



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 868**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)	A61K 31/4025 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)	C07D 401/06 (2006.01)
C07D 401/08 (2006.01)	C07D 401/10 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)	C07D 207/16 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)	C07D 403/12 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)	C07D 405/14 (2006.01)
C07K 5/02 (2006.01)	C07K 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00959232 .0**

86 Fecha de presentación : **14.08.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1265606**

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

54 Título: **Inhibidores de la adhesión celular.**

30 Prioridad: **13.08.1999 US 148845 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Biogen Idec MA Inc.**
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **Lee, Wen-Cherng;**
Scott, Daniel;
Cornebise, Mark y
Petter, Russell

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Inhibidores de la adhesión celular.

5 Antecedentes

La adhesión celular es un procedimiento mediante el cual las células se asocian unas con otras, se desplazan hacia una diana específica o se localizan en la matriz extra-celular. Como tal, la adhesión celular constituye uno de los mecanismos fundamentales que subyacen en numerosos fenómenos biológicos. Por ejemplo, la adhesión celular es responsable de la adhesión de células hematopoyéticas a células endoteliales y la posterior migración de esas células hematopoyéticas fuera de los vasos sanguíneos y al sitio de la herida. Como tal, la adhesión celular desempeña una función en patologías como inflamación y reacciones inmunes en mamíferos.

Las investigaciones en la base molecular de la adhesión celular han puesto de manifiesto que diversas macromoléculas de la superficie celular, colectivamente conocidas como moléculas o receptores de adhesión celular, median en las interacciones de célula-célula y célula-matriz. Por ejemplo, las proteínas de la superfamilia denominadas “integrinas” son mediadoras clave en las interacciones adhesivas entre células hematopoyéticas y su microentorno (M.E. Hemler, “VLA Proteins in the Integrin Family: Structures, Functions, and Their Role on Leukocytes”, *Ann. Rev. Immunol.* 8, pag. 365 (1990)). Las integrinas son complejos heterodímeros no covalentes que consisten en dos subunidades denominadas α y β . Hay al menos 12 subunidades α diferentes ($\alpha 1$ - $\alpha 6$, α -L, α -M, α -X, α -IIB, α -V y α -E) y al menos 9 subunidades β diferentes ($\beta 1$ - $\beta 9$). Basándose en el tipo de sus componentes de subunidades α y β , cada molécula de integrina es clasificada en una subfamilia.

La integrina $\alpha 4 \beta 1$, también conocida como antígeno-4 muy tardío (“VLA-4”), CD49d/CD29 es un receptor de la superficie celular de leucocitos que participa en una amplia diversidad de interacciones adhesivas tanto de célula-célula como de célula-matriz (M.E. Hemler, *Ann. Rev. Immunol.*, 8, pag. 365 (1990)). Sirve como receptor para la proteína de superficie celular endotelial inducible por citoquinas, molécula 1 de adhesión de células vasculares (“VCAM-1”), como para la fibronectina de la proteína de la matriz extracelular (“FN”) (Ruegg *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 177, pag. 179 (1991); Wayner *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 105, pag. 1873 (1987); Kramer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264, pag. 4684 (1989); Gehlsen *et al.* *Science*, 24, pag. 1228 (1988)). Los anticuerpos monoclonales anti-VLA4 (“mAb”) se ha mostrado que inhiben las interacciones adhesivas dependientes de VLA-4 tanto *in vitro* como *in vivo* (Ferguson *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88, pag. 8072 (1991); Ferguson *et al.*, *J. Immunol.*, 150, pag. 1172 (1993)). Los resultados de los experimentos *in vivo* sugieren que esta inhibición de la adhesión celular dependiente de VLA-4 puede prevenir o inhibir diversas patologías inflamatorias y autoinmunes (R. L. Lobb *et al.*, “The Pathophysiologic Role of $\alpha 4$ Integrins *In Vivo*”, *J. Clin. Invest.*, 94, pag. 1722-28 (1994)).

A pesar de estos avances, continúa habiendo una necesidad de inhibidores específicos y pequeños de la adhesión celular dependiente de VLA-4. Idealmente, estos inhibidores pueden ser administrados por vía oral. Estos compuestos proporcionarían agentes útiles para el tratamiento, prevención o supresión de diversas patologías mediadas por la adhesión celular y la unión de VLA-4.

Sumario

La presente invención proporciona nuevos compuestos no péptidos que inhiben específicamente la unión de ligandos a VLA-4. Estos compuestos son útiles para la inhibición, prevención y supresión de la adhesión celular mediada por VLA-4 y patologías asociadas con esa adhesión, como inflamación y reacciones inmunes. Los compuestos de esta invención pueden ser usados solos o en combinación con otros agentes terapéuticos o profilácticos que inhiban, prevengan o supriman la adhesión celular. Esta invención proporciona también composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de esta invención. Los compuestos y composiciones de la invención pueden ser usados para la inhibición de la adhesión celular.

Los nuevos compuestos y composiciones de la invención son ventajosamente usados para tratar enfermedades inflamatorias e inmunes. La descripción proporciona también métodos para preparar los compuestos de esta invención y los intermedios para los mismos.

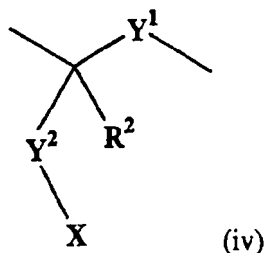
Esta invención se refiere a inhibidores de la adhesión celular de fórmula (I):



en la cual

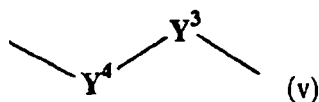
R^1 es pirrolidinil-SO₂-fenilo opcionalmente sustituido, en el que el sustituyente opcional es alquilo o halo;

L' es de fórmula (iv)



en la que Y¹ es -NH-CO-, R² es H, Y² es un enlace y X es COOH;

L es de fórmula (v)



en la que Y³ -(CH₂)₀₋₅-, e Y⁴ es -CO-NH; y

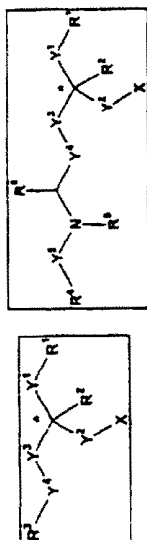
R³ es de fórmula R⁴-Y⁵-N(R⁵)-CH(R⁶)-, en que R⁶ es la cadena lateral de leucina o isoleucina; R⁵ es hidrógeno o metilo; Y⁵ es C(=O)- y R⁴ es o-metilfenilureidofenil-CH₂;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

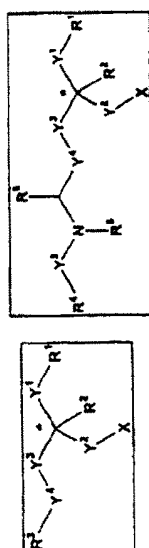
En una realización, los compuestos de la invención tienen un valor de IC₅₀ de 5 mM o por debajo, 2 nM o por debajo, 1 nM o por debajo o 0,5 nM o por debajo. Los valores de IC₅₀ pueden ser determinados mediante ensayos de unión como se describe con posterioridad o mediante otros métodos convencionales conocidos. En una realización, los compuestos de la invención tienen un % unido a la forma activada por Mn de moléculas de VLA-4 de 50% o más, 75% o más, 90% o más o 95% o más. En una realización, los compuestos de la invención tienen un % unido de la forma activada por Ca/Mg de moléculas de VLA-4 de 50% o más, 75% o más, 90% o más o 95% o más. El % unido a las moléculas de VLA-4 puede ser determinado mediante ensayos biológicos como se describe con posterioridad.

A continuación se exponen algunos ejemplos de un compuesto de esta invención. Por motivos de conveniencia, el átomo de nitrógeno y el átomo de carbono en la columna "N(R⁵)-CH(R⁶)" representan los átomos de nitrógeno α y los átomos de carbono α del aminoácido indicado. Por ejemplo, una entrada "Leu" indica que R⁵ es H y R⁶ es isobutilo.

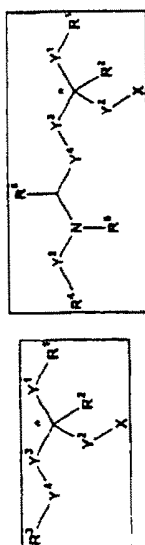
(Tabla pasa a página siguiente)



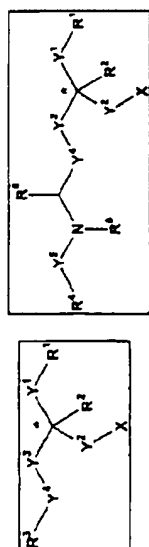
Comp. n°	R^3/R^4	Y^5	$N(R^5)CHR^6$	Y^4	Y^3	Y^2	Y^1	R^2	R^1	X	Conf.
5192	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
5283	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Lcu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
6714	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
7234	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
7662	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Lcu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
7796	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8221	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S



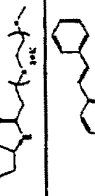
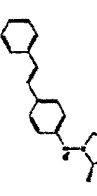
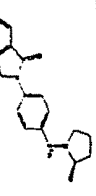
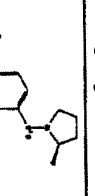
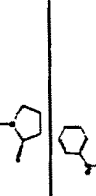
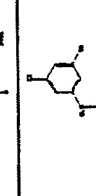

Comp. n°	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)CHR ⁶	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Conf.
8341	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8342	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	R
8343	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	R
8348	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	R
8367	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8368	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8469	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S

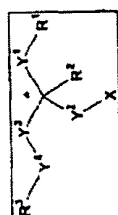
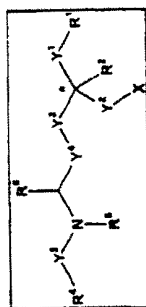


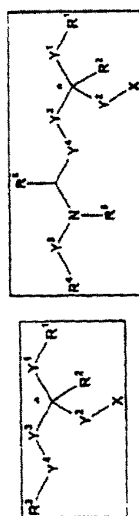
Comp. n°	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)CHR ⁶	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Conf.
8491	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHIC(O)-	H		CO ₂ H	S
8494	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	R
8555	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8558	oMePUP(CH ₂) ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8559	oMePUP(CH ₂) ₃	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8685	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8689	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S



Comp. n°	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)CHR ⁶	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Conf.
8690	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8723	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8746	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8749	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8758	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8796	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8797	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S

Comp. n°	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)CHR ⁶	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Conf.
8809	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9120	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9169	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9171	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9182	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9227	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9264	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S





Comp. n°	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)CHR ⁶	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Conf.
9315	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9418	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S

ES 2 270 868 T3

Uno o más de los inhibidores anteriormente descritos o sus sales pueden ser usados para la elaboración de un medicamento para tratar los trastornos anteriormente mencionados.

Un aspecto adicional de esta invención se refiere a una composición que comprende un vehículo farmacéutico y una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), *supra*.

Un compuesto de fórmula (I), *supra*, puede ser usado en un método para inhibir la adhesión celular dependiente de VLA-4, mediante el cual va a ser administrado a un paciente que lo necesita en una cantidad eficaz.

La capacidad de los compuestos de esta invención para antagonizar las acciones de VLA-4 los hace útiles para prevenir, tratar o invertir los síntomas, trastornos o enfermedades inducidos por la unión de VLA-4 a sus ligandos. Por tanto, estos antagonistas inhibirán los procedimientos de adhesión celular que incluyen la activación, migración, proliferación y diferenciación celular. Por lo tanto, pueden ser usados en métodos para el tratamiento, prevención, alivio o supresión de enfermedades o trastornos mediados por la trayectoria de VLA-4. Estas enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, asma, esclerosis múltiple, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, enfermedades pulmonares inflamatorias, artritis reumatoide, artritis séptica, diabetes de tipo I, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad de inflamación intestinal y otras.

Los compuestos de la invención contienen uno o más centros simétricos y, por tanto, se pueden producir como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros únicos, mezclas diastereómeras y diastereómeros individuales. La presente invención se entiende que abarca todas estas formas isómeras de los compuestos de la invención.

La invención reivindicada está previsto también que abarque las sales farmacéuticamente aceptables de Fórmula 1. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables que incluyen bases inorgánicas u orgánicas y ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, mangánicas, manganosas, potasio, sodio, zinc y similares. Son particularmente preferidas las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio.

Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se producen de forma natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanol-amina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliaminas, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden ser preparadas sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que incluyen ácidos inorgánicos y orgánicos. Estos ácidos incluyen los ácidos acético, bencenosulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mucico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares. Son particularmente preferidos los ácidos cítrico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico y tartárico.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "alquilo", solo o en combinación, se refiere a un radical alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene de 1 a 10, preferentemente de 1 a 6 y más preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos de estos radicales incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isoamilo, hexilo, decilo y similares.

Como se usa en toda esta solicitud, el término "paciente" se refiere a mamíferos, incluidos seres humanos. Y el término "célula" se refiere a células de mamíferos, incluidas células humanas.

Teniendo en cuenta las definiciones anteriores, otros términos químicos usados en toda esta solicitud pueden ser fácilmente comprendidos por los expertos en la técnica. Los términos pueden ser usados solos o en cualquier combinación de los mismos. Las longitudes de cadena preferidas y más preferidas de los radicales se aplican a todas estas combinaciones.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones, y también a partir de las reivindicaciones anejas.

Descripción detallada

Los compuestos de esta invención pueden ser sintetizados usando cualquier técnica convencional, de las que se ilustran varias en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, estos compuestos son químicamente sintetizados a partir de materiales de partida fácilmente disponibles, como α -aminoácidos y sus equivalentes funcionales. Los métodos modulares y convergentes para la síntesis de estos compuestos son también preferidos. En una aproximación convergente, por ejemplo, grandes secciones del producto final son llevadas conjuntamente en las últimas etapas de la síntesis, en lugar de mediante una adición aumentada de pequeños trozos a una cadena molecular creciente.

Los compuestos de la invención, $R^3-L-L'-R^1$, según una realización, pueden ser representados como $R^3-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1-R^1$. Este compuesto puede ser considerado como un derivado de dipéptido: con R^1 como un residuo de aminoácido o un derivado del mismo; Y^1 como un enlace amido, o un derivado del mismo, entre los dos residuos; X como un carboxilato o un derivado del mismo; C como un átomo de carbono α en el segundo residuo; y $R^3-Y^4-Y^3$ como la cadena lateral del segundo residuo.

En el método general ilustrado a continuación, el compuesto $R^3-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1-R^1$ es preparado acoplando primero un $Y^{4'}-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ apropiadamente protegido con un $R^{3'}$ apropiadamente protegido. Y^3 y X fueron definidos anteriormente. $Y^{4'}$, $Y^{1'}$ y $R^{3'}$ son precursores de Y^4 , Y^1 y R^3 , respectivamente.

Los compuestos de fórmula $Y^{4'}-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ están disponibles en el comercio o pueden ser reparados según métodos conocidos por un experto ordinario en la técnica. Por ejemplo, si $Y^{1'}$ es un grupo amino, X es un carboxilato y $Y^{4'}-Y^3$ es $-NH_2-(CH_2)_3-$, el compuesto $Y^{4'}-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ es ornitina. Como otro ejemplo, si $Y^{1'}$ es un grupo amino, X es carboxilato y $Y^{4'}-Y^3$ es 4- NH_2 -fenil- CH_2- , el compuesto $Y^{4'}-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ es 4-aminofenilalanina, disponible por reducción de 4-nitrofenilalanina disponible en el comercio. Una reducción adicional del resto fenilo produce un compuesto en el que $Y^{1'}$ es un grupo amino, X es carboxilato y $Y^{4'}-Y^3$ es 4- NH_2 -ciclohexil- CH_2- o 4-aminociclohexilalanina, disponible en el comercio como una mezcla de isómeros *cis* y *trans*. Como se mencionó anteriormente, son necesarios grupos protectores apropiados para evitar que ciertas funcionalidades experimenten reacciones indeseadas. Usando ornitina como un ejemplo, $Y^{1'}$ y X son funcionalidades que no están involucradas en la primera reacción de acoplamiento, y deben ser protegidas con grupos protectores de amino comunes, como carbamatos (por ejemplo, carbamato de t-butilo (BOC) y carbamato de bencilo (CBZ)) y grupos protectores de carboxilo comunes como ésteres sustituidos (por ejemplo, éster etílico y éster metoximetílico). Para más grupos protectores apropiados, véase la obra de T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, New York, 1981, y las referencias citadas en la misma.

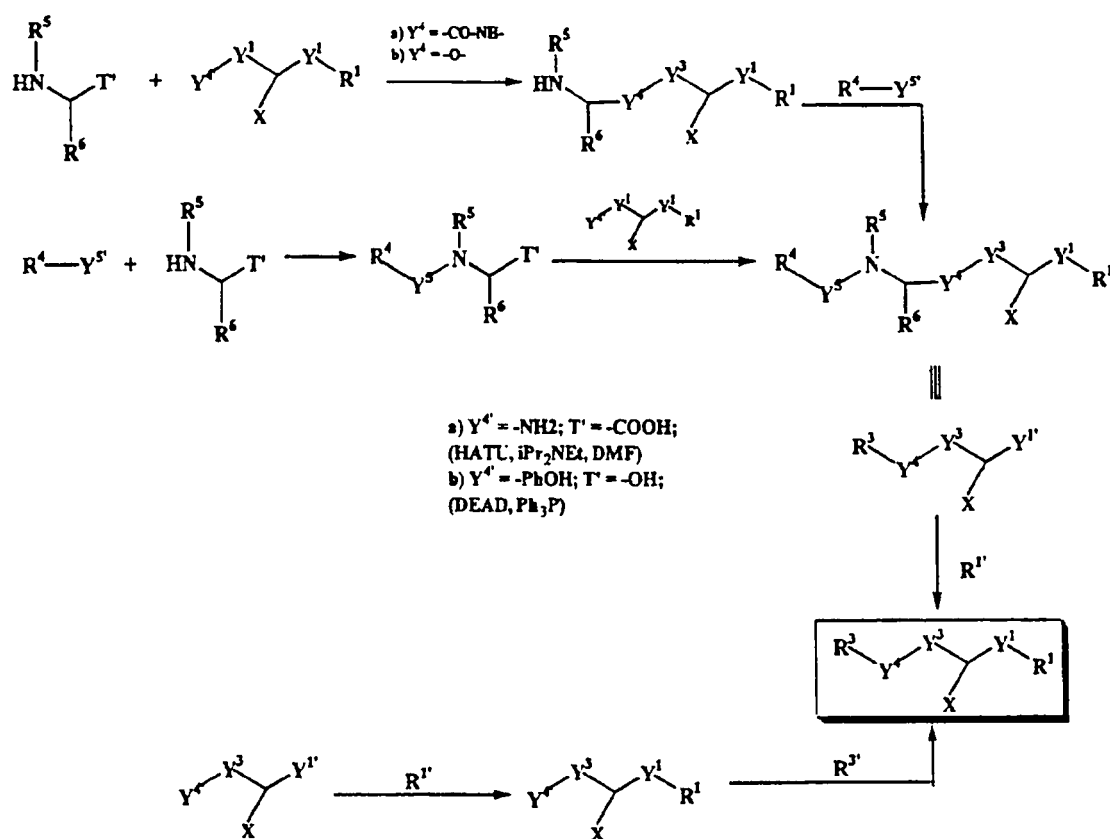
El compuesto $R^{3'}$ puede estar representado por la fórmula $Z^3-L^b-Z^4-T$ o $R^4-Y^5-N(R)CH(R^6)-T'$. Cada uno de T y T' es una funcionalidad que se une con $Y^{4'}$ para formar Y^4 . Por ejemplo, si el Y^4 deseado es un enlace amido, puede ser formado haciendo reaccionar un grupo amino ($Y^{4'}$) con un grupo carboxilo (T o T') en presencia de un reactivo de acoplamiento común como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP) o hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU). Como otro ejemplo, si el Y^4 deseado es un aril-éter, puede ser formado haciendo reaccionar un fenol con un alcohol en presencia de dicarboxilato de dietilo (DEAD) y trifenilfosfina.

Cuando $R^{3'}$ es de fórmula $Z^3-L^b-Z^4-T$, el compuesto está disponible en el comercio o puede ser preparado según métodos conocidos por un experto ordinario en la técnica. Por ejemplo, cuando Z^3 es 2-metil-fenilo, Z^4 es fenilmetilo, L^b es $-NH-CO-NH-$ y T es $-COOH$, $R^{3'}$ es ácido o-metilfenilureidofenilacético y puede ser obtenido mediante la reacción de ácido 4-aminofenilacético con isocianato de 2-metilfenilo. Como otro ejemplo, cuando Z^3 es 3-indol, Z^4 es fenilmetilo, L^b es $-CO-NH-$ y T es $-COOH$, $R^{3'}$ es ácido 3-indolcarboxamidofenilacético y puede ser obtenido mediante reacción de ácido 4-aminofenilacético con cloruro de indol-3-carbonilo.

Cuando $R^{3'}$ es de fórmula $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-T'$, $Y^{4'}-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ puede acoplarse a $NH(R^5)-CH(R^6)-T'$ para formar el intermedio $NH(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ antes de acoplarse adicionalmente a R^4-Y^5 para formar $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$. $Y^{5'}$ es una funcionalidad que, tras experimentar reacciones de acoplamiento adicionales, da lugar a la funcionalidad Y^5 . Debe apreciarse que el compuesto $NH(R^5)-CH(R^6)-T'$ puede ser un derivado de aminoácido que esté disponible en el comercio y puede ser preparado usando métodos convencionales por un experto ordinario en la técnica. Por ejemplo, cuando T' es carboxilo, R^6 es isobutilo y R^5 es metilo, el compuesto $NH(R^5)-CH(R^6)-T'$ es N-metil-leucina. $R^4-Y^{5'}$ puede ser acoplado a $NH(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ mediante métodos sintéticos comúnmente usados. Por ejemplo, si $Y^{5'}$ es carboxilo, el Y^5 es un enlace amido y puede ser preparado usando reactivos comunes de síntesis de péptidos, como se mencionó anteriormente. Como otro ejemplo, si $Y^{5'}$ es un haluro o sulfonato, el Y^5 resultante es una amina secundaria o terciaria que resulta de la alquilación de la amina de partida. Alternativamente, para formar el compuesto $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$, $NH(R^5)-CH(R^6)-T'$ puede ser acoplado primero a $R^4-Y^{5'}$ para formar el intermedio $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-T'$ antes de acoplarse adicionalmente a $Y^{4'}-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$. El Ejemplo 1 siguiente proporciona un procedimiento detallado en el que R^3 es de fórmula $R^4-Y-N(R^5)-CH(R^6)-$.

Alternativamente, cuando $R^{3'}$ es de fórmula $Z^3-L^b-Z^4-T$, puede reaccionar con $Y^{4'}-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ para formar $Z^3-L^b-Z^4-Y^4-Y^3-C(X)-Y^1$. Véase el Ejemplo 2.

El producto final $R^3-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ puede ser seguidamente formado haciendo reaccionar $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ o $Z^3-L^b-Z^4-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^{1'}$ con $R^{1'}$ (el precursor de R^1). El resto Y^1 puede ser formado de una manera similar a Y^4 .



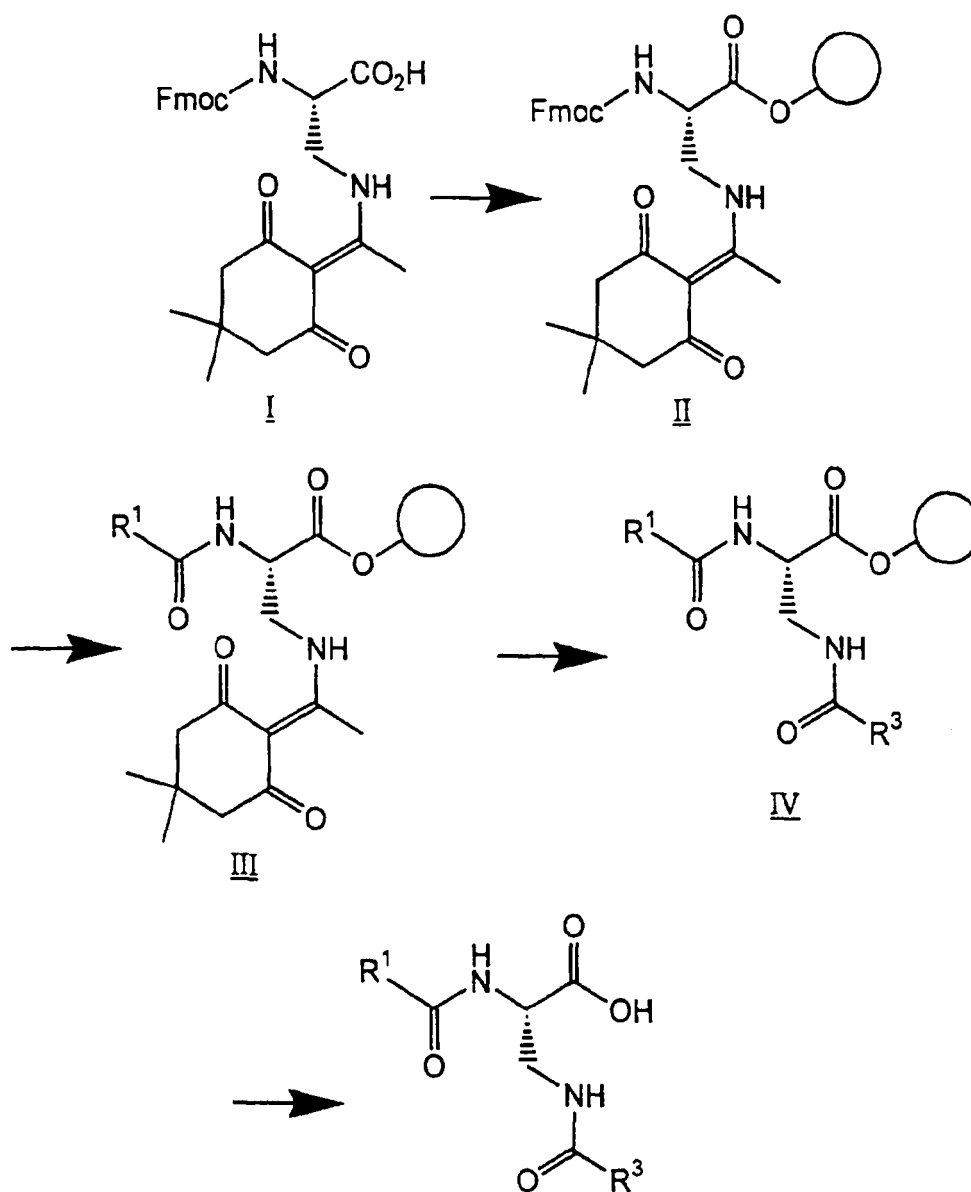
Un inhibidor de la adhesión celular de la invención puede ser purificado mediante métodos convencionales como cromatografía o cristalización.

A continuación se exponen métodos generales para preparar un compuesto de esta invención.

(Esquema pasa a página siguiente)

Método general A

Preparación en fase sólida de derivados de diaminopropionato



Resina de Wang protegida ortogonalmente con Fmoc/Dde (II): se unió ácido S-N- α -Fmoc-N- β -Dde-diaminopropiónico I (4,95 g, 10,1 mmol) a resina de Wang (7,88 g, 0,64 mmol/g, malla 100-200) mediante reacción con cloruro de 2,6-diclorobenzoilo (1,45 ml, 10,1 mmol) y piridina seca (1,35 ml) en 40 ml de DMF seca. La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La resina se aisló por filtración y se lavó tres veces con DMF y diclorometano. La resina fue rematada en los grupos terminales con cloruro de diclorobenzoilo y piridina (2 ml de cada uno) durante 2 h seguido de lavado como anteriormente. La resina resultante contenía 0,64 mol/g de Fmoc según se determinó mediante tratamiento con piperidina y medición de A₂₉₀.

Desprotección y acilación de N- α : La resina de diaminopropionato, II, fue tratada con piperidina al 20% en DMF durante 15 minutos, después de lo cual fue filtrada y lavada con DMF y diclorometano. La resina desprotegida fue inmediatamente acilada mediante tratamiento con R¹CO₂H (2 eq.), HATU (2 eq.) y diisopropiletilamina (4 eq.). Las reacciones fueron agitadas durante 2 h, filtradas y se repitió la acilación. La compleción de la acilación fue determinada mediante ensayo Kaiser negativo. La resina fue filtrada y lavada con DMF y diclorometano. Si R¹CO₂H es un aminoácido protegido con Fmoc, la desprotección y la acilación son repetidas como se describió anteriormente.

Desprotección y acilación de N- β : La resina acilada de diaminopropionato, III, fue tratada con hidrazina al 2% en DMF durante 1 h, después de lo cual fue filtrada y lavada con DMF y diclorometano. La resina desprotegida fue inmediatamente acilada mediante tratamiento con R³CO₂H (2 eq.), HATU (2 eq.) y diisopropiletilamina (4 eq.). Las

10

15

20

25



50

55

60

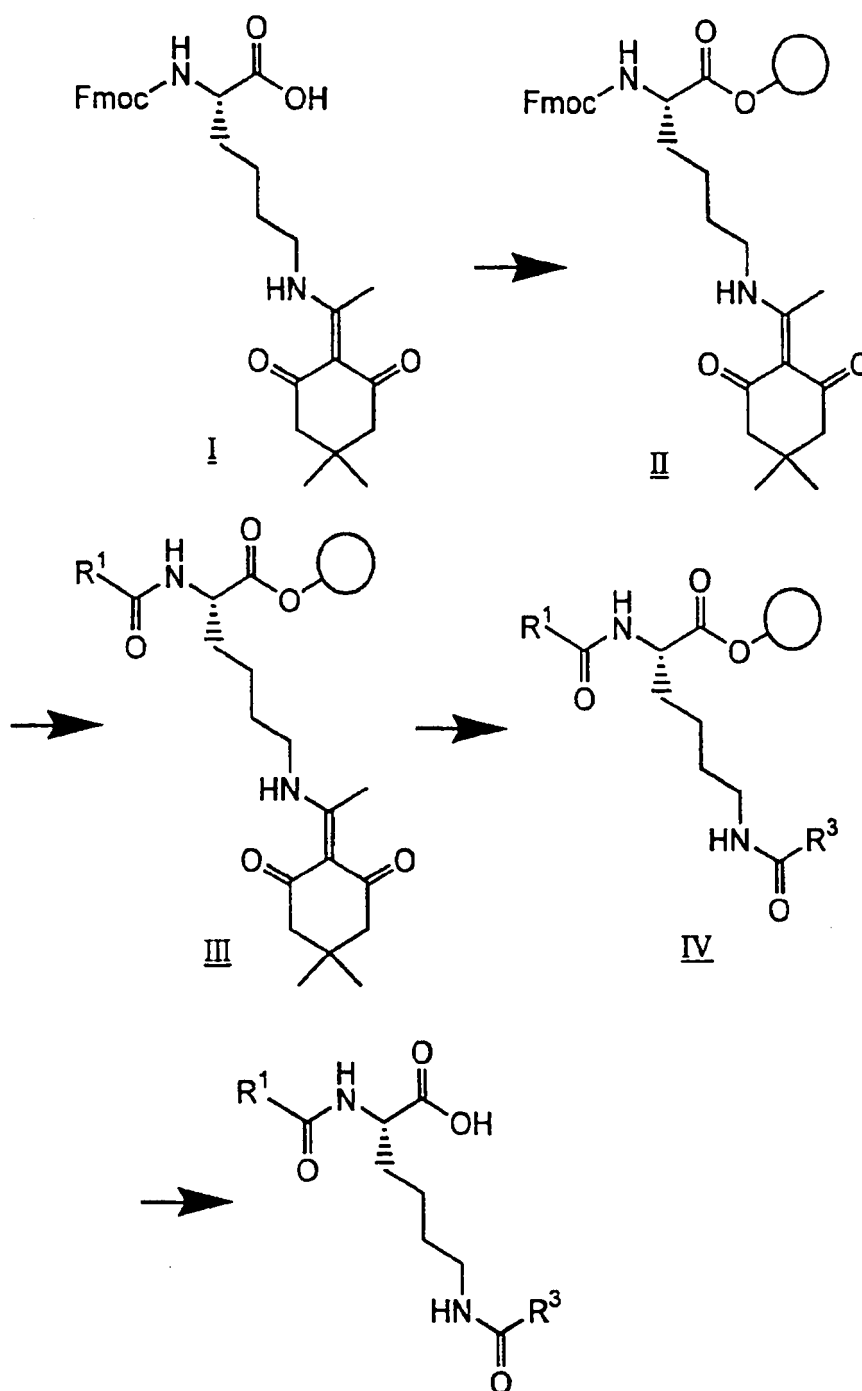
65

en N,N-dimetilformamida junto con R^3CO_2 (1 equivalente) y HBTU (1,1 equivalente). Con agitación fue añadida N,N-diisopropiletilamina (7,5 equivalentes). Después de agitar durante una noche, la reacción se dividió en partes entre ácido cítrico acuoso al 5% y acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada con solución saturada de cloruro de sodio y seguidamente secada sobre sulfato de sodio. La filtración del agente desecante y la evaporación del disolvente proporcionaron la amida VI en bruto, que fue usada sin purificación adicional.

Desprotección final: El éster metílico VI fue disuelto en tetrahidrofurano y metanol. Con agitación fue añadido hidróxido de litio acuoso (2 N). Después de agitar durante una hora, la mezcla de reacción fue concentrada hasta sequedad. El residuo fue dividido en partes entre cloruro de hidrógeno acuoso 1 N y acetato de etilo, y la capa orgánica fue lavada con cloruro de sodio saturado. Un secado sobre sulfato de sodio, filtrado y evaporación proporcionaron el ácido en bruto. Una purificación por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa proporcionó ácido puro.

Método general C

Preparación en fase sólida de derivados de lisina



ES 2 270 868 T3

Resina de Wang de Fmoc/Dde-lisina (II): Se unió N- α -Fmoc-N- β -Dde-lisina, I (5,0 g, 9,39 mmol) a resina de Wang (7,34 g, 0,64 mmol/g, malla 100-200) mediante reacción con cloruro de 2,6-diclorobenzoilo (1,33 ml, 10,1 mmol) y piridina seca (1,27 ml) en 50 ml de DMF seca. La mezcla fue agitada durante 16 h a temperatura ambiente. La resina fue aislada por filtración y fue lavada tres veces con DMF y diclorometano. La resina fue rematada en los grupos terminales mediante reacción con cloruro de diclorobenzoilo y piridina (2 ml de cada uno) durante 2 h seguido de un lavado como anteriormente. La resina resultante contenía 0,56 mmol/g de Fmoc según se determinó mediante tratamiento con piperidina y medición de A₂₉₀.

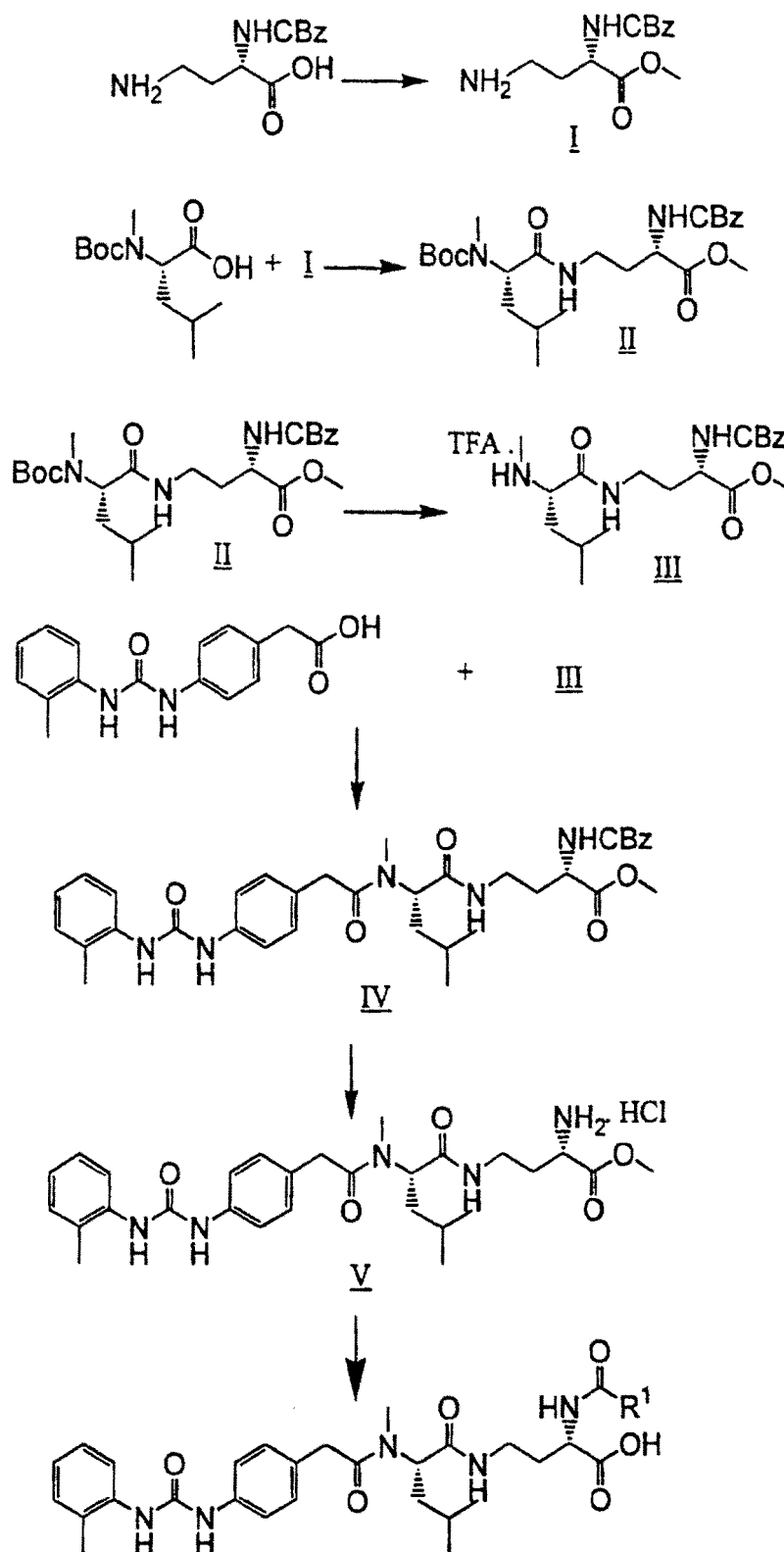
Desprotección y acilación de N- α : La resina de diaminopropionato, II, fue tratada con 20% de piperidina en DMF durante 15 minutos, después de lo cual fue filtrada y lavada con DMF y diclorometano. La resina desprotegida fue inmediatamente acilada mediante tratamiento con R¹CO₂H (2 eq.), HATU (2 eq.) y diisopropiletilamina (4 eq.). Las reacciones fueron agitadas durante 2 h, filtradas y fue repetida la acilación. La compleción de la acilación fue determinada mediante un ensayo Kaiser negativo. La resina fue filtrada y lavada con DMF y diclorometano. Si R¹CO₂H es un aminoácido protegido con Fmoc, la desprotección y acilación son repetidas como se describió anteriormente.

Desprotección y acilación de N- ϵ : La resina de lisina acilada, III, fue tratada con 2% de hidrazina en DMF durante 1 h, después de lo cual fue filtrada y lavada con DMF y diclorometano. La resina desprotegida fue inmediatamente acilada mediante tratamiento con R³CO₂H (2 eq.), HATU (2 eq.) y diisopropiletilamina (4 eq.). Las reacciones fueron agitadas durante 2 h, filtradas y se repitió la acilación. La resina fue filtrada y lavada con DMF y diclorometano.

Escisión de producto final a partir de resina: La resina de diacil-lisina, IV, fue tratada con 95% TFA/5% agua durante 1 h. El disolvente fue separado por filtración y la resina fue lavada con dos pequeñas partes de TFA. Las soluciones combinadas de TFA fueron concentradas bajo vacío y el residuo resultante fue purificado por HPLC de fase inversa produciendo derivados puros de diacil-lisina.

(Esquema pasa a página siguiente)

Método general D

Preparación de derivados de ácido oMePUPA-N-MeLeu- α,γ -diaminobutírico

65 Hidrocloruro de éster metílico de ácido N- α -CBZ-L-2,4-diaminobutírico (I): En un matraz RB de 500 ml se pusieron en suspensión 8,4 g (33,3 mmol) de ácido N- α -CBZ-L-2,4-diaminobutírico en 200 ml de metanol con agitación. Éste se enfrió a 0°C (baño con hielo) y seguidamente se añadieron gota a gota 14,6 ml (200 mmol) de SOCl₂ durante

15 minutos para proporcionar una solución incolora. La solución se dejó calentar a TA (temperatura ambiente) y fue agitada durante una noche. La solución fue concentrada, se volvió a disolver en MeOH y fue concentrada 2x, seguidamente fue disuelta en CH₂Cl₂, concentrada y colocada bajo alto vacío durante 16 horas para proporcionar el compuesto I en forma de una espuma ligeramente amarilla, que pesaba 10,33 g (34,2 mmol, 103%). M/z = 267,1 (M+H⁺).

Éster metílico de BOC-N-metil-leucinil-(N- α -CBZ)-GABA (II): En un matraz RB de 500 ml fueron disueltos 10,33 g (33,3 mmol) de I (PM = 302) en 10 ml de dimetilformamida (DMF) seca con agitación para proporcionar una solución incolora. A ésta se añadieron 17,4 ml (100 mmol) de diisopropiletilamina (DIEA), seguidamente 7,96 g (32,5 mmol) de Boc-N-Me-leucina y finalmente 14,83 g (39,0 mmol) de hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) para proporcionar una solución amarilla. Ésta fue agitada durante una noche, después de lo cual una HPLC no mostró nada de material de partida. La solución fue diluida con acetato de etilo (EtOAc, 500 ml) y lavada con HCl 1 N (2x), NaOH 1 N (2x) y salmuera (1x). La fase orgánica fue secada sobre MgSO₄ anhidro, filtrada y concentrada hasta dar un aceite rojo. Una cromatografía con 2:1 de hexano/EtOAc frente a gel de sílice proporcionó 12,56 g (25,5 mmol, 78%) de II (R_f = 0,46 con 1:1 de hex/EtOAc frente a sílice) en forma de un jarabe amarillo (HPLC > 99%). M/z = 494,3 (M+H⁺).

Sal de trifluoroacetato de éster metílico de H-N-metil-leucinil-(N- α -CBZ)-GABA (III): En un matraz RB de 50 ml fueron disueltos 0,50 g (1,01 mmol) de II (PM = 493) en 10 ml de CH₂Cl₂ con agitación para proporcionar una solución incolora. A ésta se añadieron 2 ml (26 mmol, gran exceso) de ácido trifluoroacético y la solución resultante fue agitada durante cuatro horas, después de lo cual una HPLC no mostró nada de material de partida. La solución fue concentrada, vuelta a disolver en CH₂Cl₂ y concentrada (2x), y seguidamente fue colocada bajo alto vacío durante una noche para proporcionar 0,52 g (~cuantitativo) de III en forma de un aceite amarillo muy pálido. M/z = 394,4 (M+H⁺). Material arrastrado.

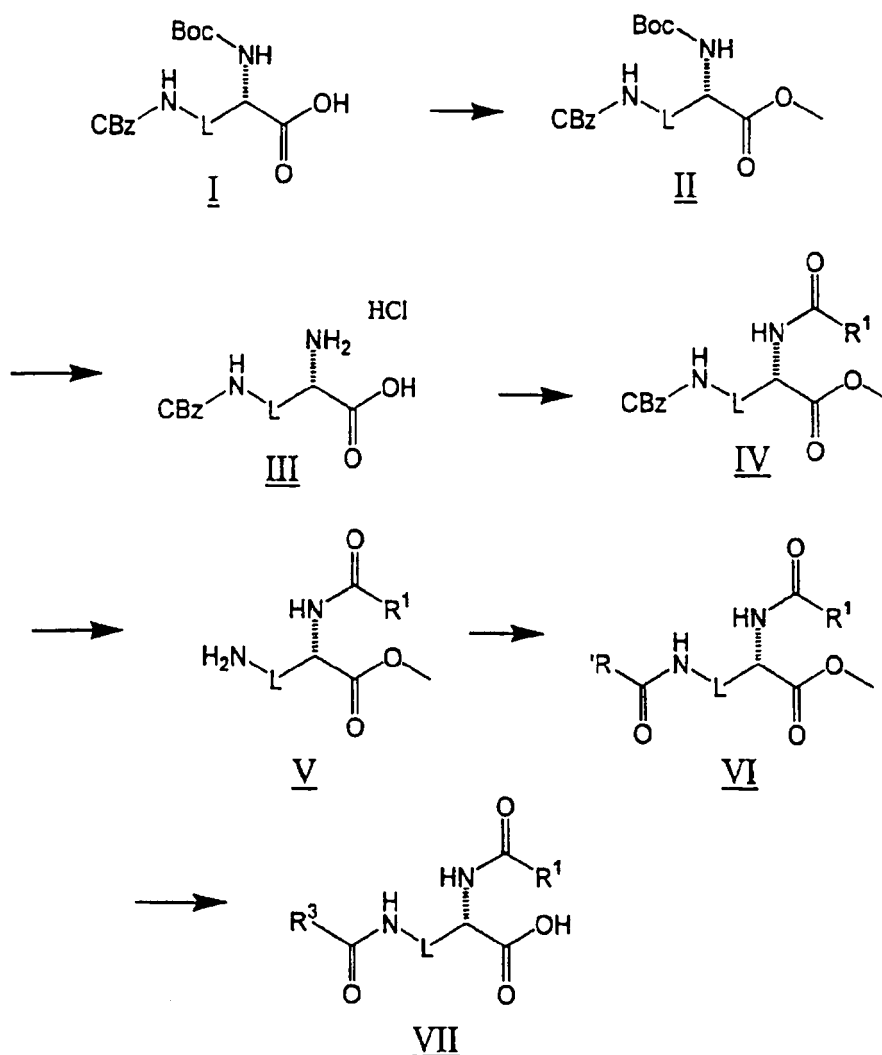
Éster metílico de oMePUPA-N-metil-leucinil-(N- α -CBZ)-GABA (IV): En un vial de 10 ml fueron disueltos 0,52 g (1,01 mmol) de III (PM = 507) en 5 ml de DMF con agitación para proporcionar una solución amarilla pálida. A ésta se añadieron 525 μ l (3,0 mmol) de DIEA, seguidamente 284 mg (1,0 mmol) de ácido libre oMePUPA (Ricerca; PM = 284) y finalmente 0,42 g (1,1 mmol) de HATU para proporcionar una solución amarilla. Ésta fue agitada durante una noche, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución fue diluida con EtOAc (75 ml) y lavada con HCl 1 N (3x), NaOH 1 N (3x) y salmuera (1x). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y el filtrado se concentró hasta dar una mezcla amarilla de aceite/sólido. Una cromatografía con 1:2 de acetonitrilo/CH₂Cl₂ frente a sílice proporcionó 0,49 g (0,74 mmol, 74%) de VI (R_f = 0,56 con 1:1 de acetonitrilo/CH₂Cl₂ frente a sílice) en forma de un sólido espumoso blanco brillante (HPLC > 99%). M/ = 660,1 (M+H⁺).

Hidrocloreto de éster metílico de oMePUPA-N-metil-leucinil-(N- α -H)-GABA (V): En un recipiente a presión elevada de 85 ml fueron disueltos 400 mg (0,61 mmol) de IV (PM = 659) en 10 ml de MeOH con agitación para proporcionar una solución incolora. El recipiente fue barrido con nitrógeno y se añadieron ~50 mg (catalítica) de 10% de paladio sobre carbono. Los lados del recipiente fueron lavados con MeOH adicional, y el recipiente fue tapado con un cabezal de hidrogenación. En el recipiente se introdujo H₂ a 4,14 bares y la mezcla fue agitada durante una noche, después de lo cual el recipiente fue purgado a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada a través de Celite 545, el cartucho de filtración fue lavado con MeOH adicional (10 ml) y el filtrado fue concentrado. El residuo fue disuelto en MeOH mínimo (2 ml) y se hizo gotear en HCl 1,0 M en dietil-éter para proporcionar un precipitado blanco. El sólido fue triturado en el HCl/éter durante 20 minutos, seguidamente fue filtrado, el sólido fue lavado con éter y secado con aire durante una hora. El sólido blanco fue seguidamente triturado en forma de un polvo con una espátula, fue lavado con éter adicional y secado con aire durante una noche para proporcionar 336 mg (0,60 mmol, 98%) de V en forma de un polvo blanco (HPLC > 99%). ESMS m/z = 526,6 (M+H⁺).

Acilación e hidrólisis final: La amina V en bruto fue disuelta en N,N-dimetilformamida junto con R³CO₂H (1 equivalente) y HBTU (1,1 equivalente). Con agitación fue añadida N,N-diisopropiletilamina (4 equivalentes). Después de agitar durante una noche, la reacción se dividió en partes entre 5% de ácido cítrico acuoso y acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada con solución saturada de cloruro de sodio, seguidamente fue secada sobre sulfato de sodio. Una filtración del agente desecador y la evaporación del disolvente proporcionaron la amida en bruto, que pudo ser purificada por HPLC de fase inversa. Se disolvió éster metílico en 1:1 de tetrahidrofurano y metanol. Con agitación fue añadido hidróxido de litio acuoso (2 N). Después de agitar durante una hora, la mezcla de reacción fue concentrada hasta sequedad. El residuo se dividió en partes entre cloruro de hidrógeno acuoso 1 N y acetato de etilo, y la capa orgánica fue lavada con cloruro de sodio saturado. Un secado sobre sulfato de sodio, filtrado y evaporación proporcionaron el ácido en bruto. Una purificación por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa preparativa proporcionó el producto puro.

Método general E

Síntesis en fase de solución a partir de diaminoácidos



La diamina ortogonalmente protegida con N-alfa-Boc/Cbz, I, fue convertida en el éster metílico II mediante reacción con yoduro de metilo (5 eq.) en acetona a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción fue diluida con agua y extraída con acetato de etilo. Las fases orgánicas fueron lavadas con agua, bicarbonato de sodio saturado y salmuera, secadas sobre sulfato de sodio y filtradas. El producto fue eluido a través de sílice en acetato de etilo y hexanos.

N-alfa-desprotección y acilación: La diamina completamente protegida, II, fue disuelta en HCl 3 N en EtOAc y fue agitada 1 h a temperatura ambiente. La solución fue concentrada bajo presión reducida. El sólido resultante fue puesto en suspensión en dietil-éter, aislado por filtración, lavado con éter y secado bajo vacío. El hidrocloreto, III, así aislado, fue tratado con HATU (1,25 eq.), diisopropiletilamina (4 eq.) y R¹CO₂H (1,25 eq.) en DMF seca, y fue agitado bajo nitrógeno durante 16 h. La mezcla de reacción fue diluida con 5% de ácido cítrico y fue extraída con EtOAc. Las fases orgánicas fueron lavadas con agua, bicarbonato de sodio saturado y salmuera, secadas sobre sulfato de sodio y filtradas. La solución fue concentrada bajo presión reducida y el residuo fue purificado mediante elución a través de sílice en EtOAc y hexano, proporcionando el producto puro, VI.

Desprotección y acilación distal de nitrógeno: El intermedio protegido con Cbz, IV, fue disuelto en metanol y desgasificado. Fue añadido 10% de Pd sobre carbono activado y la mezcla fue agitada bajo 4,14 bares de hidrógeno durante 3 a 16 h. La reacción fue filtrada y concentrada. La amina libre resultante fue inmediatamente acilada haciéndola reaccionar con HATU (1,25 eq.) en DMF seca, con agitación bajo nitrógeno durante 16 h. La mezcla de reacción fue diluida con ácido cítrico al 5% y fue extraída con EtOAc. Las fases orgánicas fueron lavadas con agua, bicarbonato de sodio saturado y salmuera, secadas sobre sulfato de sodio y filtradas. El producto, VI, fue purificado mediante elución a través de sílice en acetato de etilo y hexano.

Hidrólisis al producto final: El éter metílico VI fue disuelto en 1:1 de tetrahidrofurano y metanol. Cuan agitación fue añadido hidróxido de litio acuoso (2 N). Después de agitar durante una hora, la mezcla de reacción fue concentrada hasta sequedad. El residuo fue dividido en partes entre cloruro de hidrógeno acuoso 1 N y acetato de etilo, y la capa orgánica fue lavada con cloruro de sodio saturado. Un secado sobre sulfato de sodio, filtrado y evaporación proporcionaron el ácido en bruto. Una purificación mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa proporcionó el ácido puro VII.

Los compuestos de esta invención pueden ser modificados también mediante funcionalidades apropiadas anejas para mejorar las propiedades biológicas selectivas. Estas modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen las que aumentan la penetración biológica en un sistema biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumento de la disponibilidad oral, aumento de la solubilidad para permitir la administración por inyección, alteración del metabolismo y alteración de la velocidad de excreción. Ejemplos de estas modificaciones son esterificaciones con polietilenglicoles.

Una vez sintetizados, las actividades y las especificidades de VLA-4 de los compuestos según esta invención pueden ser determinadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Por ejemplo, la actividad inhibidora de la adhesión celular de estos compuestos puede ser medida determinando la concentración de inhibidor requerida para bloquear la unión de células que expresan VLA-4 a placas revestidas con fibronectina o CS1. En este ensayo, los pocillos de microtitulación son revestidos con fibronectina (que contiene la secuencia CS-1) o CS-1. Si se usa CS-1, debe ser conjugado a una proteína portadora, como albúmina de suero bovino, con el fin de que se una a los pocillos. Una vez que los pocillos están revestidos, son seguidamente añadidas concentraciones variables del compuesto del ensayo junto con células que expresan VLA-4 apropiadamente marcadas. Alternativamente, el compuesto del ensayo puede ser añadido en primer lugar y permitir que incube con los pocillos revestidos antes de la adición de las células. Las células se permite que incuben en los pocillos durante al menos 30 minutos. A continuación de la incubación, los pocillos son vaciados y lavados. La inhibición de la unión es medida cuantificando la fluorescencia de radiactividad unida a la placa para cada una de las diversas concentraciones de compuesto del ensayo, así como para los testigos que no contienen compuesto del ensayo.

Las células que expresan VLA-4 que pueden ser utilizadas en este ensayo incluyen células Ramos, células Jurkat, células de melanoma A375 así como linfocitos de sangre periférica humana (PBL). Las células usadas en este ensayo pueden estar marcadas de forma fluorescente o radiactiva.

Puede ser empleado también un ensayo de unión directa para cuantificar la actividad inhibidora de los compuestos de esta invención. En este ensayo, una proteína de fusión VCAM-IgG que contiene los dos primeros dominios de inmunoglobulina de VCAM 8D1D2) unida por encima de la región bisagra de una molécula de IgG1 ("VCAM 2D-IgG") es conjugada a una enzima marcadora, como fosfatasa alcalina ("AP"). La síntesis de esta fusión VCAM-IgG es descrita en la publicación PCT WO 90/13300, cuya descripción se incorpora como referencia a la presente memoria descriptiva. La conjugación de esa fusión a una enzima marcadora es conseguida mediante métodos de reticulación bien conocidos en la técnica.

El conjugado VCAM-enzima IgG es seguidamente colocado en los pocillos de una placa de filtración de múltiples pocillos, como la contenida en el sistema de ensayo Millipore Multiscreen (Millipore Corp., Bedford, MA). Seguidamente son añadidas concentraciones variables del compuesto inhibidor del ensayo a los pocillos, seguido de la adición de células que expresan VLA-4. Las células, el compuesto y el conjugado VCAM-enzima IgG son mezclados conjuntamente y se dejan incubar a temperatura ambiente.

A continuación de la incubación, los pocillos son purgados a vacío, dejando a un lado las células y cualquier VCAM unidas. La cuantificación de VCAM unidas es determinada añadiendo un sustrato colorimétrico apropiado para el conjugado enzimático a VCAM-IgG y determinando la cantidad de producto de reacción. Un producto de reacción disminuido indica una actividad inhibidora de la unión aumentada.

Con el fin de valorar la especificidad inhibidora de VLA-4 de los compuestos de esta invención, se realizan ensayos para otros grupos principales de las integrinas, es decir, $\beta 2$ y $\beta 3$, así como otras integrinas $\beta 1$, como VLA-5, VLA-6 y $\alpha 4\beta 7$. Estos ensayos pueden ser similares a los ensayos de inhibición de la adhesión y unión directa anteriormente descritos, sustituyendo la célula de expresión de integrinas apropiada y el correspondiente ligando. Por ejemplo, las células polimorfonucleares (PMN) expresan integrinas $\beta 2$ en su superficie y se unen a ICAM. Las integrinas $\beta 3$ están involucradas en la agregación plaquetaria y la inhibición puede ser medida en un ensayo estándar de agregación plaquetaria. Las VLA-5 se unen específicamente a secuencias de Arg-Gly-Asp, mientras que VLA-6 se une a laminina. La $\alpha 4\beta 7$ es un homólogo recientemente descubierto de VLA-4, que se une también a fibronectina y VCAM. La especificidad con respecto a $\alpha 4\beta 7$ es determinada en un ensayo de unión que utiliza el conjugado marcador de VCAM-enzima IgG anteriormente descrito y una línea celular que expresa $\alpha 4\beta 7$, pero no VLA-4, como células RPMI-8866.

Una vez que son identificados inhibidores específicos de VLA-4, pueden ser adicionalmente caracterizados en ensayos *in vivo*. Uno de estos ensayos verifica la inhibición de la hipersensibilidad de contacto en un animal, como es descrito por P.L. Chisholm *et al.*, "Monoclonal Antibodies to the Integrin $\alpha 4$ Subunit Inhibit the Murine Contact Hypersensitivity Response", Eur. J. Immunol., 23, pag. 682-688 (1993) y en "Current Protocols in Immunology", J. E. Coligan, *et al.*, Eds., John Wiley & Sons, New York, 1, pag. 4.2.1-4.2.5 (1991), cuyas descripciones se incorporan como

referencia a la presente memoria descriptiva. En este ensayo, la piel del animal es sensibilizada mediante la exposición a un irritante, como dinitrofluorobenceno, seguido de irradiación física de luz, como raspado de la piel ligeramente con un borde afilado. A continuación de un período de recuperación, son animales son nuevamente sensibilizados siguiendo el mismo procedimiento. Varios días después de la sensibilización, un oído del animal es expuesto al irritante químico, mientras que el otro oído es tratado con una solución testigo no irritante. Poco después de tratar los oídos, se proporciona a los animales varias dosis del inhibidor de VLA-4 mediante inyección subcutánea. La inhibición *in vivo* de la inflamación asociada a la adhesión celular es valorada midiendo la respuesta de hinchamiento del oído en el oído tratado frente al no tratado. El hinchamiento es medido usando dispositivos calibradores u otro instrumento adecuado para medir el grosor de oído. De esta manera, se pueden identificar los inhibidores de esta invención que están mejor adecuados para inhibir la inflamación.

Otro ensayo *in vivo* que puede ser empleado para ensayar los inhibidores de esta invención es el ensayo de asma de oveja. Este ensayo es realizado esencialmente como se describe por W. M. Abraham *et al.*, “ α -Integrins Mediate Antigen-induced Late Bronchial Responses and Prolonged Airway Hyperresponsiveness in Sheep”, J. Clin. Invest., 93, pag. 776-87 (1994), cuya descripción se incorpora como referencia a la presente memoria descriptiva. Este ensayo mide la inhibición de respuestas de las vías respiratorias en fase tardía inducida por antígenos *Ascaris* e hipersensibilidad de las vías respiratorias en una oveja asmática.

Los compuestos de la presente invención pueden ser usados en la forma de sales farmacéuticamente aceptables derivadas de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Están incluidos entre estas sales de ácidos los siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanoinpropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxiitanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalino-térreos, como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas, como sales de dicitlohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos como arginina, lisina, etcétera. También los grupos que contienen átomos básicos de nitrógeno pueden ser cuaternizados con agentes como haluros de alquilo inferior, como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; dialquil-sulfatos, como dimetil-, dietil-, dibutil- y diamil-sulfatos, haluros de cadenas largas como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. Son obtenidos así productos solubles o dispersables en agua o aceite.

Los compuestos de la presente invención pueden ser formulados en forma de composiciones farmacéuticas que pueden ser administradas por vía oral, parenteral, pulverización para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado. El término “parenteral”, como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye técnicas subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intra-articulares, intra-sinoviales, intraesternales, intratecales, intrahepáticas, intralesionales y de inyección o infusión.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden cualquiera de los compuestos de la presente invención, o sus derivados farmacéuticamente aceptables, junto con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. El término “vehículo”, como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye adyuvantes y vehículos aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser usados en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, como albúmina de suero humano, sustancias tamponantes como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, como sulfato de protamina, hidrógenofosfato de disodio, hidrógenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímero de bloques de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Según esta invención, las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una preparación inyectable esterilizada, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable esterilizada. Esta suspensión puede ser formulada según técnicas conocidas en el estado de la técnica, usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes suspensorios. La preparación inyectable puede ser también una solución o suspensión inyectable esterilizada en un diluyente o disolvente no tóxico farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución de 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden ser empleados están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos son convencionalmente empleados como un disolvente o medio suspensor. Para estos fines, puede ser empleado cualquier aceite fijo blando incluidos mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparaciones de productos inyectables, como lo son los aceites farmacéuticamente aceptables como el aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietyladas. Estas soluciones o suspensiones en aceites pueden contener también versiones polioxietyladas de cadena larga. Estas soluciones o suspensiones pueden contener también un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, como *Ph. Helv* o un alcohol similar.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral que incluyen, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos y suspensiones o soluciones acuosas.

En el caso de comprimidos para un uso oral, los vehículos que son comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. Normalmente son añadidos también agentes lubricantes, como estearato de magnesio. Para una administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando son requeridas suspensiones acuosas para un uso oral, el ingrediente activo es combinado con agentes emulsionantes y suspensores. Si se desea, pueden ser añadidos también ciertos agentes edulcorantes, aromáticos y colorantes.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas en la forma de supositorios para una administración rectal. Estas pueden ser preparadas mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Estos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas también por vía tópica, especialmente cuando la diana de tratamiento incluye zonas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluidas enfermedades del ojo, la piel o el tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas son fácilmente preparadas para cada una de estas zonas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede ser efectuada en una formulación para supositorio rectal (véase lo que antecede) o en una formulación adecuada para enemas. Pueden ser usados también parches tópicos-transdermales.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas en forma de un ungüento adecuado que contenga el componente activo puesto en suspensión o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para una administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas en forma de una solución o crema adecuada que contenga los componentes activos puestos en suspensión o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para un uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas en forma de suspensiones micronizadas en solución salina isotónica esterilizada de pH ajustado o, preferentemente, en forma de soluciones en solución salina esterilizada isotónica de pH ajustado, con o sin un conservante como cloruro de bencilalconio. Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas en un ungüento como petrolato.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas también mediante aerosol o inhalación nasal a través del uso de un nebulizador, un inhalador de polvos o un inhalador de dosis medidas. Estas composiciones son preparadas según técnicas bien conocidas en el estado de la técnica de las formulaciones farmacéuticas y pueden ser preparadas en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, favorecedores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinado con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variarán dependiendo del hospedante tratado y el modo particular de administración. Sin embargo, debe entenderse un régimen específico de tratamiento y dosificación para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, tiempo de administración, ritmo de excreción, combinación de fármacos y el criterio del facultativo encargado y la gravedad de la enfermedad particular que esté siendo tratada. La cantidad de ingrediente activo puede depender también del agente terapéutico o profiláctico, si no hay, con el que es conjuntamente administrado el ingrediente.

Como se estableció anteriormente, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un compuesto de esta invención está también dentro del alcance de esta invención. Una cantidad eficaz es definida como la cantidad que es necesaria para conferir un efecto terapéutico al paciente tratado, y dependerá de una diversidad de factores, como la naturaleza del inhibidor, la talla del paciente, el objetivo del tratamiento, la naturaleza de la patología que va a ser tratada, la composición farmacéutica específica usada y el criterio del facultativo encargado. Para una referencia, véase Freireich *et al.*, Cancer Chemother. Rep. 1966,50,219 and Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537. Son útiles niveles de dosificación entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día del compuesto del ingrediente activo.

Las composiciones que contienen un compuesto de esta invención pueden comprender también un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en corticoesteroides, broncodilatadores, antiasmáticos (estabilizadores de mastocitos), antiinflamatorios, antirreumáticos, inmunosupresores, antimetabolitos, inmunomoduladores, antipsoriáticos y antidiabéticos. Los compuestos específicos dentro de cada una de estas clases pueden ser seleccionados entre cualquiera de los citados bajo las cabeceras del grupo apropiado en "Comprehensive Medicinal Chemistry", Pergamon Press, Oxford, Inglaterra, pag. 970-986 (1990), cuya descripción se incorpora como referencia a la presente memoria descriptiva. También están incluidos en este grupo compuestos como teofilina, sulfasalazina y aminosalicilatos (antiin-

flamatorios); ciclosporina, FK-506 y rapamicina (inmunosupresores); ciclofosfamida y metotrexato (antimetabolitos) e interferones (inmunomoduladores).

Las composiciones de la invención pueden ser usadas en métodos para prevenir, inhibir o suprimir la inflamación asociada a la adhesión celular y las respuestas inmunes o autoinmunes asociadas a la adhesión celular. La adhesión celular asociada a VLA-4 desempeña una función central en una diversidad de enfermedades de inflamación, inmunes y autoinmunes. Por tanto, la inhibición de la adhesión celular por los compuestos de esta invención puede ser utilizada en métodos para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias, inmunes y autoinmunes. Preferentemente, las enfermedades que van a ser tratadas son seleccionadas entre asma, artritis, soriasis, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, diabetes y enfermedad de inflamación intestinal.

Estos métodos pueden emplear los compuestos de esta invención en una monoterapia o en combinación con un agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Estas terapias de combinación incluyen la administración de los agentes en una forma de dosificación única en formas de dosificaciones múltiples administradas al mismo tiempo o en momentos diferentes.

Con el fin de que esta invención sea comprendida de forma más completa, se exponen los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos son para fines solamente de ilustración, y no deben ser concebidos como una limitación del alcance de la invención en modo alguno.

Intermedio 1

Ácido 4-(2-metilfenilaminocarbonilamino)fenilacético (oMePUPA-OH): A una suspensión de ácido p-aminofenilacético (56,8 g, 376 mmol) en DMS (150 ml) se añadió gota a gota isocianato de o-tolilo (50 g, 376 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar 1 h y se vertió en EtOAc (1,75 l) con agitación. El precipitado se recogió y se lavó con EtOAc (400 ml) y MeCN (400 ml) para proporcionar oMePUPA (80 g, 75%). ESMS m/z (M+H)⁺ 285,1.

Intermedio 2

OMePUPA-Leu-OH: Se combinó oMePUPA-OH (0,78 g) con hidrocloreto de éster metílico de leucina (0,50 g, 1,0 eq.), HATU (1,10 g, 1,05 eq.) y diisopropiletilamina (1,9 ml, 4 eq.) en 10 ml de DMF seca. La reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, después de lo cual se diluyó con 50 l de EtOAc, que se lavó con ácido cítrico al 5%, agua, bicarbonato de sodio saturado y salmuera. La solución orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para producir 1,13 g de un sólido blanco. Este producto se disolvió en 10 ml de THF. Se añadieron 5 ml de LiOH 2 N y la reacción se agitó durante 16 h. Se separó THF bajo presión reducida y la solución se diluyó con 40 ml de agua y se lavó con EtOAc. La capa acuosa se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con HCl diluido y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, produciendo 0,77 g de un sólido blanco. ESMS m/z (M+H)⁺ 398,5.

Intermedio 3

Éster metílico de N-(3,5-diclorobencenosulfonil)prolina: A una solución de 24,8 g (0,15 moles) de hidrocloreto de éster metílico de L-prolina en 500 ml de CH₂Cl₂ se añadieron 70 ml (0,5 moles) de trietilamina con agitación, para proporcionar un precipitado blanco copioso. La mezcla se filtró y el filtrado se enfrió a 0°C (baño con hielo) con agitación. A la solución enfriada se añadió una solución de 36,8 g (0,15 moles) de cloruro de 3,5-diclorobencenosulfonilo en 70 ml de CH₂Cl₂ gota a gota rápidamente durante cinco minutos. El embudo de adición fue aclarado con 30 ml adicionales de CH₂Cl₂ y la mezcla amarilla turbia se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación durante una noche. La mezcla se lavó 2x con 400 ml de HCl 1 N, 2x con 400 ml de NaOH 1 N, seguidamente salmuera, seguidamente se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para dar un aceite amarillo que cristalizó en reposo. El material se recrystalizó tres veces en acetato de etilo/hexanos para proporcionar 39,3 g (0,116 moles, 77%) de éster metílico de N-(3,5-diclorobencenosulfonil)prolina (PM = 338) en forma de agujas blancas (TLC sobre sílice frente a 2:1 de hexanos/acetato de etilo, R_f = 0,51). M/z = 339 (M+H)⁺.

N-(3,5-diclorobencenosulfonil)prolina: A una solución de 39,3 g (0,116 moles) del éster metílico anterior en 250 ml de metanol se añadieron 115 ml (0,23 moles) de LiOH acuoso 2 M recientemente preparado con agitación, para proporcionar una solución incolora. Ésta se agitó durante tres horas, después de lo cual una HPLC mostró que no había nada de material de partida. La solución se redujo en un 50% a vacío y se dividió en partes entre HCl 1 N y CH₂Cl₂ (~200 ml de cada uno). Las fases se separaron y la capa acuosa se lavó nuevamente con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se concentraron hasta dar un sólido espumoso blanco. Éste se recrystalizó dos veces en acetato de etilo/hexanos para proporcionar 33,8 g (0,104 moles, 90%) del compuesto del título en forma de agujas lisas, anchas e incoloras. M/z = 325,2 (M+H)⁺.

Intermedio 4

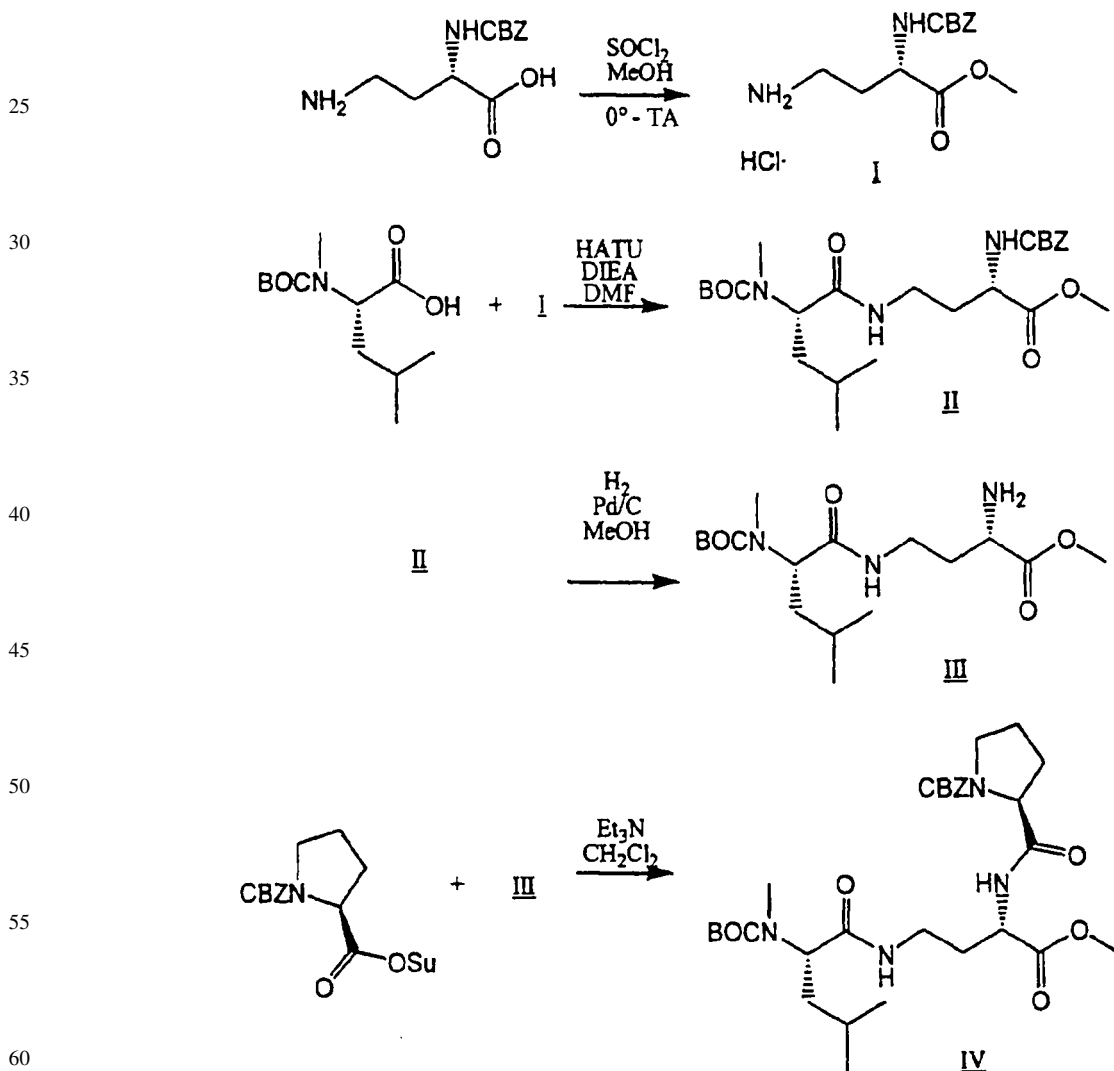
Éster metílico de N-(bencenosulfonil)prolina: A una solución de 25 g (0,15 moles) de hidrocloreto de éster metílico de L-prolina en 500 ml de CH₂Cl₂ se añadieron 70 ml (0,5 moles) de trietilamina con agitación, para proporcionar un precipitado blanco copioso. La mezcla se filtró y el filtrado se enfrió a 0°C (baño con hielo) con agitación. A la solución

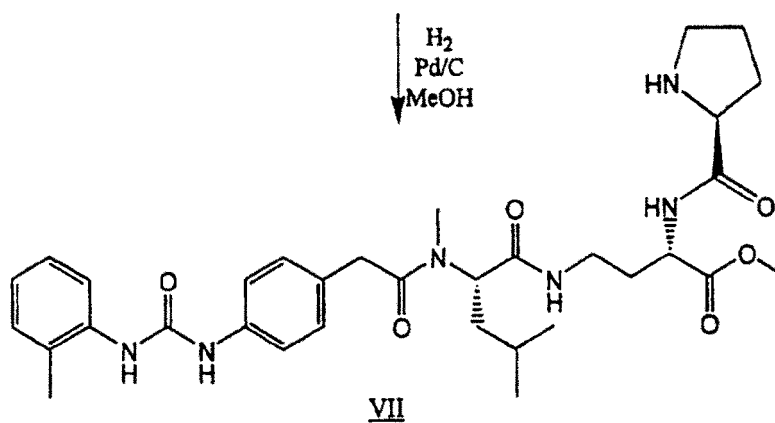
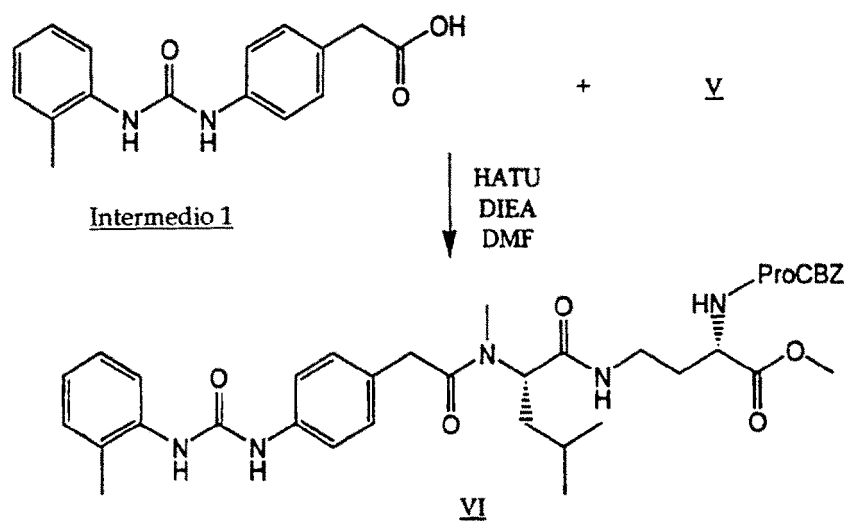
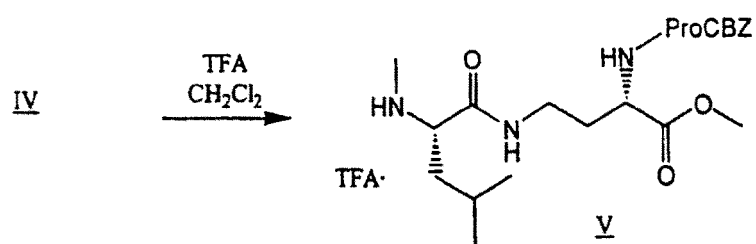
enfriada se añadió una solución de 20 ml (0,15 moles) de cloruro de bencenosulfonilo en 50 ml de CH_2Cl_2 gota a gota durante quince minutos. El embudo de adición se aclaró con 25 ml adicionales de CH_2Cl_2 y la mezcla incolora turbia se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación durante una noche. La solución se lavó 2x con 400 ml de HCl 1 N, 2x con 400 ml de NaOH 1 N, 1x con salmuera y seguidamente secó (MgSO_4), se filtró y se concentró hasta dar un sólido amarillo pálido. Este material se recrystalizó tres veces en acetato de etilo/hexanos para proporcionar 38,2 g (0,142 moles, 95%) de éster metílico de N-(bencenosulfonil)prolina (PM = 269) en forma de agujas blancas anchas (TLC frente a 2:2 de hexanos/acetato de etilo, $R_f = 0,35$). $M/z = 270,2$ ($M+H$)⁺.

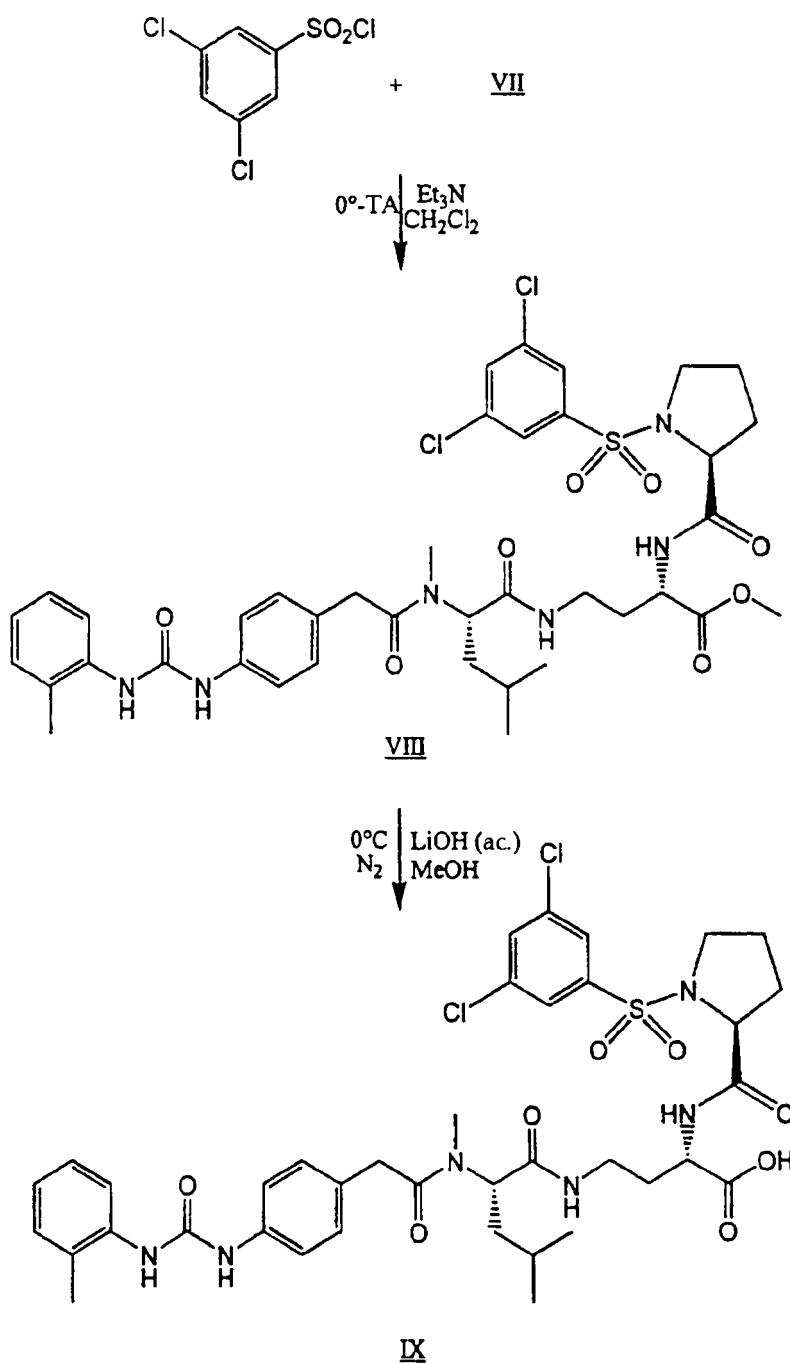
N-(bencenosulfonil)prolina: A una solución de 38,2 g (0,42 moles) de éster metílico anterior en 500 ml de metanol se añadieron 140 ml (0,28 moles) de LiOH acuoso 2 M recientemente preparado con agitación para proporcionar una solución incolora. Ésta se agitó durante una noche, después de lo cual una HPLC mostró que no había nada de material de partida. La solución se redujo en un 50% a vacío y se dividió en partes entre HCl 1 N y CH_2Cl_2 (~200 ml de cada uno). Las fases se separaron y la capa acuosa se lavó nuevamente con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO_4) y se concentraron hasta dar un sólido blanco. Éste se recrystalizó dos veces en acetato de etilo/hexanos para proporcionar 34,7 g (0,136 moles, 96%) del compuesto del título en forma de agujas blancas finas. $M/z = 256,2$ ($M+H$)⁺.

Ejemplo 1

20 Síntesis del Compuesto IX







55 *Hidrocloruro de éster metílico I*: En un matraz RB de 500 ml se pusieron en suspensión 8,4 g (33,3 mmol) de ácido 1-N-CBZ-L-2,4-diaminobutírico en 200 ml de metanol (MeOH) con agitación. Éste se enfrió a 0°C (baño con hielo) y seguidamente se añadieron 14,6 ml (200 mmol) de SOCl₂ gota a gota durante 15 minutos para proporcionar una solución incolora. La solución se dejó calentar a TA y agitar durante una noche, después de lo cual el espectro de RMN protónica de una parte alícuota indicó que la reacción se había completado. La solución se concentró, se volvió a disolver en MeOH y se concentró 2x, seguidamente se disolvió en CH₂Cl₂ concentrado y se colocó bajo alto vacío durante 16 horas para proporcionar el compuesto I en forma de una espuma ligeramente amarilla, que pesaba 10,33 g (34,2 mmol, 103%). MS: m/z 267 (M+H)⁺.

60

65 *Éster metílico de terc-butoxicarbonilo II*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 10,33 g (33,3 mmol) de I en dimetilformamida seca (DMF) con agitación para proporcionar una solución incolora. A ésta se añadieron 17,4 ml (100 mmol) de diisopropiletilamina (DIEA), seguidamente 7,96 g (32,5 mmol) de Boc-N-metil-leucina y finalmente 14,83 g (39,0 mmol) de hexafluorofosfato de O-(7-azabencotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) para proporcionar una solución amarilla. Ésta se agitó durante un anoche, después de lo cual una HPLC mostró que no había nada de material de partida. La solución se diluyó con acetato de etilo (EtOAc, 500 ml) y se lavó con HCl 1 N (2x), NaOH 1 N

ES 2 270 868 T3

(2x) y salmuera (1x). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró hasta dar un aceite rojo. Una cromatografía con 2:1 de hexanos/ EtOAc frente a sílice proporcionó 12,56 g (25,5 mmol, 78%) de II en forma de un jarabe amarillo (HPLC > 99%), MS: m/z 393 (M-BOC)⁺ 494 (M+H)⁺.

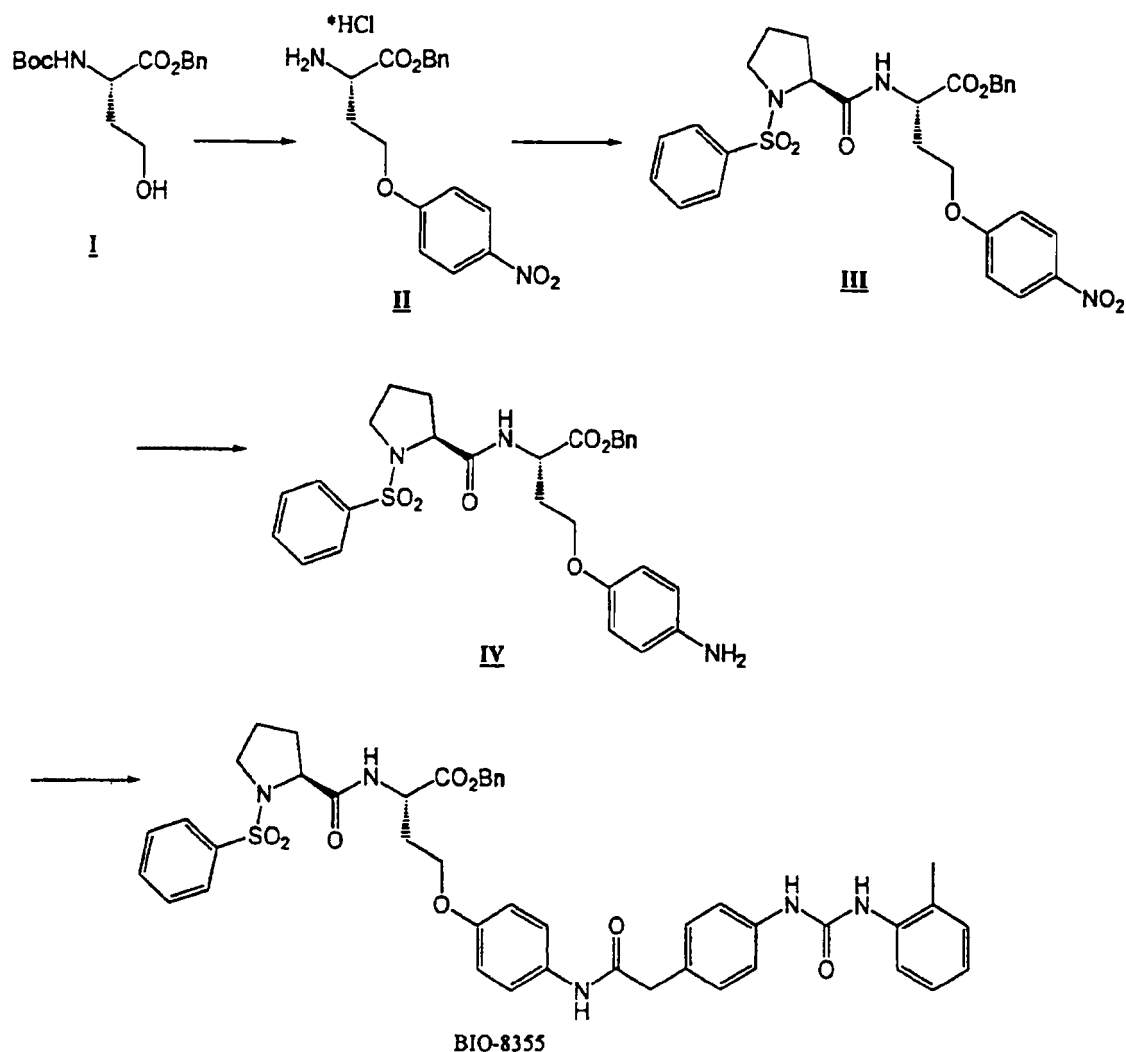
- 5 *Aminoéster III*: En un recipiente a presión elevada de 280 ml se disolvieron 11,38 g (23,08 mmol) de II en 75 ml de MeOH con agitación para proporcionar una solución color naranja. El recipiente se barrió con nitrógeno, y se añadieron ~200 mg (catalíticos) de 10% de paladio sobre carbono (Pd/C). Los lados del recipiente se lavaron con MeOH adicional, y el recipiente fue tapado con un cabezal de hidrogenación. La mezcla se colocó bajo 4,14 bares de H_2 con agitación durante una noche, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida.
- 10 La mezcla se filtró a través de Celite 545, el cartucho del filtro se aclaró con MeOH adicional y el filtrado se concentró hasta dar un aceite incoloro, III, que pesaba 8,29 g (~cuantitativo). Material tratado. MS: m/z 360 (M+H)⁺.

- 15 *Éster metílico de carbamato de bencilo IV*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 8,29 g (23,08 mmol) de III en 100 ml de CH_2Cl_2 con agitación para proporcionar una solución incolora. A ésta se añadieron 7,0 ml (50 mmol) de trietilamina (Et_3N), seguidamente 7,96 g (23,0 mmol) de éster de hidroxisuccinimida de CBZ-prolina (CBZ-Pro-Osu) para proporcionar una solución incolora. Ésta se agitó durante una noche, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se diluyó con CH_2Cl_2 adicional, se lavó con HCl 1 N (2x), NaOH 1 N (2x) y la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el filtrado se concentró hasta dar un aceite incoloro. Una cromatografía con 3:1 de EtOAc /hexanos frente a sílice proporcionó 12,22 g (20,7 mmol, 90%) de IV en forma de un cristal espumoso incoloro (HPLC, >99%). MS: m/z 490 (M-BOC)⁺ 591 (M+H)⁺.
- 20 *Sal de trifluoroacetato de amina V*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 11,80 g (20,0 mmol) de IV en 120 ml de CH_2Cl_2 con agitación para proporcionar una solución incolora. A ésta se añadieron 20 ml (260 mmol, gran exceso) de ácido trifluoroacético (TFA), y la solución resultante se agitó durante cuatro horas, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se concentró, se volvió a disolver en CH_2Cl_2 con agitación para proporcionar una solución incolora. A esta se añadieron 20 ml (260 mmol, gran exceso) de ácido trifluoroacético (TFA) y la solución resultante se agitó durante cuatro horas, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se concentró, se volvió a disolver en CH_2Cl_2 y se concentró (2x), seguidamente se colocó bajo alto vacío para proporcionar 12,1 g (~cuantitativo) de V en forma de un aceite amarillo pálido. Material tratado. MS: m/z 491 (M+H)⁺.
- 30 *Éster metílico de diaril-urea VI*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 12,1 g (20 mmol) de V en 100 ml de DMF con agitación para proporcionar una solución amarilla pálida. A ésta se añadieron 17,4 ml (100 mmol) de DIEA, seguidamente 5,68 g (20,0 mmol) de Intermedio 1 (oMePUPA-OH) y finalmente 9,12 g (24 mmol) de HATU para proporcionar una solución amarilla. Ésta se agitó durante una noche, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se diluyó con EtOAc (500 ml) y se lavó con HCl 1 N (2x), NaOH 1 N (2x) y salmuera (1x). La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y el filtrado se concentró hasta dar una mezcla amarilla de aceite/sólido. Una cromatografía con 2:1 de acetonitrilo/ CH_2Cl_2 frente a sílice proporcionó 11,35 g (15,0 mmol, 75%) de VI en forma de un sólido espumoso ligeramente amarillo (HPLC >99%). MS: m/z 757 (M+H)⁺, 779 (M+Na⁺).
- 35 *Éster aminometílico VII*: En un recipiente a presión elevada de 280 ml se disolvieron 8,0 g (10,6 mmol) de VI en 50 ml de MeOH con agitación para proporcionar una solución ligeramente amarilla. El recipiente fue barrido con nitrógeno y se añadieron ~250 mg (catalíticos) de 10% de Pd/C. Los lados del recipiente fueron lavados con MeOH adicional y el recipiente fue tapado con el cabezal de hidrogenación. La mezcla se colocó bajo 3,45 bares de H_2 con agitación durante una noche, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La mezcla se filtró a través de Celite 545, el cartucho del filtro se aclaró con MeOH adicional y el filtrado se concentró para proporcionar 6,6 g (~cuantitativo) de VII en forma de un sólido blanco. Material tratado. MS: m/z 623 (M+H)⁺.
- 50 *Éster metílico de sulfonamida VIII*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 6,6 g (10,6 mmol) de VIII en 100 ml de CH_2Cl_2 seco con agitación para proporcionar una solución incolora. Ésta se enfrió a 0°C (baño con hielo) y se añadieron 4,2 ml (30 mmol) de Et_3N , seguidos de una solución de 3,68 g (15 mmol) de cloruro de 3,5-diclorobencenosulfonilo en 25 ml de CH_2Cl_2 seco añadidos gota a gota durante 10 minutos. La solución resultante se dejó calentar a TA y se agitó durante 2 horas, después de lo cual una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se diluyó con CH_2Cl_2 adicional y se lavó con HCl 1 N (2x) y NaOH 1 N (2x), seguidamente se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el filtrado se concentró hasta dar un sólido amarillo. Una cromatografía con 2:1 de CH_2Cl_2 /acetonitrilo frente a sílice proporcionó 6,68 g (8,0 mmol, 75%) de VIII en forma de un sólido amarillo (HPLC >99%). MS: m/z 832/833 (M+H)⁺.
- 55 *Ácido carboxílico IX*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 6,26 g (7,53 mmol) de VIII en 150 ml de MeOH con agitación para proporcionar una solución incolora. Ésta se enfrió a 0°C (baño con hielo) y se hizo burbujear nitrógeno a través de la solución en agitación durante 30 minutos. A ésta se añadieron 19 ml (38 mmol) de solución 2 M de LiOH recientemente preparada gota a gota durante 10 minutos, después de lo cual la solución se agitó a 0°C bajo nitrógeno mientras el progreso de la reacción se verificaba estrechamente mediante HPLC. Después de tres horas, una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se concentró con un calentamiento mínimo
- 60 *Ácido carboxílico IX*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 6,26 g (7,53 mmol) de VIII en 150 ml de MeOH con agitación para proporcionar una solución incolora. Ésta se enfrió a 0°C (baño con hielo) y se hizo burbujear nitrógeno a través de la solución en agitación durante 30 minutos. A ésta se añadieron 19 ml (38 mmol) de solución 2 M de LiOH recientemente preparada gota a gota durante 10 minutos, después de lo cual la solución se agitó a 0°C bajo nitrógeno mientras el progreso de la reacción se verificaba estrechamente mediante HPLC. Después de tres horas, una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se concentró con un calentamiento mínimo
- 65 *Ácido carboxílico IX*: En un matraz RB de 500 ml se disolvieron 6,26 g (7,53 mmol) de VIII en 150 ml de MeOH con agitación para proporcionar una solución incolora. Ésta se enfrió a 0°C (baño con hielo) y se hizo burbujear nitrógeno a través de la solución en agitación durante 30 minutos. A ésta se añadieron 19 ml (38 mmol) de solución 2 M de LiOH recientemente preparada gota a gota durante 10 minutos, después de lo cual la solución se agitó a 0°C bajo nitrógeno mientras el progreso de la reacción se verificaba estrechamente mediante HPLC. Después de tres horas, una HPLC mostró que no quedaba nada de material de partida. La solución se concentró con un calentamiento mínimo

(volumen reducido ~50%), y se vertió lentamente, por partes, en HCl 1 N enfriado con hielo para proporcionar un precipitado blanco brillante copioso. El sólido se aisló por medio de filtración, se lavó con agua destilada fría y se secó en aire durante una noche. El sólido blanco fino resultante se transfirió a una taza de vidrio y se colocó bajo alto vacío durante 72 horas. El peso final era 6,02 g (7,36 mmol, 98%) de IX en forma de un polvo blanco (HPLC, >98%). MS: m/z 818/819 (M+H)⁺, 841 (M+Na⁺).

Ejemplo 2

Síntesis del Compuesto XVI



Éster bencílico de homoserina-4-nitrofenil-éter: A una solución de éster bencílico de N-Boc-homoserina I (1,2 g, 3,889 mmol), 4-nitrofenol (485 mg, 4,08 mmol) y trifetilfosfina (1,2 g, 4,66 mmol) en THF (10 ml) se añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (DEAD) (0,74 ml, 4,66 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente 12-24 h. Tras la compleción estimada por LC, los disolventes se separaron para proporcionar un jarabe viscoso. Se añadió rápidamente HCl 4 N en dioxano (10 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente 3-6 h o hasta que se estimó completa por LC. La reacción se concentró hasta ¼ del volumen y el producto se separó por precipitación de acetato de etilo para proporcionar la sal de hidrocloreto II (96% pura, LC) en forma de un sólido blanco (867 mg, 2,36 mmol, 61%). ESMS: (M-Cl) = 331.

A una solución de Intermedio 4 (117 mg, 0,46 mmol) en DMF (3 ml) se añadió DIPEA (27 ml, 1,84 mmol) seguido secuencialmente de la sal de hidrocloreto II (160 mg, 0,48 mmol) y HATU (239 mg, 0,63 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2-4 h hasta que se estimó completada por LC. La reacción se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y se lavó con bicarbonato al 5% (10 ml), agua (10 ml), ácido cítrico (10 ml), salmuera (2 x 10 ml) y se secó sobre sulfato de sodio para proporcionar el producto en bruto III en forma de una espuma color castaño (213 mg, 0,37 mmol, 82%) que se usó directamente.

ES 2 270 868 T3

ESMS: (M+H) = 568.

El material anterior se disolvió en acetato de etilo (15 ml), se añadió 10% de Pd/C (200 mg) y la reacción se sometió a hidrogenólisis a 3,45 bares durante 4-6 h o hasta que se estimó completa por LC. Una filtración a través de celite y concentración proporcionó la anilina en bruto IV (144 mg, 0,32 mmol, 87%) en forma de una espuma color castaño que se usó inmediatamente.

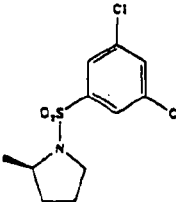
ESMS: (M+H) = 448.

La anilina (74 mg, 0,17 mmol) anteriormente obtenida se disolvió en DMF (3 ml) y se añadió oMePUPA (52 mg, 0,18 mmol) seguido de DIPEA (0,08 ml, 0,43 mmol) y HATU (69 mg, 0,18 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente 3-4 h hasta que se completó por LC. Una purificación por HPLC proporcionó Bio-8355 (39 mg, 0,054 mmol, 30%) en forma de un sólido blanco.

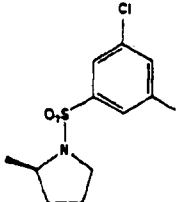
ESMS: (M+H) = 714, (M-H) = 712.

Se prepararon compuestos de esta invención como se muestra en las siguientes Tablas, según el método anteriormente descrito.

Compuestos preparados según el Método general A incluyen:

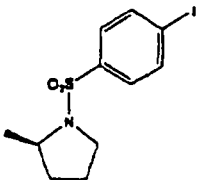
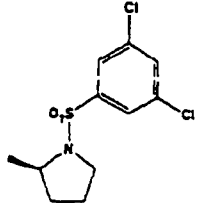
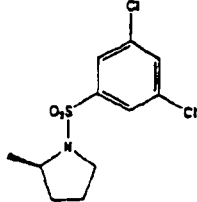
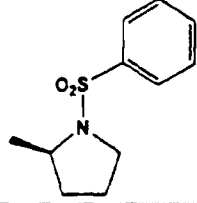
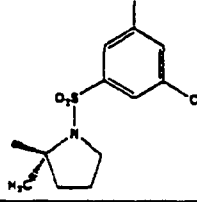
Compuesto n°	R ³	R ¹	ESMS m/z
6714	oMePUPA-N-MeLeu		804,4 (M+H) ⁺

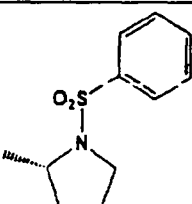
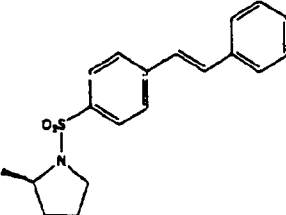
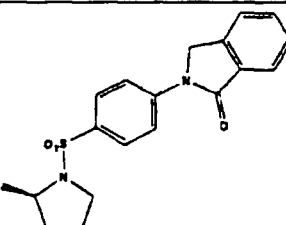
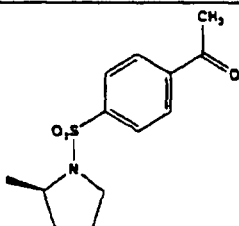
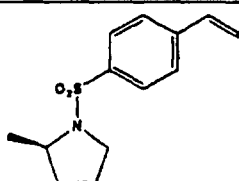
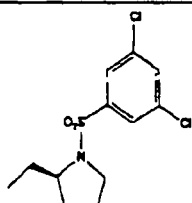
Compuestos preparados según el Método general C incluyen:

Compuesto n°	R ³	R ¹	ESMS m/z
7234	oMePUPA-Leu		831,1 (M+H) ⁺

ES 2 270 868 T3

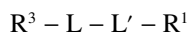
Compuestos preparados según el Método general D incluyen:

Compuesto n°	R ¹	ESMS m/z
7092		875,8 (M+H) ⁺
7181		833,1 (M+H) ⁺
7398		832,1 (M+H) ⁺
7662		750,1 (M+H) ⁺
8221		821,9 (M+H) ⁺

5	8341		750,0 (M+H) ⁺
10	9120		852,2 (M+H) ⁺
20	9169		881,4 (M+H) ⁺
30	9171		791,3 (M+H) ⁺
35	9182		775,5 (M+H) ⁺
45	9264		764,2 (M+H) ⁺

REIVINDICACIONES

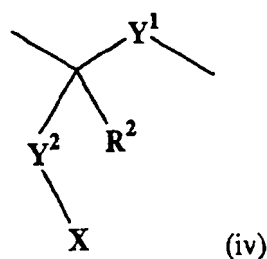
1. Un compuesto de fórmula:



en la cual

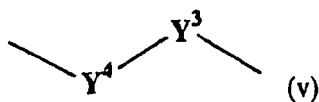
R^1 es pirrolidinil-SO₂-fenilo opcionalmente sustituido, en el que el sustituyente opcional es alquilo o halo;

L' es de fórmula (iv)



en la que Y^1 es -NH-CO-, R^2 es H, Y^2 es un enlace y X es COOH;

L es de fórmula (v)



en la que Y^3 -(CH₂)₀₋₅-, e Y^4 es -CO-NH; y

R^3 es de fórmula R^4 -Y⁵-N(R⁵)-CH(R⁶)-, en que R^6 es la cadena lateral de leucina o isoleucina; R^5 es hidrógeno o metilo; Y^5 es C(=O)- y R^4 es o-metilfenilureidofenil-CH₂;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^5 es H.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^5 es metilo.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el fenilo está sustituido.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el fenilo está sin sustituir.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dicho compuesto es

5192, ácido 2S-{[1-(3,5-diclorobencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino}-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico,

5283, ácido 2S-{[1-(3,5-diclorobencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino}-3-(4-metil-2S-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetilamino}petanoilamino)propiónico,

6714, ácido 2S-{[1-(3,5-diclorobencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino}-3-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)pentanoilamino]-propiónico,

7234, ácido 2S-{[1-(3,5-diclorobencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino}-6-(4-metil-2S-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetilamino}petanoilamino)hexanoico,

7662, ácido 2S-[(1-bencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)pentanoilamino]butírico,

8221, ácido 2S-{[1-(3,5-diclorobencenosulfonil)-2-metilpirrolidino-2S-carbonil]amino}-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]butírico,

ES 2 270 868 T3

8341, ácido 2S-[(1-bencenosulfonilpirrolidino-2R-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)pentanoilamino]butírico,

8342, ácido 2R-[(1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico,

8343, ácido 2R-[(1-bencenosulfonilpirrolidino-2R-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico,

8367, ácido 2S-[(1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2R-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)pentanoilamino]butírico,

8368, ácido 2S-[(1-bencenosulfonilpirrolidino-2R-carbonil)amino]-4-[4-metil-2R-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)pentanoilamino]butírico,

8469, ácido 2S-[[1-(3,5-diclorobencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino]-4-(4-metil-2S-{2-[4-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetilamino}petanoilamino)-butírico,

8491, ácido 2S-[(1-bencenosulfonil-2-metilpirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)pentanoilamino]butírico, o

9264, ácido 2S-[2-(1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-il)acetilamino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)pentanoilamino]butírico.

7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que dicho compuesto es 5192, ácido 2S-[[1-(3,5-diclorobencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico.

8. Un compuesto, que es

8685, ácido 2S-[(1-bencenosulfonil-4R-benciloxicarbonilaminopirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-pentanoilamino]butírico,

8689, ácido 2S-[(4R-amino-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico,

8690, ácido 2S-[[4R-(6-aminohexanoilamino)-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil]amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]butírico,

8749, ácido 2S-[[4S-(6-aminohexanoilamino)-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil]amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]-butírico, conjugado PEG-SPA 20K,

8758, ácido 2S-[(4S-amino-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico, conjugado PEG-SPA 20K,

8796, ácido 2S-[(1-bencenosulfonil-4R-[2-(4-hidroxifenil)acetilamino]-pirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]-acetil}amino)petanoilamino]butírico,

8797, ácido 2S-[(1-bencenosulfonil-4R-[3-(4-hidroxifenil)propionilamino]-pirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]-acetil}amino)petanoilamino]butírico,

8809, ácido 2S-[(4R-amino-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico, conjugado PEG-SPA 20K,

9120, ácido 4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-pentanoilamino]-2S-[[1-(4-(E)estirilbencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino]-butírico,

9169, ácido 4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]-2S-[[1-(4-(1-oxo-1,3-dihidroisindol-2-il)bencenosulfonil]pirrolidino-2S-carbonil]aminobutírico,

9171, ácido 2S-[[1-(4-acetilbencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)petanoilamino]butírico,

9182, ácido 4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]-2S-[[1-(4-vinilbencenosulfonil)pirrolidino-2S-carbonil]amino]butírico,

9227, ácido 2S-[[4R-(6-amino)hexanoilamino]-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil]amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]butírico, conjugado PEG-SPA 30K,

ES 2 270 868 T3

9315, ácido 2S-{[(4R-(6-amino)hexanoilamino)-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil]amino}-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]butírico, conjugado PEG-SPA 50K,

5 9418, ácido 2S-{[(4R-(6-amino)hexanoilamino)-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil]amino}-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]butírico, conjugado PEG-SPA 20K,

8723, ácido 2S-{[(4S-(6-amino)hexanoilamino)-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil]amino}-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]butírico, o

10 8746, ácido 2S-[(4S-amino-1-bencenosulfonilpirrolidino-2S-carbonil)amino]-4-[4-metil-2S-(metil-{2-[4-(3-o-tolilureido)fenil]acetil}amino)-petanoilamino]butírico.

15 9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el compuesto está modificado con un polietilenglicol.

10. Una composición, que comprende un vehículo farmacéutico y un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65