



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 269 141**

(51) Int. Cl.:

C07K 5/02 (2006.01)

C07C 323/60 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00929365 .5**

(86) Fecha de presentación : **17.04.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1171452**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

(54) Título: **Disulfuros cíclicos de pirrolidincarbonilamino como antagonistas de VCAM-VLA4.**

(30) Prioridad: **20.04.1999 US 130215 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es: **Chen, Li;**
Fotouhi, Nader;
Jackson, David, Young y
Tilley, Jefferson, Wright

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Disulfuros cíclicos de pirrolidincarbonilamino como antagonistas de VCAM-VLA4.

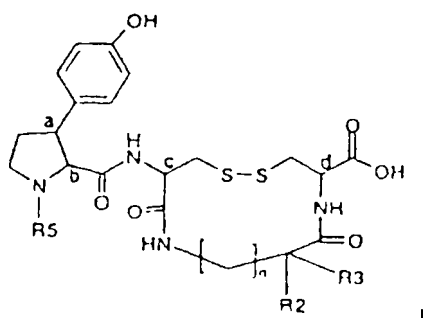
La invención se refiere, en general, a los compuestos disulfuro cíclicos de pirrolidinilo útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

La molécula-1 de adhesión vascular celular (VCAM-1), un miembro de la familia de supergenes de inmunoglobulina (Ig) se expresa en el endotelio activado. La integrina VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), es el principal receptor para VCAM-1. La VLA-4 se expresa en muchos tipos de células, inclusive en los linfocitos en circulación, en eosinófilos, basófilos y monocitos. La VCAM-1 también se une con una segunda integrina LPAM-1 (molécula de adhesión a parches de Peyer) que se expresa en las células B y T. La integrina LPAM-1 también puede unirse con otra molécula de adhesión celular denominada mucosal que se concentra en la molécula de adhesión celular (MadCAM). La unión de las integrinas VLA-4 y LPAM-1 con las moléculas de adhesión celular VCAM-1 o MadCAM generalmente permite el paso de las macromoléculas y las células en circulación desde la sangre a los tejidos. Sin embargo, la unión de las integrinas con las moléculas de adhesión celular puede producir una inflamación no deseable en la que los tipos de células antes citados se infiltran en el tejido y producen daños en dichos tejidos.

Por lo tanto, los antagonistas de molécula de adhesión celular/integrina que inhiben la unión de las integrinas con las moléculas de adhesión celular pueden evitar la inflamación no deseable. A modo de ejemplo, tales antagonistas son necesarios para evitar el daño tisular provocado por el síndrome de intestino inflamable, la de emigración de células T en la artritis, la acumulación de eosinófilos y la broncoconstricción en el asma así como la prolongación del tiempo de sobrevida de los aloinjertos de tejidos.

J. Med. Chem., vol. 40, n° 21, 1997, págs. 3359-3368, D. Y. Jancksone *et al.* describe péptidos cíclicos que son potentes antagonistas peptídicos $\alpha_4\beta_1$.

Por lo tanto, constituye un objeto de la presente invención proporcionar compuestos de la siguiente fórmula general 1:



donde R_2 y R_3 son, cada una de manera independiente, alquilo inferior o junto con el átomo de carbono que tienen unido forman un anillo carbocíclico alifático con entre 4 y 6 átomos de carbono, R_5 es hidrógeno, alquilo inferior, $R-SO_2-$.

$R_6-(CH_2)_m-CO-$ o $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$; R es alquilo inferior; R_6 y R_8 son hidrógeno o alquilo inferior; X es $-O-$ o $-NH-$; m es un entero que va de 1 a 7, y es un entero que va de 0 a 7, y n es un entero que va de 1 a 3; donde a , b , c y d denotan átomos de carbono asimétricos; y

sus ésteres o éteres hidrolizables.

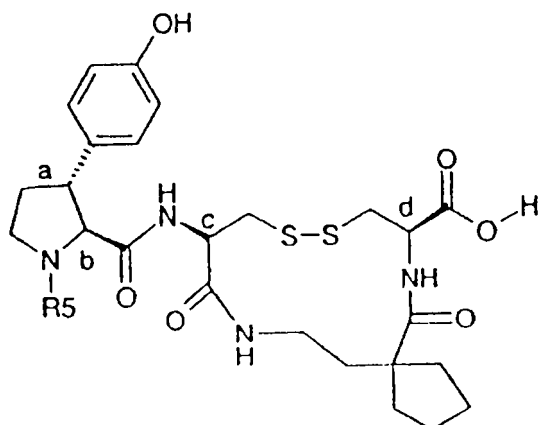
R_2 y R_3 junto con el carbono que tienen unido pueden formar un grupo cicloalcano o cicloalqueno que contiene entre 4 y 7 átomos de carbono, tales como ciclopentano, ciclopenteno, ciclobutano, ciclobuteno, ciclohexano o ciclohexeno.

Las siguientes también son formas de realización que se prefieren de la presente invención:

(i) Los compuestos de acuerdo con la fórmula I en la cual R_2 y R_3 junto con el carbono unido a ellas forman un anillo de cicloalcano alifático que contiene entre 4 y 6 átomos de carbono o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(ii) Los compuestos de acuerdo con (i), en los cuales R_2 y R_3 , junto con el carbono unido a ellas, forman un anillo de ciclopentano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(iii) Los compuestos de acuerdo con (ii), con la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(iv) Un compuesto de acuerdo con (iii), que es ácido (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(v) Los compuestos de acuerdo con (iii) donde R₅ es R₆(CH₂)_mCO- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(vi) Un compuesto de acuerdo con (v) que es ácido (8R,13R)-13-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(vii) Un compuesto de acuerdo con (v) que es ácido (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(viii) Los compuestos de acuerdo con (iii), donde R₅ es R₈-X-(CH₂)_y-CO- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(ix) Los compuestos de acuerdo con (viii) donde X es oxígeno o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(x) Los compuestos de acuerdo con (iii), donde R₅ es hidrógeno o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(xi) Un compuesto de acuerdo con (x) que es ácido (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

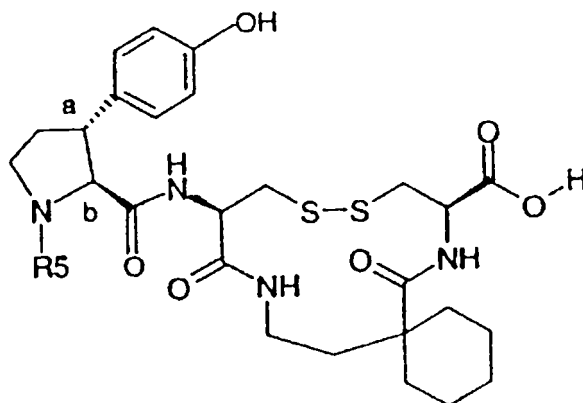
(xii) Los compuestos de acuerdo con (iii), donde R₅ es R-SO₂- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(xiii) Los compuestos de acuerdo con (iii), donde R₅ es alquilo inferior o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(xiv) Los compuestos de acuerdo con (xii) que es ácido (8R,13R)-13-[[[1-metilsulfonyl-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(xv) Los compuestos de acuerdo con (i), donde R₂ y R₃ junto con el carbono unido a ellas forman un anillo de ciclohexano o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(xvi) Los compuestos de acuerdo con (xv) de la fórmula:

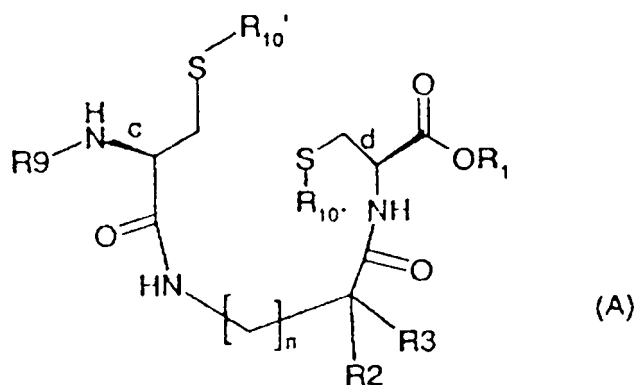


(xvii) Los compuestos de acuerdo con (xvi), que es ácido (9R,14R)-14-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-7,15-dioxo-11,12-ditia-8,16-diazaspiro[5.12]octadecan-9-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(xviii) Los compuestos de acuerdo con (xvi), donde R₅ es R₆-(CH₂)_m-CO- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

(xix) Un compuesto de acuerdo con (xviii) que es ácido (9R,14R)-14-[[[1-acetil-2-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-7,15-dioxo-11,12-ditia-8,16-diazaspiro[5.12]octadecan-9-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(xx) Los compuestos de la fórmula general "A":



donde R₁ con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable; R₂ y R₃ son, cada una de manera independiente, alquilo inferior, o junto con el átomo de carbono que tienen unido forman un anillo carbocíclico alifático con entre 4 y 6 átomos de carbono; R₉ es un grupo de protección amino; R₁₀· y R₁₀' , son grupos de protección tio; y n es un entero que va de 1 a 3.

(xxi) Los compuestos de acuerdo con (xx), donde R₂ y R₃ junto con el carbono que tienen unido forman un anillo de ciclopentano.

(xxii) Un compuesto de (xxi) que es 1,1-dimetiletil éster del ácido 2(R)-[[[1[[2(R)-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-1-oxo-3-[(trifenilmetil)tio]propil]amino]etil]ciclopentil]carbonil]amino-3-[(trifenilmetil)tio]propanoico.

10



20

25

(xxvi) Los compuestos de la fórmula general “C”:



45

50

55

60

65

tal como se utiliza en la presente, el término “ácidos alcanóicos inferiores” comprende un ácido alcanóico con entre 2 y 7 átomos de carbono tales como ácido propiónico y ácido acético. Tal como se utiliza más adelante en la presente, el término “halógeno” o “halo”, a menos que se incluya una indicación en contrario, comprende flúor, cloro, bromo y yodo.

El término “alquilo inferior sustituido” hace referencia a un grupo alquilo inferior sustituido por uno o más grupos que se seleccionan, de manera independiente, entre hidroxilo, halógeno, ciano, alcoxi inferior, alcanóilo inferior, alquiltio inferior, alquilsulfonilo inferior, alquilsulfonilo inferior y amino sustituido. Entre los ejemplos de grupos alquilo inferior sustituidos se incluyen 2-hidroxietilo, 2,2,2-trifluoroetilo, cianometilo y 2-nitropropilo.

El término “alcanóilo inferior” o “acilo” denota un radical obtenido a partir de un ácido carboxílico alifático con entre 2 y 7 átomos de carbono, por ejemplo, acetilo, propionilo y similares. El término “acilo”, además de referirse a “alcanóilo inferior” también hace referencia a un aroilo, por ejemplo, benzoilo.

También tal como se lo utiliza en el presente, el término “arilo” significa grupos hidrocarburos aromáticos mononucleares tales como fenilo, toliilo, etc., que pueden estar insustituidos o sustituidos en una o más posiciones con un sustituyente alquiltio inferior, halógeno, nitro, alquilo inferior o alcoxi inferior y grupos arilo polinucleares tales como naftilo, antrilo, fenantrilo, azulilo, etc., que pueden estar sustituidos con uno o más de los grupos antes citados. Los grupos arilo que se prefieren son los grupos arilo mononucleares sustituidos e insustituidos, en particular fenilo. El término “aralquilo” denota un grupo alquilo, donde alquilo es alquilo inferior y en el que se ha reemplazado uno de los átomos de hidrógeno por un grupo arilo. Entre los ejemplos de grupos aralquilo se encuentran bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo, 4-clorobencilo, 4-metoxibencilo y otros similares.

Tal como se utiliza en la presente, el término “grupo éster o éter hidrolizable” designa cualquier éster o éter que puede hidrolizarse para obtener un grupo hidroxilo y/o un grupo carboxilo. Entre los ejemplos de grupos ésteres útiles con este fin en los que el radical acilo se obtiene a partir de un diácido carboxílico alcanóico inferior, arilalcanóico inferior o alcanó inferior. Entre los ácidos activados que se pueden utilizar para formar tales grupos ésteres se encuentran los anhídridos ácidos y los haluros ácidos, preferentemente los cloruros o bromuros ácidos obtenidos a partir de ácidos arilo o alcanóico inferior. Entre los ejemplos de anhídridos se incluyen anhídrido acético, anhídrido caproico, anhídridos de ácido benzoico, y anhídridos de diácido carboxílico alcanó inferior, por ejemplo anhídrido succínico. Además, los ésteres hidrolizables pueden formarse a partir de cloroformatos, por ejemplo, tricloroetilcloroformato.

Un grupo de protección éter adecuado es, por ejemplo, tetrahidropiranyl éter o 4-metoxi-5,6-dihidro-2H-piranyl éter. Otros son los éteres arilmetilo tales como éteres de bencilo, benzhidrilo, o tritilo o un éter α -alcoxi inferior alquilo inferior, por ejemplo, los éteres metoximetilo o alílicos, o los éteres alquilsililo tales como el trimetilsililéter.

Como alternativa, el término “grupo éster hidrolizable” designa un éster que puede hidrolizarse para obtener un grupo carboxilo. Por lo general, el radical alcoxi se obtiene a partir de un alcohol inferior o un alcohol inferior sustituido. Entre los alcoholes que se pueden utilizar para formar tales grupos ésteres se encuentran los alcoholes primarios, secundarios y terciarios sustituidos o insustituidos, tales como etanol, metanol, isopropanol, ter-butanol y 2-(dimetilamino)etanol.

El término “grupo de protección tio” denota cualquier grupo que puede fragmentarse para obtener un grupo tio libre. Entre los grupos de protección tio que se prefieren se encuentran los grupos triarilmetano, tri-alquilmetano y aralquilo como bencilo. Los grupos acilo que se prefieren son alcanóilo y aroilo inferior, en particular, benzoilo. Por lo general, se prefiere la utilización de un ácido que pueda fragmentarse en grupos de protección tio, por ejemplo, un grupo tri-arilmetilo y, en especial se prefiere un grupo tritilo.

El término “grupo de protección amino” denota cualquier grupo que puede fragmentarse para obtener un grupo amino libre. El grupo de protección amino puede ser cualquier grupo de protección amino convencional utilizado en la síntesis de péptidos. En general, se prefieren los grupos de protección amino que pueden fragmentarse en condiciones ácidas suaves con un pH comprendido entre 2,0 y 3,0. En particular, los grupos de protección amino que se prefieren son los grupos alquilo inferior terciario, alquilo inferior y tri-alquilmetilo inferior.

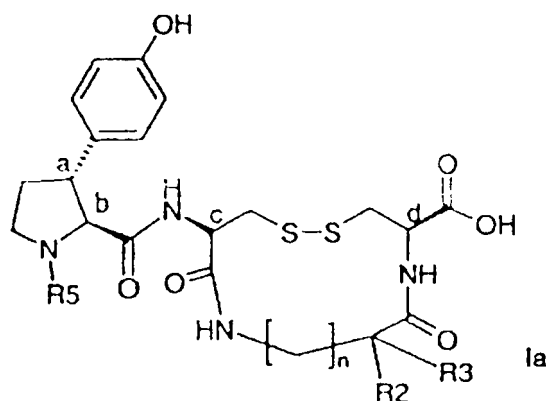
El término “sales farmacéuticamente aceptables” se utiliza para incluir sales farmacéuticamente aceptables tanto inorgánicas como orgánicas tales como de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido maleico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido metansulfónico, ácido para-toluensulfónico y similares. Todos aquellos calificados en la técnica pueden formar estas sales con bastante simplicidad recurriendo al uso de técnicas convencionales.

En la representación gráfica de los compuestos que se presentan en toda esta solicitud, una línea cónica gruesa (▼) indica un sustituyente que está por sobre el plano del anillo al que pertenece el carbono asimétrico, una línea de trazos (---) indica un sustituyente que está por debajo del plano del anillo al que pertenece el carbono asimétrico y una línea ondulada (~) indica un sustituyente que puede estar por encima o por debajo del plano de la molécula. Deberá entenderse que la representación gráfica de los compuestos que se brindan en toda esta especificación se proporcionan a los fines de una mayor conveniencia, y se deberá interpretar que incluyen otras formas entre las cuales se encuentran los estereoisómeros, los enantiómeros y los racematos. Por lo tanto, no se los deberá interpretar como limitados a la forma particular que se ilustra.

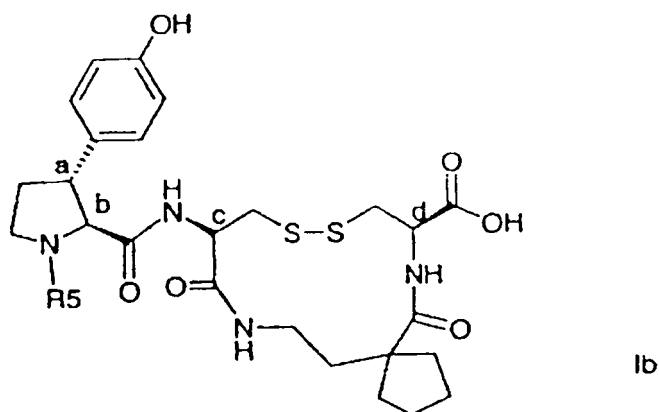
Los compuestos de la fórmula 1 y sus sales farmacéuticamente aceptables, así como los intermediarios de los compuestos de la fórmula 1 presentan estereoisomerismo. Los compuestos de esta invención pueden ser cualquiera de los isómeros del compuesto de la fórmula 1 o bien las mezclas de estos isómeros. Los compuestos y los intermediarios de la presente invención que tienen uno o más átomos de carbono asimétricos pueden obtenerse como mezclas racémicas de estereoisómeros que pueden resolverse, en los pasos adecuados dentro del procedimiento de la presente invención, a través de métodos muy conocidos en la técnica para obtener un determinado estereoisómero o un enantiómero puro con la estereoconfiguración deseada. Como alternativa, los isómeros deseados pueden sintetizarse directamente siguiendo métodos conocidos en la técnica.

Se denota a los átomos de carbono asimétricos en los compuestos de la presente invención como a, b, c y d. Las configuraciones estereo de cada uno de los átomos de carbono asimétricos denotados como a, b, c y d pueden estar designadas de acuerdo con el estereoisómero particular que representan. Los compuestos de la presente invención incluyen aquellos compuestos en los que el átomo de carbono denotado como "a" tiene la configuración S, R, o R,S-; el átomo de carbono denotado como "b" tiene la configuración S, R o R,S-; el átomo de carbono denotado como "c" tiene la configuración S, R, o R,S-; y el átomo de carbono denotado como "d" tiene la configuración S, R, o R,S-.

La estereoconfiguración que se prefiere de los compuestos de la presente invención son los estereoisómeros puros de los compuestos de la fórmula 1. Los compuestos que poseen esta estereoconfiguración preferida son los compuestos de la fórmula 1a:



donde R_2 y R_3 en el compuesto anterior, tomadas junto con el átomo de carbono que tienen unido forman un anillo de ciclopentano, y la configuración que se prefiere es un compuesto de la fórmula:



Los compuestos de la fórmula 1 y, en especial, sus análogos obtenidos a partir de los (+)-trans isómeros puros de pirrolidina de los compuestos de la fórmula 1 presentan una gran potencia como agentes antiinflamatorios. Un medio para determinar la potencia de estos agentes anti-inflamatorios es mediante la evaluación de su capacidad para inhibir la unión de la integrina VLA-4 a la molécula de adhesión celular VCAM-1. Por ejemplo, la potencia de los compuestos de la presente puede determinarse en relación con la concentración del compuesto a un 50% de inhibición de la unión de VCAM/VLA-4 (IC_{50}) conforme se mide mediante un ensayo de unión de VLA-4/VCAM-1. Los compuestos de la presente invención, en especial las formas(+)-trans isoméricas sustancialmente puras, es decir, los (+)-trans isómeros que contienen menos que aproximadamente un 5% de los estereoisómeros correspondientes, presentan una potencia mayor que la de los antagonistas VCAM/VLA-4 anteriormente conocidos.

De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquier método convencional conocido en la técnica para determinar la inhibición de la unión de VCAM-1/VLA-4. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo ELISA de anticuerpos dual de fase sólida o un ensayo de detección basado en células de Ramos para determinar la inhibición de la unión VCAM-1/VLA-4.

Los compuestos de la fórmula 1 que se prefieren especialmente son:

Ácido (8R,13R)-13-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2(S)-pirrolidinil]-carbonil]-amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico;

Ácido (9R,14R)-14-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2(S)-pirrolidinil]-carbonil]amino]-7,15-dioxo-11,12-ditia-8,16-diazaspiro[5.12]octadecan-9-carboxílico;

Ácido (8R,13R)-13-[[[1-metilsulfonil-2-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico;

Ácido (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico; y

Ácido (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]-amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico.

Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral, rectal o parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal o transdérmica; o bien por vía sublingual, como preparaciones oftalmológicas o como un aerosol para el tratamiento de la inflamación pulmonar. Las cápsulas, tabletas, suspensiones o soluciones para la administración por vía oral, los supositorios, las soluciones para inyecciones, las gotas oculares, los protectores y las soluciones en atomizado son ejemplos de sus formas de administración.

Una forma de administración que se prefiere es la administración por vía intravenosa, intramuscular, oral o por inhalación. Las formas de dosificación en las que se administran los compuestos de la invención en cantidades efectivas dependerán de la naturaleza del ingrediente activo específico, la edad y las necesidades del paciente así como también del modo de administración. Las formas de dosificación pueden determinarse empleando cualquier método convencional, por ejemplo, mediante ensayos clínicos de limitación de dosis. De esta manera, la invención comprende, además, un método para el tratamiento de un huésped que padece una enfermedad en la que la unión de VCAM-1 o fibronectina a las células que expresan VLA-4 es un factor causal de los síntomas de la enfermedad o afección al administrar una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para inhibir la unión de VCAM-1 o fibronectina a las células que expresan la VLA-4 de forma tal que se reducen tales síntomas o afecciones. En general, se prefieren las dosificaciones comprendidas entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal por día, y en particular se prefieren las dosificaciones comprendidas entre 1 y 25 mg/kg por día y, las que se prefieren particularmente son las dosificaciones comprendidas entre 1 y 10 mg/kg de peso corporal por día.

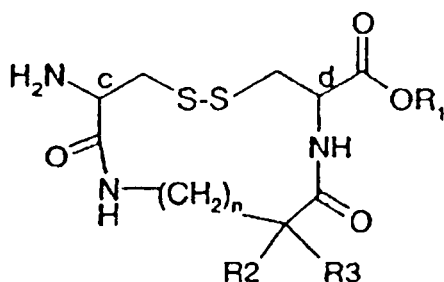
La invención comprende, además, composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden formularse siguiendo cualquier medio convencional. Las tabletas o granulados pueden contener una serie de aglutinantes, rellenos, vehículos o diluyentes. Las composiciones líquidas pueden presentarse, por ejemplo, en la forma de una solución miscible en agua estéril. Las cápsulas pueden contener una carga o un espesador además del ingrediente activo. Asimismo, por lo general se utilizan aditivos mejoradores del sabor y también sustancias como agentes conservantes, estabilizantes, conservadores de la humedad y emulsionantes así como también pueden encontrarse presentes sales para modificar la presión osmótica, amortiguadores y otros aditivos.

El uso de un compuesto de la presente invención en la preparación de un medicamento que contiene dicho compuesto como agente activo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en especial, de las enfermedades mediadas por la unión no deseada de las integrinas a las moléculas de adhesión celular, como por ejemplo el asma, también constituye un objeto de la presente invención.

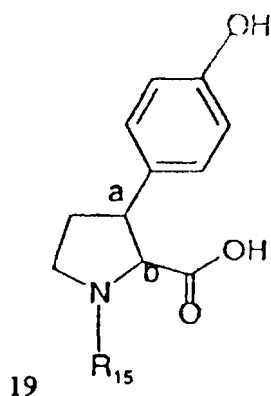
Los materiales vehículos y diluyentes que se mencionaran antes pueden comprender cualquier sustancia orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable convencional, por ejemplo, agua, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, goma arábiga, poli-alquilenglicoles y otros similares.

Los compuestos, siempre que se los prepare siguiendo los procedimientos de la presente invención, también constituyen un objeto de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos de la fórmula 1 se preparan al hacer reaccionar el compuesto de núcleo peptídico cíclico de la fórmula 13

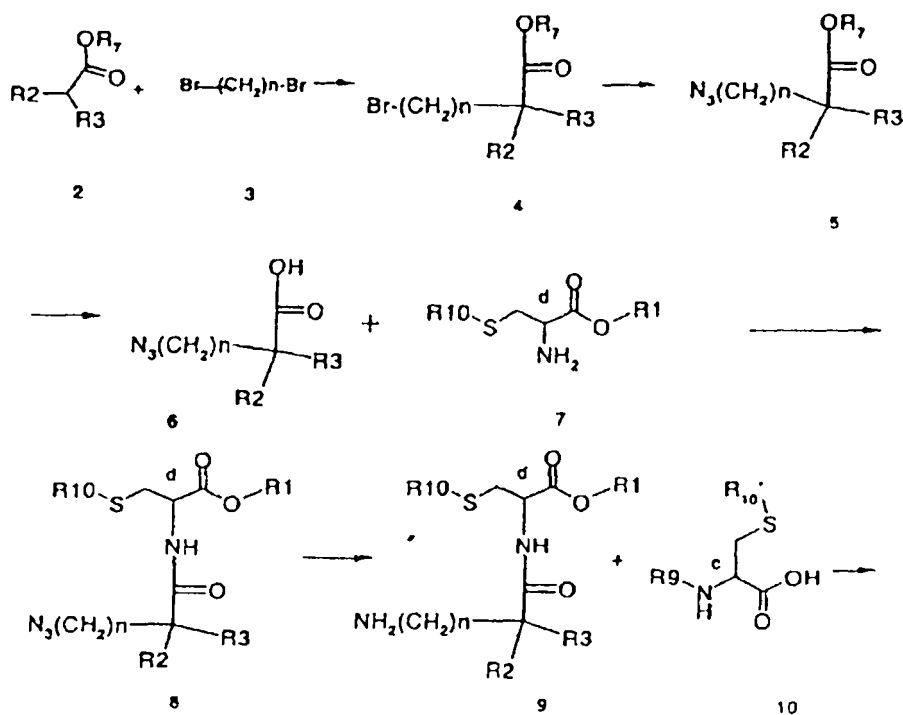


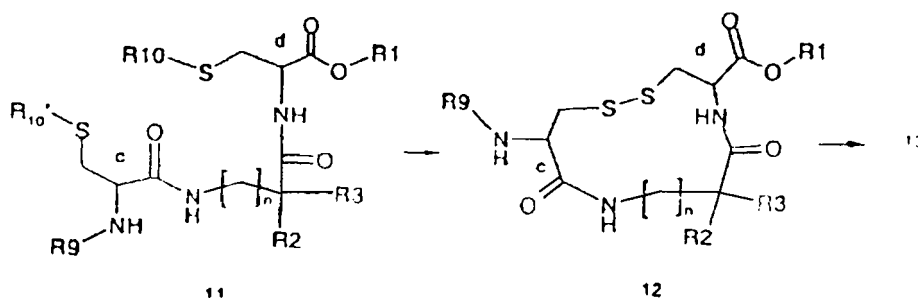
donde R_1 con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable, y R_2 y R_3 son tal como se citara antes, con el compuesto de la fórmula 19



donde R_{15} es alquilo inferior, $R-SO_2-$, $R_6-(CH_2)_m-CO-$ o $R_8X-(CH_2)_y-CO-$ y R , R_6 y R_8 son tal como se ha expuesto antes.

El núcleo peptídico cíclico 13 adecuado para la preparación de los compuestos de esta invención pueden prepararse haciendo reaccionar los compuestos de las fórmulas 2 y 3 de acuerdo al Siguiete Esquema de Reacción 1 que se incluye a continuación.





donde R_1 con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable; R_2 y R_3 son como se ha expuesto antes; R_7 con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable; R_9 es un grupo de protección amino; R_{10} y $R_{10'}$ son grupos de protección tio; y n es tal como ha expuesto antes.

R_7 en el compuesto de la fórmula 2 se forma a partir del ácido correspondiente al proteger el grupo carboxi libre de este ácido mediante la esterificación. R_7 es, preferentemente, alquilo inferior, por ejemplo un grupo metilo. Para la preparación del compuesto de la fórmula 2, se hace reaccionar el ácido libre correspondiente en el compuesto de la fórmula 2 con un alquilhaluro para formar el éster protector. Se puede utilizar cualquier método convencional para la conversión del grupo ácido libre correspondiente de la fórmula 2 en un grupo de protección de éster hidrolizable estándar.

En el Esquema de Reacción I, se alquila el éster de la fórmula 2 al hacer reaccionar el compuesto de la fórmula 2 con el dibromoalcano de la fórmula 3. De manera conveniente, esta alquilación se lleva a cabo al tratar el éster de la fórmula 2 con una base fuerte, por ejemplo diisopropilamida de litio, en un disolvente inerte, por ejemplo THF mantenido a baja temperatura, por lo general a una temperatura comprendida entre -40 y -78°C y luego al hacer reaccionar la mezcla de reacción con el dibromoalcano de la fórmula 3 a esta temperatura para proporcionar el bromuro de la fórmula 4. Se hace reaccionar el bromuro de la fórmula 4 con una azida de metal alcalino para formar la azida de la fórmula 5. Se puede utilizar cualquier medio convencional para la conversión de un haluro en un grupo azida en este paso de la reacción. Por ejemplo, una azida sódica en un disolvente inerte adecuado como DMF a una temperatura comprendida entre temperatura ambiente y 80°C permite obtener la azida de la fórmula 5.

La azida de la fórmula 5 se convierte en el compuesto de la fórmula 6 mediante la hidrólisis del grupo de protección de éster formado por R_7 . Esta hidrólisis para producir el compuesto de la fórmula 6, que es el ácido libre correspondiente de la azida de la fórmula 5, puede llevarse a cabo siguiendo cualquier medio convencional para la hidrólisis del éster. Por ejemplo, la hidrólisis del grupo éster de la fórmula 5 puede llevarse a cabo mediante el tratamiento con un exceso de hidróxido de litio en metanol acuoso a una temperatura comprendida entre temperatura ambiente y la temperatura de reflujo del disolvente, lo que permite obtener el ácido de la fórmula 6.

En el siguiente paso de la reacción, se hace reaccionar el ácido libre de la fórmula 6 con la amina de la fórmula 7 para formar un enlace amida entre el grupo de ácido libre de la fórmula 6 y el grupo amino libre de la fórmula 7, por lo que se obtiene el compuesto azida de la fórmula 8. Al formar el compuesto de la fórmula 8, se puede utilizar cualquier método convencional para la formación de amida al llevar a cabo esta reacción. La reacción de condensación de los compuestos de las fórmulas 6 y 7 se lleva a cabo, preferentemente, utilizando reactivos de acoplamiento convencionales tal como se emplea en la química de péptidos, por ejemplo, HBTU en presencia de una base terciaria base como diisopropiletilamina en un disolvente adecuado, por ejemplo, DMF a temperatura ambiente.

En el compuesto de la fórmula 7, el grupo carboxilo está protegido por R_1 . El uso de un grupo ter-butilo se prefiere porque se lo puede retirar con facilidad en las posteriores reacciones dentro de este esquema de reacción sin que afecte a otros grupos de protección en el anillo. En el compuesto de la fórmula 7, R_{10} es también un grupo de protección tio. Tal como se describiera antes, se puede utilizar cualquier grupo de protección tio adecuado.

El compuesto 7 que tiene un átomo de carbono asimétrico denotado como "d" puede tener una estereoconfiguración específica. Por otra parte, el compuesto 7 puede ser una mezcla de estereoisómeros. La estereoconfiguración del compuesto 7 se lleva a cabo en todo el esquema de reacción. Por lo tanto, la estereoconfiguración del producto final, el compuesto 1 depende de la estereoconfiguración del compuesto 7. Es decir, en el átomo de carbono asimétrico denotado como "d", el Compuesto 1 tendrá la misma estereoconfiguración específica del compuesto 7, o si el compuesto 7 es una mezcla de estereoisómeros, entonces el compuesto 1 se producirá como una mezcla de estereoisómeros.

El compuesto de la fórmula 8 se convierte en el compuesto de la fórmula 9 mediante la reducción del grupo azida en la amina primaria correspondiente. Se puede utilizar cualquier método convencional para la reducción de una azida en la amina primaria correspondiente. Por lo general, la reducción de la azida 8 para formar la amina de la fórmula 9 se lleva a cabo usando agentes de reducción convencionales y, preferentemente, una fosfina, por ejemplo trimetil- o trifenilfosfina en un disolvente inerte adecuado como diclorometano a temperatura ambiente.

En el paso siguiente de la reacción, se acopla la amina primaria de la fórmula 9 con el ácido carbocíclico libre del derivado de cisteína de la fórmula 10, para formar un grupo amida que produce un enlace peptídico que forma el compuesto de la fórmula 11. Se acopla el grupo amino de la fórmula 9 con el ácido libre del derivado de cisteína 10 siguiendo cualquier método de acoplamiento peptídico convencional como se describiera antes. Al formar el compuesto de la fórmula 11, R_9 del compuesto 10 puede ser cualquier grupo de protección amino convencional utilizado en la síntesis de péptidos. Por lo general, los grupos de protección amino que se prefieren son aquellos que pueden fragmentarse en condiciones ácidas suaves a un pH comprendido entre 2,0 y 3,0. En particular, los grupos de protección amino que se prefieren son grupos alcoxi carbonilo inferior terciarios, por ejemplo el grupo Boc. En el compuesto de la fórmula 10, también R_{10} es un grupo de protección tio. Tal como se describiera antes, se puede utilizar cualquier grupo de protección tio adecuado.

El compuesto 10 en su átomo de carbono asimétrico denotado como "c" puede tener una estereoconfiguración específica. Por otra parte, el compuesto 10 puede ser una mezcla de estereoisómeros. La estereoconfiguración del compuesto 10 se lleva a cabo en todo el esquema de reacción. En consecuencia, en la estereoconfiguración del producto final, el compuesto 1 depende de la estereoconfiguración del compuesto 10. Es decir, en el átomo de carbono asimétrico denotado como "c", el Compuesto 1 tendrá la misma estereoconfiguración específica del compuesto 10, o si el compuesto 10 es una mezcla de estereoisómeros, entonces el compuesto 1 será una mezcla de estereoisómeros.

El acoplamiento de amida de los compuestos de las fórmulas 9 y 10 puede llevarse a cabo cuando ambos o cualquiera de los compuestos 9 y 10 tienen estereo-configuraciones específicas o bien pueden ser mezclas de los mismos. De preferencia, ambos compuestos se obtienen a partir de L-cisteína. En los casos en los que se utilizan mezclas de estereoisómeros, el compuesto 11 se produce como una mezcla de estereoisómeros que se mantiene durante todo el esquema de reacción. Como alternativa, en los casos en los que el compuesto 11 se forma como un estereoisómero, la estereoconfiguración específica de ese estereoisómero se mantiene durante todo el esquema de reacción.

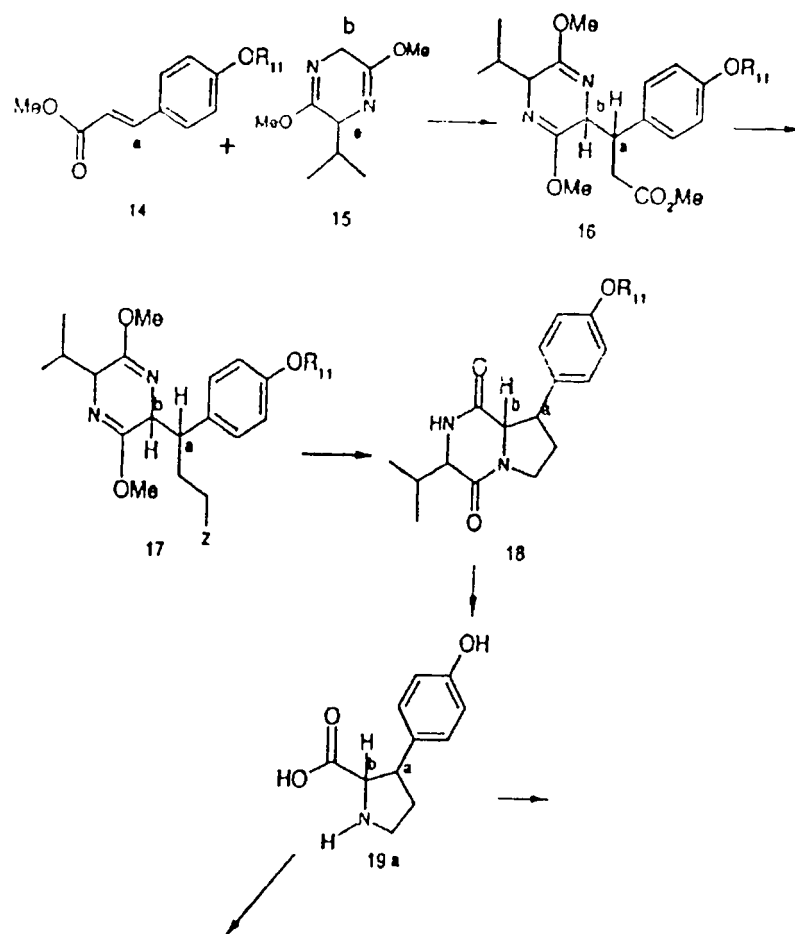
El compuesto de la fórmula 11 se cicliza para formar el compuesto de la fórmula 12. En general, la ciclización del compuesto 11 puede llevarse a cabo a través del tratamiento en una solución diluida a entre 0,5 y 2 g/litro con una solución de diclorometano y yodo a, aproximadamente, temperatura ambiente, lo que permite obtener el disulfuro cíclico de la fórmula 12. En estas condiciones, se eliminan los grupos de protección tio R_{10} y $R_{10'}$ y del compuesto de la fórmula 11 para permitir que el acoplamiento de los dos grupos tio ciclice el compuesto de la fórmula 11 formando el disulfuro cíclico 12.

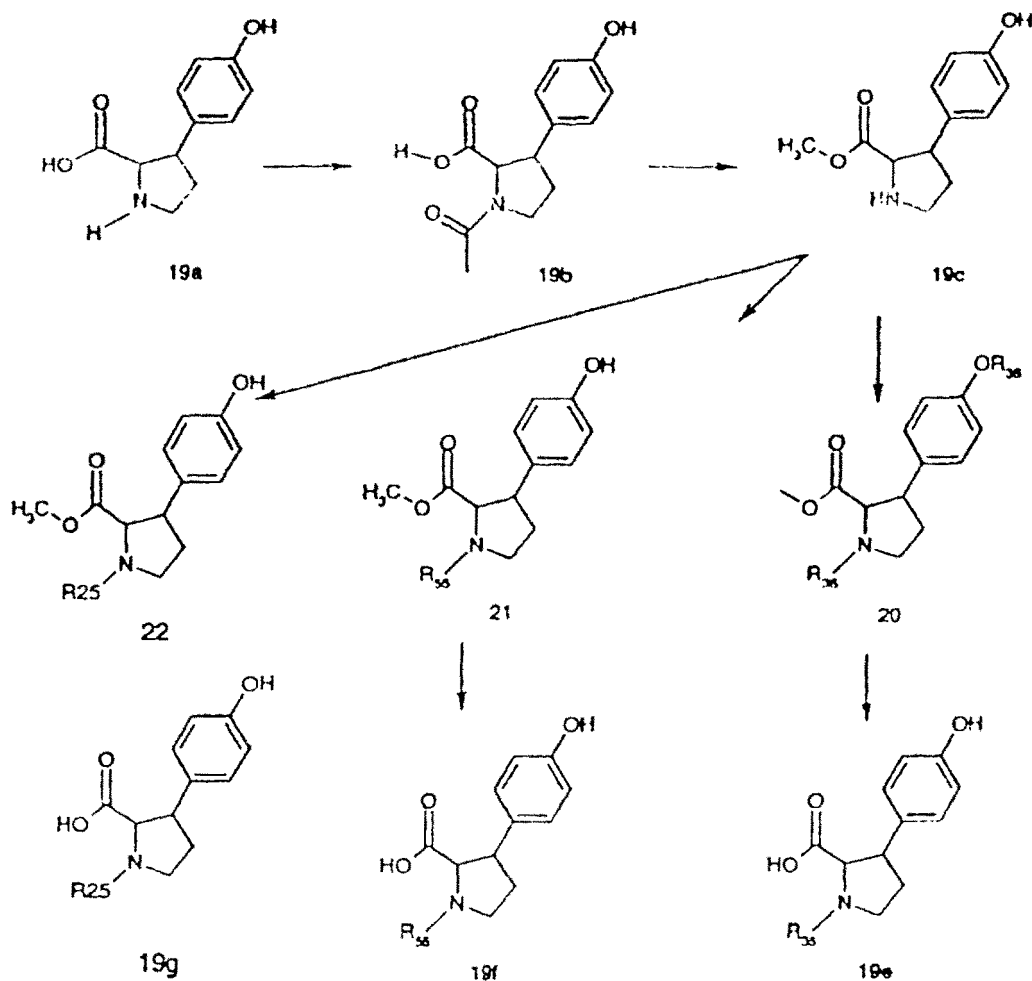
En el paso siguiente de la reacción, el compuesto de la fórmula 13 se forma mediante la eliminación selectiva del grupo de protección amino R_9 del compuesto de disulfuro cíclico 12. El disulfuro cíclico 12 contiene un grupo de protección amino R_9 y un grupo de protección de éster R_1 . Por lo tanto, se deberá tratar al compuesto de la fórmula 12 en condiciones ácidas a temperaturas bajas y, preferente-mente, a 0-20°C, en HCl 1N en acetato de etilo para eliminar el grupo de protección amino R_9 al mismo tiempo que no afecta al grupo de protección éster R_1 para proporcionar el derivado de amina libre 13 que resulta adecuado para el paso de acoplamiento siguiente. En los casos favorables, el producto 13 puede precipitarse de la mezcla de reacción y, en otros casos, el aislamiento puede llevarse a cabo mediante la precipitación a través del agregado de un disolvente como éter o hexano o mediante una cuidadosa concentración.

Las estereoconfiguraciones específicas de los átomos de carbono asimétricos "c" y "d" en el compuesto 11 se llevan a cabo a través del compuesto 13. En consecuencia, la o las estereoconfiguraciones de los compuestos 7 y 10 utilizados para producir el compuesto 11.

El compuesto 19 puede prepararse de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Esquema de Reacción 2 que aparece a continuación.

Esquema de reacción 2



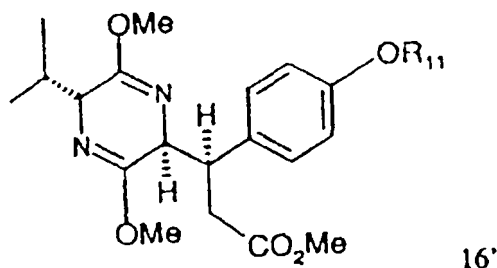


donde R_{11} es un grupo de protección éter; Z es un grupo saliente; R_{25} es alquilo inferior; R_{35} es $R-SO_2-$; R_{55} es $R_6-(CH_2)_m-CO-$ o $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$; $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$; R, R_6 , R_8 , X, y, y m son tal como se ha expuesto antes.

El compuesto de la fórmula 19 se produce, en primer lugar, al hacer reaccionar el compuesto de la fórmula 14 con el compuesto de la fórmula 15 para formar el compuesto de la fórmula 16. De acuerdo con esta reacción, se agrega el compuesto 15 por el enlace doble del compuesto de la fórmula 14 con el agregado de 1,4-enolato. Se puede utilizar cualquier método de agregado de enolato convencional por el enlace doble al llevar a cabo esta reacción. Por ejemplo, al llevar a cabo este agregado de 1,4-enolato, se convierte el compuesto 14 en su enolato de litio utilizando un medio convencional como la reacción del compuesto de la fórmula 14 con el R-bis lactim dimetiléter del compuesto 15 y n-BuLi. La realización de la reacción de los compuestos 14 y 15 a una temperatura que va de -60 a -78°C permite obtener el producto deseado 16.

En el átomo de carbono asimétrico denotado como "a", el compuesto 14 puede existir como uno de dos isómeros geométricos posibles o como una mezcla de estos dos isómeros geométricos. De igual modo, debido al átomo de carbono asimétrico denotado como "e", el compuesto 15 puede existir como un estereoisómero específico o como una mezcla de estereoisómeros. Por lo tanto, de acuerdo con las estereo-configuraciones específicas de los compuestos 14 y 15, se puede producir uno de los cuatro estereoisómeros posibles del compuesto 16 o bien sus mezclas. Estas diversas estereoconfiguraciones se llevan a cabo en el compuesto 18.

La estereoconfiguración del compuesto 16 que se prefiere es la siguiente:



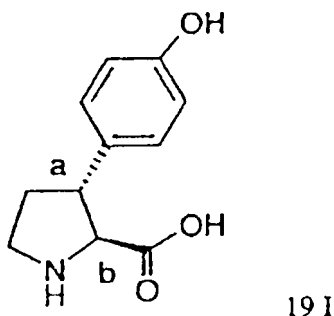
donde R_{11} es como se definiera antes.

En el compuesto de la fórmula 16, el grupo R_{11} es, preferentemente metilo. El compuesto de la fórmula 16 se convierte en el compuesto de la fórmula 17 a través de la reducción del grupo carboximetilo del compuesto 16 en el grupo CH_2OH correspondiente y luego se convierte en OH en el grupo CH_2OH en un grupo saliente Z. En general, esta reacción de reducción se lleva a cabo usando un reactivo reductor de litio-aluminio o borohidruro de litio, por ejemplo $LiBH_4$ o LAH en un disolvente inerte adecuado, por ejemplo THF, a una temperatura comprendida entre $-20^\circ C$ y la temperatura ambiente, para proporcionar un compuesto que no está normalmente aislado, pero que se convierte directamente en el compuesto 17 mediante la reacción con un agente adecuado para producir el grupo saliente Z que puede ser cualquier grupo saliente convencional como mesiloxi o tosiloxi. Se puede utilizar cualquier medio convencional para hacer reaccionar el compuesto 17 para producir el grupo saliente Z, por ejemplo, el tratamiento como cloruro de metan sulfonilo en diclorometano en presencia de una base de amina terciaria, por ejemplo, diisopropiltilamina.

Se convierte el compuesto 17 en la lactama 18 mediante la ciclización en presencia de yoduro de sodio en DMF a una temperatura comprendida entre 60 y $130^\circ C$. En general, la reacción se lleva a cabo, de manera conveniente, al destilar el disolvente de diclorometano con un punto de ebullición más bajo a medida que aumenta la temperatura de reacción hasta que se completa la reacción. Se puede aislar la lactama 18 utilizando un medio convencional como cromatografía en gel de sílice. Al formar la lactama 18, se convierten los dos grupos metoxilo unidos a los carbonos en el anillo que contiene nitrógeno heterocíclico del compuesto 17 en los grupos carbonilo.

Se convierte la lactama 18 en el compuesto de la fórmula 19a mediante hidrólisis. Se puede utilizar cualquier método conocido que hidrolizará tanto el grupo de lactama como el grupo de protección formado por R_{11} en el compuesto de la fórmula 18. Por ejemplo, el tratamiento de la lactama 18 con HBr al 48% en ácido acético a una temperatura comprendida entre 100 y $130^\circ C$ durante varias horas efectúa la eliminación del grupo R_{11} y abre el anillo de lactama para proporcionar el 19a. Con la hidrólisis, se realizan las estereoconfiguraciones específicas de los átomos de carbono asimétricos "a" y "b" en el compuesto 18 a través del compuesto 19a. Por lo tanto, la o las estereoconfiguraciones del compuesto 19a serán el producto de las estereoconfiguraciones de los compuestos 14 y 15 utilizados para producir el compuesto 16.

El estereoisómero que se prefiere del compuesto 19 es el siguiente:



De acuerdo con esta invención, se convierte el compuesto de la fórmula 19a en el compuesto de la fórmula 19b al hacer reaccionar el compuesto de la fórmula 19a con cloruro de acetilo en presencia de una base orgánica débil como bicarbonato de sodio. De esta manera, se protege el grupo amino libre en el compuesto de la fórmula 19b.

El compuesto de la fórmula 19b puede convertirse en el compuesto de la fórmula 19c mediante el tratamiento del compuesto de la fórmula 19c con ácido clorhídrico anhidro en metanol a una temperatura comprendida entre $40^\circ C$ y $80^\circ C$. De esta forma, se convierte el compuesto de la fórmula 19b en el ácido protegido de 19c que ahora posee un grupo amino libre. Se puede convertir por separado el grupo amino libre en los sustituyentes R_{25} , R_{55} y R_{35} .

Al convertir el compuesto de la fórmula 19c en el compuesto de la fórmula 22, donde R_{25} es un grupo alquilo, se trata el compuesto de la fórmula 19c al hacerlo reaccionar con alquilaldehído inferior y se forma una amina intermedia a la que, a su vez, se la trata con un agente de reducción adecuado, por ejemplo borohidruro de ciano sódico, por lo general, en presencia de un ácido orgánico débil, por ejemplo, ácido acético, para obtener el compuesto de la fórmula 22. Se convierte el compuesto de la fórmula 22 en el compuesto de la fórmula 19g mediante hidrólisis en condiciones básicas, por ejemplo con el tratamiento con una base alcalina, por ejemplo, hidróxido de sodio.

Por otra parte, se puede convertir el compuesto de la fórmula 19c en el compuesto de la fórmula 19e mediante la reacción con un cloruro de alquilsulfonilo inferior. De este modo, se convierte la fórmula 19c en el compuesto de la fórmula 20. Se puede utilizar cualquier método convencional que condense una amina secundaria con un cloruro alquil-sulfonilo inferior al convertir el compuesto de la fórmula 19c en el compuesto de la fórmula 20. Se convierte el compuesto de la fórmula 20 en el compuesto de la fórmula 19e mediante hidrólisis en condiciones básicas, por ejemplo con una base alcalina, por ejemplo hidróxido de sodio en condiciones acuosas. De esta manera, se puede producir el compuesto de la fórmula 19e, donde R_{35} es un grupo alquilsulfonilo inferior.

ES 2 269 141 T3

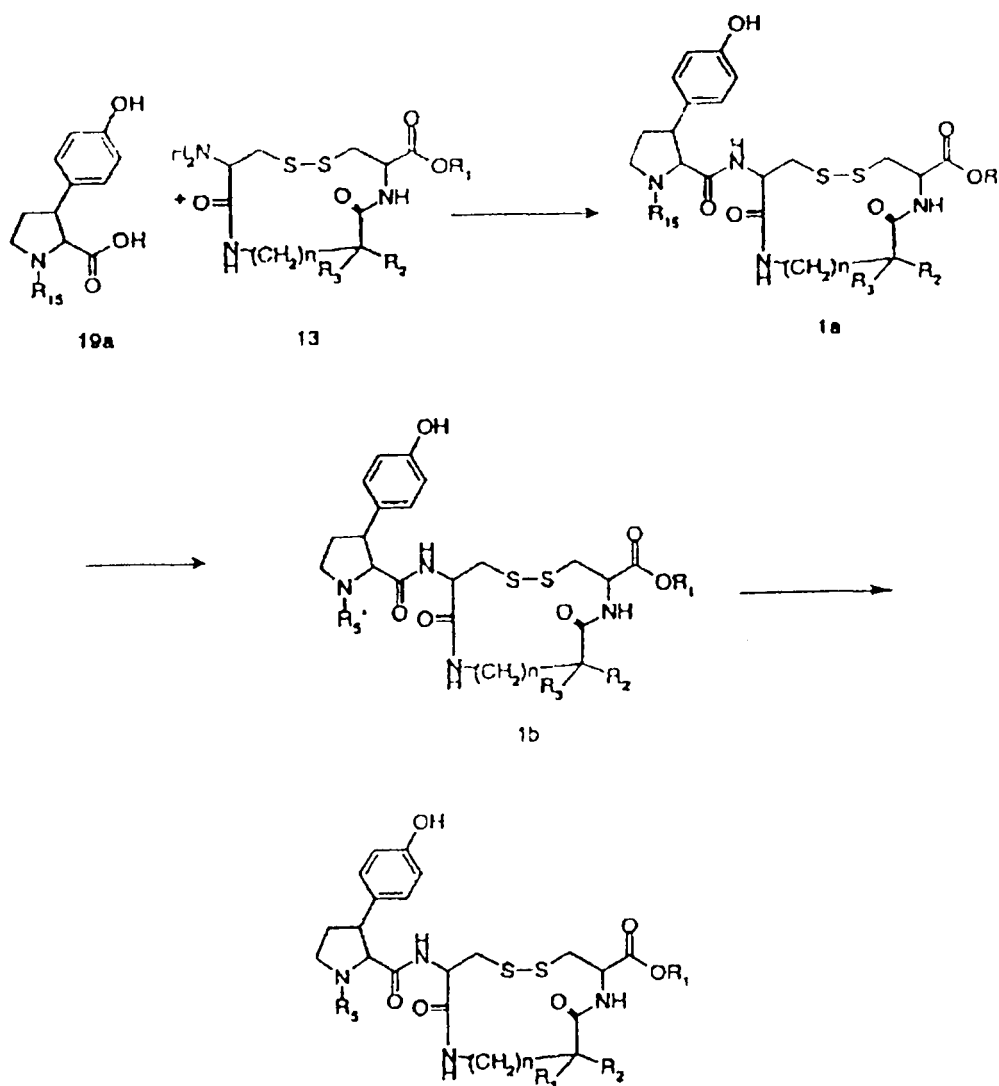
Se convierte el compuesto de la fórmula 19c en el compuesto de la fórmula 21 al hacer reaccionar el compuesto de la fórmula 19 con un agente de acilación, en particular, un derivado reactivo de:



Los derivados reactivos incluyen haluros ácidos o anhídridos ácidos. Se puede utilizar cualquier método convencional para acilar una amina secundaria con estos anhídridos ácidos o haluros ácidos en este procedimiento. De esta manera, se produce el compuesto de la fórmula 19f.

El compuesto de la fórmula 19 consiste en los compuestos de la fórmula 19f, 19g y 19e. Se puede convertir este compuesto en el compuesto de la fórmula Ig siguiendo el siguiente esquema de reacción 3.

Esquema de reacción 3



donde $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ y R_{15} son tal como se ha expuesto antes.

Tal como se ha descrito antes, se convierten los compuestos de las fórmulas 13 y 19 en el compuesto de la fórmula 1a mediante la síntesis de amida estándar, por ejemplo mediante el tratamiento de 13 y 19 con un leve exceso de HBTU y diisopropiletilamina en un disolvente polar aprótico tales como DMF a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y +45°C para obtener un compuesto de la fórmula 1a. R_1 con el átomo de oxígeno que tienen unido forma un grupo de éster hidrolizable tal como se ha descrito antes. El ulterior tratamiento de 1a en condiciones ácidas adecuadas para la fragmentación de ésteres hidrolizables, por ejemplo con ácido clorhídrico 4N en dioxano/diclorometano a temperatura ambiente y, después de completar la reacción, la precipitación del producto con éter produce el compuesto de la invención I.

ES 2 269 141 T3

Al convertir el compuesto de la fórmula 1a en el compuesto de la fórmula 1, donde R_{15} es un grupo ter-butoxi carbonilo (grupo Boc), es decir donde R_{15} es $R_8-X-(CH_2)_Y-CO-$; y R_8 es ter-butilo, X es O e Y es cero, se eliminará este grupo mediante hidrólisis ácida a partir del compuesto de la fórmula 1a para producir el compuesto de la fórmula 1, y R_5 es hidrógeno. Por otra parte, se puede convertir el compuesto de la fórmula 1 donde R_5 es hidrógeno nuevamente en el grupo Boc al hacer reaccionar el compuesto de la fórmula 1 en la que R_5 es hidrógeno con anhídrido de Boc en las mismas condiciones que se utilizan para formar el compuesto de la fórmula 21, a partir del compuesto de la fórmula 19c. Si se utiliza el compuesto de la fórmula 19g como el material inicial en el esquema de reacción 3 en lugar del compuesto de 19a, se formará el compuesto de la fórmula 1 con el grupo amino que está sustituido con R_{25} . Por otra parte, si se utiliza el compuesto de la fórmula 19f en lugar del compuesto de la fórmula 19a, en el esquema de reacción 3, se formará el compuesto de la fórmula 1 con el sustituyente R_{55} . Por otro lado, si se sustituye el compuesto de la fórmula 19e por el compuesto de la fórmula 19a en el esquema de reacción 3, se formará el compuesto de la fórmula 1 con el sustituyente R_{35} .

La invención se ilustra aún más con los ejemplos que se incluyen a continuación. Los términos que se utilizan en los ejemplos son los que se definen de la siguiente forma:

THF	es tetrahidrofurano,
DMF	es N,N-dimetilformamida,
HOBT	es 1-hidroxibenzotriazol,
BOP	es hexafluorofosfato de [(benzotriazol-1-il)oxi]tris (dimetilamino)fosfonio,
HATU	es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio,
HBTU	es hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio,
DIPEA	es diisopropiletilamina,
DMAP	es 4-(N,N-dimetilamino)piridina,
DPPA	es difenilfosforilazida,
DBU	es 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno,
NaH	es hidruro de sodio,
Salmuera	es una solución de cloruro de sodio saturada,
TLC	es cromatografía de capa fina,
LiOH	es hidróxido de litio,
LDA	es diisopropilamida de litio,
BOP-Cl	es cloruro bus(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico,
NMP	es N-metil pirrolidinona,
Fmoc	es (9-fluorenilmetoxi)carbonilo,
TFA	es ácido trifluoroacético,
HOAC	es ácido acético,
HRMS	es espectroscopia de masa de alta resolución,
Tritil	es trifenilmetilo,
LAH	es hidruro de litio-aluminio,
DCM	es diclorometano,

ES 2 269 141 T3

Boc es [(1,1-dimetil)etoxi]carbonil]-anhídrido de Boc es di-ter-butil-dicarbonato,

Boc₂O es di-ter-butil-dicarbonato,

5 HRP es peroxidasa de rábano picante,

DMSO es dimetilsulfóxido,

BSA es albúmina sérica bovina,

10 CHO es ovario de hámster chino,

EDTA es ácido tetraacético de etilendiamina,

15 PMSF es fluoruro de p-toluensulfonilo,

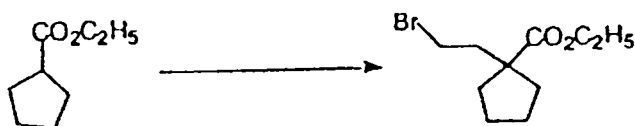
PBS es solución amortiguadora de fosfato.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de ácido 1-(2-azidoetil)ciclopentan carboxílico

25

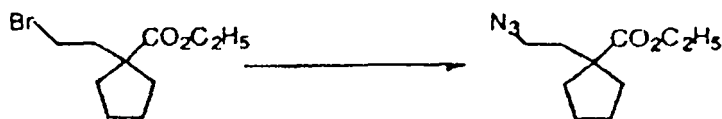


30

a. A una solución enfriada con hielo de di-isopropilamina (56 mL, 0,396 mol) en THF 85 (mL), se agregó n-butil litio en solución de hexano (240 mL, 1,6 M, 0,393 mol) en 20 min. Se agitó la mezcla a 0°C durante 30 min., se la enfrió a una temperatura de baño de -65°C y se agregó etilciclopentano carboxilato (37,4 g, 0,263 mol) en THF (50 mL) durante 20 min. Después de 1 hora, se agregó una solución de 1,2-dibromoetano (47 mL, 0,545 mol) en THF (50 mL), se mantuvo la mezcla a -65°C durante 3 horas y se la dejó templar hasta temperatura ambiente durante la noche. Se enfrió la reacción mediante el agregado de una solución de cloruro amónico saturado (200 mL), se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (100 mL). Se lavaron los extractos combinados con agua:salmuera 1:1 (250 mL) y se los secó (Na₂SO₄). Se filtró la solución y luego se la concentró y diluyó con tolueno (100 mL) y se la concentró. Se repitieron dos veces la dilución y la concentración para producir el bromuro que es 1-(2-bromoetil) ciclopentan carboxilato de etilo (52,5 g).

40

45

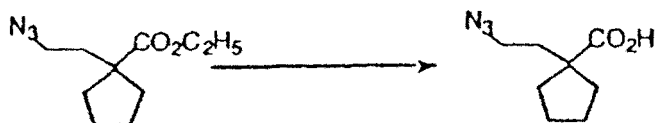


50

b. Se agitó una solución del bromuro antes citado (52,5 g, 0,211 mol) y azida sódica (54 g, 0,831 mol) en DMF (200 mL) a 50°C durante 5 horas en una atmósfera de nitrógeno y se filtró. Se concentró el filtrado hasta llegar casi a la sequedad, se lo diluyó con acetato de etilo (500 mL), se lo filtró y se lo concentró para obtener 1-(2-azidoetil) ciclopentan carboxilato de etilo crudo (40,9 g) como un aceite pardo. Se combinó este material con el producto de una partida anterior (total de 63,5 g) y se purificó mediante cromatografía en 250 g de gel de sílice, eluyendo con 5% de acetato de etilo en hexano para obtener 50,3 g de 1-(2-bromoetil)ciclopentan carboxilato de etilo como un aceite pardo claro.

55

60



65

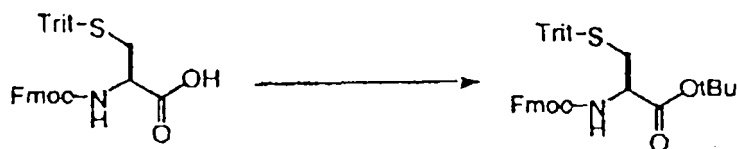
c. Se disolvió el 1-(2-bromoetil)ciclopentan carboxilato de etilo anterior (50,3 g, 0,238 mol) en THF (750 mL) y metanol (375 mL) y se agregó una solución de hidróxido de litio hidratado (15 g, 0,357 mol) en agua (300 mL). Se agitó la solución resultante a 40°C durante la noche y se concentró. Se disolvió el residuo en 2 L de agua que contenía

ES 2 269 141 T3

40 mL de hidróxido de sodio 1N y posteriormente se lavó con hexano (1 L). Se hizo ácida la capa acuosa con HCl 1N (375 mL) y se extrajo con éter (2 x 1L). Se secaron los extractos combinados (Na_2SO_4) y se los concentró para obtener ácido 1-(2-azidoetil)ciclopentan carboxílico (37,5 g) como un líquido color ámbar.

5 Ejemplo 2

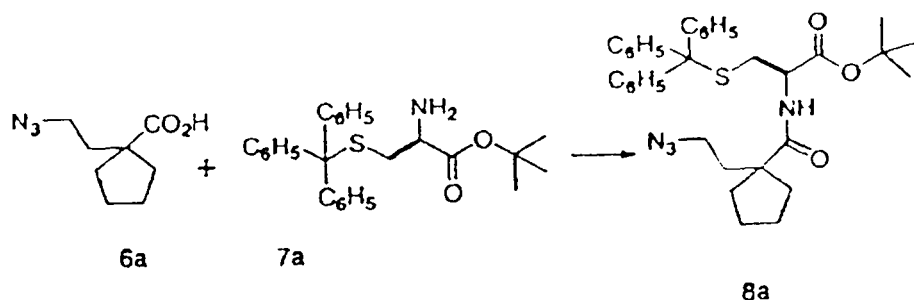
Preparación de N-fluorenilmetoxicarbonil-S-tritil-L-cisteína-t-butil éster



Se calentó una suspensión de Fmoc-S-tritil-L-cisteína (2,9 g, 5 mmol) en tolueno seco (10 mL) a 80°C. A esta suspensión se agregó en 20 min., acetal de di-ter-butildimetilformamida (4,8 mL, 20 mmol). Se enfrió la solución, se lavó con agua, se saturó con bicarbonato de sodio (2 x 19 mL) y se evaporó. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo/hexanos (15/85), para obtener 2,2 g de N-fluorenilmetoxicarbonil-S-tritil-L-cisteína-t-butil éster.

Ejemplo 3

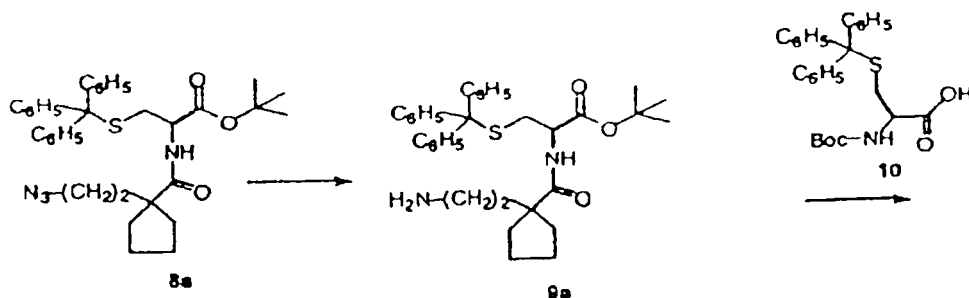
Preparación de 1,1-dimetiletil éster de N-[[1-(2-azidoetil)ciclopentil]carbonil]-S-trifenilmetil-L-cisteína

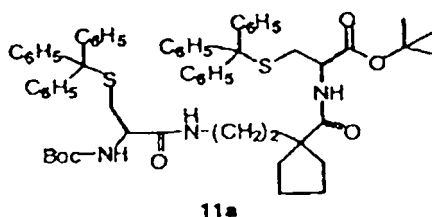


A una solución de 1,1-dimetiletil éster de N-fluorenilmetoxicarbonil-S-tritil-L-cisteína (640 mg, 1 mmol) en 5 mL de DMF se agregaron 2 mL de piperidina. Se agitó la solución durante 20 min., y se evaporó el disolvente. Se retiró la piperidina residual al efectuar la azeotropía del sólido con DMF (3 x 20 mL) y al secar a alto vacío durante 1 hora para obtener 1,1-dimetiletil éster de S-tritil-L-cisteína como un sólido. A este sólido se agregaron 5 mL de DMF, a lo que le siguió ácido 1-(2-azidoetil)ciclopentan carboxílico (6a) (183 mg, 1 mmol), HBTU (379 mg, 1 mmol) y DIPEA (0,18 mL, 1 mmol). Se agitó la solución resultante durante 5 horas y se retiró el disolvente a alto vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando acetato de etilo/hexano (15/85) como eluyente para obtener 500 mg (86%) de 1,1-dimetiletil éster de N-[[1-(2-azidoetil)ciclopentil]carbonil]-S-trifenilmetil-L-cisteína.

Ejemplo 4

Preparación de 1,1-dimetiletil éster del ácido 2(R)-[[[1-[[2(R)-[[1,1-dimetiletoxi]carbonil]amino]-1-oxo-3-[[trifenilmetil]tio]propil]amino]etil]ciclopentil]carbonil]amino-3-[(trifenilmetil)tio]propanoico (11a)

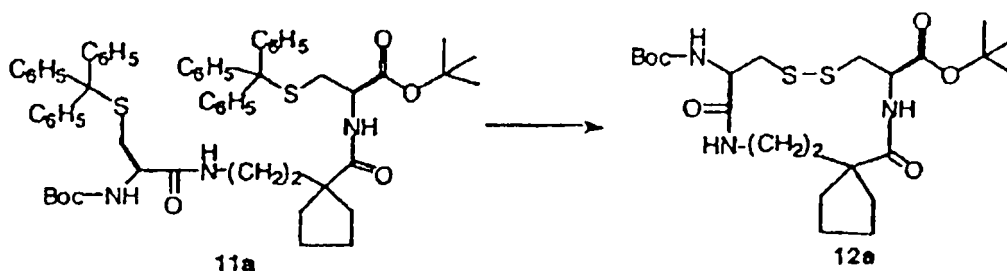




A una solución de 1,1-dimetiletil éster de N-[[1-(2-azidoetil)ciclopentil]carbonyl]-S-trifenilmetil-L-cisteína, (500 mg, 0,86 mmol) en 5 mL de THF, se agregó en argón, una solución de trimetilfosfina en THF (1,41 mL de una solución 1M, 1,5 equiv.). Se agitó la solución durante 3 horas y, después se agregaron 6 gotas de agua. Se agitó la solución resultante durante 15 minutos, se evaporó el disolvente al vacío y se secó el residuo a alto vacío durante 14 horas. Al aceite resultante se le agregó una solución de N-[(1,1-dimetiletoxi)carbonyl]-S-tritil-L-cisteína 10 (463 mg, 1 mmol), HBTU (379 mg, 1 mmol) y DIPEA (0,18 mL, 1 mmol) en 5 mL de DMF. Se agitó la solución durante 6 horas y se evaporó el disolvente a alto vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con 35% de acetato de etilo en hexano, para obtener 510 mg de 1,1-dimetiletil éster del ácido 2(R)-[[[1-[[2(R)-[[1,1-dimetiletoxi]carbonyl]amino]-1-oxo-3-[[trifenilmetil]tio]propil]amino]etil]ciclopentil]-carbonyl]amino-3-[(trifenilmetil)tio]propanoico (11a) (59%).

Ejemplo 5

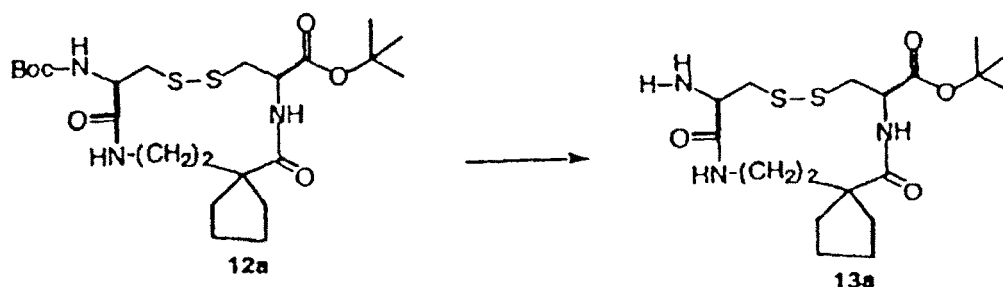
Preparación de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-[[[1-(1,1-dimetiletoxi)carbonyl]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico



A una solución de 1,1-dimetiletil éster del ácido 2(R)-[[[1-[[2(R)-[[1,1-dimetiletoxi]carbonyl]amino]-1-oxo-3-[[trifenilmetil]tio]propil]amino]etil]ciclopentil]carbonyl]amino-3-[(trifenilmetil)tio]propanoico (11a) (510 mg, 0,51 mmol) en 500 mL de diclorometano-metanol 9/1 se agregó en 5 min., una solución de yodo (520 mg, 4 equiv.) en 500 mL de diclorometano-metanol 9/1. Se agitó la mezcla de reacción resultante durante 10 min. y se la apagó con 300 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 M. Se separaron las capas y se extrajo la capa orgánica con 200 mL de diclorometano. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua, se las secó en sulfato de magnesio anhidro y se las evaporó para obtener un aceite. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con de acetato de etilo/hexano 1/1 permitió obtener 160 mg (61%) de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-[[[1-(1,1-dimetiletoxi)carbonyl]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico.

Ejemplo 6

Preparación de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico

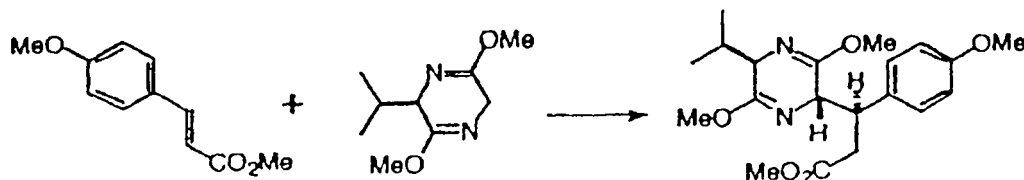


Se agregó a una mezcla de metanol (0,15 mL, 3,8 mmol) en 5 mL de acetato de etilo a 0°C, en una atmósfera de argón, cloruro de acetilo (0,27 mL, 3,8 mmol). Se agitó la solución a 0°C durante 10 min. y luego a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregó a la solución 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-[[[1-(1,1-dimetiletoxi)carbonyl]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico (130 mg, 0,25 mmol). Se agitó

la mezcla durante 7 horas. Se recogió el precipitado en una frita de vidrio y se lavó con éter dietílico. Después del secado a alto vacío, se obtuvieron 92 mg de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditiaz-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico (rendimiento del 96% basado en el material inicial recuperado después de la evaporación del filtrado y los lavados).

Ejemplo 7

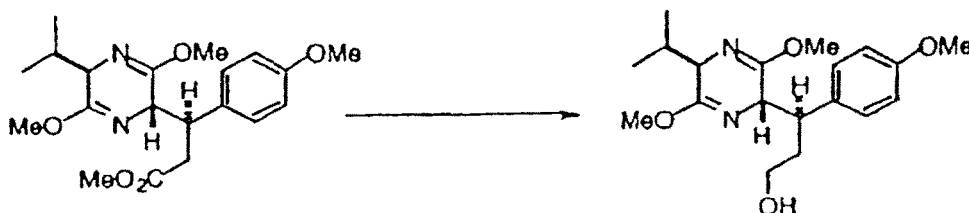
Preparación de metil éster del ácido 3(R)-[(2S,5R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-(1-metiletil)-2-pirazinil]-3-(4-metoxifenil)propanoico



A una solución de (R)-2,5-dimetoxi-3-isopropil-3,6-dihidropirazina (18,4 g, 100 mmol) en 250 mL de THF seco a -70°C (temperatura interna) se adicionó a gotas una solución de n-BuLi (1,6 M en hexano, 63 mL, 100 mmol) durante 3 horas para mantener la temperatura interna por debajo de -70°C . Después del agregado, se agitó la solución a -70°C durante 40 min. Después de ello, se agregaron a la solución 90 mL de una solución de THF de metil trans-4-metoxicinamato (21,2 g, 110 mmol) en 1 hora. Se agitó la solución resultante a -70°C durante un lapso adicional de 4 horas. Se templó la reacción con el agregado de ácido acético (6,1 mL, 100 mmol) a -70°C y se templó la suspensión resultante a temperatura ambiente para obtener una solución amarilla. Se diluyó la solución con éter hasta 1000 mL y se lavó la capa orgánica con agua (3 x 80 mL) y salmuera (3 x 80 mL) y, después de ello, se secó en MgSO_4 . Después de retirar el disolvente, se purificó el residuo (44,3 g) mediante HPLC en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (1:5:5) para obtener metil éster del ácido 3(R)-[(2S,5R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-(1-metiletil)-2-pirazinil]-3-(4-metoxifenil)propanoico (30,6 g, 81,3 mmol, 81,3%). TLC: R_f - 0,3, acetato de etilo/hexano (1/5). HRMS, obs. 377.2071, Calc. 377.2076. Anal. cálc. Para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$; C, 64,16; H, 7,00; N, 7,48. Observado: C, 64,05; H, 7,28; N, 7,37.

Ejemplo 8

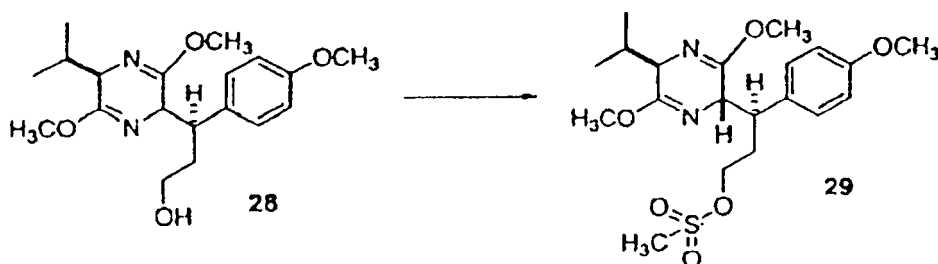
Preparación de 3(R)-[(2S,5R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-(1-metiletil)-2-pirazinil]-3-(4-metoxifenil)propanol



En un matraz de dos cuellos seco equipado con un embudo de goteo y termómetro, se agregó metil éster del ácido 3(R)-[(2S,5R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-(1-metiletil)-2-pirazinil]-3-(4-metoxifenil)propanoico (17,5 g, 46,48 mmol) y 559 mL de solución THF seco y posteriormente se enfrió a -10°C en un baño de acetona-hielo. A la solución se agregó en forma de gotas una solución de hidruro de litio aluminio en THF (0,8 M, 60 mL, 48 mmol) a una velocidad que permitiera mantener la temperatura interna por debajo de 0°C . Después del agregado, se retiró el baño de hielo, y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se templó la reacción con el agregado de 10 mL de acetato de etilo, a lo que le siguieron 25 mL de solución de sulfato de sodio saturada. Se filtró el precipitado blanco resultante y se lo lavó con acetato de etilo (4 x 100 mL). Posteriormente se concentró el filtrado combinado para obtener 3(R)-[(2S,5R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-(1-metiletil)-2-pirazinil]-3-(4-metoxifenil)propanol como un aceite incoloro (17,7 g). TLC (R_f : 0,5, acetato de etilo/hexano = 1:1) único punto.

Ejemplo 9

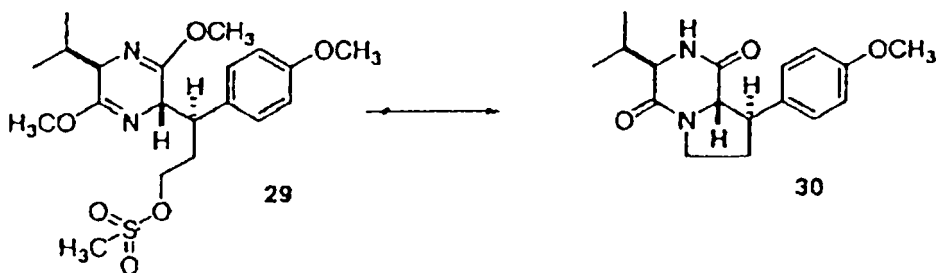
Preparación de 3(R)-[(2S,5R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-(1-metiletil)-2-pirazinil]-3-(4-metoxifenil)propil éster del ácido metansulfónico (29)



Se disolvió el aceite anterior 3(R)-[(2S,5R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-(1-metiletil)-2-pirazinil]-3-(4-metoxifenil)propanol (28) (17,7 g) en 300 mL de diclorometano. A la solución a -5°C se agregó cloruro de metan sulfonilo (8,02 g, 5,42 mL, 70 mmol) a lo que le siguió diisopropiletilamina (DIPEA, 12 mL, 70 mmol) en forma de gotas en 10 min. Se agitó la reacción a 0°C durante 2 horas. Se diluyó la solución amarilla clara con 2L de éter y se la lavó con agua (3 x 200 mL) y salmuera (2 x 200 mL). Después del secado en sulfato de sodio, se concentró la solución en un volumen de 160 mL al vacío a 20°C. TLC en EA/H (= 1:1): R_f = 0,74, como un punto principal; R_f = 0,21, como un punto menor.

Ejemplo 10

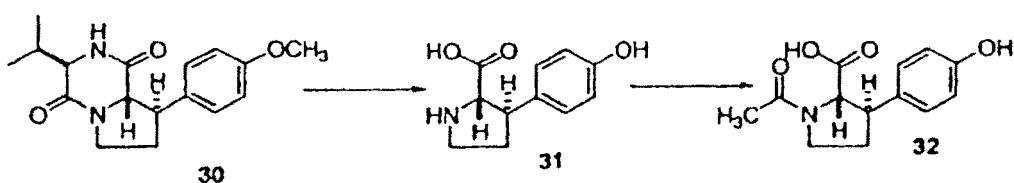
Preparación de (3R,8R,8aS)-hexahidro-8-(9-metoxifenil)-3-(1-metiletil)pirrolo[1,2-a]pirazin-1,4-dióxido (30)



A un matraz de tres cuellos de 2L equipado con un embudo de goteo ecualizado por presión, un termómetro y un cabezal rígido de vía corta se cargaron 1.000 mL de DMF y yoduro de sodio (33 g, 200 mmol). Se agregó una solución de metano sulfonato crudo 29, obtenida antes en el Ejemplo 9, a la solución de DMF a través del embudo de goteo durante 1,2 horas a una temperatura de baño comprendida entre 60 y 120°C en argón. Después del agregado, se retiraron los componentes con baja ebullición mediante destilación a través del cabezal rígido a una presión de 100 mm. Se agitó el residuo a 120°C (temperatura interna) durante un lapso adicional de 2,5 horas. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se evaporó el disolvente al vacío y se diluyó el residuo con acetato de etilo (700 mL). Se recogió el sólido blanco resultante por filtrado, se lavó con acetato de etilo (3 x 100 mL) y se descartó. Se lavó el filtrado combinado con agua (3 x 100 mL). Se saturó la capa de agua con NaCl y se la extrajo con acetato de etilo (3 x 200 mL). Se secaron las capas de acetato de etilo combinadas en sulfato de sodio y se las concentró para obtener 16,5 g del crudo 30. Después del filtrado por 300 g de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo, se obtuvo el producto 30 (11,5 g que contiene 1 equivalente de DMF). La purificación HPLC en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano (8:1) permitió obtener 9,3 g de 30 como un sólido espumoso blanco, HRMS (M+H): obs. 302.1627, calc.: 302.1630.

Ejemplo 11

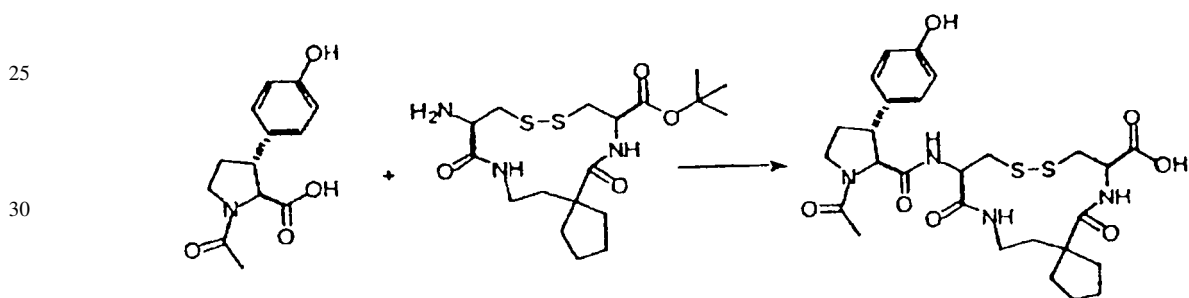
Preparación de (+)-(2S,3R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)prolina (29)



Se disolvió el compuesto 30 obtenido antes en el ejemplo 10 (8,0 g, 26,45 mmol) en 60 mL de ácido bromhídrico acuoso al 48% y 18 mL de ácido acético. Se agitó la solución a una temperatura de baño de 130-135°C durante 3,5 horas. Se controló la reacción mediante HPLC de fase inversa. Después de ello, se diluyó un total de 65 mL del disolvente al vacío y se enfrió el residuo a temperatura ambiente. Se retiró el sólido cristalino blanco resultante (bromhidrato de valina, 2,15 g) por filtrado y se diluyó el filtrado con agua (70 mL). Se trató la capa acuosa con NaHCO₃ sólido (25,6 g) para obtener una suspensión marrón de 31. Después de ello, se agregó a la suspensión anterior cloruro de acetilo (12,2 mL, 171 mmol) en 60 mL de THF en 2 horas a 20°C. Durante el agregado, se introdujeron otros 1,2 g de NaHCO₃ en varias porciones para mantener el pH de la reacción por encima de 7. Después del agregado, se agitó la suspensión a temperatura ambiente durante la noche. Después de la acidificación con TFA a pH <3, se concentró la suspensión hasta alcanzar la sequedad y se extrajo el residuo pardo con acetona (2 x 250 mL). Se secó la solución de acetona en sulfato de sodio y se concentró para obtener una goma parda. Se extrajo este residuo pardo con acetato de etilo caliente (2 x 250 mL) para retirar la N-acetilvalina. Se disolvió la goma parda restante (11,2 g) en 60 mL de agua y se purificó mediante RP-HPLC (columna Delta Prep C- 18 Waters de 5 x 30 cm eluyendo con un gradiente lineal de 5% a 95% de acetonitrilo en agua, 150 mL/min.) para obtener (+)-(2S,3R)-1-metilcarbonil-3-(4-hidroxi)fenilprolina (32) como un sólido blanco (3,45 g, 14,28 mmol) (53,8%). HRMS (M+H), obs. 250.1078, calc. 250.1079.

Ejemplo 12

Preparación de ácido (8R,13R)-13-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico



A una solución de (2S,3R)-1-metilcarbonil-3-(4-hidroxi)fenilprolina (29), preparada en el Ejemplo 11, (1,37 g, 5,5 mmol) y 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico, preparado en el ejemplo 6 (2,27 g, 5,0 mmol) en 20 mL de DMF, se agregó HBTU (2,08 g, 5,5 mmol) y DIPEA (2,7 mL, 15 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la solución en argón durante 1,5 horas. Luego se templó la reacción con 30 mL de salmuera y se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo (3 x 100 mL). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con cloruro de hidrógeno 0,1 N, NaHCO₃ saturado y salmuera (2 x 30 mL, cada uno) y se secó en Na₂SO₄. Después de retirar el disolvente, se recristalizó la espuma amarilla resultante a partir de diclorometano-hexano para obtener 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico, como un polvo amarillo claro (3,01 g).

A una solución de este éster (3,01 g en 15 mL de diclorometano seco se agregó HCl 4N en dioxano (50 mL) en una porción a temperatura ambiente. Se agitó la solución resultante a temperatura ambiente durante 4,5 horas para producir una suspensión. Se diluyó la suspensión con 50 mL de un disolvente mezclado (diclorometano:éter 3:7) y se filtró. Se lavó la torta de filtrado amarillo claro con el disolvente mezclado antes citado (2 x 20 mL) a lo que le siguió éter (2 x 20 mL). Se secó la torta al vacío para obtener un polvo amarillo claro (2,51 g, pureza HPLC: >85%). Se efectuó la purificación final con RP-HPLC para obtener ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico como un sólido blanco (1,55 g, 2,61 mmol) con un rendimiento del 52%. HRMS (M+H) Obs. 593.209, Calc. 593.2103.

Ejemplo 13

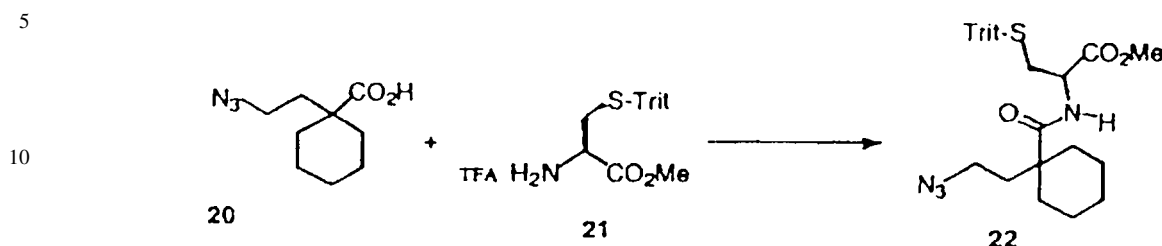
Preparación de ácido 1-(2-azidoetil)ciclohexan carboxílico



Usando el método que se describe en el ejemplo 1 y a partir de etil éster del ácido ciclohexan carboxílico, se obtuvo ácido 1-(2-azidoetil)ciclohexan carboxílico como un aceite. Espectro de masa de baja resolución (ES-) m/z 196,1 [(M-H) Calc. para C₉H₁₄N₃O₂: 196,1].

Ejemplo 14

Preparación de metil éster de N-[(1-(2-azidoetil)ciclohexano)carbonil]-S-trifenilmetil-L-cisteína (22)

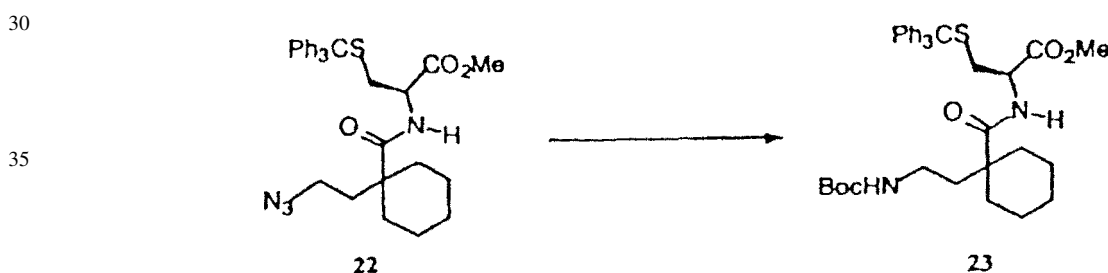


15 A una solución de ácido 1-(2-azidoetil)ciclohexano carboxílico (20) (0,60 g, 3,0 mmol), en la sal de TFA de metil éster de S-trifenilmetil-L-cisteína (1,4 g, 3,0 mmol) y diisopropiletilamina (0,78 g, 6,0 mmol) en DMF (12 ml) se agregó HBTU (1,1 g, 3,0 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 horas. Se vertió la mezcla de reacción en un embudo separador que contenía acetato de etilo (100 mL) y agua (35 mL). Se separó la capa acuosa y se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 50 mL). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera saturada, se las secó en MgSO₄, se las filtró y luego se las concentró al vacío. La purificación mediante cromatografía en columna instantánea eluyendo con hexano:acetato de etilo (8:1) permitió obtener la azida 22 (1,25 g, 74%) como un sólido blanco. Espectro de masa de alta resolución m/z 579.2396 [(M+Na)⁺; Calc. para C₃₂H₃₆N₄O₃SNa: 579.2406].

20

Ejemplo 15

Preparación de metil éster, 23 N-[(1-[(2-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-etil]ciclohexano)carbonil]-S-trifenilmetil-L-cisteína, metil éster



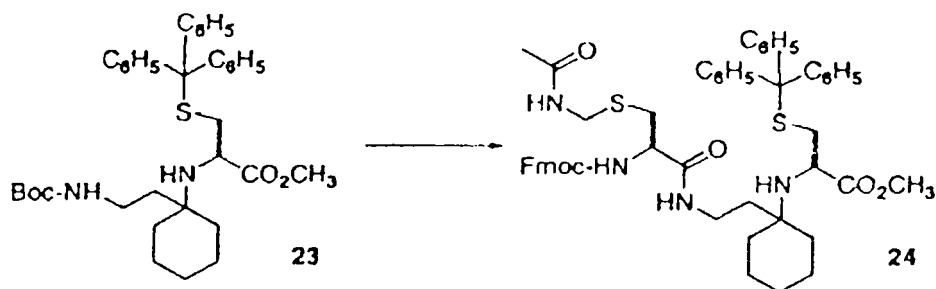
45 A una solución de la azida 22 obtenida antes en el ejemplo 14 (1,24 g, 2,2 mmol) en THF (10 ml) se agregó trimetilfosfina (2,5 ml, 1M en THF, 2,5 mmol) en forma de gotas. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 30 min. y se agregó agua (0,080 g, 4,5 mmol) a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 2 h, se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (70 mL) se la secó en Na₂SO₄, se la filtró y concentró *in vacuo*. Se secó el aceite a alto vacío durante 5 h.

50 Se disolvió la amina cruda en acetato de etilo (10 mL) y se agregó Boc₂O (1,0 g, 4,6 mmol) a la mezcla. Se agitó la mezcla resultante durante la noche. Se vertió la mezcla de reacción en un embudo separador que contenía acetato de etilo (75 mL) y agua (25 mL). Se separó la capa acuosa y se la volvió a extraer con acetato de etilo (1 x 50 mL). Se lavó la capa orgánica combinada con salmuera saturada, se la secó en MgSO₄, se la filtró y luego se la concentró *in vacuo*. La purificación mediante cromatografía en columna instantánea eluyendo con hexano-acetato de etilo (6:1 y luego 4:1) permitió obtener metil éster de N-[(1-[(2-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino)etil]-ciclohexano)carbonil]-S-trifenilmetil-L-cisteína (23) (0,88 g, 62%). Espectro de masa de alta resolución m/z 653.3007 [(M+Na)⁺; Calc. para C₃₇H₄₆N₂O₅SNa: 653.3025].

55

Ejemplo 16

Preparación de metil éster del ácido 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[acetilamino]metil]tio]2(R)-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-1-oxopropil]amino]etil]ciclohexil]-carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico (24)

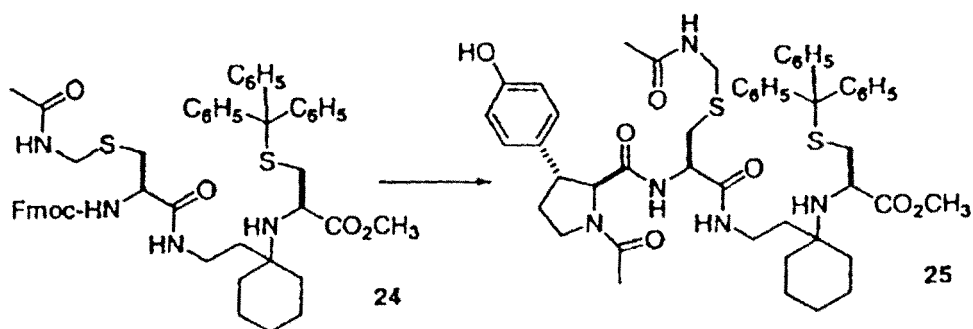


A una solución del éster 23 (0,88 g, 1,4 mmol), producida en el Ejemplo 15 en diclorometano (10 ml) se agregó TFA (5 ml). Se agitó la mezcla durante 45 min. y se la concentró *in vacuo*. Se secó la sal de TFA a alto vacío durante 2 horas.

A una solución de la sal de TFA cruda, Fmoc-Cys(Acm)-OH (575 mg, 1,4 mmol) y diisopropiletilamina (1 ml, exceso) en DMF (10 ml) se agregó HBTU (595 mg, 1,6 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante la noche. Se vertió la mezcla de reacción en un embudo separador que contenía acetato de etilo (150 ml) y se lavó con HCl 0,3 M (2 x 30 ml). Se combinaron las capas acuosas y se las volvió a extraer con acetato de etilo (1 x 50 ml). Se lavó la capa orgánica combinada con NaHCO₃ saturado (1 x 30 ml), se secó en MgSO₄, se filtró y se concentró *in vacuo*. La purificación mediante cromatografía en columna instantánea eluyendo con hexano-acetato de etilo (1:1 y luego 2:3), permitió obtener metil éster del ácido 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[acetilamino]metil]tio]2(R)-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-1-oxopropil]amino]etil]ciclohexil]-carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico (24) (1,05 g, 80%). HRMS: (C₅₃H₅₈N₄O₇S₂): obs. m/z 949.3636, (M+Na)⁺. Calc. 949.3645.

Ejemplo 17

Preparación de metil éster del ácido 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[acetilamino]metil]tio]2(R)-[[2(S)3(R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-il]carbonil]amino]-1-oxopropil]-amino]etil]ciclohexil]carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico

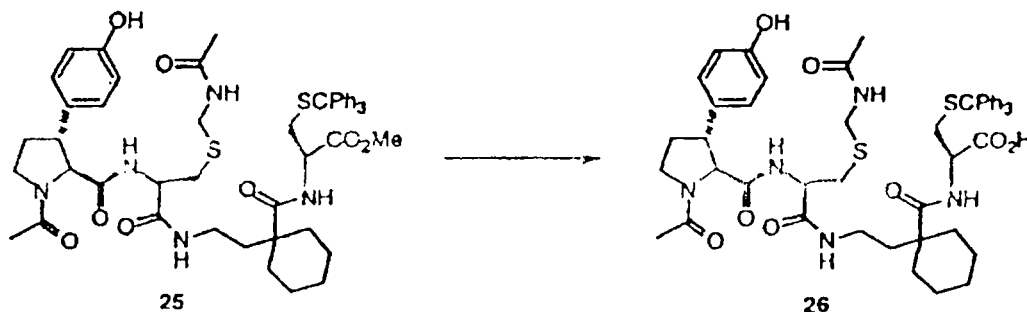


A una solución del compuesto de metil éster del ácido 2(R)-[[[1-[2-[[3-[[acetilamino]metil]tio]2(R)-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-1-oxopropil]-amino]etil]ciclohexil]carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico (24) (500 mg, 0,54 mmol) en DMF (3 ml) se agregó piperidina (2 ml). Se agitó la mezcla durante 1 h y se la concentró al vacío. Se secó el residuo a algo vacío durante la noche. Se lavó el residuo crudo con hexano (3 x 25 ml) y se secó a alto vacío durante 45 min. para proporcionar la amina cruda (364 mg) resultante de la remoción del grupo Fmoc del 24. Se almacenó esta amina cruda en argón a -10°C.

A una solución de la amina antes citada (50 mg, 0,07 mmol), (2S,3R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)prolina (32) (18 mg, 0,07 mmol) y diisopropiletilamina (0,05 ml, exceso) en DMF (1 ml) se agregó HBTU (30 mg, 0,08 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3,5 h. Se vertió la mezcla de reacción en un embudo separador que contenía acetato de etilo (50 ml) y se lavó con HCl 0,5M (2 x 15 ml). Se combinaron las capas acuosas y se las volvió a extraer con acetato de etilo (1 x 20 ml). Se lavó la capa orgánica combinada con NaHCO₃ saturada (1 x 15 ml), se la secó en MgSO₄, se la filtró y luego se la concentró *in vacuo* para obtener 50 mg del crudo 25. Este material fue difícil de purificar y, por lo tanto, se llevó a cabo una caracterización completa después de la hidrólisis del metiléster.

Ejemplo 18

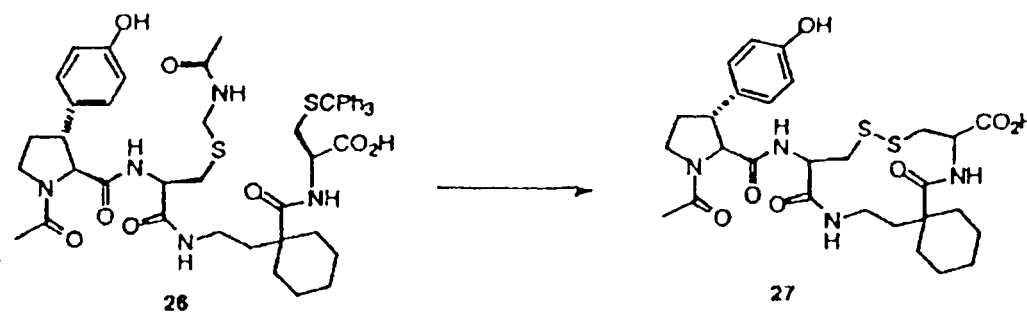
Preparación del ácido 2(R)[[1-[2-[[3-[(acetilamino)metil]tio]-2(R)-[[2(S)3(R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-il]carbonil]amino]-1-oxopropil]-amino]etil]ciclohexil]carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico (26)



A una solución de metil éster del ácido 2(R)[[1-[2-[[3-[(acetilamino)metil]tio]-2(R)-[[2(S)3(R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-il]carbonil]amino]-1-oxopropil]-amino]etil]ciclohexil]carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico (25) (50 mg crudo) en MeOH (0,5 ml) se agregó una solución de hidróxido de litio (2,5 mg, 0,060 mmol) en agua (0,25 ml). Se agitó la mezcla durante 2 h y se acidificó la mezcla de reacción (pH ~1-2) con HCl 0,5 M (varias gotas). Se vertió la mezcla de reacción en un embudo separador que contenía acetato de etilo (20 ml) y agua (5 mL). Se separó la capa acuosa y se la volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 10 mL). Se lavó la capa orgánica combinada con salmuera saturada, se la secó en MgSO_4 , se la filtró y se la concentró al vacío. La purificación mediante HPLC de fase inversa usando un gradiente al 15-95% de acetonitrilo-agua durante 25 min., permitió obtener ácido 2(R)[[1-[2-[[3-[(acetilamino)metil]tio]-2(R)-[[2(S)3(R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-il]carbonil]amino]-1-oxopropil]-amino]etil]ciclohexil]carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico (26) (42 mg). Espectro de masa de alta resolución m/z 944.3701 ($\text{M}+\text{Na}^+$); Calc. para $\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}$: 944.3703.

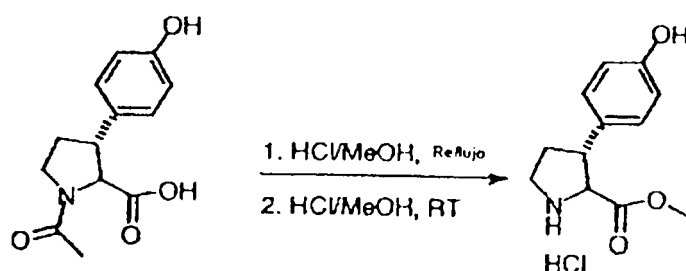
Ejemplo 19

Síntesis de ácido (9R,14R)-14-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-7,15-dioxo-11,12-ditia-8,16-diazaspiro[5.12]octadecan-9-carboxílico



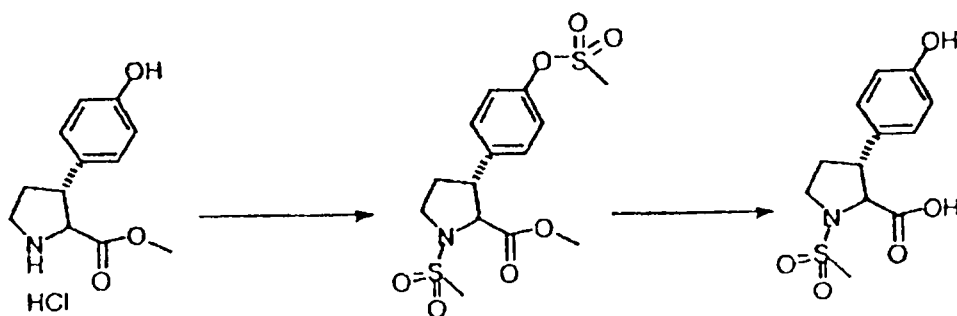
A una solución de ácido 2(R)[[1-[2-[[3-[(acetilamino)metil]tio]-2(R)-[[2(S)3(R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-il]carbonil]amino]-1-oxopropil]-amino]etil]ciclohexil]carbonil]amino]-3-[(trifilmetil)tio]propanoico (26) (40 mg, 0,045 mmol) en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100 ml, 9:1) a temperatura ambiente se agregó en forma de gotas una solución de I_2 (41 mg, 0,16 mmol) en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100 ml, 9:1) en 25 min. Después de terminar con el agregado, se agitó la mezcla de reacción durante 5 min. y se agregó una solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1 mL) en forma de gotas. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró al vacío. La purificación mediante HPLC de fase inversa, usando un gradiente de 15-95% de acetonitrilo-agua en 25 min. permitió obtener ácido (9R,14R)-14-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-7,15-dioxo-11,12-ditia-8,16-diazaspiro[5.12]octadecan-9-carboxílico (6 mg, 23%). Espectro de masa de alta resolución m/z 607.2255 [$\text{M}+\text{H}^+$]; Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$: 607.2260].

Ejemplo 20

Síntesis de clorhidrato de metil éster del ácido (2S,3R)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico

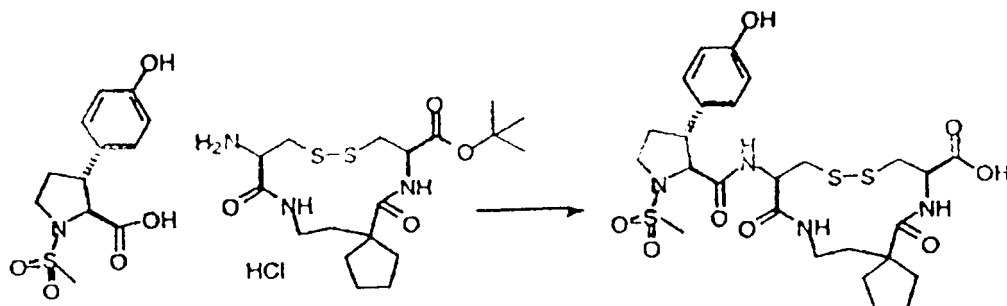
Se saturó una solución de ácido (2S,3R)-1-acetil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico (1,0 g) en 50 mL de metanol con gas de HCl. Se sometió la solución a reflujo durante 24 horas y se evaporó el disolvente para obtener un sólido pardo. Después de ello, se disolvió este sólido pardo en 20 mL de HCl saturado anhidro en metanol y se agitó la solución resultante durante la noche a temperatura ambiente. Después de retirar el disolvente, se obtuvo el clorhidrato de metil éster del ácido (2S,3R)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico como un sólido pardo claro (0,83 g).

Ejemplo 21

Síntesis de ácido (2S,3R)-1-metansulfonil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico

A la suspensión de clorhidrato de metil éster del ácido (2S,3R)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico (100 mg, 0,38 mmol), preparada en el Ejemplo 20, en diclorometano (2 mL) se agregó DIPEA (129 mg, 1,15 mmol) y cloruro de metan sulfonilo (80,2 mg, 0,70 mmol) a 0°C. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 6 horas y se la diluyó con acetato de etilo (20 mL). Luego se lavó la solución con bicarbonato de sodio saturado (2 x 5 mL) y salmuera (2 x 5 mL) y se la concentró. Se filtró el residuo por una almohadilla de gel sílice para obtener un aceite incoloro (89,9 mg). Se disolvió el aceite MeOH/THF (1 mL/1 mL) y se trató la solución resultante con hidróxido de sodio (0,5 mL, 0,5 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 4 horas y se acidificó con ácido acético. Se purificó el producto crudo mediante HPLC de fase inversa (5-95% de acetonitrilo que contenía 0,75% de TFA en agua) en 40 min. de gradiente lineal) para obtener ácido (2S,3R)-1-metansulfonil-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico como un sólido blanco (22 mg, 0,08 mmol). HRMS (M+H): Obs. 286.0757, Calc. 286.0750.

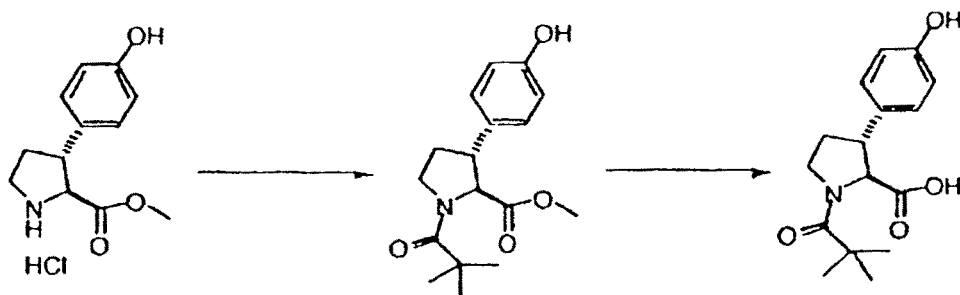
Ejemplo 22

Síntesis de ácido (8R,13R)-13-[[[1-metilsulfonil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditiaz-7,15-diazaspiro[4.12]-heptadecan-8-carboxílico

A la mezcla de ácido (2S,3R)-1-metansulfonil-3-(4-hidroxifenil)-pirrolidin-2-carboxílico (15 mg, 0,05 mmol) y clorhidrato de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico (22,7 mg, 0,05 mmol), preparada en el Ejemplo 6, se agregó, en 0,2 mL de DMF, DIPEA (19,4 mg, 0,15 mmol) y HBTU (19 mg, 0,05 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 3 horas y se la diluyó con agua a 3 mL. Se recolectó el precipitado blanco resultante y se secó durante la noche a presión reducida para obtener 40 mg de un sólido blanco. Se disolvió el sólido seco en 1 mL de diclorometano y se trató la solución con HCl 4N en dioxano (2 mL). Se agitó la solución durante la noche y se la concentró. Se purificó el residuo mediante HPLC de fase inversa (5-95% de acetonitrilo que contenía un 0,75% de TFA en agua en un gradiente lineal de 40 min) para obtener ácido (8R,13R)-1-3-[[[1-metilsulfonil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidin-il]-carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico como un sólido blanco (17,3 mg). HRMS (M+H): Obs. 629.1767, Calc. 629.1773.

Ejemplo 23

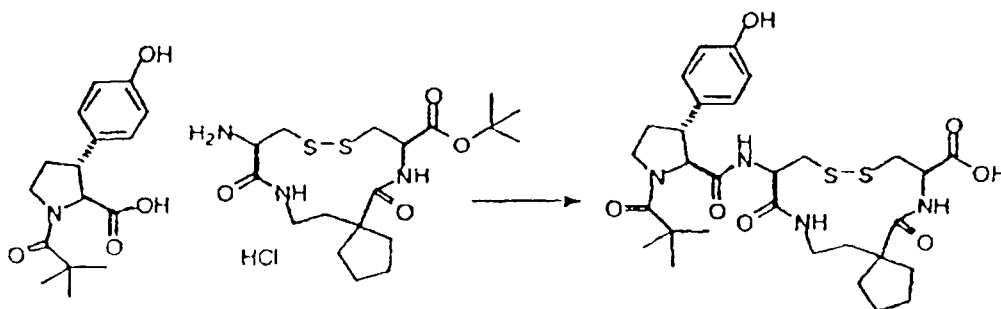
Síntesis de ácido (2S,3R)-1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3-(4-hidroxifenil)-pirrolidin-2-carboxílico



A la solución de clorhidrato de metil éster del ácido (2S,3R)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico, (200 mg, 0,76 mmol), preparada en el Ejemplo 20, en THF/H₂O (2 mL/1 mL) se agregó NaHCO₃ saturado (5 mL). A la mezcla antes citada se le agregó cloruro de trimetilacetilo (420 mg, 3,5 mmol) en 20 min. Después de ello, se agitó la solución resultante a temperatura ambiente durante 4 horas y se diluyó con acetato de etilo hasta 30 mL. Luego se lavó la capa orgánica con salmuera (2 x 5 mL) y se la concentró para obtener metil éster del ácido (2S,3R)-1-(1-oxo-2,2,2-trimetiletil)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico, como un sólido blanco (320 mg). Se disolvió este sólido en 3 mL de EtOH y se agitó con hidróxido de sodio 1N (3 mL, 3 mmol) a temperatura ambiente durante 8 horas. Después de la acidificación con HCl 6N, se retiró el disolvente y se extrajo el residuo con diclorometano. Después de la concentración, se lavó el residuo con éter para obtener ácido (2S,3R)-1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico como un sólido blanco (117 mg). HRMS (M+H): Obs. 292.1556, Calc. 292.1549.

Ejemplo 24

Síntesis de ácido (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico



A una mezcla de ácido (2S,3R)-1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico (45 mg, 0,15 mmol) y clorhidrato de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico (70 mg, 0,15 mmol), preparada en el Ejemplo 6, en 0,5 mL de DMF, se agregó DIPEA (58 mg, 0,45 mmol) y HTBU (59 mg, 0,15 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 3 horas y se diluyó con agua hasta los 3 mL. Se recolectó el precipitado blanco resultante y se secó durante la noche a presión reducida para obtener 98 mg de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]-carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico como un sólido blanco. Se disolvió este sólido seco en 1 mL de diclorometano y se trató la solución con HCl 4N en dioxano (2 mL). Se agitó la solución durante la noche y se concentró. Se purificó el residuo mediante

HPLC de fase inversa (5-95% de acetonitrilo que contenía 0,75% de TFA en agua en gradiente lineal de 40 min.) para obtener ácido (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3(R)-(4-hidroxifenil)-2(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico como un sólido blanco (9 mg). HRMS (M+H): Obs. 635.2543, Calc. 635.2573.

5

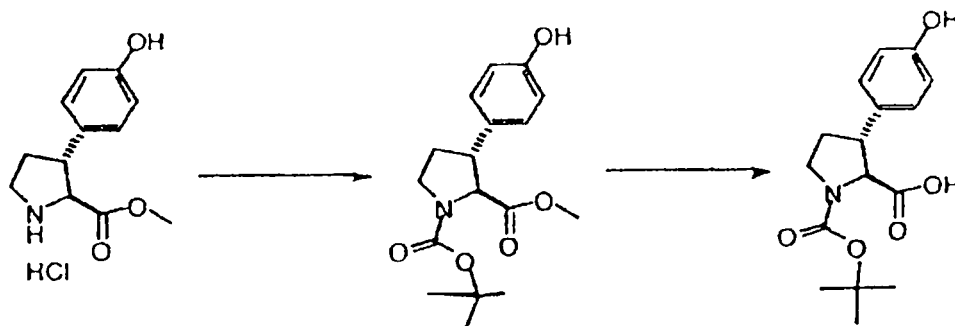
Ejemplo 25

Síntesis de ácido (2S,3R)-1-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-3-(4-hidroxifenil)-pirolidin-2-carboxílico

10

15

20



A la suspensión de clorhidrato de metil éster del ácido (2S,3R)-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico (100 mg, 0,38 mmol), preparada en el Ejemplo 20, en THF (2 mL), se agregó DIPEA (65 mg, 0,5 mmol) y Boc₂O (218 mg, 1 mmol) a 20°C. Después de ello, se agitó la solución a temperatura ambiente durante 16 horas y se diluyó con acetato de etilo (20 mL). Luego se lavó la solución con bicarbonato de sodio saturado (2 x 5 mL) y salmuera (2 x 5 mL) y posteriormente se concentró. Se filtró el residuo a través de gel de sílice para obtener metil éster del ácido (2S,3R)-1-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico como un aceite incoloro (113 mg). Después de ello, se disolvió este aceite en MeOH/THF (2 mL/1 mL) y se trató la solución resultante con hidróxido de sodio 1N (0,7 mL, 0,7 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 4 horas y se la tornó ácida con ácido acético. Se purificó el producto crudo mediante HPLC de fase inversa (5-95% de acetonitrilo que contenía 0,75% de TFA en agua en un gradiente lineal de 40 min.) para obtener ácido (2S,3R)-1-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico como un sólido blanco (70 mg, 0,22 mmol). HRMS (M+H): Obs. 308.1511, Calc. 308.1498.

35

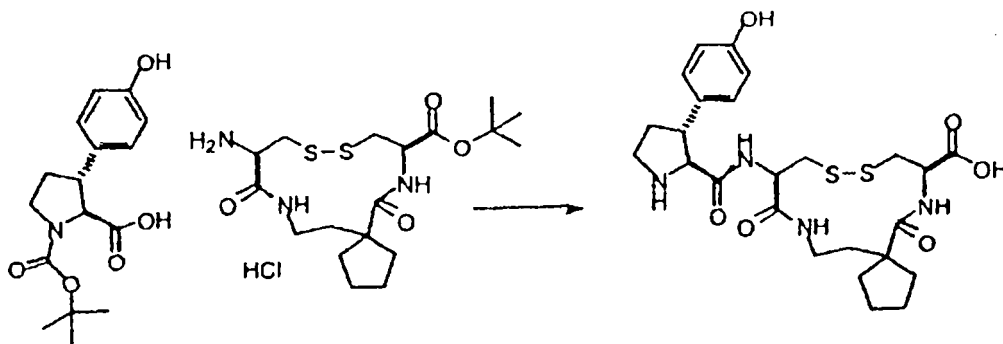
Ejemplo 26

Síntesis de ácido (8R,13R)-13-[[[3(R)-(4-hidroxifenil)-2(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico

40

45

50



55

60

65

A la mezcla de ácido (2S,3R)-1-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-3-(4-hidroxifenil)pirrolidin-2-carboxílico (46 mg, 0,15 mmol) y clorhidrato de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico (70 mg, 0,15 mmol), preparada en el Ejemplo 6, en 0,5 mL de DMF, se agregó DIPEA (58 mg, 0,45 mmol) y HBTU (59 mg, 0,15 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 3 horas y se diluyó con agua a 3 mL. Se recogió el precipitado blanco resultante y se secó durante la noche a presión reducida para obtener 105 mg de 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-[[[3(R)-(4-hidroxifenil)-2(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico como un sólido blanco. Se disolvió este sólido seco (85 mg) en 2 mL de diclorometano y se trató la solución con HCl 4N en dioxano (2 mL). Se agitó la solución durante la noche y posteriormente se retiró el disolvente. Se purificó el residuo mediante HPLC de fase inversa (5-95% de acetonitrilo que contenía 0,73% de TFA en agua en gradiente lineal de 40 min.) para obtener ácido (8R,13R)-13-[[[3(R)-(4-hidroxifenil)-2(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico como un sólido blanco (58 mg). HRMS (M+H): Obs. 551.2017, Calc. 551.1998.

Ejemplo 27

Ensayo de detección de VLA-4/VCAM-1

Se cuantificó la actividad antagonista de VLA-4, definida como la capacidad para competir en la unión a VCAM-1 inmovilizada, utilizando un ELISA de anticuerpo dual de fase sólida. Se detectó la VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrina) unida a VCAM-1 mediante un complejo de anticuerpo anti-integrina $\beta 1$: IgG anti-ratón conjugada con HRP: sustrato cromogénico (K Blue). En un principio, esto comprendió recubrir placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) con VCAM-1 humana recombinante (0,4 μg en 100 μl de PBS), cerrando herméticamente cada placa y luego dejando reposar las placas a 4°C durante 18 horas. Posteriormente, se bloquearon las placas recubiertas con VCAM con 250 μl de 1% de BSA/0,02% de NaN_3 para reducir la unión no específica. El día del ensayo, se lavaron todas las placas dos veces con amortiguador para Ensayo VCAM (200 μl /pozo de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MnCl_2 1 mM, 0,05% de Tween 20; pH 7,4). Se disolvieron los compuestos de prueba en DMSO 100%, y posteriormente se diluyó 1:20 en el amortiguador para Ensayo VCAM suplementado con 1 mg/mL de BSA (es decir, DMSO final = 5%). Se llevó a cabo una serie de diluciones 1:4 para alcanzar un intervalo de concentración de 0,005 nM - 1.563 μM para cada compuesto de prueba. Se agregaron 100 μl por pocillo en cada dilución a las placas recubiertas con VCAM, a lo que le siguieron 10 μl de VLA-4 derivado de células Ramos. Posteriormente, se mezclaron en forma secuencial estas placas en una agitadora de plataforma durante 1 min., se las incubó durante 2 horas a 37°C, y posteriormente se las lavó cuatro veces con 200 μl /pocillo de amortiguador para Ensayo VCAM. Se introdujeron 100 μl de anticuerpo b1 de integrina anti-humana de ratón en cada pocillo (0,6 μg /mL en amortiguador para Ensayo de VCAM + 1 mg/mL de BSA) y se dejó incubar durante 1 hora a 37°C. Al finalizar este período de incubación, se lavaron todas las placas cuatro veces con amortiguador para Ensayo VCAM (200 μl /pocillo). Posteriormente se agregó un segundo anticuerpo correspondiente, IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (100 μl por pocillo @ dilución 1:800 en amortiguador para Ensayo VCAM + 1 mg/mL de BSA), en cada pocillo a lo que le siguió 1 hora de incubación a temperatura ambiente y, esto culminó con tres lavados (200 μl /pocillo) con amortiguador para Ensayo VCAM. El desarrollo del color comenzó con el agregado de 100 μl de K-Blue por pocillo (15 min. de incubación, temperatura ambiente) y terminó con el agregado de 100 μl de amortiguador Red Stop por pocillo. Luego se efectuó la lectura de todas las placas en un espectrofotómetro DV/Vis a 650 nM. Se calcularon los resultados como el % de inhibición de la unión total (es decir, VLA-4 + VCAM-1 en ausencia del compuesto de prueba).

Ejemplo 28

*Protocolo del ensayo de detección (VLA-4/VCAM-1) de Ramos**Materiales*

Se purificó VCAM-1 humana recombinante soluble (mezcla de dominio 5- y 7-Ig) a partir de medios de cultivo celular de CHO mediante cromatografía de inmovilización mantenida en una solución que contenía Tris-glicina 0,1M (pH 7,5), NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, 0,02% de NaN_3 y 10 μg /mL de leupeptina. Se compró Calcein-AM de la firma Molecular Probes Inc.

Métodos

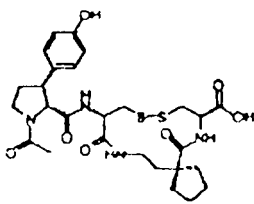
Se cuantificó la actividad antagonista VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrina), definida como la capacidad para competir con la VLA-4 de superficie celular para la unión con la VCAM-1 inmovilizada, usando un ensayo de adhesión celular VCAM-1 Ramos. Se marcaron las células Ramos que portaban VLA-4 de superficie celular con un colorante fluorescente (Calcein-AM) y se dejó unir la VCAM-1 en presencia o ausencia de los compuestos de prueba. Una reducción en la intensidad de la fluorescencia asociada con las células adherentes (% de inhibición) reflejó una inhibición competitiva de la adhesión celular mediada por VLA-4 con el compuesto de prueba.

Inicialmente, esto conllevó el recubrimiento de placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) con VCAM-1 humana recombinante (100 ng en 100 μl de PBS), cerrando herméticamente cada placa y dejando que las placas reposaran a 4°C durante -18 horas. Posteriormente, se lavaron las placas recubiertas con VCAM dos veces con 0,05% de Tween-20 en PBS y, después de ello, se bloqueó durante 1 hora (temperatura ambiente) con 200 μl de amortiguador de bloqueo (1% de BSA/0,02% de timerosal) para reducir la unión no específica. Después de la incubación con amortiguador de bloqueo, se invirtieron las placas, se las manchó y se aspiró el amortiguador restante.

Se disolvieron los compuestos de prueba en 100% de DMSO y posteriormente se diluyeron 1:25 en amortiguador de ensayo de adhesión celular VCAM (CaCl_2 4 mM, MgCl_2 4 mM en TRIS-HCl 50 mM, OH 7,5) (DMSO final = 4%). Se llevó a cabo una serie de ocho diluciones 1:4 para cada compuesto (intervalo de concentración general de 1 nM-12,500 nM). Se agregaron 100 μl /pocillo de cada dilución en las placas recubiertas con VCAM, a lo que le siguieron 100 μl /pocillo de células Ramos (200,00 células/pocillo en 1% de BSA/PBS). Se dejaron incubar las placas que contenían los compuestos de prueba y las células Ramos durante 45 minutos a temperatura ambiente y, después de ello, se agregaron 165 μl /pocillo de PBS. Se invirtieron las placas para eliminar las células no adherentes, se las manchó y se introdujeron 300 μl /pocillo de PBS. Se volvieron a invertir las placas, se las manchó y se aspiró suavemente el amortiguador restante. Se agregaron 100 μl de amortiguador de Lisis (0,1% de SDS en TRIS-HCl 50 mM, pH 8,5) en cada cavidad y se agitó durante 2 min. en una plataforma de agitación giratoria. Luego se efectuó

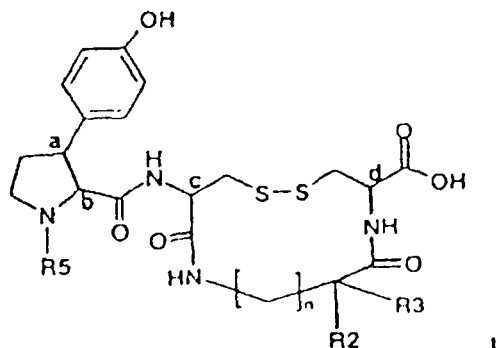
ES 2 269 141 T3

una lectura de las placas para determinar la intensidad de la fluorescencia en un sistema de medición de fluorescencia Cytofluor 2300 (Millipore) (excitación = 485 nm, emisión = 530 nm).

Compuesto del Ejemplo	IC ₅₀ de Prueba ELISA nM	IC ₅₀ de Prueba Celular Ramos
TBC772	227	1.800
12	0.185	0.21
24	0.14	0.18
26	0.19	0.15
22	0.17	0.32
19	0.12	0.28
	1.65	2.4

REIVINDICACIONES

1. Los compuestos de la fórmula general 1:



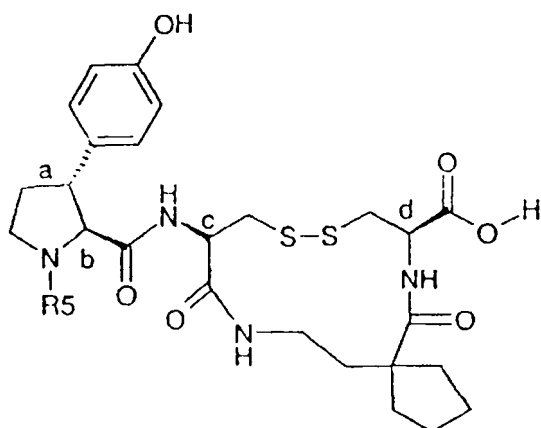
donde R_2 y R_3 son, cada una de manera independiente, alquilo inferior o junto con el átomo de carbono que tienen unido forman un anillo carbocíclico alifático con entre 4 y 6 átomos de carbono, R_5 es hidrógeno, alquilo C_{1-7} , $R-SO_2$, $R_6-(CH_2)_m-CO-$ o $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$; R es alquilo C_{1-7} ; R_6 y R_8 son hidrógeno o alquilo C_{1-7} , X es $-O-$ o $-NH-$; m es un entero que va de 1 a 7, y es un entero que va de 0 a 7, y n es un entero que va de 1 a 3; donde a , b , c y d denotan átomos de carbono asimétricos; y

sus ésteres o éteres hidrolizables o sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. Compuestos de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizados** porque R_2 y R_3 junto con el carbono que tienen unido forman un anillo de cicloalcano alifático con entre 4 y 6 átomos de carbono o sus sales farmacéuticamente aceptables.

3. Compuestos de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizados** porque R_2 y R_3 junto con el carbono que tienen unido forman un anillo de ciclopentano o su sal farmacéuticamente aceptable.

4. Compuestos de conformidad con la reivindicación 3, de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizado** porque es ácido (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o su sal farmacéuticamente aceptable.

6. Compuestos de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizados** porque R_5 es $R_6-(CH_2)_mCO-$ o sus sales farmacéuticamente aceptables.

7. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 6, **caracterizado** porque es el ácido (8R,13R)-13-[[[1-acetil-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o su sal farmacéuticamente aceptable.

8. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 6, **caracterizado** porque es el ácido (8R,13R)-13-[[[1-(2,2-dimetil-1-oxopropil)-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]-carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o su sal farmacéuticamente aceptable.

9. Compuestos de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizados** porque R_5 es $R_8-X-(CH_2)_y-CO-$ o sus sales farmacéuticamente aceptables.

10. Compuestos de conformidad con la reivindicación 9, **caracterizados** porque X es oxígeno o sus sales farmacéuticamente aceptables.

11. Compuestos de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizados** porque R_5 es hidrógeno o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

12. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 11, **caracterizado** porque es ácido (8R,13R)-13-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o su sal farmacéuticamente aceptable.

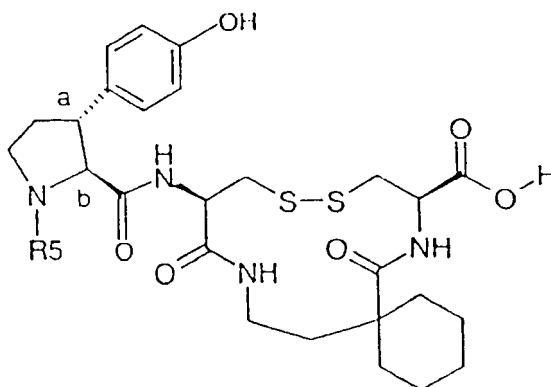
13. Compuestos de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizados** porque R_5 es $R-SO_2$ o su sal farmacéuticamente aceptable.

14. Compuestos de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizados** porque R_5 es alquilo C1-7 o sus sales farmacéuticamente aceptables.

15. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 13, **caracterizados** porque es ácido (8R,13R)-13-[[[1-metilsulfonyl-3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico o su sal farmacéuticamente aceptable.

16. Compuestos de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizados** porque R_2 y R_3 junto con el carbono que tienen unido forman un anillo de ciclohexano o sus sales farmacéuticamente aceptables.

17. Compuestos de conformidad con la reivindicación de la fórmula

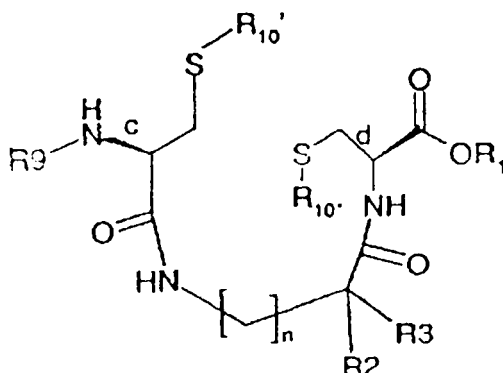


18. Compuestos de conformidad con la reivindicación 17, **caracterizado** porque es ácido (9R,14R)-14-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-7,15-dioxo-11,12-ditia-8,16-diazaspiro[5.12]octadecano-9-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

19. Compuestos de conformidad con la reivindicación 17, **caracterizados** porque R_5 es $R_6-(CH_2)_m-CO-$ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 19, **caracterizado** porque es ácido (9R,14R)-14-[[[3-(R)-(4-hidroxifenil)-2-(S)-pirrolidinil]carbonil]amino]-7,15-dioxo-11,12-ditia-8,16-diazaspiro[5.12]octadecano-9-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

21. Compuestos de la fórmula general:

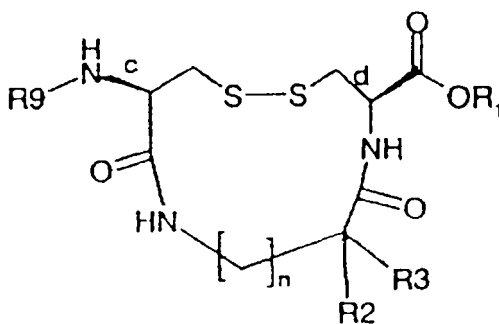


caracterizados porque R_1 con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable; R_2 y R_3 son, cada una de manera independiente, alquilo C_{1-7} , o junto con el átomo de carbono que tienen unido forman un anillo carbocíclico alifático con entre 4 y 6 átomos de carbono; R_9 es un grupo de protección amino; $R_{10'}$ y $R_{10''}$ son grupos de protección tio; y n es un entero que va de 1 a 3, denotando c y d átomos de carbono asimétricos.

22. Los compuestos de conformidad con la reivindicación 21, **caracterizados** porque R_2 y R_3 junto con el carbono que tienen unido forman un anillo de ciclopentano.

23. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 22, **caracterizado** porque es 1,1-dimetiletil éster del ácido 2(R)-[[[1-[[2(R)-[[[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-1-oxo-3-[(trifenilmetil)tio]propil]amino]etil]ciclopentil]carbonil]amino-3-[(trifenilmetil)tio]propanoico.

24. Compuestos de la fórmula general:

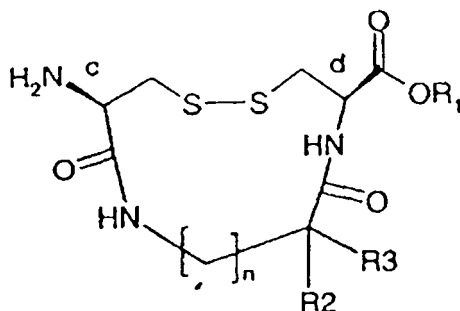


caracterizados porque R_1 con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable; R_2 y R_3 son, cada una de manera independiente, alquilo C_{1-7} , o junto con el átomo de carbono que tienen unido forman un anillo carbocíclico alifático con entre 4 y 6 átomos de carbono; R_9 es un grupo de protección amino; y n es un entero que va de 1 a 3, denotando c y d átomos de carbono asimétricos.

25. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 24, **caracterizado** porque R_2 y R_3 junto con el carbono que tienen unido forman un anillo de ciclopentano.

26. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 25, **caracterizado** porque es 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-(1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico.

27. Compuestos de la fórmula general:



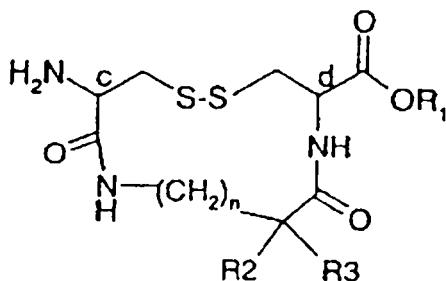
caracterizados porque R_1 con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable; R_2 y R_3 son, cada una de manera independiente, alquilo C_{1-7} , o junto con el átomo de carbono que tienen unido forman un anillo carbocíclico alifático con entre 4 y 6 átomos de carbono; y n es un entero que va de 1 a 3; denotando c y d átomos de carbono asimétricos y sus ésteres y éteres hidrolizables.

28. Compuestos de conformidad con la reivindicación 27, **caracterizados** porque R_2 y R_3 junto con el carbono que tienen unido forman un anillo de ciclopentano.

29. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 28, **caracterizado** porque es 1,1-dimetiletil éster del ácido (8R,13R)-13-amino-6,14-dioxo-10,11-ditia-7,15-diazaspiro[4.12]heptadecan-8-carboxílico.

30. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y, si se desea un vehículo inerte farmacéutico ya citado.

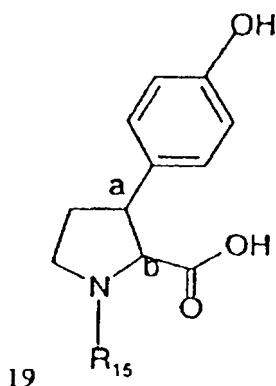
31. Un procedimiento para la preparación de un compuesto, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque se hace reaccionar el compuesto de núcleo cíclico de la fórmula 13.



donde R_1 con el oxígeno que tiene unido forma un grupo éster hidrolizable;

y R_2 y c , d y R_3 son tal como se define en la reivindicación 1,

con el compuesto de la fórmula 19



ES 2 269 141 T3

donde R_{15} es alquilo C_{1-7} , $R-SO_2-$, $R_6-(CH_2)_m-CO-$ o $R_8-X-(CH_2)_yCO-$ y R , R_6 , R_8 y a , b tal como se define en la reivindicación 1.

5 32. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, siempre que se prepare siguiendo un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31.

33. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 como un agente terapéutico.

10 34. El uso de un compuesto, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para la preparación de un medicamento que contiene dicho compuesto como un agente activo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en especial las enfermedades mediadas por la unión no deseada de integrinas a las moléculas de adhesión celular, por ejemplo el asma.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65