se suspendieron microsomas humanos combinados en tampón Tris (50 mM, pH 7,4) a una concentración final de 1 mg/ml de proteína microsómica. Se añadieron los compuestos de prueba disueltos en acetonitrilo:DMSO (1:99) hasta una concentración final de 2 M. Se realizaron incubaciones a 37°C y se recogieron muestras (50 μ l) tras 5, 15, 30, 60 y 90 minutos y luego se precipitaron mediante la adición de 100 μ l de patrón interno que contenía acetonitrilo y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min. a 4°C. Se analizaron las muestras mediante CL/EM/EM para determinar el contenido en fármaco original.

Para determinar el papel de CYP450 en el metabolismo, se realizaron incubaciones o bien con o bien sin un sistema de regeneración de NADPH (NADPH es cofactor estricto para enzimas CYP450). Las incubaciones que incluían el cofactor NADPH representan el metabolismo total por CYP450 + esterasa. Las incubaciones que no contienen ningún NADPH representan el metabolismo por esterasa sola. Por tanto, cuando la disminución relativa del fármaco original observada es mayor en presencia de NADPH, el metabolismo está mediado por CYP450. Cuando la disminución relativa es equivalente en presencia y ausencia de cofactor, el metabolismo está mediado por esterasa.

Se realizó un conjunto adicional de incubaciones como control: estas incubaciones no contenían microsomas y establecieron la estabilidad del compuesto en el sistema de prueba. Todos los compuestos eran estables.

Los compuestos de prueba tenían la fórmula general:



en la que R representa un grupo que puede formar un resto éster. Se sometieron a prueba estructuras similares de manera que la única diferencia era la presencia o la ausencia de un átomo de halógeno en el grupo éster. Los resultados se muestran en las figuras 12-14.

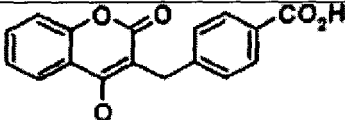
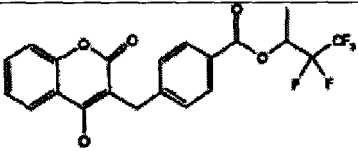
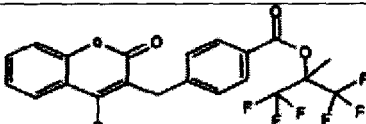
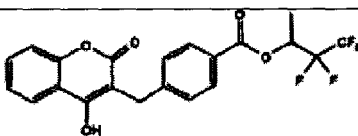
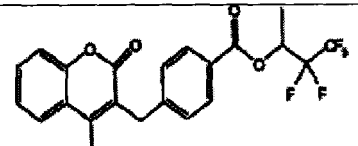
De manera similar, se sometieron a prueba compuestos en los que R es CH₃, CH₂-CH₃, (CH₂)₃CH₃, CH₂-CH₂-OH, CH₂-C(CH₃)₃, CH₂-CH₂-O-CH₃, 1-pirrolidiniletilo, CH₂-CH₂-SO₂-CH₃, bencilo, CH₂-CH₂-O-fenilo, CH₂-CH₂-SO₂-fenilo, CH₂-ciclopropilo, fenilo, fenilo sustituido. En todos los casos CYP450 era o bien el único agente metabólico, o bien si se encontraban presentes esterasas, CYP450 era la ruta principal. Se sometieron a prueba otros ésteres halogenados tales como compuestos en los que R es CH(CH₂F)₂, C(CH₃)(CF₃)₂, ciclohexilo polifluorado. En cada caso el metabolismo era principalmente por esterasa.

En un conjunto separado de incubaciones se sometieron a prueba los efectos de paraoxón, un inhibidor de esterasas conocido, con el fin de confirmar que el metabolismo observado se debía a esterasa. Paraoxón, a una concentración final de 320 μ g/ml, inhibía eficazmente el metabolismo de los ésteres halogenados, tal como se muestra en la figura 15, confirmando que la esterasa era la principal enzima implicada en el metabolismo de compuestos halogenados.

A continuación aparecen datos adicionales generados usando esencialmente el protocolo de ensayo descrito anteriormente.

ES 2 340 690 T3

Estabilidad de varios compuestos (a concentración final 2 μ M) en microsomas humanos combinados

		CYP+ Esterasa	Esterasa	Tampón
Estructura	CI ₅₀ de VKER (μ M)	% de estabilidad a los 90 min. (Est. T ^{1/2})	% de estabilidad a los 90 min. (Est. T ^{1/2})	% de estabilidad a los 90 min. (Est. T ^{1/2})
	>30,00	101% (>90 min.)	ND	99% (>90 min.)
 Racémico	3,38	69%** (>90 min.)	70%** (>90 min.)	108% (>90 min.)
	5,07	91%** (>90 min.)	96%** (>90 min.)	92%** (>90 min.)
 Isómero S	4,02	70% (>90 min.)	86% (>90 min.)	123% (>90 min.)
 Isómero R	4,15	24% (~30 min.)	27% (~30 min.)	113% (>90 min.)
Warfarina	3,0 \pm 0,8*			

* es el promedio de 3 experimentos realizados en 3 días separados.

Los resultados indican que la incorporación de un enlace éster hace posible desplazar el metabolismo desde la degradación mediada por CYP hasta rutas mediadas por coxilesterasa.

Ejemplo 11

Estudio de células HEK-293

Se realizaron registros electrofisiológicos de I_{Kr} en células HEK-293 transfectadas de manera estable en la configuración de célula completa de la técnica de registro electrofisiológico de fijación de voltaje (Hamill *et al*, 1981) usando un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA). Se extrajeron microelectrodos de voltaje desde tubos de vidrio de borosilicato de 1,5 mm usando un extractor de pipeta vertical de dos fases (Narishige, East Meadow,

ES 2 340 690 T3

NY). Cuando se llenaron con disolución de registro, los microelectrodos de voltaje tenían una resistencia de 3-5 M Ω . Se sembraron en placa células HEK-293 en placas de cultivo tisular y de células de plástico de 35 mm durante 2-3 días. Para la aplicación de disoluciones que contenían fármaco a las células, se usó el sistema SF-77B (Warner Instrument Corp, Hamden, CT). Los intercambios de disolución se completaron en el plazo de 20 ms. Los datos de corriente se digitalizaron en línea usando un cuadro analógico a digital DigiData 1200A (Axon Instruments) y se almacenaron en el disco duro de un ordenador Pentium compatible con IBM (GP7-600 MHz, Gateway Computer, Sioux City, ND). Los protocolos experimentales de fijación de voltaje y el análisis de datos fuera de línea se realizaron usando el programa informático pCLAMP7 (Axon Instruments). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22-23°C).

La composición de la disolución control extracelular se describe en la tabla a continuación. Su pH se ajustó a 7,4 usando NaOH.

La disolución para llenar los electrodos de voltaje se describe en la tabla a continuación y su pH se ajustó a 7,4 usando KOH.

Registros electrofisiológicos de I_{Kr}	
Fuente	Células HEK-293 de mamífero que expresan el gen hERG
Potencial	-80 mV
Despolarización	+10 mV durante 20 s
Repolarización	-50 mM durante 5 s
Temperatura de incubación	22-23°C
Disolución extracelular	NaCl 140 mM, KCl 4 mM, CaCl ₂ 2 mM, MgCl ₂ 1 mM, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 10 mM, y glucosa 11 mM
Tampón de electrodo	Gluconato de potasio 135 mM, MgCl ₂ 1 mM, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) 5 mM, HEPES 10 mM, MgATP 5 mM

Se estudió el efecto de warfarina, 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,2-trifluoro-1-metil-1-(trifluorometil)etil y su metabolito ácido correspondiente, ácido 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoico sobre I_{Kr} en una línea de células HEK-293 transfectada de manera estable usando un protocolo de dos pulsos. Se sometieron las células a fijación a un potencial de retención de -80 mV y se despolarizó hasta +10 mV durante un periodo de 20 s para activar I_{Kr} y luego se aplicó una etapa de repolarización hasta -50 mV durante 5 s para provocar una corriente de cola desactivadora de salida (I_{Kr} de cola). Se aplicó el protocolo de dos pulsos cada 45 s. Se midió la amplitud de la I_{Kr} de cola como la diferencia entre la corriente pico y la corriente de línea de base a -50 mV en el control y en presencia de compuestos de ATI cuando se obtuvo un bloque en estado estacionario.

El estudio mostró que 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoato de 2,2,2-trifluoro-1-metil-1-(trifluorometil)etil y su metabolito ácido correspondiente, ácido 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]benzoico, no tenían un efecto inhibitorio sobre la I_{Kr} humana ($IC_{50} > 100$ y > 1000 μ M, respectivamente). Ninguno de los compuestos mostró una actividad significativa en un amplio ensayo de selección de receptores bioquímicos o celulares, a concentraciones de hasta 10 μ M.

Los expertos en la técnica pueden realizarse fácilmente modificaciones de los compuestos dados a conocer en el presente documento. Por tanto, análogos, derivados, enantiómeros y sales de los compuestos mostrados a modo de ejemplo están dentro del alcance de la presente invención. Conociendo los compuestos de la presente invención y sus estructuras, los químicos expertos pueden usar procedimientos conocidos para sintetizar estos compuestos a partir de sustratos disponibles.

ES 2 340 690 T3

Debe entenderse que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son sólo para fines ilustrativos y que se sugerirá diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la técnica y han de incluirse dentro del espíritu y el ámbito de esta solicitud.

5 La invención y la manera y el procedimiento de realizarla y usarla, se describen ahora en términos completos, claros, concisos y exactos tales que permiten que cualquier experto en la técnica a la que pertenece, realice y use la misma. Ha de entenderse que lo anterior describe realizaciones preferidas de la invención y que puede realizarse modificaciones en la misma sin apartarse del alcance de la invención tal como se expone en las reivindicaciones. Para señalar particularmente y reivindicar con claridad el presente contenido considerado como invención, las siguientes
10 concluyen esta memoria descriptiva.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

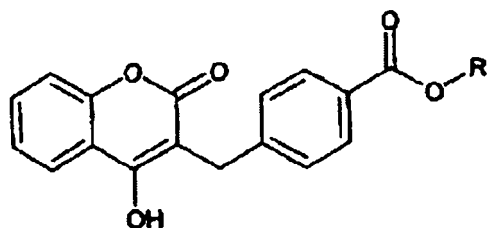
60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:

5



10

15

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que

R es alquilo C₁-C₈ sustituido con al menos un halógeno;

20

R es alquilo C₂-C₈ sustituido con al menos un halógeno;

R es alquilo C₃-C₇ sustituido con al menos un halógeno; o

25

R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos un halógeno.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que

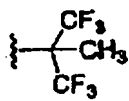
R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos un grupo flúor;

30

R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos dos grupos flúor;

R es un grupo terc-butilo sustituido con seis grupos flúor; o

35



R es

40

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

R es alquilo C₁-C₈ sustituido con al menos un grupo cloro;

45

R es alquilo C₂-C₈ sustituido con al menos un grupo cloro;

R es alquilo C₃-C₇ sustituido con al menos un grupo cloro; o

R es alquilo C₃-C₆ sustituido con al menos un grupo cloro.

50

4. Compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son

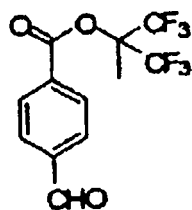
4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de (R)-3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo; o

55

4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de (S)-3,3,4,4,4-pentafluorobutan-2-ilo.

5. Compuesto de fórmula:

60



65

ES 2 340 690 T3

6. Compuesto según la reivindicación 1 que es:

4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo;

5 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo; o

la sal de sodio o de potasio de 4-((4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil)benzoato de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metilpropan-2-ilo.

10 7. Composición que comprende un compuesto o una sal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la reivindicación 6 y al menos un deslizante, disolvente, adyuvante, diluyente, lubricante, excipiente farmacéuticamente aceptable, o una combinación de los mismos.

15 8. Composición o sal farmacéutica aceptable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la reivindicación 6 ó 7 para su uso como medicamento.

20 9. Composición según la reivindicación 8, en la que el medicamento es adecuado para su uso en el tratamiento de trastornos de coagulación o es adecuado para su uso en pacientes que corren el riesgo de desarrollar un trastorno.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1: Actividad inhibidora VEKR de ácido 3-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-propiónico

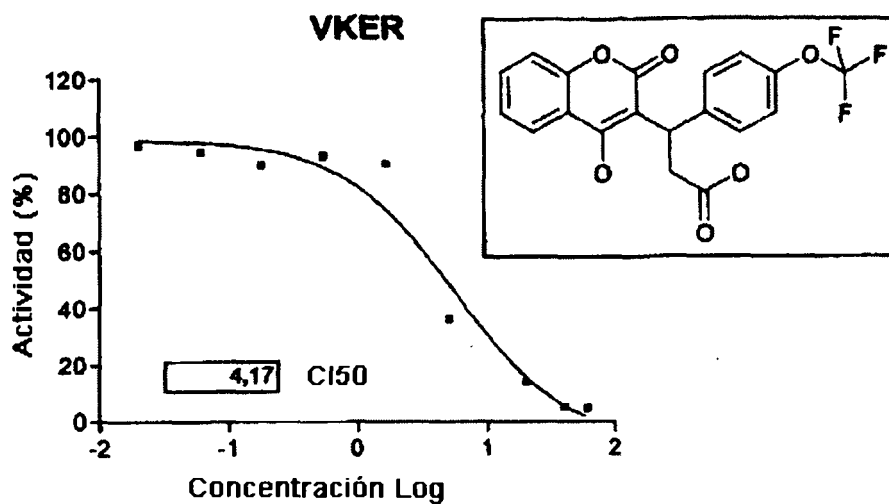


Figura 2: Actividad inhibidora VEKR de éster 2,2,3,3,3-pentafluoro-propílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico

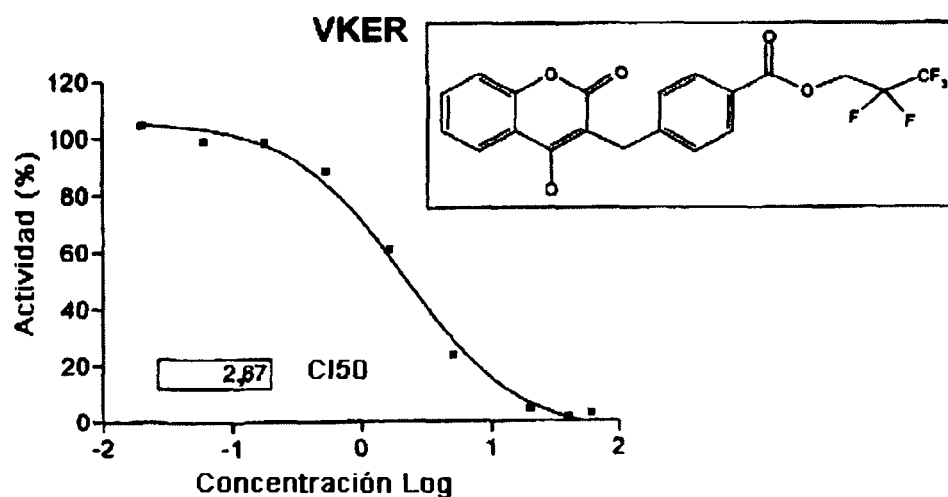


Figura 3: Actividad inhibidora VKER de éster 3,3,3-trifluoro-propílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ílmetil)-benzoico

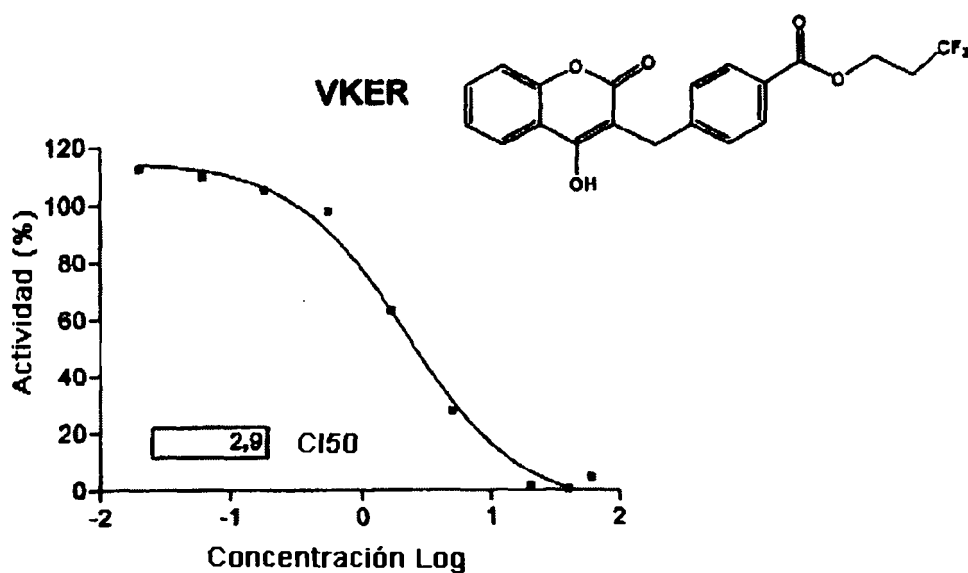


Figura 4: Actividad inhibidora VKER de éster 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-metil-propílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ílmetil)-benzoico

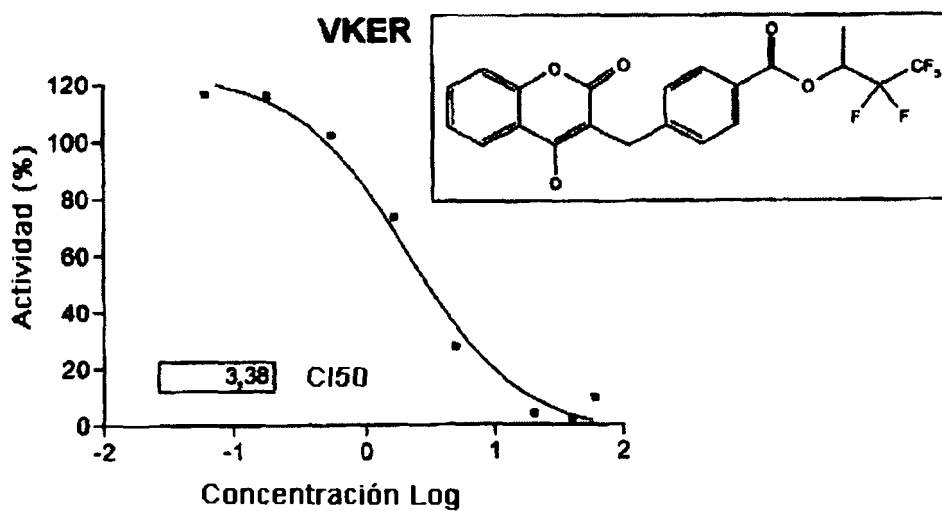


Figura 5: Actividad inhibidora VKER de éster 4-fluoro-bencílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico

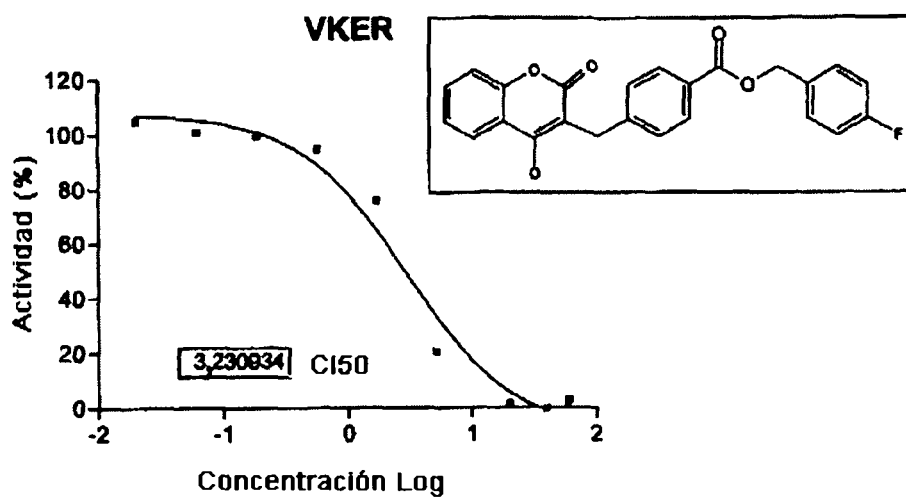


Figura 6: Actividad inhibidora VKER de éster 2-(4-fluoro-fenoxi)-etilico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico

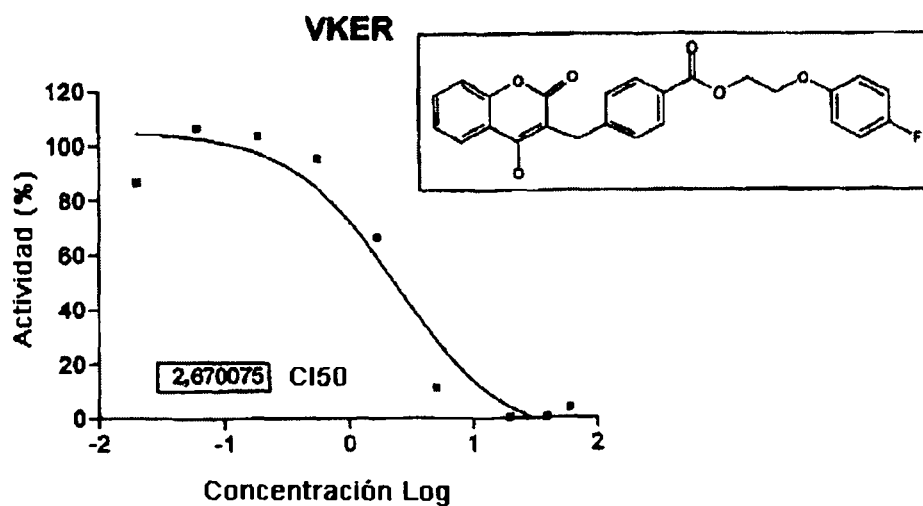


Figura 7: Actividad inhibidora VKER de éster 2,2,2-trifluoro-1-metil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico

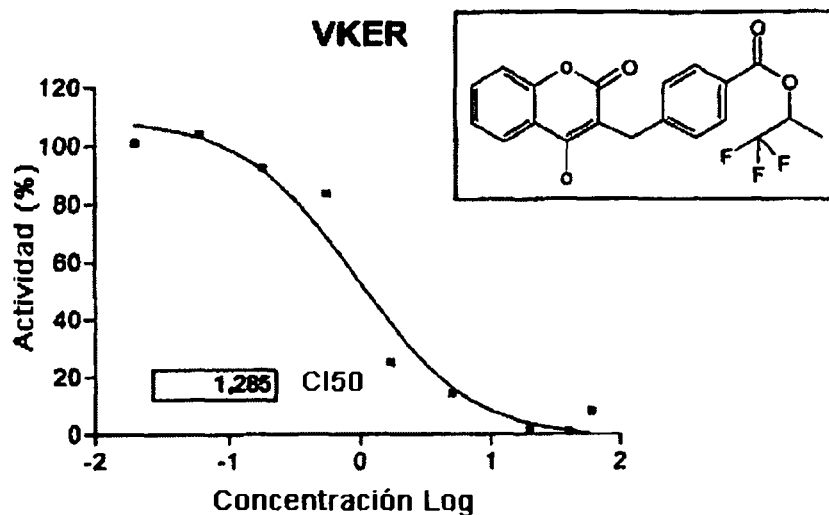


Figura 8: Actividad inhibidora VKER de éster 2,2,2-trifluoro-1-trifluorometil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico

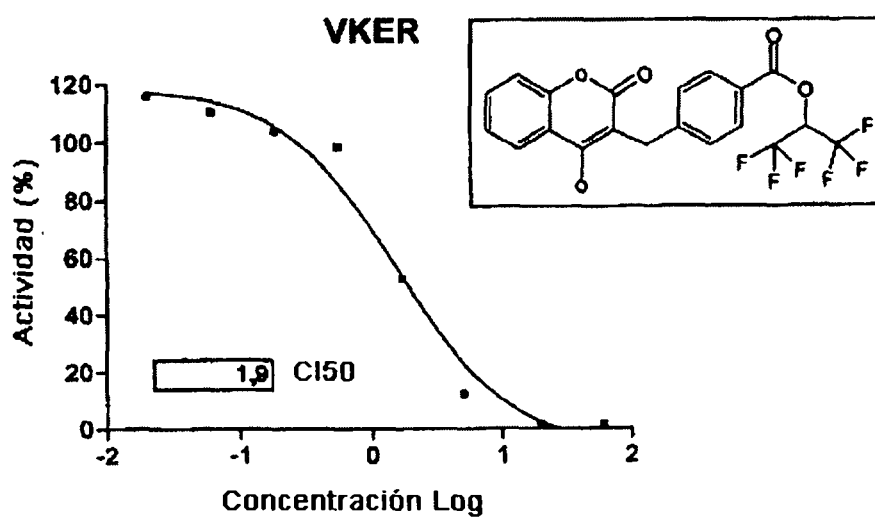


Figura 9: Actividad inhibidora VKER de éster 2,2,2-trifluoro-1-metil-1-trifluorometil-etílico del ácido 4-(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetil)-benzoico

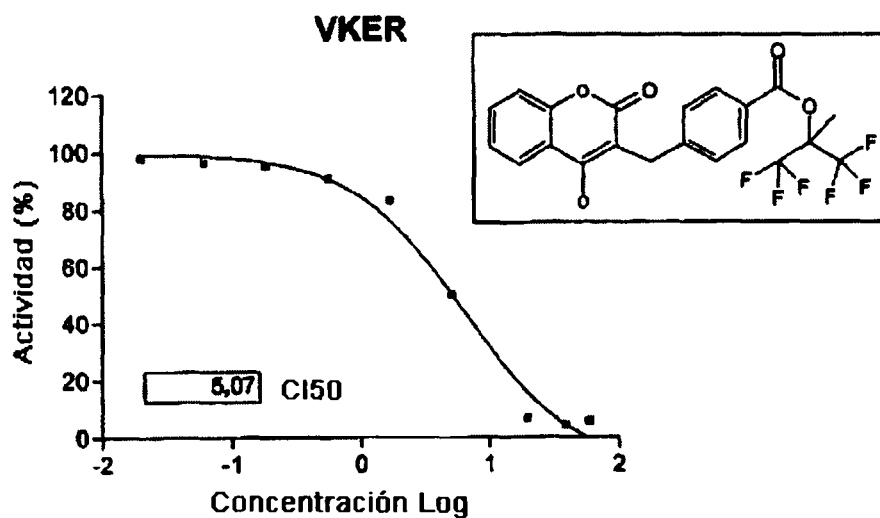


Figura 10: Actividad inhibidora VKER de warfarina

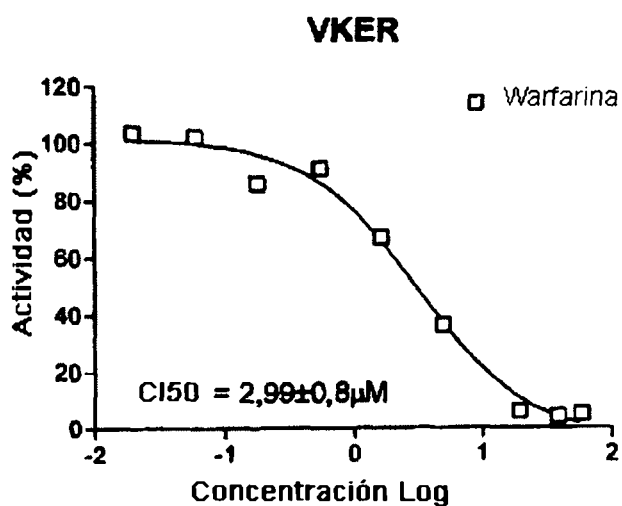


Figura 11: Actividad inhibidora VKER de ácido 4-[(4-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)metil]-benzoico

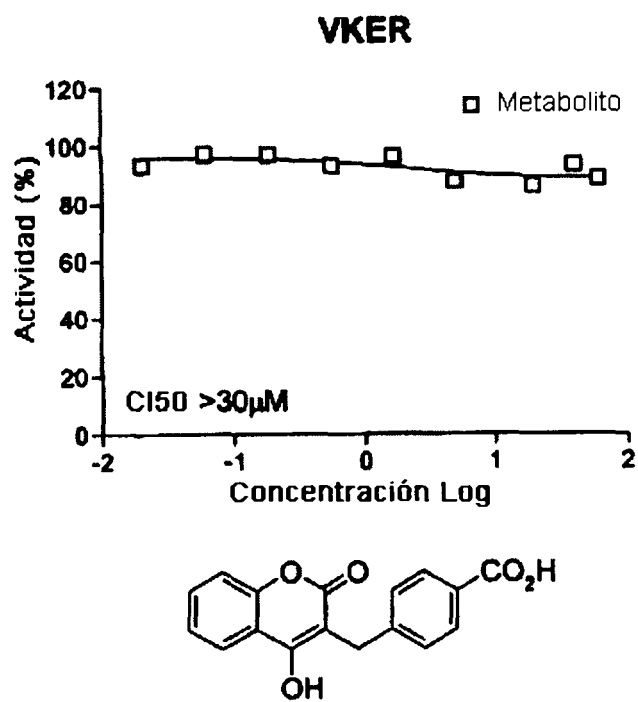


Figura 12. Efecto de la fluoración sobre el metabolismo por citocromo P450 y esterasa en microsomas humanos combinados

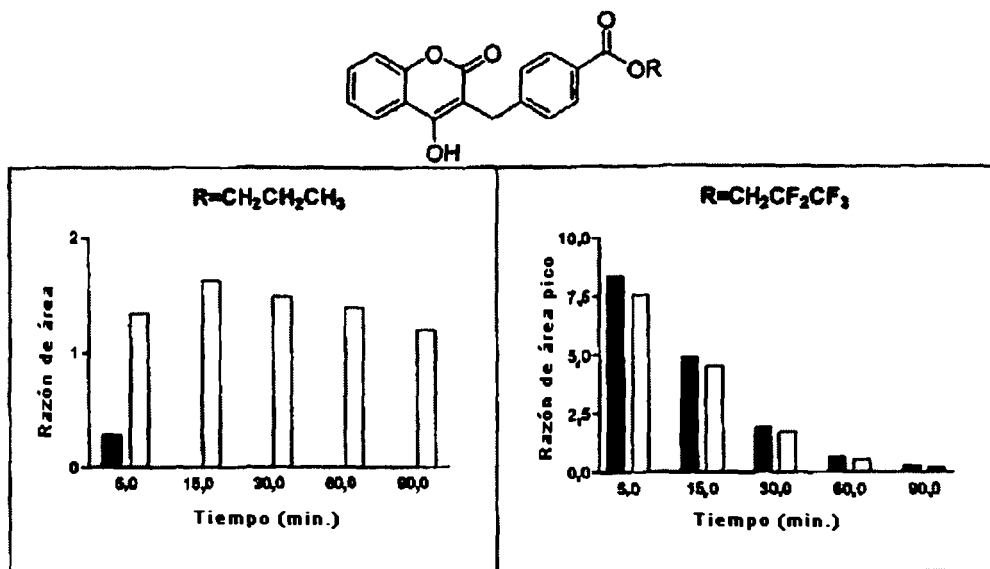


Figura 13. Efecto de la fluoración sobre el metabolismo por citocromo P450 y esterasa en microsomas humanos combinados

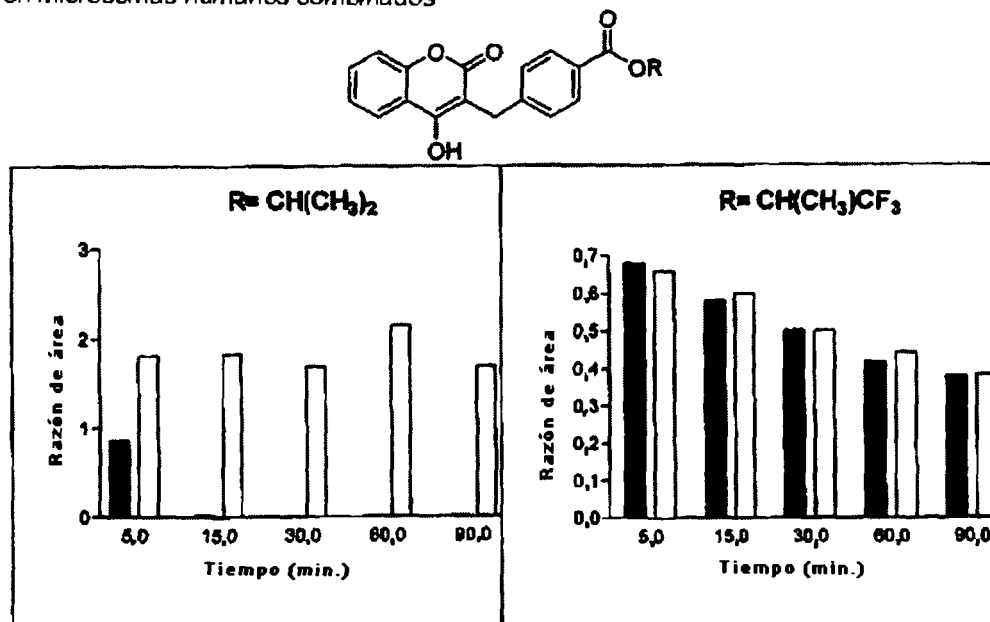


Figura 14. Control que demuestra el metabolismo de compuestos por esterasa

